



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

19
2eje.

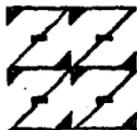
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

MODIFICACION Y VALIDACION DE UN METODO
ANALITICO PARA DETERMINAR LISINOPRIL EN
TABLETAS POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE
ALTA RESOLUCION

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
NIDIA GARCIA ARROYO

U N A M
P E R
ZARAGOZA



LO HUMANO
ES
DE NUESTRA DEPENDENCIA

MEXICO, D. F.,

1994

TESIS CON
FALLA LE CRUGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se desarrolló en
Laboratorios Wayne, S.A. de
C.V., en el Departamento de
Desarrollo.

CONTENIDO

	PAG.
1. INTRODUCCION	1
2. FUNDAMENTACION DEL TEMA	3
2.1. LISINOPRIL	3
2.1.1. Propiedades químicas	3
2.1.2. Propiedades físicas	4
2.1.3. Propiedades fisicoquímicas	4
2.1.4. Lisinopril, tabletas	5
2.1.4.1. Indicaciones terapéuticas	5
2.1.4.2. Contraindicaciones	6
2.1.4.3. Interacciones medicamentosas	8
2.1.4.4. Reacciones secundarias y adversas	9
2.1.4.5. Farmacología clínica	9
2.1.4.6. Teoría del Sistema Renina-Angiotensina	14
2.1.4.7. Inhibidores del Sistema Renina-Angiotensina Derivados de la Prolina	17
2.2. CROMATOGRAFIA	19
2.2.1. Tipos de Cromatografía Líquida	21
2.2.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución	25
2.2.2.1. Conceptos Generales	25
2.2.2.2. Términos más usados en CLAR	27
2.2.3. Componentes básicos de un sistema cromatográfico	33
2.3. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS	53
2.3.1. Definiciones y Determinaciones	55
2.3.1.1. Linealidad	55
2.3.1.2. Intervalo	57
2.3.1.3. Exactitud	57
2.3.1.4. Precisión	57
2.3.1.4.1. Repetibilidad	58
2.3.1.4.2. Reproducibilidad	58
2.3.1.5. Especificidad	59
2.3.1.6. Estabilidad de la muestra	59
2.3.1.7. Límite de detección	60
2.3.1.8. Límite de cuantificación	61
2.3.1.9. Tolerancia	61
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	63
4. OBJETIVOS	65
5. HIPOTESIS	66
6. METODOLOGIA	67
6.1. MATERIAL	67
6.2. EQUIPO	68
6.3. REACTIVOS	69
6.4. METODOS	70
6.4.1. Modificación del método analítico	70

5.4.2. Validación del Método Analítico	74
6.4.2.1. Evaluación del Sistema	74
6.4.2.1.1. Linealidad del Sistema	74
6.4.2.1.2. Precisión del Sistema	75
6.4.2.2. Evaluación del Método	77
6.4.2.2.1. Linealidad del Método	78
6.4.2.2.2. Especificidad del Método	79
6.4.2.2.3. Exactitud y Repetibilidad al 100% del Método	79
6.4.2.2.4. Precisión (Reproducibilidad)	80
6.4.2.2.5. Estabilidad de la muestra	80
7. RESULTADOS	82
7.1. MODIFICACION DEL METODO ANALITICO	82
7.2. VALIDACION DEL METODO ANALITICO	87
7.2.1 Evaluación del Sistema	87
7.2.1.1. Linealidad del sistema	87
7.2.1.2. Precisión del sistema (Repetibilidad)	92
7.2.2. Evaluación del Método	93
7.2.2.1. Linealidad del método	93
7.2.2.2. Especificidad del método	98
7.2.2.3. Exactitud y Repetibilidad al 100%	99
7.2.2.4. Precisión (Reproducibilidad)	101
7.2.2.5. Estabilidad de la muestra analítica	103
8. ANALISIS DE RESULTADOS	106
9. CONCLUSIONES	109
10. SUGERENCIAS	110
11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	111
12. ANEXOS	118
12.1. VALIDACION DEL METODO ANALITICO	118
12.1.1. Evaluación del Sistema	118
12.1.1.1. Precisión del sistema	118
12.1.2. Evaluación del Método	118
12.1.2.1. Linealidad del método y del sistema	118
12.1.2.2. Especificidad del método	120
12.1.2.3. Exactitud y Repetibilidad al 100%	120
12.1.2.4. Precisión (Reproducibilidad)	120
12.1.2.5. Estabilidad de la muestra analítica	122

1. INTRODUCCION

Es de considerable importancia el desarrollo de nuevos medicamentos para la industria farmacéutica en nuestro país; no tan solo por el adelanto tecnológico del mismo en esta rama, sino que lo es también por asegurar que todo medicamento al ser administrado cumpla con la eficacia y efectividad terapéuticas para las cuales fue diseñado y con esto se crea una tecnología propia para proporcionar una mejor atención médica a toda la población mexicana.

Ahora bien, para crear una alta tecnología en el desarrollo de medicamentos, se debe remarcar que éstos deben presentar una total calidad, es decir, como es ya sabido que la calidad se fabrica no se controla, por lo tanto, esto implica la fijación y aplicación de medidas de calidad operativas y sencillas; como lo son el diseño de procedimientos y técnicas que permitan tener un conocimiento y control verídicos de lo que sucede y/o debe suceder con el fármaco a largo plazo y también antes y después de ser administrado a un organismo.

En la actualidad, existe para cada fármaco en un medicamento un método analítico que lo determina exclusivamente; y se desarrollan nuevos métodos más completos para los fármacos que aún no tienen uno específico para su evaluación.

El presente trabajo esta enfocado hacia una pequeña parte de este gran universo de medicamentos; se estudia el LISINOPRIL en una formulación de tabletas; se trata de evaluar este fármaco con una tecnología más sencilla de la ya existente, es decir, se modificará experimentalmente un método analítico para su determinación fundamentado en la técnica de CLAR y se comprobará la validez por métodos estadísticos del mismo.

La determinación de Lisinopril en tabletas por CLAR, se realizó efectuando en primer término algunas modificaciones al método analítico redactado en la USP XXII. Una vez que se hubo establecido el método se prosiguió con la validación del mismo; la cual consiste de linealidad y precisión del sistema, y para el método: linealidad, precisión, exactitud, especificidad y estabilidad de la muestra.

Los resultados obtenidos de la validación demostraron que el método es lineal, exacto, preciso y específico y la muestra es estable por un período de 6 horas, por lo menos, así que el método se puede utilizar en la determinación de lisinopril en tabletas, como un método de rutina o para estabilidad.

2. FUNDAMENTACION DEL TEMA

2.1. LISINOPRIL

2.1.1. Propiedades químicas

Fórmula condensada: $C_{21} H_{31} N_3 O_5 \cdot 2 H_2O$

Fórmula desarrollada:

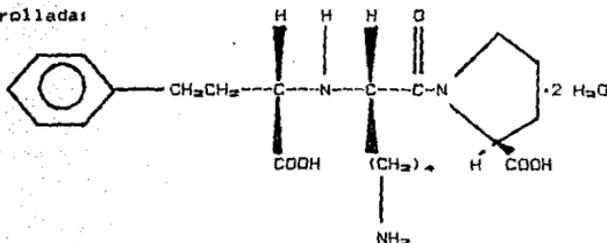


Figura 1. Fórmula desarrollada del lisinopril.

El lisinopril contiene no menos de 98.0% y no más de 102.0% de $C_{21} H_{31} N_3 O_5$, calculado en base seca.

Peso molecular: 441.52 g/mol

Nombres químicos:

- L-Prolina, 1-(N₂-(1-carboxi-3-fenilpropil)-L-lisil)-dihidrato, (S)
- 1-(N₂-((S)-1-carboxi-3-fenilpropil)-L-lisil)-L-prolinadihidrato.

2.1.2 Propiedades físicas.

El lisinopril es un polvo blanco o casi blanco.

Agua: Entre 8.0% y 9.5%.

2.1.3. Propiedades fisicoquímicas

Solubilidad: Soluble en agua, escasamente soluble en metanol y prácticamente insoluble en etanol.

Residuo de ignición: No más de 0.1%.

Metales pesados: No más del 0.001%.

Rotación específica: Entre -115.3° y -122.5° , calculado en base seca.

Identificación: Espectro de absorción infrarrojo, contra un estándar.

Tiempo de retención en CLAR, con fase móvil de solución de fosfatos pH 5.0-acetonitrilo (96:4) y una columna de 4.6 mm X 25 cm que contenga un empaque L7 (sílica porosa de octilsilano que es igual a las columnas CB con grupo funcional $\text{Si}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$) de 5 μm y que esté mantenida a una temperatura de 50°C .

2.1.4. Lisinopril, tabletas

Las tabletas de lisinopril contienen no menos del 90.0% y no más del 110.0% de $C_{21}H_{31}N_3O_5$.

Identificación: Tiempo de retención del pico mayor en CLAR. (2)

El lisinopril es un derivado peptídico sintético, inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina (E.C.A.) de acción prolongada, activo por vía oral. Al inhibir la E.C.A., el lisinopril disminuye la angiotensina II en el plasma y la excreción de aldosterona; como consecuencia, reduce la presión arterial en los pacientes hipertensos y mejora los síntomas y signos de la insuficiencia cardíaca congestiva. El lisinopril no se une a las proteínas plasmáticas distintas de la E.C.A., no sufre ninguna transformación metabólica en el organismo, y es excretado totalmente sin ningún cambio con la orina. (3)

2.1.4.1. Indicaciones terapéuticas

El lisinopril está indicado en el tratamiento de la hipertensión esencial y de la hipertensión renovascular. Se puede usar solo o asociado a otras clases de agentes antihipertensivos.

El lisinopril también está indicado en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva que no haya sido controlada adecuadamente por el tratamiento con digitálicos y diuréticos.

Vía de administración: Oral.

Posología: Como la absorción de lisinopril no se afecta por la presencia de alimentos en el estómago, las tabletas se pueden administrar antes, durante o después de las comidas.

Se sugieren dosis de 2.5 mg inicialmente, incrementando gradualmente hasta mantener una dosis usual de 10 a 20 mg por día.

Es también usado en el tratamiento de fallas cardíacas, la dosificación eficaz usual es de 5 a 20 mg diarios, administrados en una sola dosis. (3, 4)

2.1.4.2. Contraindicaciones

El lisinopril está contraindicado en pacientes hipersensibles a cualquiera de los componentes de este producto o que hayan presentado edema angineurótico, en tratamientos previos con un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina.

Los síntomas de hipotensión han sido raros en los pacientes con hipertensión no complicada tratados con lisinopril. La hipotensión es más probable si el paciente tiene una disminución del volumen circulante debida, por ejemplo, a tratamiento previo con diuréticos, restricción de la ingestión de sal, diálisis, diarrea o vómito. En los pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva, con o sin insuficiencia renal asociada, se ha observado hipotensión sintomática, la cual es más probable en aquellos pacientes con mayores grados de insuficiencia cardíaca, que reciben dosis altas de diuréticos del asa de Henle y tienen hiponatremia o deterioro de la función renal. Se debe vigilar cuidadosamente a estos pacientes tanto al iniciar el tratamiento como cada vez que

se ajuste la dosificación de lisinopril y/o del diurético. Se deben hacer consideraciones similares en pacientes con cardiopatía isquémica o enfermedad cerebrovascular, en los que una disminución excesiva de la presión podría ocasionar un infarto al miocardio o un accidente cerebrovascular.

En algunos pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva y presión arterial normal o baja, ocasiona el lisinopril un descenso adicional de la presión. Este efecto es previsible y generalmente no obliga a interrumpir el tratamiento. Si aparecen síntomas de hipotensión, puede ser necesario disminuir la dosificación o suspender la administración de lisinopril.

No se ha determinado la seguridad ni la eficacia de lisinopril en niños.

No se han hecho estudios adecuados y bien controlados con lisinopril en mujeres embarazadas. Sin embargo, hay datos que indican que la administración de inhibidores de la E.C.A. durante el embarazo puede causar morbilidad y mortalidad fetal y neonatal; por lo tanto, no se recomienda el uso de lisinopril durante el embarazo, a menos que sea necesario porque no se puedan emplear o sean ineficaces otros medicamentos. Si se usa lisinopril se debe informar a la paciente sobre el riesgo potencial para el feto.

El lisinopril pasa a través de la placenta. Se debe vigilar estrechamente a los recién nacidos cuyas madres recibieron lisinopril durante el embarazo; está contraindicado en mujeres embarazadas. (4)

2.1.4.3. Interacciones medicamentosas

a. Cuando se añade un diurético al tratamiento con lisinopril generalmente el efecto antihipertensivo es aditivo.

En algunos casos, los pacientes que ya están tomando diuréticos, especialmente si hace poco tiempo que empezaron a tomarlos, pueden experimentar una disminución excesiva de la presión al añadir lisinopril a su tratamiento. La aparición de síntomas de hipotensión es menos probable si se interrumpe la administración del diurético antes de iniciar la de lisinopril.

b. La administración concomitante de indometacina puede disminuir la eficacia antihipertensiva del lisinopril.

c. Como sucede con otros medicamentos que aumentan la eliminación de sodio, el lisinopril puede disminuir la excreción de litio.

Por lo tanto, si se administran al mismo tiempo sales de litio, se deben vigilar cuidadosamente las concentraciones de litio en el suero.

d. Aunque en los ensayos clínicos generalmente el potasio sérico se mantuvo dentro de los límites normales, en algunos casos se produce hiperpotasemia. El uso de suplementos de potasio, diuréticos ahorradores de potasio o sustitutos de la sal que contienen potasio puede aumentar considerablemente el potasio sérico, en particular en pacientes con deterioro de la función renal. (10. 17)

2.1.4.4. Reacciones secundarias y adversas

En los estudios clínicos controlados, el lisinopril fue generalmente bien tolerado. La mayor parte de los efectos colaterales observados fueron leves y pasajeros; estos fueron: mareos, cefalea, diarrea, fatiga, tos y náuseas. Otros efectos colaterales menos frecuentes son efectos ortostáticos, incluyendo hipotensión, erupción cutánea y astenia.

Ha habido raros casos de edema angineurótico de la cara, las extremidades, los labios, la lengua, la glotis y/o la laringe.

También se han encontrado reacciones como infarto al miocardio o accidente cerebrovascular, posiblemente secundarios a hipotensión excesiva en pacientes de alto riesgo; palpitaciones; taquicardia.

Alteraciones en el estado de ánimo, confusión mental, dolor abdominal, sequedad de boca, hepatitis hepatocelular o colestática, ictericia, disfunción renal, insuficiencia renal aguda y uremia.

2.1.4.5. Farmacología clínica

Mecanismo de acción:

Se ha comprobado que el lisinopril inhibe a la enzima convertidora de la angiotensina (E.C.A.) en seres humanos y animales. La E.C.A. es una peptidildipeptidasa que cataliza la conversión de la angiotensina I en angiotensina II, sustancia vasoconstrictora y estimulante de la secreción de aldosterona por la corteza suprarrenal. La inhibición de la E.C.A. da por resultado una disminución de la angiotensina II en el plasma y, por consiguiente, también disminuye la secreción de aldosterona. La disminución de la aldosterona puede ocasionar un pequeño aumento

del potasio sérico. En los pacientes tratados con lisinopril y un diurético tiazídico no hubo ningún cambio importante del potasio sérico. La supresión de la retroacción negativa de la angiotensina II sobre la secreción de renina ocasiona un aumento de la actividad de la renina plasmática.

La E.C.A. es idéntica a la cininasa, la enzima que degrada la bradiginina. Aún no se ha aclarado si el aumento de la concentración de bradiginina, que es un potente péptido vasodepresor, tiene algún papel en el efecto terapéutico del lisinopril.

Aunque se cree que el mecanismo por el que el lisinopril disminuye la presión arterial es principalmente la inhibición del sistema renina-angiotensina-aldosterona, se ha comprobado que el lisinopril tiene acción antihipertensiva aún en los casos de hipertensión con renina baja. Aunque el lisinopril no tuvo efecto antihipertensivo en todas las razas humanas estudiadas, el promedio de respuesta al tratamiento con lisinopril solo fue menor en los hipertensos de raza negra (que suelen tener la renina baja) que en los de otras razas. Esta diferencia desapareció cuando se añadió hidroclorotiazida al tratamiento con lisinopril.

Farmacocinética y metabolismo:

En los estudios clínicos las concentraciones séricas de lisinopril alcanzaron su valor máximo seis a ocho horas después de la administración por vía oral, y después de disminuir presentaron una fase terminal prolongada que no contribuyó a la acumulación del medicamento. Dicha fase terminal representa probablemente una

saturación de la fijación a la E.C.A., y no fue proporcional a la dosis. Al parecer, el lisinopril no se une a ninguna otra proteína plasmática. Durante la administración de dosis múltiples, el lisinopril tuvo una vida media efectiva de acumulación de 12 horas.

El lisinopril no sufre transformaciones metabólicas, y es excretado totalmente sin ningún cambio con la orina. Según los datos de recuperación de lisinopril de la orina en los estudios clínicos, se absorbió aproximadamente 25% de la dosis administrada.

La absorción de lisinopril no fue modificada por la presencia de alimentos en el conducto digestivo.

Una dosis única de 20 mg de lisinopril produjo concentraciones séricas mayores en personas sanas de edad avanzada (65 años o más) que en adultos jóvenes sanos. En otro estudio, se administraron dosis diarias únicas de 5 mg de lisinopril durante siete días consecutivos a voluntarios sanos jóvenes y viejos y a pacientes de edad avanzada con insuficiencia cardíaca congestiva. El séptimo día las concentraciones séricas máximas de lisinopril fueron mayores en las personas sanas de edad avanzada que en las jóvenes, y aún mayores en los pacientes de edad avanzada con insuficiencia cardíaca congestiva. Estos resultados concuerdan con el concepto de que los medicamentos de baja liposolubilidad (como el lisinopril) tienen un menor volumen de distribución en las personas de edad avanzada, que tienen disminuida la relación masa corporal/grasa; además, la depuración renal de lisinopril estaba disminuida en las personas de edad avanzada, particularmente en las que padecían insuficiencia cardíaca congestiva.

En los pacientes con insuficiencia renal, la eliminación de lisinopril fue similar a la de los pacientes con función renal normal, mientras la filtración glomerular fue mayor de 30 ml/min. Con filtraciones glomerulares de 30 ml/min o menos, aumentaron las concentraciones máximas y mínimas de lisinopril, el tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima y, en algunos casos el tiempo para llegar al estado de equilibrio.

Farmacodinamia:

En pacientes hipertensos, el lisinopril disminuyó la presión arterial tanto en decúbito como de pie, sin causar taquicardia compensadora. Generalmente no se observaron síntomas de hipotensión postural, aunque serían de esperarse en pacientes con disminución del volumen circulante y/o déficit de sal.

A las dosis únicas diarias recomendadas, el efecto antihipertensivo del lisinopril se ha mantenido hasta 24 horas.

El efecto antihipertensivo del lisinopril se ha mantenido durante los tratamientos prolongados. Al suspender bruscamente su administración, la presión arterial no ha aumentado con rapidez ni ha sobrepasado significativamente sus valores anteriores al tratamiento. (3, 4, 12, 13)

En la mayoría de los pacientes estudiados, el efecto antihipertensivo de lisinopril se inició una a dos horas después de la administración de una dosis individual por vía oral, y se llegó a la disminución máxima de la presión en seis horas. La reducción óptima de la presión arterial puede requerir dos a cuatro semanas de tratamiento.

El efecto antihipertensivo de lisinopril se ha mantenido durante los tratamientos prolongados. Al suspender bruscamente su administración, la presión arterial no ha aumentado con rapidez ni ha sobrepasado significativamente sus valores anteriores al tratamiento.

Dentro de las dosificaciones usuales de 20 a 80 mg diarios, el lisinopril tuvo la misma eficacia en pacientes hipertensos de edad avanzada (65 años o más) que en pacientes más jóvenes. En los estudios clínicos la edad de los pacientes no influyó en las características de seguridad del lisinopril.

El lisinopril fue bien tolerado y controló eficazmente la presión arterial en pacientes con hipertensión renovascular.

El efecto antihipertensivo del lisinopril se ha mantenido durante los tratamientos prolongados. Al suspender bruscamente su administración, la presión arterial no ha aumentado con rapidez ni ha sobrepasado significativamente sus valores anteriores al tratamiento.

En los estudios hemodinámicos realizados en pacientes con hipertensión esencial, la disminución de la presión arterial se acompañó de una reducción de la resistencia arterial periférica, con poco o ningún cambio del gasto o de la frecuencia cardíaca. En estudios en pacientes hipertensos, tras la administración de lisinopril aumentó el flujo sanguíneo renal y no varió el índice de filtración glomerular.

En pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva bajo tratamiento con digital y diuréticos, la administración de lisinopril se asoció con disminuciones de la resistencia periférica

y de la presión arterial. Aumentaron la fracción de eyección y el gasto cardíaco sin aumento concomitante de la frecuencia cardíaca, disminuyó la presión capilar pulmonar en cuña, y mejoraron la tolerancia al esfuerzo y la intensidad de la insuficiencia cardíaca. Todos esos efectos se mantuvieron durante el tratamiento prolongado. (4, 12, 13, 17, 18, 19)

2.1.4.6. Teoría del Sistema Renina-Angiotensina

La angiotensina es una sustancia que ocasiona aumento en la presión arterial, y está presente en la corriente sanguínea; se produce por mediación de una enzima renal llamada renina. Existen algunos datos que sugieren que la hipertensina presente en el encéfalo forma parte del mecanismo de este último para la regulación de su propia presión arterial.

Cada glándula suprarrenal se localiza en el plano superior de cada riñón y se divide estructural y funcionalmente, en dos partes: la corteza, externa, que compone la mayor parte de la glándula, y la medula, interna; la primera se deriva del mesodermo y la segunda del ectodermo.

Desde el punto de vista histológico, se subdivide la corteza en tres zonas. Cada zona presenta las células dispuestas de manera diferente, y secreta grupos también diversos de hormonas. La más superficial de las tres, situada inmediatamente por debajo de la cubierta de tejido conectivo, recibe el nombre de zona glomerulosa; las células de esta zona están dispuestas en grupos que forman esferas o asas y secretan principalmente un grupo de hormonas llamadas mineralocorticoides. La zona intermedia, o zona

fasciculada, constituye la mayor parte de la corteza y consiste en células dispuestas en largos cordones; secreta principalmente las hormonas del grupo de glucocorticoides. La zona reticulada interna, cuyas células están dispuestas en una red anastomosada, sintetiza sobre todo hormonas sexuales (gonadocorticoides), de modo particular los andrógenos, que son las hormonas sexuales masculinas.

El grupo de mineralocorticoides participa en la regulación del metabolismo de agua y electrólitos, de modo particular las concentraciones de sodio y potasio. La corteza suprarrenal secreta por lo menos tres hormonas diferentes que forman parte de este grupo, pero una de ellas lleva a cabo casi 95% de la actividad mineralocorticoide: la aldosterona. Esta hormona actúa en las células de los túbulos renales y ocasiona que las mismas incrementen la "reabsorción" de sodio y agua. Como resultado de dicho fenómeno, los iones sodio son extraídos de la orina y regresan al torrente sanguíneo, con lo cual se evita la rápida disminución de las cantidades de sodio y agua presentes en el cuerpo. Por otra parte, la aldosterona origina disminución en la reabsorción de potasio, con lo cual se eliminan grandes cantidades de dicho ion a través de la orina.

Estas dos funciones básicas, es decir, la retención de sodio y el agua y la eliminación del potasio, originan diversos efectos secundarios. Por ejemplo, gran parte de la reabsorción de sodio se lleva a cabo por medio de una reacción de intercambio en la que iones hidrógeno (positivos) pasan a la orina y sustituyen a los iones sodio (también positivos). Gracias a este mecanismo disminuye

la cantidad de iones hidrógeno presente en la sangre, con lo que ésta se vuelve menos ácida y se evita la acidosis. El movimiento de los iones Na^+ también genera un campo de carga positiva en los vasos sanguíneos que rodean a los túbulos del riñón. Como resultado de ello, los iones bicarbonato y cloruro, de carga negativa, pasan de la orina a la sangre. Por último, el aumento en la concentración de iones sodio en la sangre hace que el agua pase, por ósmosis, de la orina a la sangre. En resumen, cabría decir que la aldosterona ocasiona la excreción de potasio y la reabsorción de sodio. Esta última origina, a su vez, la eliminación de iones H^+ y, la retención de Na^+ , Cl^- , HCO_3^- y agua.

La regulación de la secreción de aldosterona es bastante compleja. Al parecer, diversos mecanismos participan en ella, uno de los cuales es el de renina-angiotensina. La disminución en el volumen total de sangre como resultado de deshidratación o deficiencia de Na^+ origina a su vez disminución de la presión arterial, lo cual estimula a algunas células renales, las llamadas células yuxtaglomerulares, mismas que secretan una enzima llamada renina. Esta última pasa a la sangre y transforma el angiotensinógeno que es una proteína plasmática producida por el hígado, en angiotensina I, que a su vez se convierte en angiotensina II por acción de una enzima plasmática. La angiotensina II estimula la producción de mayores cantidades de aldosterona por parte de la corteza suprarrenal y, con ello, aumento en la reabsorción de Na^+ y agua, con lo que aumenta el volumen de líquidos extracelulares y se restaura la presión

arterial normal. El segundo mecanismo de regulación de la aldosterona guarda relación con la concentración de iones potasio.

El aumento de esta última en el líquido extracelular estimula de manera directa la secreción de la aldosterona por parte de la corteza y origina la eliminación, por los riñones, de los iones potasio excesivos. Si la concentración de los iones señalados en el líquido extracelular disminuye más allá de lo normal, también lo hará la producción de aldosterona y los riñones eliminarán cantidades de iones potasio menores que las usuales. Las hemorragias son otro factor que estimula la producción de aldosterona en la corteza suprarrenal. ' 15 '

2.1.4.7. Inhibidores del Sistema Renina-Angiotensina

Derivados de la Prolina

Un enfoque nuevo en la serie de fármacos antihipertensivos es la inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina I en angiotensina II. Recuerdese que la renina es una enzima proteolítica que actúa sobre el angiotensinógeno, sustrato de la renina, dando lugar a la angiotensina I, péptido prácticamente inactivo que, por acción de la enzima convertidora origina la angiotensina II, péptido de potente acción vasoconstrictora arteriolar y presora. Si se inhibe la enzima convertidora, se producirá una reducción consecutiva de la presión arterial por disminución de la resistencia periférica debido a vasodilatación.

Uno de los primeros fármacos inhibidores del sistema renina-angiotensina es el Captopril, sustancia de origen sintético derivada del aminoácido L-prolina.

En el hombre, en individuos normales, el captopril antagoniza la acción presora de la angiotensina I pero no la de la angiotensina II, lo que indica una inhibición de la enzima, convertidora de la primera. En pacientes hipertensos, la administración bucal de captopril provoca un descenso de la presión arterial sistólica, diastólica y media en posición supina y erecta, que comienza al cabo de 15 minutos, llega al máximo a los 60 a 90 minutos y dura de 2 a 3 horas. Con administración repetida, el descenso tensional máximo se produce a la semana, que se mantiene mientras el paciente recibe el medicamento.

En todos los casos, la administración de diuréticos aumenta la acción antihipertensiva del captopril. (14)

Ahora, con el estudio de inhibidores más recientes de la enzima convertidora, la complejidad aparente del sistema y sus interacciones fisiológicas aumentan, se han encontrado otros fármacos antihipertensivos que aún se encuentran en proceso de diversos estudios como son el maleato de enalapril (MK-421), el éster monoetil de MK-422 y el lisinopril (MK-521). El enalapril se absorbe más rápidamente en el hombre que la forma de inhibidor activo MK-422, las estimaciones de la absorción mínima de enalapril son del 60-70%, en base a la recuperación urinaria, la excreción de enalapril y de MK-422 es principalmente renal. (12. 17)

2.2. CROMATOGRAFIA

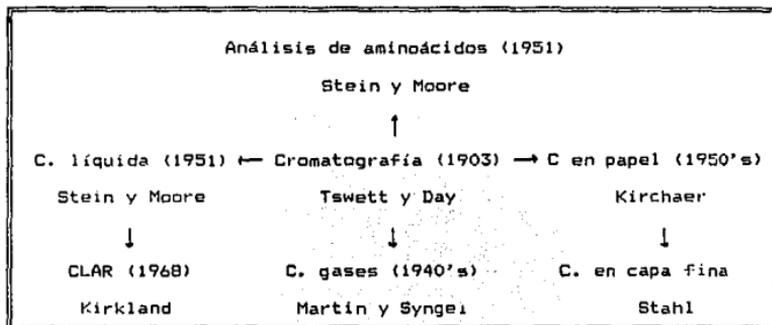
El geólogo norteamericano Day, casi al mismo tiempo que el bioquímico ruso Tswett, efectuaba separaciones parciales de petróleo sin refinar mediante su paso a través de las columnas adsorbentes. (Cuadro 1)

Tswett ideó una nueva técnica de separación que obligaba a la mezcla que se había de separar a atravesar una columna de adsorbente reducido a polvo fino. La mezcla se depositaba en la parte superior de la columna después se lavaba la columna con un solvente orgánico. A medida que se desarrollaba el proceso de lavado, los diversos componentes de la mezcla eran eluidos de la columna a diferentes velocidades; finalmente se separaban por completo y se podían recobrar por lavado eluyéndolos fuera de la columna y recogiendo en fracciones separadas, o haciendo salir la columna del tubo en donde estaba contenida y cortándola aparte entre las zonas de los compuestos separados. La mayoría de las muestras de Tswett eran pigmentos de plantas, por lo que las bandas coloreadas que formaban los compuestos en la columna eran fácilmente visibles y, de hecho, estas bandas coloreadas justificaron el nombre dado de cromatografía a este método de separación. Tswett advirtió la separación y propuso que las moléculas de soluto eran adsorbidas en la superficie del material reducido a polvo de la columna. Estas sustancias, que el sólido adsorbía muy fuertemente, no las desadsorbía fácilmente el solvente, y estos compuestos descendían muy lentamente por la columna. Los solutos menos fuertemente adsorbidos eran

transportados en la columna a mayores velocidades; así se lograba una separación a causa de las afinidades variables de los solutos por el solvente y el sólido adsorbente.

Ahora existen muchas formas de cromatografía, pero todas se basan en este sencillo principio: se produce la separación gracias a las distintas velocidades de migración de zona causadas por diferencias en las afinidades relativas por las dos fases.

Obviamente, éste es el mismo principio puesto de manifiesto en el método de separación por extracción a contracorriente. La cromatografía es un proceso para la separación de mezclas moleculares por distribución de los solutos entre dos fases, las cuales están en contacto de una forma parecida a una contracorriente continúa. (Cuadro 2)



Cuadro 1. Desarrollo de la cromatografía. (7, p. 20, 21)

2.2.1. Tipos de Cromatografía Líquida

La naturaleza física de las fases y los mecanismos de toma de contacto entre ellas, producen varios tipos de cromatografía. (Tabla 1)

Mientras que la fase móvil sea un líquido, la técnica, se llama cromatografía líquida (CL). Su clasificación es:

a. Por el mecanismo: Cuando la fase estacionaria es un líquido, de suerte que el mecanismo de distribución es una partición líquido-líquido, la técnica se denomina cromatografía de partición o cromatografía líquido-líquido (CLL).

Cuando la fase estacionaria es un sólido (más propiamente la interfase entre un sólido y un líquido), el método es cromatografía de adsorción o cromatografía sólido-líquido (CSL). Existen también la cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión molecular.

TIPO	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL	CROMATOGRAFIA	METODO
ADSORCION	sólido	líquido	sólido-líquido	C. colum. C. C. F. I. iónico CLAR
	sólido	gas	gas-líquido	C. gases
PARTICION	líquido	líquido	líquido-líquido	C. colum.
	líquido	gas	gas-líquido	C. gases C. colum. C. capil.

Tabla 1. Tipos de cromatografía. (20. 21)

- b. Por la forma experimental: En la columna cromatográfica (el "lecho") se halla en un tubo cilíndrico, de vidrio o metal por lo general. La cromatografía plana se efectúa en una superficie plana. Las formas de la cromatografía plana son: cromatografía en papel (que por lo general actúa por un mecanismo de partición) y cromatografía de capa fina (CCF), que suele ser una forma de cromatografía de adsorción.
- c. Por la linealidad de los isotermas: En la cromatografía lineal, el coeficiente de partición o coeficiente de distribución es independiente de la concentración, es decir, la isoterma de partición es lineal sobre el margen de concentración encontrado en la zona. En la cromatografía no lineal, la isoterma es no lineal. La cromatografía de partición acostumbra ser lineal y la cromatografía de adsorción, a menudo no lineal.

De manera que los métodos de separación por cromatografía líquida son:

a. Cromatografía de adsorción

La fase estacionaria es un sólido que funge como adsorbente y la fase móvil puede ser un líquido o un gas; la separación se basa en repetidas etapas de adsorción-desorción. El grado de separación depende por lo tanto notablemente de la superficie activa del sólido, así que, el tamaño de partícula sólida que se emplea debe ser lo menor posible para tener una mayor superficie activa en relación al volumen del empaque.

b. Cromatografía de fase reversa

El lecho estacionario es de naturaleza apolar, mientras la fase móvil es un líquido apolar, cuanto más apolar sea la muestra mayor será su retención.

c. Cromatografía de partición líquido-líquido

La fase estacionaria es un líquido que se mantiene fijo por adsorción sobre un sólido inerte y poroso, en tanto que la fase móvil es un gas o un líquido. En este tipo de cromatografía la fase estacionaria está saturada por la fase móvil y viceversa, de tal manera que la separación se efectúa entre dos fases debido a las diferencias de afinidad de los componentes por cada una de las dos fases, esto es, a sus diferencias en sus coeficientes de reparto.

d. Cromatografía de fase normal

El lecho estacionario es de naturaleza fuertemente polar y la fase móvil es apolar. Las muestras polares quedan retenidas en la columna durante tiempos mayores que los materiales menos polares o apolares.

e. Cromatografía de intercambio iónico

El lecho estacionario tiene una superficie cargada iónicamente, con carga contraria a la de la muestra. Esta técnica se usa casi exclusivamente con muestras iónicas o ionizables. Cuanto mayor sea la carga de la muestra, más fuertemente será atraída hacia la superficie iónica y, por

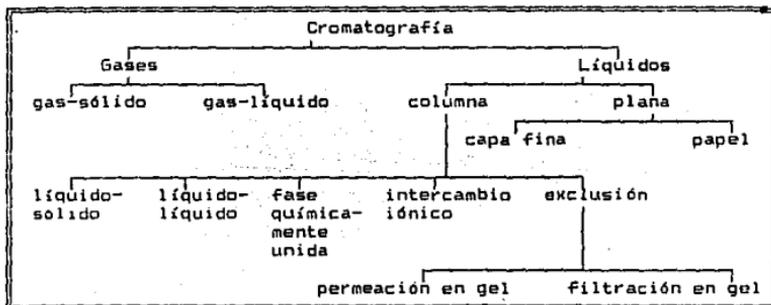
tanto, más tiempo tardará en ser eluida. La fase móvil es un tampón acuoso, en el que el pH y la polaridad se utilizan para controlar el tiempo de elución.

f. Cromatografía de exclusión molecular

El relleno de la columna es un material que posea poros de dimensiones comprendidas entre ciertos límites, con lo que la muestra es retenida o filtrada según sea su tamaño molecular.

Si el material estacionario es un gel reticulado se le denomina filtración en gel y si es un polímero rígido se le denomina permeación en gel; pero en sí el proceso de separación se efectúa por lo mismo, la diferencia de pesos moleculares.

(7. ■)



Cuadro 2. Clasificación de la cromatografía.

2.2.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución

2.2.2.1. Conceptos Generales

Para llevar a cabo la separación de una muestra problema por Cromatografía Líquida de Alta Resolución, el primer paso a seguir es disolver dicha muestra en un solvente apropiado, el cual en forma ideal debería ser idéntico a la fase móvil. A continuación la muestra se introduce por medio de un mecanismo inyector en la parte superior de la columna. La muestra se mueve dentro de la columna por un flujo continuo de fase móvil que es impulsado por una bomba.

Algunos componentes de la muestra viajan por la columna más lentamente que otros; los componentes que tienen más afinidad por la columna, tardan más en salir de la misma. Comúnmente un detector UV/VIS monitorea a los componentes cuando salen de la columna. Por último, el detector transmite señales a un mecanismo de registro que gráfica los datos. El cromatograma obtenido puede proporcionarnos información tanto cualitativa como cuantitativa en relación a la muestra.

En realidad, la separación de los componentes ocurre, físicamente en la columna, la cual está empacada con pequeñas partículas sólidas llamadas material de empaque o resinas.

Actualmente llama mucho la atención la tecnología en los materiales de empaque, ya sea para diversificar los tipos moleculares con afinidad, como para aumentar la estabilidad de las partículas en la columna. (Tabla 2)

El mayor potencial de la cromatografía líquida en comparación con la cromatografía de gases se debe a dos factores

TIPO DE SEPARACION	MECANISMO	MOLECULAS QUE SE SEPARAN	SOLVENTES UTILIZADOS
C. Exclusión	Separa moléculas por tamaños. Las más grandes eluyen primero.	Desde proteínas y carbohidratos hasta metacrilatos y neopreno.	Tolueno, Dioxano, Acetona, H ₂ O
C. líquido-sólido Fase normal	Adsorción; separa en base a polaridad. La menos polar eluye primero.	Hidrocarburos y aromáticos. Isómeros y compuestos no polares.	Orgánicos no ionizables (hexano)
C. líquido-líquido Fase normal	Partición del soluto entre 2 solventes inmiscibles. "Fase estacionaria más polar".	Monosacáridos, Catecolaminas y aromáticos.	Polar-no polar (Agua-acetonitrilo)
C. líquido-líquido Fase reversa	Partición del soluto entre 2 solventes inmiscibles. "Fase móvil más polar"	Herbicidas, ácidos grasos.	Agua con modificadores orgánicos (Metanol)
C. inter-cambio iónico.	Iones de la muestra se intercambian con un contra-ión.	Aminoácidos, Nucleótidos.	Diversos buffers orgánicos.

Tabla 2. Tipos de cromatografía líquida de alta resolución. (21)

primordialmente. El primero es que más moléculas pueden disolverse, a diferencia de las que pueden ser volatilizadas y aún retener su estructura molecular original. Es decir, la cromatografía líquida es una técnica más suave que la cromatografía de gases y menos factible de dañar las moléculas delicadas.

La segunda gran ventaja de la cromatografía líquida es que puede manejar una gran variedad de moléculas: ionizadas y no ionizadas, de muy alto peso molecular, biológicamente activas (enzimas), entre otras.

Una gran desventaja es el alto costo de este tipo de cromatógrafos. (20)

2.2.2.2. Términos más usados en CLAR

TIEMPO DE RETENCION: Es el tiempo que transcurre desde la inyección hasta el ápice del pico, este valor siempre será igual en la misma columna y bajo las mismas condiciones de trabajo. En cromatografía de líquidos el tiempo de retención está dado por el flujo de la fase móvil, su interacción con la muestra y la fase estacionaria dependiendo del tipo de separación, por ejemplo; adsorción, intercambio iónico, etc. Es característico para cada muestra, se usa como ayuda para la identificación de los componentes. Se denota t_R . (Figura 2.)

TIEMPO MUERTO: Cuando se inyecta una muestra a la corriente de la fase móvil, esta saldrá de la columna de acuerdo a la interacción que haya con la fase estacionaria, si un compuesto no es retenido y sale a la misma velocidad de la fase móvil se le llama tiempo muerto (t_0 ó t_m), pues es el tiempo en que la fase móvil se translada de un lado a otro de la columna.

TIEMPO DE RETENCION ABSOLUTO: Es el tiempo que permanece la muestra interaccionando con la fase estacionaria más el tiempo que permanece en la fase móvil (tiempo muerto). Se denota T_r .

$$T_r = t_m + T'r$$

TIEMPO DE RETENCION CORREGIDO: Es el tiempo de retención absoluto menos el tiempo muerto. $T'r = T_r - t_m$.

VOLUMEN DE RETENCION: El tiempo de retención puede cambiar a volumen de retención al multiplicar el tiempo por el caudal de la fase móvil. Se denota $V_r = \text{flujo ml/min} \times t_r$.

COEFICIENTE DE DISTRIBUCION: Es el coeficiente de reparto común a todos los procedimientos de distribución, también llamado coeficiente de partición, es una propiedad física fundamental, es una constante termodinámica y mide la solubilidad de la muestra en la fase estacionaria. Este valor nos indica el tiempo durante el cual puede retenerse cada componente de una muestra en la columna y es constante para una temperatura dada.

$K = (\text{Cantidad de muestra/ml de fase estacionaria}) / (\text{Cantidad de muestra/ml de fase móvil})$

En cromatografía de líquidos K esta controlada por la polaridad del solvente, debiéndose encontrar el más adecuado para una separación utilizando desde un solvente de débil polaridad hasta uno de mayor polaridad; dependiendo de que tan rápido sale el primer componente de la muestra, los valores óptimos son de 2 a 6 y en muestras con más de 2 componentes el rango óptimo es $1 < \delta = K < \delta = 10$.

$$K = T'r/t_m = (t_r - t_m) / t_m.$$

RELACION DE FASE: Se denota por la letra griega beta (β).

$$\beta = (\text{ml de fase móvil}) / (\text{ml de fase estacionaria})$$

Es decir; que por cada sección de columna, equivale a la porción del volumen de dicha sección ocupado por la fase móvil y la fase estacionaria.

ANCHO DE LA BASE DEL PICO: Se denota W_b y es la parte de la línea de base intersectada por las líneas tangentes del pico. Es igual a 4 de un pico de forma gaussiana y es necesario para calcular la cantidad de platos teóricos y la resolución. El ancho del pico medido a la mitad de la altura es $W_1/2H$.

NUMERO DE PLATOS TEORICOS: La eficiencia de la columna se mide por los platos teóricos, denotados por N , éstos miden el ensanchamiento de la banda del soluto de la muestra a medida que pasa a través de la columna. Los platos teóricos se calculan directamente del cromatograma. Un plato teórico es un determinado equilibrio entre la fase móvil y la fase estacionaria.

El número de platos depende de la longitud de la columna, a mayor longitud de la columna mayor número de platos, así al haber una menor altura de plato y mayor número de estos habrá una mayor eficiencia en la columna.

Existen varios factores que afectan el número de platos teóricos, como son el tiempo de retención, la longitud de la columna, el soluto de la muestra, el caudal, tamaño de muestra, la técnica de inyección, etc.

$$N = 16 \left(t_R / W_b \right)^2 ;$$

en donde t_m y W_b tienen las mismas unidades de volumen, tiempo o distancia en la gráfica. Los platos teóricos dan a conocer la calidad de la columna. Una buena columna tendrá mayor número de platos.

ALTURA EQUIVALENTE A UN PLATO TEORICO: Se denota como AEPT.
su fórmula es: $AEPT = L/N$

donde L es la longitud de la columna, expresada normalmente en mm; es el largo de la columna necesario para un plato teórico, es decir, es la longitud de la columna requerida para obtener un equilibrio de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. Un menor valor de AEPT significa un mayor número de platos teóricos por unidad de longitud y por lo tanto mayor eficiencia de la columna.

PROMEDIO LINEAL DE LA VELOCIDAD DE LA FASE MOVIL: Se denota μ , es usado cuando se presenta esquemáticamente AEPT en función de μ para estudios de la eficiencia de la columna (Ecuación de Van Deemter).

FACTOR DE SELECTIVIDAD: El factor de selectividad es la relación del tiempo que dos picos permanecen en la fase estacionaria. En la fase estacionaria se realiza la separación y de acuerdo a la interacción que haya con un compuesto y otro se realizará una selección de que pico sale primero y cual al final. La selectividad se denota por la letra griega alfa (α); si el valor de $\alpha = 1$ los dos picos tienen solubilidades iguales con respecto a la fase estacionaria y no se realiza la separación, así mientras más

elevados sean los valores de α , mayor la selectividad de la fase estacionaria, más fácil la separación y mejor resolución.

$$\alpha = (T_R(b) - T_m) / (T_R(a) - T_m) = (T'r(b)) / (T'r(a))$$

En cromatografía de líquidos puede mejorarse la selectividad por:

- El cambio de fase móvil, por ejemplo, aumentando la polaridad, pH, y/o la fuerza iónica.
- Cambio de fase estacionaria, el cambio de columna, variar el tamaño de partícula.
- Puede cambiarse la selectividad aumentando o disminuyendo la temperatura, utilizando un horno para columnas o una circulación de agua.

FACTOR DE CAPACIDAD: Se denota por k' . Es la relación del tiempo que el soluto ocupa en la fase estacionaria y la fase móvil.

$$k' = T'r/T_m \quad \text{ó también por} \quad k' = K/\beta$$

EFICIENCIA DE LA COLUMNA: Al introducir una muestra en la columna esta se presenta como un estrecho perfil de concentración (T_m), a medida que la muestra se reparte entre la fase estacionaria y móvil y es arrastrada por la última a través de la columna, se extiende en una concentración de perfil gaussiano o normal (T_i). Mientras más tiempo permanezca el pico en la columna más se ensancha, volviéndose más corto y más ancho pero sin perder su forma gaussiana (T_2). A la capacidad de una columna de proporcionar picos

altos y picos delgados se le llama alta eficiencia de la columna y se mide calculando el número de platos teóricos.

RESOLUCION: Denotada por R. La resolución es una medida cuantitativa de la capacidad que tiene una columna para separar dos picos y es definida como la distancia que hay entre el centro de dos picos dividida entre el promedio de las anchuras de los mismos.

Para el cálculo de la resolución se utilizan los picos más difíciles (los más juntos), y si estos se pueden separar con éxito, todos los demás que estén contenidos en la muestra lo harán.

La resolución esta relacionada con la eficiencia ya que al utilizar en la fórmula como denominador el promedio de las anchuras de pico se maneja la velocidad de ensanchamiento de la banda en la columna y puede medirse como número de platos teóricos.

Una resolución igual a 1 se considera como una separación completa aunque en realidad es 98%. Cuando R = 1.5 la resolución es completa y hay solo una sobreposición de 0.3%.

Una forma de explicar la resolución es observar que R = 1 es el número de picos que pueden acomodarse entre los dos picos de interés.

Tanto la selectividad, como la eficiencia N y el factor de capacidad k' están estrechamente ligados a la resolución al utilizar la siguiente fórmula:

$$R = \frac{1}{2} \left(\alpha - 1 / \alpha \right) \left(\sqrt{N} \right) \left(k' / 1 + k' \right)$$

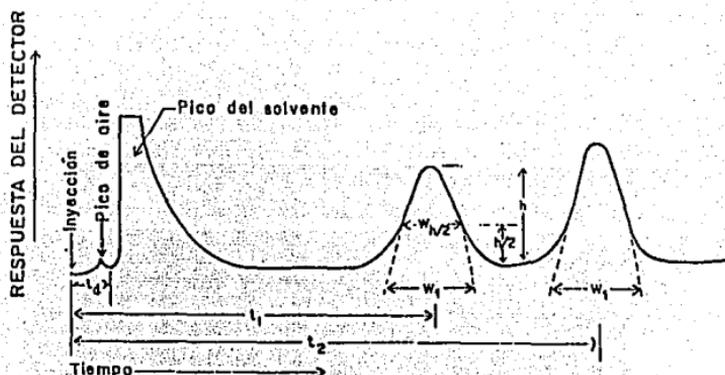


Figura 2. Cromatograma típico, donde t_1 y t_2 (t_R), h y $h/2$ son la altura total y la mitad de la altura del pico; $wh/2$ es el ancho del pico a la mitad de la altura; w_1 y w_2 son los anchos de las bases de los picos 1 y 2 respectivamente.

2.2.3. Componentes básicos de un sistema cromatográfico

Un sistema cromatográfico está constituido por la fase móvil, bomba, inyector, columna, detector y un integrador de resultados. (Figura 3)

Todo sistema cromatográfico está integrado por dos componentes, uno llamado fase estacionaria y otro fase móvil.

La fase estacionaria o fija, es donde tendrá lugar la separación, y es también llamada soporte o adsorbente. Puede ser sólida o líquida.

La fase móvil o eluyente, es la que efectúa la separación de la mezcla al desplazarse sobre la fase fija. Puede ser líquida o gaseosa.

FASE MOVIL: En CLAR la composición de los solventes o fase móvil que influyen la separación debe cumplir con ciertas características como:

- a. La muestra debe ser soluble en la fase móvil. Si la muestra no es soluble puede precipitarse y taponar la columna.
- b. La fase móvil debe ser pura para no dañar la columna con las impurezas ni provocar interferencias con el análisis.
- c. No reaccionar con el empaque.
- d. Ser compatible con el detector.
- e. Tener baja viscosidad.
- f. Fácil recuperación de la muestra.
- g. Estar comercialmente disponible a bajo precio.
- h. Ser de baja toxicidad.
- i. Conocer su punto de ebullición.
- j. No degradar o disolver la fase estacionaria.
- k. Tener la polaridad adecuada para permitir la retención conveniente de la muestra en la columna.
- l. Valores de k' entre 2 y 10. La polaridad del solvente debe ser controlada para producir valores de k' entre 2 y 10. k' es el factor de capacidad que mide la distribución de la muestra entre la fase estacionaria y la fase móvil. Los valores de k' menores de 1 indican que la muestra casi no es retenida por la fase estacionaria de la columna y da como resultado separaciones muy

pobres. Los valores de k' mayores de 10 indican que la muestra se retiene excesivamente por la fase estacionaria de la columna y dará como resultado un tiempo de análisis muy largo. Por estas razones, es necesario ajustar el valor de k' en ese rango, mezclando solventes de diferentes polaridades.

- m. La filtración del solvente antes de que entre a la bomba es una etapa importante, ya que la contaminación de la bomba por partículas, daña el funcionamiento de las válvulas ocasionando escurrimiento o escape de fase móvil. Esto cambia la velocidad de flujo y reduce la reproducibilidad de los tiempos de retención y de las áreas de los picos. Además, las partículas pueden rayar la superficie del pistón de la bomba permanentemente.
- n. La filtración de la muestra, ya que las partículas no disueltas o suspendidas darán resultados pocos satisfactorios y dañarían también la columna.
- o. En muchas ocasiones, en especial con fases polares existe una marcada tendencia del oxígeno y otros gases a disolverse en el líquido, si estos gases se degasifican dentro del instrumento y forman burbujas, pueden afectar seriamente el funcionamiento del detector y la eficacia de la columna por lo que es necesario remover estos gases disueltos antes de comenzar el análisis.

Los sistemas de solventes más comunes son:

- a. Para cromatografía de adsorción: hexano, cloruro de metileno, cloroformo, metanol y acetonitrilo, comúnmente se usan mezclas

binarias de éstos solventes para obtener un valor de k' favorable.

- b. Para los empaques de fase reversa: donde la fase estacionaria es no polar, la fase móvil debe ser polar; los sistemas de solventes más usados son metanol:agua y acetonitrilo:agua.
- c. Para intercambio iónico: el solvente es agua. Generalmente se usan soluciones amortiguadoras a pH y fuerza iónica controlada.

En la cromatografía de intercambio iónico se usa comúnmente la elución por gradiente, la cual va acompañada de un programa para el cambio de pH y fuerza iónica del solvente durante el análisis.

- d. Para cromatografía de permeación en gel: la primera consideración es seleccionar el solvente que disuelva los polímeros de alto peso molecular. El tetrahidrofurano y el tolueno son los solventes más usados.

Los solventes usados en este tipo de cromatografía deberán ser siempre grado HPLC. (20, 21, 22, 27)

PRECOLUMNAS

Ayudan a la mejor separación de mezclas de difícil resolución, éstas al igual que las columnas pueden tener diferentes fases estacionarias para brindar una mayor versatilidad de la técnica de CLAR, por lo que, las precolumnas pueden separar compuestos en base a su peso molecular, en base a cargas eléctricas, en base a su coeficiente de distribución entre dos líquidos, de esta manera se puede obtener una mayor eficiencia en la columna analítica. Las precolumnas también se utilizan con frecuencia en cromatografía de

fase inversa, para evitar que la fase móvil disuelva a la fase estacionaria de la columna analítica; en este caso la precolumna, esta empacada con la misma fase estacionaria de la columna analítica, pero a una mayor concentración, para que se sature la fase móvil, evitando así que solubilice la fase estacionaria de la columna analítica. (20, 27, 30, 31)

COLUMNAS

La columna es la parte más importante de todo el sistema cromatográfico, ya que en ella ocurre la separación de los componentes de la mezcla en estudio. La columna está constituida por un segmento de tubo de material inerte, que comúnmente es acero inoxidable el más utilizado, de diámetro uniforme, resistente a altas presiones, con una longitud de 10 a 50 cm en promedio. Las columnas más eficaces son de diámetro pequeño de 3 μ m.

Las columnas utilizadas en el sistema de alta velocidad se basan en extensos estudios teóricos sobre las ventajas de las partículas más pequeñas; ya que con esto se ha establecido que los menores AEPT se obtendrían usando partículas muy pequeñas e incrementos de presión altos a lo largo de la longitud de la columna. La reducción de la longitud de la columna y del tamaño de partícula produce la disminución del volumen muerto lo que supone una reducción de consumo de disolventes y tiempos de retención menores.

Las partículas menores permiten una eficacia mayor por unidad de longitud de columna, con lo que las columnas de alta velocidad más cortas ofrecen eficacias iguales o superiores a las de los

sistemas convencionales. Una ventaja adicional de la utilización de partículas pequeñas para análisis rápidos resulta del menor término de la resistencia a i , a transferencia de masas de la ecuación de Van Deemter. Esto significa que a los flujos superiores que generalmente se utilizan en análisis de alta velocidad (3-6 ml/min) las columnas de partículas pequeñas todavía operan cerca de sus eficacias óptimas y, por tanto, sus propiedades diferenciales con respecto a las columnas convencionales de 10 μ m son incluso mayores.

Las columnas de alta velocidad también ofrecen significativas ventajas cuando se opera en gradiente de elución. Los menores volúmenes muertos de la columna permiten que el tiempo de reequilibración de la fase móvil generalmente sea menor de 3 minutos, por lo tanto se reduce adicionalmente el tiempo del ciclo.

El pequeño volumen muerto de la columna, la alta eficacia y pequeños volúmenes de mezcla permiten que los análisis a alta velocidad con gradiente sean fáciles de llevar a cabo.

Naturalmente, las partículas menores necesitan caídas de presión superiores para mantener los flujos deseados. (20, 22, 23)

Para una columna dada, si la viscosidad es pequeña una misma caída de presión producirá una mayor velocidad de la fase móvil y por tanto un flujo superior. La alta eficacia, los flujos altos y el pequeño volumen muerto producen un resultado adicional: la anchura del pico se reduce significativamente; esto supone que la altura correspondiente a la misma cantidad de muestra es incrementada o, dicho de otra manera, menores cantidades darán lugar a picos de la misma altura que los que se obtendrían a partir

de cantidades superiores en un sistema convencional con una columna convencional. Además, la misma cantidad de un componente de una mezcla estará en un volumen menor de fase móvil; la concentración en su banda de un componente particular de una mezcla será mayor; como resultado, el límite de detección será muy bajo a pesar de la reducción del tamaño de muestra. (20. 21)

Las eficacias más altas y los tiempos de retención más cortos dan lugar a un logro mayor: la velocidad de producción de platos se incrementa notablemente.

Se han tratado tiempos de retención altamente reducidos y de análisis de alta velocidad. Naturalmente el tiempo es relativo: mientras que en general se podría considerar que un análisis se lleva a cabo en menos de un minuto cuando se realiza a alta velocidad, a veces un cromatograma que tiene lugar en cinco o incluso en 25 minutos también representa una mejora importante, por ejemplo, si el tiempo de análisis requerido anteriormente era de 30 minutos o una hora, respectivamente. (20. 21)

SISTEMAS DE BOMBEO

En todo sistema cromatográfico la bomba es muy importante, ya que ésta realiza la función de proporcionar la fuerza necesaria para impulsar el líquido a elevadas presiones.

Las características de una bomba son:

- a. Debe ser químicamente inerte y capaz de manejar los diferentes tipos de solventes.
- b. El sistema de bombeo no debe generar pulsos que se traduzcan en un gran ruido por el detector.

- c. Debe producir alta presión, 5000 psi es suficiente para llevar a cabo la mayoría de las separaciones cromatográficas con velocidades de flujo entre 0.5 y 10 ml por minuto.
- d. La velocidad de flujo de la bomba debe ser reproducible. Es muy importante que se pueda reestablecer la velocidad de flujo de la bomba día a día para obtener tiempos de retención reproducibles.
- e. Un mecanismo que permita reciclar la muestra a través de la columna para incrementar la resolución.
- f. Capacidad para poder cambiar de un sistema de solventes a otro.

(20, 31)

TIPOS DE BOMBEO

Los sistemas de bombeo se pueden dividir en dos grupos; de presión constante y de flujo constante (o desplazamiento constante). (20, 21, 33)

a. Bombas de presión constante

La forma más sencilla de una bomba de presión constante consiste en un tubo de acero inoxidable en forma de espiral con fase móvil en su interior, al cual en un extremo se le coloca una columna y el otro extremo se conecta a una fuente de gas. Cuando el suministro de gas se acciona, el gas desplaza a la fase móvil, forzándola por el sistema.

Existen otras bombas de presión constante en donde el pistón se encuentra entre el gas y la fase móvil. En general, las bombas de presión constante tienen las siguientes

características.

1. Cámara de fase móvil de volumen limitado.
2. Para una presión constante de la bomba, la velocidad de flujo del sistema varía con cambio en la composición de la fase móvil, en la temperatura, viscosidad, resistencia generada por la columna (filtros obstruidos), entre otros factores.
3. Generalmente son más sencillas en su construcción, por lo tanto, es más fácil de darles servicio y son menos costosas.

b. Bombas de flujo constante

Estas se pueden subdividir en dos tipos:

1. De cámara reducida o tipo jeringa: Mantiene constante la velocidad de flujo, la forma más simple consiste en un pistón accionado por un tornillo; si el tornillo se mueve a una velocidad constante el desplazamiento del pistón será constante y una vez que el sistema ha alcanzado la presión de operación, la velocidad de flujo será constante, y dan también flujos libres de pulsaciones debido a su acción tipo jeringa.

Estas bombas presentan una desventaja: tienen capacidad limitada, teniendo que interrumpir el flujo de la fase móvil para volver a llenar la cámara y desplazar nuevamente más volumen de fase móvil; actualmente este tipo de bombas se utiliza para gradientes de elución, permitiendo una buena reproducibilidad en la elución de muestras, y además

son relativamente costosas.

2. Con cámara de volumen infinito o tipo recíproco:

Están constituidas por dos o tres cámaras, que desplazan volúmenes constantes de disolvente, en forma alternada para permitir el llenado de las mismas, mientras se bombea la fase móvil a través de la columna; la desventaja de este tipo de bombas es que se obtienen pulsaciones si no se coloca un amortiguador, es decir, un flujo pulsante, lo que podría interrumpir la detección de la muestra, alternativa que no siempre ocurre, debido a que el cromatógrafo de líquidos es equipado con aditamentos que corrigen estos pulsos, y por otro lado, al pasar la fase móvil por la columna, las partículas de adsorbente, por la misma resistencia al flujo que ofrecen, van atenuando las pulsaciones dentro de la columna, de tal manera que se obtiene a la salida de la misma, un flujo más continuo.

Las separaciones cromatográficas pueden llevarse a cabo usando dos técnicas de elución: la isocrática y la de gradiente. (20)

La elución isocrática se lleva a cabo con una fase móvil de composición constante durante toda la cromatografía. La fase móvil puede ser un solo solvente o una muestra de varios solventes.

La elución por gradiente involucra un cambio en la composición del solvente durante el tiempo que se lleva a cabo la cromatografía. Generalmente se usa un programador para controlar las velocidades de flujo de dos o más solventes para llevar a cabo

el gradiente e inclusive algunos programadores permiten el lavado del sistema con un solvente después de haberse efectuado la elución por gradiente y asegurar de esta manera la reproducibilidad.

La ventaja de la elución por gradiente está en la obtención de mejor resolución y la elución de casi todos o todos los componentes de la muestra de la columna.

INYECTORES

Existen dos métodos principales para introducir la muestra en una columna de CLAR; estos son por medio de una válvula de inyección o por métodos de detención de flujo. Los métodos de detención de flujo requieren que el flujo de la fase móvil hacia la columna sea detenido o desviado mientras la muestra es introducida en la columna. Luego se reinicia el flujo y el proceso de separación comienza. El método más común para introducir la muestra es usando una válvula de inyección. (20. 21)

El "loop" de la muestra se saca del flujo cambiando la válvula a la posición de carga. En esta posición el flujo de la fase móvil pasa a través de la válvula directamente de la columna. Ahora es cuando se introduce la muestra al "loop" de la válvula, usando una jeringa. El "loop" se puede llenar parcial o totalmente, pero si se requiere precisión se recomienda llenarlo totalmente. Cuando se cambia la válvula con la muestra a la posición de inyectar, la fase móvil ahora viaja por el "loop" y lleva la muestra hacia la entrada de la columna. El flujo de la columna sólo se interrumpió momentáneamente por el cambio de posición de la válvula.

En la actualidad la inyección de la muestra se puede hacer en forma automática. Primordialmente, los inyectores automáticos consisten de una válvula de inyección automática, un sistema de llenado de la válvula y un control electrónico que sirve para controlar funciones tales como: tiempos de inyección, tiempos de corrida, velocidades de llenado, número de inyecciones por muestra, lavado de válvula y jeringa, inicio de inyección para el registro, así como la operación de programadores de gradientes o controladores de sistema. (20, 21)

Existen principalmente 3 métodos por medio de los cuales los inyectores automáticos llenan la válvula de inyección:

1. Desplazamiento positivo: Al utilizar este método es necesario sellar el vial que contiene la muestra. Cuando se lleva a cabo la carga de la muestra, una aguja doble pasa a través del sello y el aire penetra por uno de los conductos de la aguja. Este aire presuriza el vial y obliga a la muestra a salir por el segundo conducto de la aguja, hacia la válvula.
2. Succión: Cuando la introducción de la muestra se hace por succión se utiliza ya sea un sistema de vacío o una jeringa de mayor volumen y los viales que contienen la muestra normalmente no están sellados.
3. Con jeringa: Se utiliza una jeringa para CLAR. La jeringa es automática y generalmente puede ajustarse para dar varios volúmenes, sin cambiar ya sea la jeringa o el "loop" de la

válvula. Los viales de la muestra pueden estar sellados o abiertos para este método de introducción. La aguja de la jeringa entra en el vial de la muestra y saca el volumen requerido de la muestra, luego la jeringa carga la muestra en la válvula de inyección, de la misma manera como si la válvula se usara en forma manual, finalmente la válvula es accionada y la muestra se introduce en la columna.

Estos inyectores eliminan algunos de los errores que se presentan en el análisis cuantitativo, ocasionados por el manejo manual de las técnicas de inyección. (20, 31)

DETECTORES

En CLAR, un detector es esencial y debe ser sensitivo para un monitoreo continuo de los efluentes de la columna. Desafortunadamente, la sensibilidad a las bandas efluentes puede ser difícil, dado que las propiedades físicas de la fase móvil y los solutos a menudo son bastante similares. Varias consideraciones han sido perseguidas en el desarrollo de la moderna cromatografía de líquidos en sus detectores. (20)

1. Medida diferencial de una propiedad de cantidad de soluto en volumen o general de la muestra y del solvente.
2. Medición de una propiedad de la muestra, que no posea la fase móvil.
3. Detección posterior a la eliminación de la fase móvil.

Un detector ideal para cromatografía de líquidos sería uno con las siguientes características:

- a. Tener una alta sensibilidad y la misma respuesta predecible.

- b. Responder a todos los solutos, o de otro modo, especificidad predecible.
- c. Tener un amplio rango de linealidad.
- d. No ser afectado por cambios en la temperatura o en el flujo de la fase móvil.
- e. Responder independientemente a la fase móvil utilizada.
- f. No contribuir a un ensanchamiento de las bandas.
- g. Ser confiable y conveniente su uso.
- h. Tener una respuesta que aumente linealmente con la cantidad de soluto.
- i. No ser destructivo.
- j. Proveer información cualitativa del pico detectado.
- h. Tener una respuesta rápida.

Cuando se evalúa un detector para cromatografía de líquidos, varios rasgos deben ser considerados para obtener un uso óptimo de estos aparatos.

En primer lugar, el ruido del detector debe ser conocido (sin flujo de solvente).

El nivel de ruido del detector es definido como la amplitud máxima del ruido de alta frecuencia combinados con las eventuales fluctuaciones de línea base que surgen de la electrónica del instrumento, fluctuaciones de temperatura, cambios en la línea de voltaje, y otros efectos no atribuibles directamente al soluto.

Las variaciones en la señal del detector también pueden ocurrir como resultado de cambios en el flujo y pulsaciones de la bomba, también puede haber desplazamientos de la línea base hacia

arriba o hacia abajo debido a cambios en la respuesta del detector por un uso muy prolongado.

El ruido del detector no puede ser medido con exactitud al menos que la magnitud del desplazamiento sea pequeña en relación al ruido. Muchos problemas que aparentemente son ruido y desplazamiento de la respuesta del detector son función de la totalidad del sistema (impurezas del solvente, variaciones de temperatura) y no una limitación inherente del detector. La sensibilidad absoluta del detector es el cambio total en un parámetro físico (absorbancia para el fotómetro) que es requerido para una deflexión de escala total del graficador a la máxima sensibilidad del detector y a un nivel de ruido específico. El límite de detección o sensibilidad del detector es generalmente como la concentración o masa de soluto que atraviesa el detector por unidad de tiempo que provee una señal del doble que el promedio de la del ruido.

Para un detector que se utilizará para análisis cuantitativo, la señal de salida deberá ser lineal con la concentración (g/ml) para un detector sensible a bajas concentraciones y con la masa para un detector sensible a la cantidad de materia (g/seg). (8-20)

Los detectores más utilizados en cromatografía de líquidos son:

a. Detector Espectrofotométrico (UV/VIS)

Estos detectores son los de más uso en CLAR y responden a aquellas sustancias que absorben luz visible o ultravioleta.

A la salida de la columna el haz de luz es enfocado a través de la celda de flujo hacia el sistema de fotodetección. Cuando los solutos que absorben luz se encuentran en la fase móvil, la intensidad de la luz que llega a la fotocelda se reduce produciendo un cambio en la señal eléctrica, la cual puede ser amplificada e introducida a un registro o sistema de datos. La relación entre la absorción de luz en la celda de flujo y la concentración del soluto esta dada por la ley de Beer: $A = ELC$, donde: A = Absorbancia,

E = Coeficiente de extinción del soluto a una longitud de onda,

L = Paso de luz de la celda de flujo,

C = Concentración del soluto en la celda.

La sensibilidad del detector será directamente proporcional al valor del coeficiente de extinción y al paso de luz de la celda.

La mayoría de las celdas tienen un paso de luz entre 1 y 10 mm y varían en volumen de 0.5 μ l a 20 μ l. (20, 21)

Existen diferentes categorías de detectores espectrofotométricos:

1. Detectores de longitud de onda fija: Usan una lámpara de mercurio como fuente de luz cuya línea de emisión principal se encuentra a 254 nm. El uso de filtros permite aislar las líneas de emisión diferentes a 254 nm.
2. Detectores de longitud de onda variable: Usan una lámpara de deuterio como fuente de luz, cuyas líneas de

emisión son dispersadas por un monocromador y dividida en dos haces; uno que pasa a través de la muestra y el otro que pasa a través de un canal de referencia. El detector mide así, la diferencia de absorbancias entre la muestra y la referencia.

3. Detectores con longitud de onda seleccionable: En estos se intercambian filtros, lo cual permite seleccionar diferentes longitudes de onda directamente de una lámpara de mercurio.
4. Detectores de selección dual: Similares a los anteriores pero tienen un sistema doble de detección que permite monitorear la celda de flujo a dos longitudes de onda, con lo cual se puede conocer la relación entre ambas longitudes. Esta relación es útil para identificar picos y confirmar su pureza.
5. Detectores de barrido (UV/VIS): La característica principal de este detector es que puede barrer rápidamente por varias longitudes de onda durante la elución de un pico de cromatografía. Esto permite obtener un espectro de absorción para identificar la longitud de onda óptima. Con los detectores de barrido se pueden realizar varias funciones en forma simultánea tales como cromatogramas a dos o más longitudes de onda, gráficas de relación y barridos rápidos. También es posible programar cambios en la longitud de onda mientras se realiza una corrida, lo cual permite optimizar aún más la longitud de onda.

b. Detector de Índice de Refracción

Este detector también es conocido como refractómetro diferencial. Se basa en el hecho de que la mayoría de los líquidos tienen diferente índice de refracción. El detector mide la diferencia entre la fase móvil pura y el soluto que eluye de la columna. El detector de índice de refracción es casi un detector universal, pero es poco popular en cromatografía líquida por las siguientes razones:

1. Tiene menos sensibilidad que los detectores por fluorescencia o ultravioleta.
2. Es sensible a variaciones de temperatura. Esto se debe a que el índice de refracción cambia con la temperatura. Por otro lado los elementos ópticos del sistema están diseñados para detectar cambios pequeños en el ángulo de la luz y por lo tanto cambios en la temperatura ocasionan variaciones ópticas.
3. Tendencia a romperse y sensible a la presión, también la celda de flujo del detector es muy frágil.
4. No puede usarse normalmente para gradientes. Si la composición de la fase móvil cambia, el índice también cambia. La elución con gradiente sólo se puede hacer dividiendo el flujo de la fase móvil usando dos columnas, una para la muestra y otra de referencia.

c. Detector de Fluorescencia

Las ventajas más grandes de la fluorescencia son la selectividad y la sensibilidad. Se trata de una técnica muy

poderosa cuando se realizan análisis de sustancias que existen en muy pequeña cantidad (trazas).

Cuando una molécula absorbe energía ocupa un estado de energía excitado; esta energía debe disiparse antes de que la molécula regrese a su estado normal o nivel de energía basal. Si la molécula cae instantáneamente a su nivel basal con la emisión de energía en forma de luz se dice que fluoresce. La luz emitida es generalmente de baja energía (mayor longitud de onda) que la radiación de excitación. Es importante hacer notar que la fluorescencia no se presenta a menos de que haya primero absorción de energía.

La cantidad de fluorescencia o eficiencia se puede definir sencillamente como la relación entre el número de fotones emitidos con el número de fotones absorbidos. De tal manera que la eficiencia tiene un valor máximo de 1. Las moléculas con un valor de eficiencia mayor de 0.5 son altamente fluorescentes mientras que los compuestos que tienen un valor de eficiencia menor a 0.1 tienen muy poca fluorescencia.

d. Detector de arreglo de diodos

Es un detector que presenta mayor resolución y sensibilidad en un sistema de longitud de onda variable. Este detector de alta resolución ofrece un mapa espectral con monitoreo continuo de la muestra, pudiéndose trabajar en región UV/Vis, y presenta la ventaja de una mayor sensibilidad cromatográfica y espectral y reporta las gráficas en tercera dimensión. (20, 21)

Existen también detectores electroquímicos, infrarrojos, de conductividad, de radioactividad y por espectrofotometría de masas.

(7, p. 21)

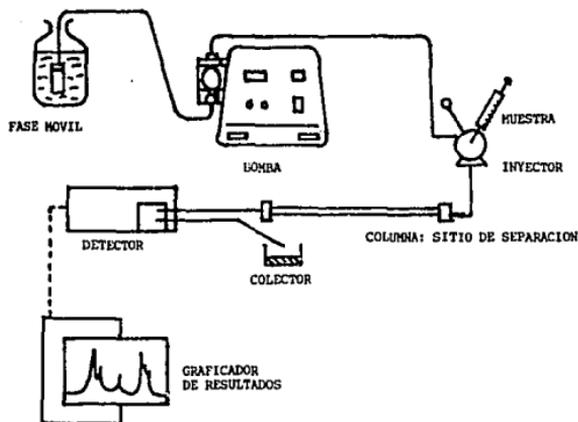


Figura 3. Componentes básicos de un sistema cromatográfico.

2.3. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

En general, los métodos analíticos que se llevan a cabo pueden comprender identificación, determinación de impurezas y valoración cuantitativa. Las características fundamentales que deben poseer los métodos analíticos son especificidad, sensibilidad, exactitud y precisión. Estas características deberán comprobarse empleando las técnicas estadísticas adecuadas.

Los métodos analíticos pueden dividirse por su origen en los siguientes grupos:

1. **Métodos farmacopéicos:** Son aquellos que aparecen en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Si por alguna razón éstos no pudieran aplicarse, se utilizan los métodos consignados en las farmacopeas de otros países.

Cuando estos métodos se utilizan para el análisis de materias primas, no es indispensable comprobarlos estadísticamente. Sin embargo, cuando se trata de formas farmacéuticas se debe tener presente que debido a la gran variedad de formulaciones existentes, los resultados pueden no ser satisfactorios y entonces es deseable comprobar la validez del método en el caso particular que se está analizando.

2. **Métodos oficiales:** Se considerarán métodos oficiales a aquellos que aparecen consignados en textos como Códex, etc.

Como estos métodos generales son sometidos a estudios estadísticos antes de ser incluidos en estos textos, no es indispensable comprobarlos antes de su empleo para el análisis de materias primas. Para productos terminados valen las mismas

consideraciones que para los métodos farmacopéicos.

3. Métodos no oficiales: Son aquellos que aparecen en la literatura técnica, algunas veces como métodos tentativos o propuestos para su inclusión en farmacopeas y demás textos oficiales.

Tanto para su empleo en el análisis de materias primas como en el de productos terminados, estos métodos deberán ser comprobados previamente a su utilización verificando su especificidad, sensibilidad, exactitud y precisión, aplicando en cada caso los métodos estadísticos necesarios.

4. Métodos Desarrollados Internamente por el Laboratorio para Materias Primas, Productos Intermedios y Terminados: Cuando no existan métodos analíticos correspondientes a las categorías descritas en los incisos anteriores, o bien cuando por alguna razón particular éstos no puedan utilizarse, se desea mejorarlos o bien se hayan obtenido resultados dudosos al aplicarlos, el laboratorio podrá desarrollar sus propios métodos.

En ese caso, siempre deberá ser comprobada estadísticamente la validez del método, por lo que se refiere a especificidad, sensibilidad, exactitud y precisión.

5. Métodos Analíticos Desarrollados por el Solicitante del Análisis: En algunos casos, el solicitante del análisis proporcionará su propio método analítico (como en el caso de un método particular enviado con la solicitud del registro del medicamento ante la Secretaría de Salud). En estos casos el método se considerará como ya comprobado, el laboratorio lo aplicará al análisis de la muestra y se limitará a reportar los resultados obtenidos con dicho método. (34)

La validación de métodos analíticos se define como, el proceso por el cual queda establecido por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. (Tabla 3)

En la validación de métodos analíticos se debe validar tanto el sistema como el método: el sistema es con el cual se estudia el problema de interés (por ejemplo, cromatógrafo de líquidos de alta presión, espectrofotómetro); y el método es el procedimiento que a través de técnicas nos permite conocer o determinar las sustancias de interés.

2.3.1. Definiciones y Determinaciones

2.3.1.1. Linealidad: La Linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

a. Linealidad del Sistema

Se determina construyendo una curva de calibración (concentración vs respuesta medida) utilizando cuando menos 5 diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo análisis cuando menos por duplicado para cada dilución.

El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método; para control de calidad y de seguimiento de la estabilidad de una forma farmacéutica, deberá

estar incluida la concentración seleccionada como 100%.

NOTA: Se considera el 100% como la concentración de la muestra en la solución final a analizar, que proporciona una respuesta adecuada dependiendo del método de cuantificación. Se utiliza estándar primario.

CRITERIOS: CV \leq 1.5%

$$r \geq 0.99$$

$$r^2 \geq 0.98$$

b. Linealidad del Método

Se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos 5 diferentes cantidades de la sustancia de interés, (placebos cargados, es decir, una mezcla de excipientes más una cantidad conocida de principio activo), cada uno de manera independiente, haciendo el análisis por triplicado.

Las concentraciones de los placebos cargados deben ser las adecuadas para que, utilizando el método propuesto, las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la Linealidad del sistema, incluyendo siempre la correspondiente al 100%.

La amplitud del estudio dependerá del uso y aplicaciones del método. (Control de Calidad, Estudios de Estabilidad, etc.) y deberá llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

CRITERIO: Cantidad adicionada vs cantidad recuperada: $m = 1$, $b = 0$,

$$r^2 \geq 0.98$$

Para método cromatográfico el promedio de recobro deberá

ser de 98-102% y los CV deberá ser \leq 2% para cada nivel y los globales de todo el intervalo de la Linealidad.

2.3.1.2. Intervalo: El intervalo de un método analítico está definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles de concentración superior e inferior de la sustancia (incluyendo estos niveles), en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

2.3.1.3. Exactitud: La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

Se determina de, cuando menos, 6 placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100%, utilizando el método propuesto. Haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

CRITERIO: PROMEDIO DE % DE RECOBRO entre 98-102%

CV \leq 2%

2.3.1.4. Precisión: La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de Desviación Estándar o del Coeficiente de Variación.

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

2.3.1.4.1. Repetibilidad: Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.).

2.3.1.4.2. Reproducibilidad: Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc.).

a. Precisión del Sistema

Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% establecido en la Linealidad del sistema.

CRITERIO: CV \leq 1.5%

b. Precisión del Método

Reproducibilidad: Se determina de una muestra homogénea del producto cercana al 100% de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado.

CRITERIO: CV TOTAL \leq 2%

Repetibilidad al 100%: Se determina de cuando menos, 6 placebos cargados (placebos adicionados del principio activo), de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100%, utilizando el método propuesto. Haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

CRITERIO: CV \leq 2%, el método es preciso.

2.3.1.5. Especificidad: Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

Con el método propuesto:

1. Analizar placebos del producto.
2. Identificar la respuesta del activo, y si procede, de los excipientes y/o de otras sustancias presentes.

CRITERIO: Confirmar que el método desarrollado es capaz de cuantificar la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes.

2.3.1.6. Estabilidad de la muestra: Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés,

después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

Se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de 3 muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones.

Almacenar las muestras analizadas bajo distintas condiciones (temperatura ambiente, refrigeración, protegidas de la luz, etc.), durante un tiempo preestablecido por el analista dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia.

Reanalizarlas bajo las mismas condiciones de operación, utilizando una solución de referencia recientemente preparada, para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido en el método analítico.

La determinación debe ser efectuada por un mismo analista.

CRITERIO: La muestra es estable si el IC para la diferencia de la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto no exceda para métodos cromatográficos el más o menos 2%. (* . *)

CV: Coeficiente de Variación

IC: Intervalo de Confianza al 95%. Un intervalo de confianza es una estimación del parámetro por un intervalo al azar.

2.3.1.7. Límite de detección: Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no

necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

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

2.3.1.9. Tolerancia: La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas, sistemas de elución, tipos de empaque (soporte, fase estacionaria, etc.), condiciones ambientales, etc. (5, 9, 10, 11, 14)

PARAMETRO	CONTROL DE CALIDAD	INDICADORES DE ESTABILIDAD	BIDDISPONIBILIDAD
LINEALIDAD Y PRECISION DEL SISTEMA	*	*	*
LIMITE DE DETECCION		*	*
LIMITE DE CUANTIFICACION		*	*
EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%	*	*	*
LINEALIDAD DEL METODO	*	*	*
PRECISION (REPRODUCIBILIDAD)	*	*	*
ESPECIFICIDAD (CONTROL DE CALIDAD)	*	*	*
ESPECIFICIDAD (ESTABILIDAD)		*	*
TOLERANCIA DEL SISTEMA		*	*
ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	*	*	*

Tabla 3. Parámetros que se deben evaluar considerando para que fin será utilizado el método analítico.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La validación de métodos analíticos es una parte fundamental del desarrollo de toda nueva formulación y también lo es de la técnica de análisis de control de calidad de una forma farmacéutica, ya que será aquí donde se notará si el estudio que se está evaluando sistemáticamente, cumple con los propósitos para los cuales ha sido diseñado.

Actualmente, la mayoría de las formulaciones farmacéuticas, contienen además del principio activo, una gran variedad de materias inertes con las cuales se debe asegurar la calidad y estabilidad del producto final. Para realizar un análisis del principio activo se debe seguir un tratamiento previo como medida de eliminación de los excipientes y cuantificar solo el principio activo.

Para la determinación de LISINOPRIL en tabletas se hará un estudio previo de modificación del método analítico reportado en farmacopea, ya que en éste, se habla de un sistema cromatográfico en el cual se debería utilizar una columna de 4.6 mm x 25 cm empacada con partículas de 5 μ m de L7 (octilsilano) y la cual debería ser mantenida a 50° Celcius; esto último no se tiene al alcance en el laboratorio. es decir no se puede mantener la columna a 50° Celcius, por lo que se buscan algunas modificaciones al método analítico, que sean igualmente eficaces y una vez

encontradas las nuevas condiciones, se podrá proseguir con la validación del método analítico para control de calidad.

Los parámetros tentativos serán la búsqueda de una nueva fase móvil, un tiempo de retención más corto, velocidad de flujo, y medio de disolución; son principalmente las modificaciones para proceder a evaluar el método analítico.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Modificar y validar un método analítico para control de calidad para la determinación y cuantificación de lisinopril mediante cromatografía de líquidos de alta presión, acorde a las necesidades del laboratorio.

OBJETIVOS PARTICULARES

- a. Realizar una investigación bibliográfica amplia y detallada del principio activo (lisinopril).
- b. Realizar las modificaciones necesarias al método analítico aplicables al equipo y al método, de acuerdo a las necesidades, instalaciones y posibilidades del laboratorio.
- c. Validar el método modificado para establecer la capacidad del mismo de satisfacer los requisitos para lo que fue diseñado.

5. HIPOTESIS

Mediante la aplicación correcta de la metodología de trabajo, se obtendrá un método analítico validado para la cuantificación de Lisinopril, con resultados confiables y reproducibles basados en un método estadístico que demuestren que esté satisface los requisitos para lo que fue creado, con lo cual se contribuye al desarrollo de normas de calidad de nuevos productos farmacéuticos.

6. METODOLOGIA

El desarrollo experimental se llevó a cabo mediante la siguiente secuencia:

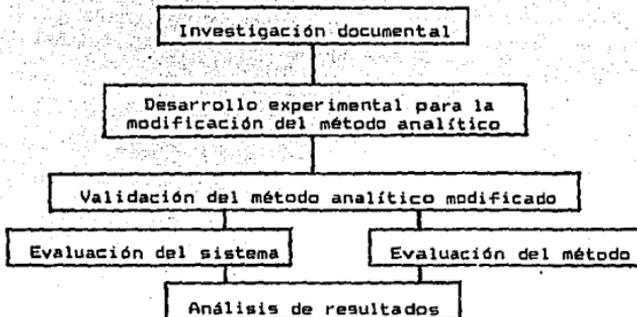


Diagrama 1. Metodología general para el desarrollo experimental.

6.1. MATERIAL

- Matraces volumétricos de 10, 25, 50, 100 y 1000 ml Marca KIMAX.
- Jeringa de aplicación de 100 μ l Unimetrics Corporations No. TP5100R
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4, 5 y 10 ml Marca KIMAX
- Jeringa con válvula para filtración Marca BD
- Microespátula Marca Stainless
- Perilla de succión
- Espátula Marca Stainless
- Matraces Erlenmeyer de 125, 250, 500 y 1000 ml Marca PYREX
- Embudos de talle corto de plástico

- Papel filtro Whatman No. 1
- Frascos viales ámbar con tapón y capacidad para 10 ml, MARCA VITRIUM.
- Papel Parafilm
- Membranas de filtración:
 - Para fase móvil: Marca Gelman Sciences de nylon de 0.2 μm de porosidad y 47 mm de diámetro, no. catálogo 66602.
 - Para filtrar agua: Marca Millipore type 65 de 0.22 μm de porosidad y 47 mm de diámetro, no. catálogo HIJM93477.
 - Para filtrar la muestra a inyectar: Marca Gelman Sciences de nylon de 0.2 μm de porosidad y 13 mm de diámetro, no. catálogo 66600.
- Probeta graduada 100 y 1000 ml Marca P.K.
- Pipeta Pasteur
- Vasos de precipitados Marca PYREX 200 ml.

6.2. EQUIPO

- Sistema de filtración a vacío Marca PYREX
- Balanza analítica ER-180A, Marca AND Comp. Capacidad máx. 0-180 g, $d=0.1$ mg
- Potenciómetro Beckman Zeromatico 65-3
- Baño de ultrasonido Cole Parmer 8850. Instrument Company
- Cromatógrafo de líquidos Perkin Elmer MODELO LC 250
- Bomba Tipo Isocrática LC 250 con interfase mod. 900 series interface

- Detector Perkin Elmer UV/VIS LC-290
- Columna CB No. 261 de 10 μm x 25 cm de longitud, de acero inoxidable, Marca Perkin Elmer
- Columna C18 No. 667 de 10 μm x 25 cm de longitud, de acero inoxidable, Marca Perkin Elmer
- Columna C18 No. 1230 de 5 μm x 15 cm de longitud, de acero inoxidable, Marca Perkin Elmer
- Computadora Printaform modelo 6551

6.3. REACTIVOS

- Acetonitrilo grado HPLC Marca Mallinckrodt, ChromAR HPLC (ACS), Lote: LOT 2856KHAM, No. Catálogo NAI648
- Agua grado HPLC, Marca Baxter, Lote: BC320, No. Catálogo 365-4
- Metanol absoluto grado HPLC, Marca Mallinckrodt ChromAR HPLC, Lote: 3041 KJAL, No. Catálogo UN1230
- Fosfato de Sodio Dibásico Dodecahidratado, Cristales; R.A.; Marca J. T. Baker, No. Catálogo 3822, Lote: F14452
- Fosfato de Sodio Dibásico Anhidro, polvo; R.A.; J. T. Baker, No. Catálogo 3828-20, Lote: E41453
- Lisinopril estándar primario grado USP, Lote: F. F=100% B.S.
- Lisinopril estándar secundario, H=8.86% K.F., P=91.12% B.H. P=99.98% B.S.
- Placebo para tabletas de Lisinopril, Lote: 004-013
- Acido Perclórico concentrado, Marca J. T. Baker grado R.A., Lote: 39343, No. Catálogo 9652-20-1
- Tabletass de Lisinopril de 5 mg Lote: 021-045, P=95.12% B.H.

6.4. METODOS

6.4.1. Modificación del método analítico

Modificación del método analítico descrito en la United States Pharmacopeia XXII; para lo cual se requiere de lo siguiente:

Solución de fosfatos: Disolver 2.76 g de fosfato de sodio monobásico en agua, ajustar a pH 5.0 con NaOH 1N, en un matraz volumétrico de 1000 ml, diluir con agua a volumen y mezclar.

Fase móvil: Preparar una mezcla de solución de fosfatos y acetonitrilo 96:4, filtrada y degasificada.

Preparación del estándar: Disolver una cantidad exactamente pesada de Lisinopril USP en agua y diluir cuantitativamente hasta obtener una solución con una concentración de 0.3 mg/ml.

Preparación de la muestra: Transferir 30 mg de Lisinopril exactamente pesado a un matraz volumétrico de 100 ml disolver y diluir a volumen con agua y mezclar.

Sistema cromatográfico: Se equipa el cromatógrafo con un detector a 210 nm, una columna de 4.6 mm x 25 cm que contenga un empaque de 5 µm de octilsilano y que se mantenga a una temperatura de 50°C, con velocidad de flujo de aproximadamente 1 ml/min.

Tiempo de retención esperado: 3.20 a 3.60 minutos.

En donde se experimentó hasta encontrar las condiciones adecuadas, que sustituyeron principalmente el empleo del calentamiento de la columna. (Diagrama 2)

Para modificar el método se estudiaron experimentalmente los siguientes parámetros:

- Fase móvil (concentración de los componentes de está)
- Velocidad de flujo
- Medio de dilución
- Columna cromatográfica

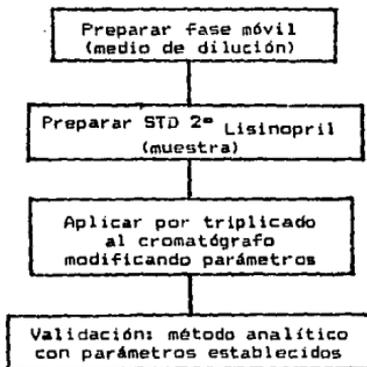


Diagrama 2. Metodología general para la modificación del método.

Para la modificación del método se realizaron los siguientes ensayos por triplicado para encontrar los parámetros más adecuados:

FASE MOVIL	COLUMNA/TAMARO DE PARTICULA (μ)	VELOCIDAD DE FLUJO (ml/min)	CONCENTRACION (μ g/ml)
Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O-Na ₂ HPO ₄ -MeOH	C18, 10	1.2	50
Acet-Na ₂ HPO ₄ 4:96	C18, 5	1.0	50
Acet-Na ₂ HPO ₄ 4:96	C18, 5	1.8	50
Acet-H ₂ O 60:40	C18, 5	1.5	50
Acet-H ₂ O pH 2 45:55	C18, 5	1.5	50
Acet-H ₂ O pH 2 45:55	C18, 5	1.0	50
Acet-H ₂ O pH 2 45:55	C18, 5	0.4	50
Acet-H ₂ O pH 2 45:55	C18, 5	0.6	50
Acet-H ₂ O pH 2 45:55	C18, 5	0.5	50
Acet-H ₂ O pH 2 45:55	C18, 5	0.5	20
Acet-H ₂ O pH 2 45:55	C18, 5	0.5	10
Acet-H ₂ O 45:55	C18, 5	0.5	50
Acet-H ₂ O 45:55	C18, 5	0.2	50
Acet-H ₂ O 40:60	C18, 5	0.5	50
Acet-H ₂ O pH 2 45:55	C18, 5	0.6	50
Acet-H ₂ O 45:55	C18, 5	0.5	50
Acet-H ₂ O 45:55 pH 4	C18, 5	0.5	50
Acet-H ₂ O 55:45 pH 3	C18, 5	0.5	50
Acet-H ₂ O pH 2 50:50	C18, 5	0.8	50
Acet-H ₂ O pH 2 55:45	C18, 5	1.0	50
Acet-H ₂ O pH 2 55:45	C18, 5	1.5	50
Acet-H ₂ O 60:40	C18, 5	1.5	50
Acet-H ₂ O pH 2 55:45	C18, 5	0.6	50
Acet-H ₂ O pH 2 55:45	C18, 5	0.8	50
Acet-H ₂ O pH 2 45:55	C18, 10	1.2	50
Acet-H ₂ O 40:60 pH 2	CB, 10	1.0	50
Acet-H ₂ O 45:55 pH 2	CB, 10	1.0	50
Acet-H ₂ O 40:60 pH 2	CB, 10	1.0	30
Acet-H ₂ O 45:55 pH 2	CB, 10	0.8	30
Acet-H ₂ O pH 2 45:55	CB, 10	1.0	30

Tabla 4. Ensayos para establecer parámetros del método analítico.

- Se preparó cada fase móvil de manera independiente y se utiliza también como medio de dilución.
- Para las muestras con concentración de 50 μ l, se pesó 25 mg de

Lisinopril STD 2^a. se aforó a 25 ml, de esta solución se tomó una alícuota de 1 ml y se aforó a 10 ml, de esta última solución se tomó una alícuota de 5ml y se aforó a 10 ml con la misma fase móvil en estudio.

- c. Para las muestras con concentración de 30 μ l, se pesó 30 mg de Lisinopril STD 2^a y se aforó a 100 ml, de esta solución se tomó una alícuota de 1 ml y se aforó 10 ml con la misma fase en estudio.
- d. Para ambas concentraciones, 50 μ l y 30 μ l, las soluciones se agitaron y se colocaron en el baño de ultrasonido durante 30 segundos, se llevaron a su aforo y aplicaron al cromatógrafo.
- e. Cada fase móvil se estudió con aplicaciones por triplicado para observar su repetibilidad.
- f. Una vez encontradas las condiciones en las que el método respondió adecuadamente, observándose esto mediante el tiempo de retención detectado en CLAR, se procedió a validar el método analítico para Control de Calidad.

6.4.2. Validación del Método Analítico

6.4.2.1. Evaluación del Sistema

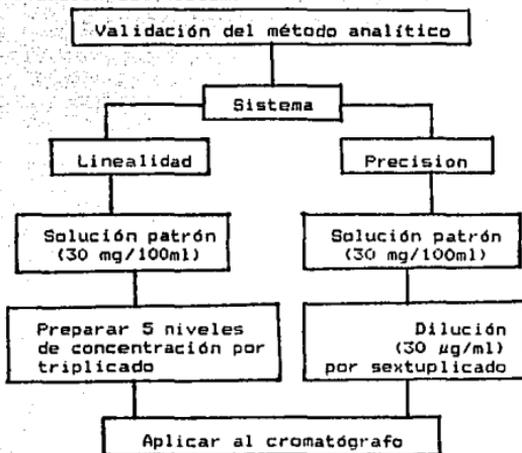


Diagrama 3. Evaluación del sistema.

6.4.2.1.1. Linealidad del Sistema

- a. Se seleccionaron cinco niveles de concentración: 40, 60, 80, 100 y 120%.
- b. Se preparó suficiente fase móvil de acetonitrilo-agua pH 2 45:55 de la manera siguiente: la fase móvil se preparó con agua grado HPLC filtrada por membrana y se llevó a pH 2 con ácido perclórico, en seguida se filtró por separado el acetonitrilo grado HPLC en membrana para solventes, una vez hecho esto se mezcla el agua y el acetonitrilo en una proporción de 45 ml a 55 ml respectivamente.

- c. Se pesó 30 mg de Lisinopril estándar primario y aforó a 100 ml con medio de dilución (fase móvil), se agitó y colocó en el baño de ultrasonido 5 minutos, enfriar. Esta fue la solución patrón.
- d. Nivel 40% (12 $\mu\text{g/ml}$): Se tomó de la solución patrón una alícuota de 1 ml y aforó en un matraz volumétrico de 25 ml con medio de dilución, se agitó hasta disolución completa y colocó en el baño de ultrasonido 5 minutos. (agitar y colocar en el baño de ultrasonido se hizo de la misma manera para cada nivel y cada repetición)
- e. Nivel 60% (18 $\mu\text{g/ml}$): Se tomó una alícuota de 3 ml de la solución patrón y aforó a 50 ml con medio de dilución.
- f. Nivel 80% (24 $\mu\text{g/ml}$): Se tomó de la solución patrón una alícuota de 2 ml y se aforó a 25 ml con medio de dilución.
- g. Nivel 100% (30 $\mu\text{g/ml}$): Se tomó de la solución patrón una alícuota de 1 ml y se aforó a 10 ml con medio de dilución.
- h. Nivel 120% (36 $\mu\text{g/ml}$): Se tomó de la solución patrón una alícuota de 3 ml y se aforó a 25 ml con medio de dilución.
- i. Para cada nivel se tomaron las alícuotas respectivas por triplicado.
- j. Se filtró cada solución en membrana y aplicó 20 μl con jeringa al cromatógrafo.

6.4.2.1.2. Precisión del Sistema

Se esquematiza en el Diagrama 3.

- a. Se pesó 30 mg de Lisinopril estándar primario, se colocó en un matraz volumétrico de 100 ml y se aforó con medio de dilución.

- b. De la solución anterior se tomó una alícuota de 1 ml y llevó a 10 ml en matraz volumétrico para tener una concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$ correspondiente al nivel del 100%, se agitó y colocó en el baño de ultrasonido cinco minutos. Se repitió toda esta operación 6 veces, menos la pesada.
- c. Se filtró en membrana para solventes y aplicó 20 μl con jeringa al cromatógrafo.

6.4.2.2. Evaluación del Método

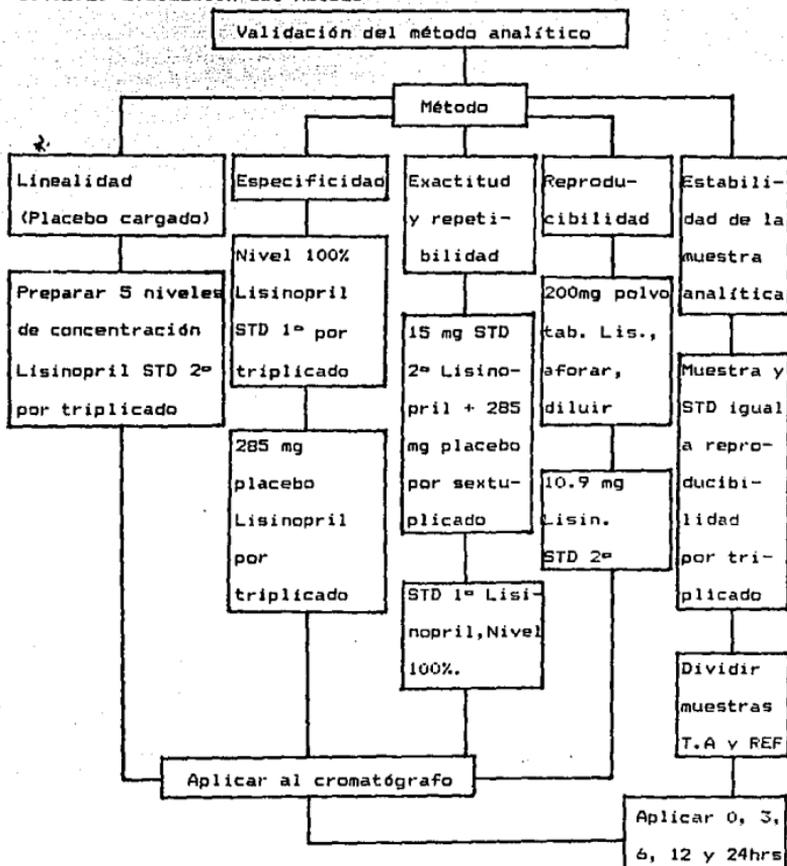


Diagrama 4. Evaluación del método analítico.

6.4.2.2.1. Linealidad del Método

- a. Se seleccionaron cinco niveles de concentración: 40, 60, 80, 100 y 120%, con 3 replicas cada nivel.
- b. Se preparó suficiente fase móvil de acetonitrilo-agua pH 2, 45:55.
- c. Nivel 40%: Se pesó 6 mg de Lisinopril estándar secundario más 285 mg de placebo para Lisinopril, tabletas; en seguida se colocó en un matraz volumétrico de 10 ml, agregar 5 ml de medio de dilución, se colocó en el baño de ultrasonido durante 5 minutos, se aforó a 10 ml y filtró por gravedad con papel watman No. 1, se tomó una segunda alícuota de 2 ml y aforó a 10 ml, se filtró por membrana para solventes, aplicó 20 μ l al cromatógrafo.
- d. Nivel 60%: Se pesó 9 mg de Lisinopril estándar secundario más 285 mg de placebo para Lisinopril, tabletas; se colocó en un matraz volumétrico de 10 ml y se prosiguió de igual forma como en el nivel del 40%.
- e. Nivel 80%: Se pesó 12 mg de Lisinopril estándar secundario más 285 mg de placebo para Lisinopril, tabletas; se colocó en un matraz volumétrico de 10 ml y se prosiguió de igual forma como en el nivel del 40%.
- f. Nivel 100%: Se pesó 15 mg de Lisinopril estándar secundario más 285 mg de placebo para Lisinopril, tabletas; se colocó en un matraz volumétrico de 10 ml y se prosiguió de igual forma como en el nivel del 40%.
- g. Nivel 120%: Se pesó 18 mg de Lisinopril estándar secundario más 285 mg de placebo para Lisinopril, tabletas; se colocó en un matraz volumétrico de 10 ml y se prosiguió de igual forma como

en el nivel del 40%.

- h. Para cada nivel se repitió la pesada por triplicado y se aplicó por triplicado al cromatógrafo.

6.4.2.2.2. Especificidad del Método

- a. Se pesó 15 mg de Lisinopril estándar primario (Nivel 100%), se agregó 5 ml de medio de dilución, se colocó en el baño de ultrasonido 5 minutos, se aforó a 10 ml, se filtró por gravedad, se tomó una alícuota de 1 ml y aforó a 10ml, se tomó una segunda alícuota de 2 ml y se aforó a 10 ml, se filtró con membrana para solventes y se aplicó 20 μ l al cromatógrafo.
- b. Se pesó 285 mg de placebo para Lisinopril, tabletas; agregó 5 ml de medio de dilución, se colocó en el baño de ultrasonido 5 minutos, se filtró por gravedad, se tomó una alícuota del filtrado de 1 ml y aforó a 10 ml, se tomó una segunda alícuota de 2 ml y aforó a 10 ml, se filtró y aplicó 20 μ l. Se hizo la repetición de toda esta operación por triplicado.

6.4.2.2.3. Exactitud y Repetibilidad al 100% del Método

- a. Se pesó 15 mg de Lisinopril estándar secundario más 285 mg de placebo, se colocó en un matraz volumétrico de 10ml, se agregó 5 ml de medio de dilución, se colocó en el baño de ultrasonido 5 minutos, se aforó a 10 ml, se tomó una alícuota de 1 ml y se aforó a 10ml, se tomó de esta última solución una alícuota de 2 ml y se aforó a 10 ml, se agitó, se filtró y aplicó 20 μ l al

cromatógrafo.

- b. Se hizo toda la operación por sextuplicado para exactitud y para repetibilidad.

Se comparó contra un estándar primario de Lisinopril correspondiente al nivel del 100%.

6.4.2.2.4. Precisión (Reproducibilidad)

- a. Se realizó por triplicado, con dos analistas diferentes y en dos días diferentes.

- b. Se pesaron 20 tabletas de Lisinopril y se muelen en un mortero.

- c. Se pesó 200mg del polvo obtenido de las tabletas, se transfiere a un matraz de 10 ml, agregó 5 ml de medio de dilución, colocó en el baño de ultrasonido 5 minutos, se aforó a 10 ml, filtró por gravedad, se tomó del filtrado una alícuota de 1 ml y aforó a 10 ml, de esta última solución se tomó una alícuota de 3 ml y se aforó a 10 ml, se agitó, se filtró y aplicó 20 μ l al cromatógrafo.

- d. Se pesó 10.9 mg de Lisinopril estándar secundario, se transfiere a un matraz volumétrico de 10 ml y se prosiguió de igual forma que en la preparación de las muestras hasta su aplicación.

6.4.2.2.5. Estabilidad de la muestra

- a. Se prepararon las muestras de la misma forma como se prepararon para reproducibilidad (tres pesadas independientes).

- b. Se preparó un estándar secundario de lisinopril de igual forma como se preparó en reproducibilidad.

- c. Se aplicó el estándar y las muestras (20 μ l) al cromatógrafo.

- d. Se dividió cada muestra en dos partes: una para temperatura ambiente protegida de la luz y la otra para refrigeración protegida de la luz; se dejó reposando cada muestra en su respectiva condición-tiempo.
- e. Después de transcurridas tres horas, se aplicó al cromatógrafo cada muestra, incluido el estándar y se dejó reposar las mismas muestras hasta las 24 horas en su respectiva condición-tiempo.
- f. Después de transcurridas las 24 horas, se aplicó cada muestra nuevamente al cromatógrafo de la misma manera como se hizo inicialmente; incluido también el estándar.

7. RESULTADOS

7.1. MODIFICACION DEL METODO ANALITICO

Los resultados obtenidos, en los ensayos diseñados para encontrar los parámetros más adecuados, que ofrezcan un método analítico igualmente eficiente y eficaz para el trabajo cotidiano en el laboratorio que el señalado en la literatura son:

- Fase móvil: Acetonitrilo-H₂O pH 2 45:55
- Medio de dilución: Acetonitrilo-H₂O pH 2 45:55
- Columna CB No. 261 de 10 μ m de porosidad x 25 cm de longitud, de acero inoxidable
- Velocidad de flujo: 1.0 ml/min
- Volumen de aplicación: 20 μ l
- Longitud de onda: 210 nm
- Tiempo de corrida: 5 minutos
- Tiempo de retención: 3.20 a 3.60 minutos.

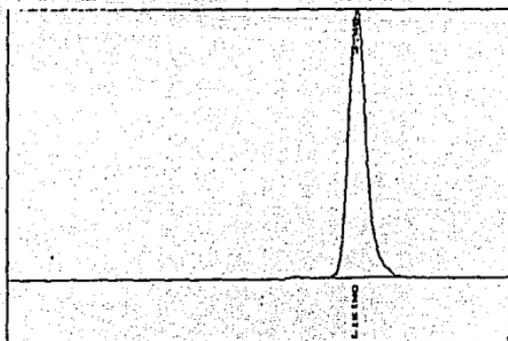


Figura 4. Cromatograma obtenido como resultado de los parámetros arriba mencionados para la modificación del método.

De manera ejemplificativa y comparativa se presentan algunos cromatogramas de los ensayos para encontrar la fase móvil, que se descartaron para establecer el método analítico.

```

LIBINOPRIL          Processed: 12-03-1992 15:30:10, segment 2, cycle 7
RAW DATA SAVED IN FILE C:\NDP7.P18

***** AREA PERCENT REPORT *****

***** 12-03-1992 15:30:10 Version 5.1 *****
* Sample Name: LIBINOPRIL                               Data File: C:\NDP7
* Date: 12-03-1992 15:47:12 Method: LIB
* Interface: 16 Cycles: 7 Operator: NGA Channels: 0 Vials: 4,4,0
* Starting Peak Width: 15 Threshold: 30 Area Threshold: 4500
* Instrument Type: DETECTOR LC200 Column Type: Poraguard C18, 5um
* Solvent Description: ACETONITRILE-H2O 45:55
* Conditions: 0.2 ml/min - No. column: 1220
* Detector 01: 210 nm Detector 02: LFI1
* Misc. Information: LIBE
Starting Delay: 0.00 Run Time: 13.00

Pk  Ret   Peak   Area  D Peak   Normalized Area/
No.  Time   Area   X L   Ht.      X      Height
-----
1    7.650   961021 100.0000 1 46738 100.000 20.6

Total Area: 961021 Area Rejects: 0 One sample per 1.500 sec.

Area, time, and heights stored in: C:\NDP7.ATB
Data File = C:\NDP7.P18 Printed on 12-03-1992 at 15:30:55
Start time: 0.00 min. Stop time: 13.00 min. Offset: 0 mv.
Low Value: 5666 uv High Value: 55005 uv Scale factor: 1.0

```

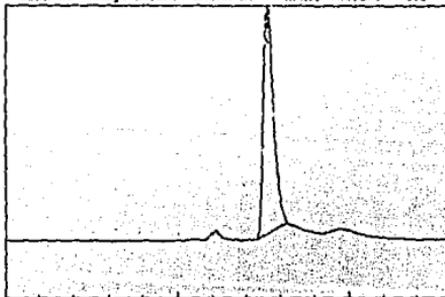


Figura 5. Cromatograma obtenido con una fase móvil de acetonitrilo-H₂O 45-55, columna C18, 5 μ m, velocidad de flujo de 0.2 ml/min, concentración de 50 μ g/ml, tiempo de retención de 7.65 min, es por este último parámetro por lo que se descartan estas condiciones.

7.2. VALIDACION DEL METODO ANALITICO

7.2.1. Evaluación del Sistema

7.2.1.1. Linealidad del sistema

Modelo estadístico: $Y_{i,j} = \alpha_0 + \beta_0 X_{i,j} + E_{j,i}$

Cantidad adicionada	Respuesta obtenida
X (μg)	Y (ABC)
12.0	591569
12.0	592091
12.0	599825
18.0	884559
18.0	889705
18.0	885299
24.0	1181315
24.0	1186291
24.0	1186500
30.0	1478486
30.0	1477810
30.0	1483911
36.0	1775215
36.0	1780217
36.0	1772048

Tabla 5. Resultados de Linealidad del sistema en Area Bajo la Curva

7.2. VALIDACION DEL METODO ANALITICO

7.2.1. Evaluación del Sistema

7.2.1.1. Linealidad del sistema

$$\text{Modelo estadístico: } Y_{i,j} = \alpha_0 + \beta_0 X_i + \epsilon_{j,i}$$

Cantidad adicionada	Respuesta obtenida
X (μg)	Y (ABC)
12.0	591569
12.0	592091
12.0	599825
18.0	884559
18.0	888705
18.0	885299
24.0	1181315
24.0	1186291
24.0	1186500
30.0	1478486
30.0	1477810
30.0	1483911
36.0	1775215
36.0	1780217
36.0	1772048

Tabla 5. Resultados de Linealidad del sistema en Area Bajo la Curva

Cálculos:

Regresión lineal:

Prom. $X = 24$

Prom. $Y = 1184256.067$

$X_{\text{prom}} = 8.4852$

$Y_{\text{prom}} = 418130.6424$

$X_{\text{prom}^2} = 8.7831$

$Y_{\text{prom}^2} = 432806.3334$

$\Sigma X^2 = 9720$

$\Sigma Y^2 = 2.36459 \times 10^{13}$

$\Sigma X = 360$

$\Sigma Y = 17763841$

$(\Sigma X)^2 = 129600$

$\Sigma XY = 479549988$

$n = 15$

Pendiente β : Prueba de hipótesis:

$H_0: \beta = 1$

$H_a: \beta \neq 1$

$\beta = 0.9988$

Ordenada al origen α : Prueba de hipótesis:

$H_0: \alpha = 0$

$H_a: \alpha \neq 0$

$\alpha = 0.0331$

Desviación estándar de la regresión $S_{v/x}$:

$S_{v/x} = 0.0674$

Intervalo de confianza de la pendiente β :

$0.9942 \leq \beta \leq 1.0033$

t de Student calculada para β :

$t_{\text{calculada}} = -0.5765$

Intervalo de confianza de la ordenada al origen α :

$-0.0827 \leq \alpha \leq 0.1489$

t de Student calculada para α :

$$t_{\text{calculada}} = 0.6183$$

Coefficiente de determinación r^2 :

$$r^2 = 0.9999$$

Coefficiente de correlación r :

$$r = 0.9999$$

Ecuación de la recta:

$$Y = (0.9988X) + 0.0331$$

Criterio: El sistema carece de error sistemático proporcional consistente y constante.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA
REGRESION	1	1077.3690	1077.3690	224983.8000
ERROR DE REGRESION	13	0.0713	0.0048	
FALTA DE AJUSTE	3	0.0193	0.0064	1.2363
ERROR PURO	10	0.0520	0.0052	

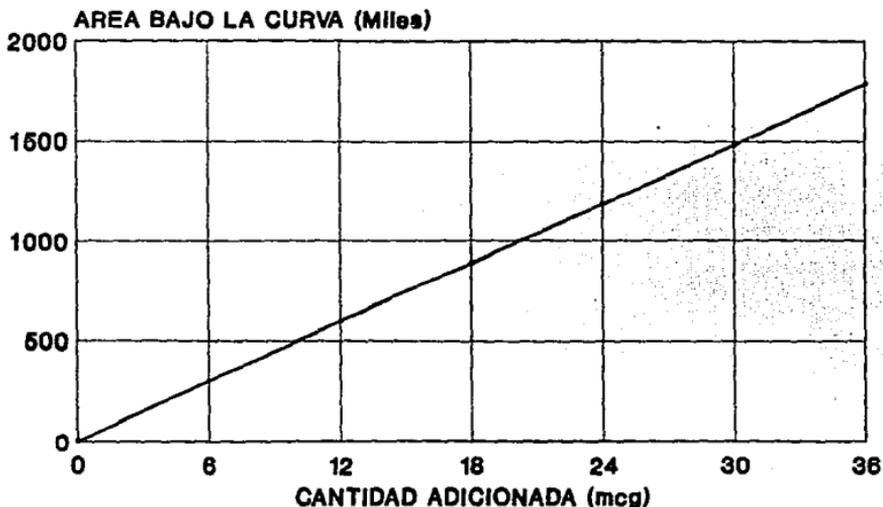
Tabla 6. Resultados de análisis de varianza de la linealidad del sistema.

Criterio: $F_r > F_{cr}$ y $F_{ra} < F_{cra}$
 $224983.8000 > 9.07$ y $1.2363 < 3.71$

Por lo tanto, se considera que el modelo lineal representa de manera correcta la relación entre cantidad adicionada con área bajo la curva.

LINEALIDAD DEL SISTEMA

LISINOPRIL, CLAR



Gráfica 1. REPRESENTACION LINEAL DEL SISTEMA.

B=0.9988, A=0.0331, r²=0.9999

***** AREA PERCENT REPORT *****

***** 12-01-1995 16:54:52 Version 5.1 *****
 * Sample Name: 110100PRIL Data File: GroupB10 *
 * Date: 10-19-1995 14:29:22 Method: L18 *
 * Interface: 16 Cycles: 610 Operator: BSO (Sample: 0' 01:08; R.A. *
 * Starting Peak Width: 15 Threshold: 30 Area Threshold: 4500 *

 * Instrument type: DETECTOR LC290 Column type: PERSPIHER C 8 10MG *
 * Solvent description: ACN:H2O:pl 2 45:55 *
 * Conditions: 1.0 ml/min - No. columns 261 20micl *
 * Detector 0: 210 nm Detector 1: LC290 *
 * Misc. Information: LINES:LINEA,STD,100% *

 Starting Delay: 0.00 Run Time: 5.00

PK	Ret	Peak	Area	%	Peak	Normalized	Area/
No.	Time	Area	%	L	H.	%	Height
1	3.476	1483911	100.0000	1	1.21953	100.000	12.2

Total Area: 1483911 Area Reject: 0 One sample per 1.500 sec.

Data File: GroupB10.P18 Printed on 12-01-1995 at 16:54:54
 Start Time: 0.00 min. Stop Time: 5.00 min. Offset: 0 mv.
 Low Value: 7208 uv High Value: 12773 uv Scale factor: 1.0

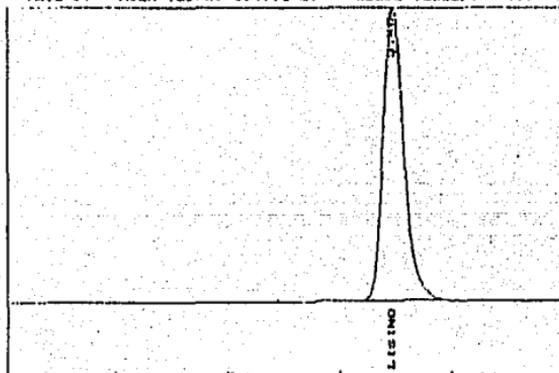


Figura 9. Cromatograma tipo obtenido en la linealidad del sistema para Lisinopril, por CLAR.

7.2.1.2. Precisión del sistema (Repetibilidad)

Cantidad adicionada X ($\mu\text{g/ml}$)	Cantidad recuperada Y ($\mu\text{g/ml}$)	% Recuperado
30	29.8873	99.6245
30	30.2281	100.7603
30	29.8661	99.5538
30	29.8787	99.5958
30	29.9378	99.7928
30	30.2017	100.6725

Tabla 7. Resultados de precisión del sistema.

Cálculos: $Y_{\sigma_{n-1}} = 0.1684$

Prom. Y = 29.9999

C.V._{exp.} = 0.5615

Criterio: C.V._{exp.} < C.V._{t.}

0.5615 < 1.5

por lo tanto, el sistema se considera preciso.

7.2.2. Evaluación del Método

7.2.2.1. Linealidad del método

$$\text{Modelo estadístico: } Y_{i,j} = \alpha_0 + \beta_0 X_i + \epsilon_{j,i}$$

Cantidad adicionada X (mg)	Cantidad recuperada Y (mg)	% Recuperado
6.0	5.9657	99.4283
6.0	5.9570	99.2833
6.0	5.9837	99.7290
9.0	8.9816	99.7955
9.0	9.1211	101.3455
9.0	9.0860	100.9555
12.0	12.0434	100.3616
12.0	11.8615	98.8458
12.0	12.0562	100.4683
15.0	14.9385	99.5900
15.0	14.8060	98.7066
15.0	15.1039	100.6926
18.0	18.2670	101.4833
18.0	18.0118	100.0655
18.0	18.3080	101.7111

Tabla 8. Resultados de linealidad del método en % recuperados.

Cálculos:

Regresión lineal:

Prom. $X = 12$

Prom. $Y = 12.0327$

$X\sigma_n = 4.2426$

$Y\sigma_n = 4.2924$

$X\sigma_{n-1} = 4.3915$

$Y\sigma_{n-1} = 4.4430$

$\Sigma X^2 = 2430$

$\Sigma Y^2 = 2448.1850$

$\Sigma X = 180$

$\Sigma Y = 180.4914$

$(\Sigma X)^2 = 32400$

$\Sigma XY = 2438.9583$

$n = 15$

$\Sigma Y^2 = 7344.1629$

Pendiente β : Prueba de hipótesis:

$H_0: \beta = 1$

$H_a: \beta \neq 1$

$\beta = 1.0113$

Ordenada al origen α : Prueba de hipótesis:

$H_0: \alpha = 0$

$H_a: \alpha \neq 0$

$\alpha = -0.1033$

Desviación estándar de la regresión $S_{v/x}$:

$S_{v/x} = 0.1293$

Intervalo de confianza de la pendiente β :

$0.9943 \leq \beta \leq 1.0283$

 t de Student calculada para β :

$t_{conf} = 1.4401$

Intervalo de confianza de la ordenada al origen α :

$-0.3198 \leq \alpha \leq 0.1132$

t de Student calculada para α :

$$t_{0.05, 13} = -1.0309$$

Coefficiente de determinación r^2 :

$$r^2 = 0.9992$$

Coefficiente de correlación r:

$$r = 0.9996$$

Ecuación de la recta:

$$Y = (1.0113x) + (-0.1033)$$

Criterio: El método carece de error sistemático proporcional consistente y constante.

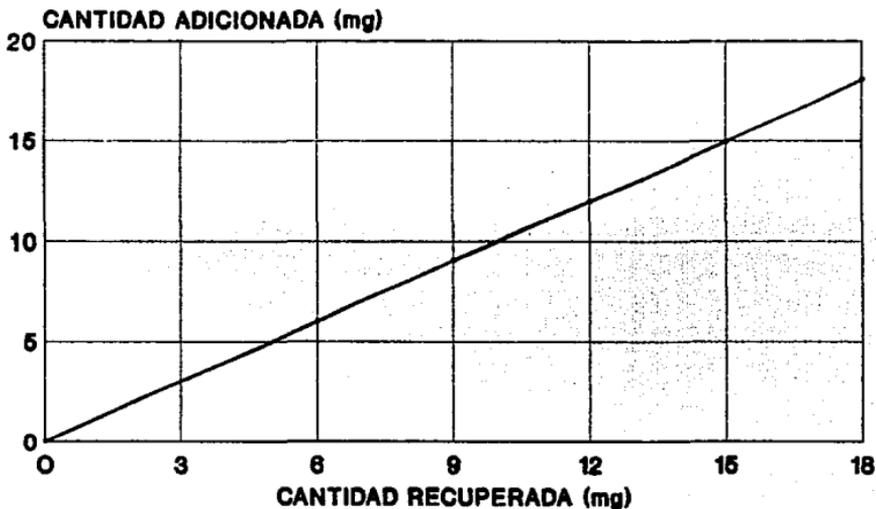
FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA
REGRESION	1	276.1565	276.1565	16497.6300
ERROR DE REGRESION	13	0.2192	0.0167	
FALTA DE AJUSTE	3	0.0884	0.0295	2.2512
ERROR PURD	10	0.1309	0.0131	

Tabla 9. Resultados de análisis de varianza de la linealidad del método.

Criterio: $F_r > F_{cr}$ y $F_{fa} < F_{cfa}$
 16497.6300 > 9.07 y 2.2512 < 3.71

LINEALIDAD DEL METODO

LISINOPRIL, CLAR



Gráfica 2. REPRESENTACION LINEAL DEL METODO.

$B=1.0113$, $A=-0.1033$, $r^2=0.9992$

Por lo tanto, se considera que el método lineal representa de manera correcta la relación entre cantidad recuperada con cantidad adicionada.

```

***** AREA PERCENT REPORT *****
*****
***** 10-21-1993 08:14:03 Version 5.1 *****
# Sample Name: L1913021L          Data File: Unop/52
# Date: 10-17-1993 19:42:56 Method: LIB
# Interface: 16 Cycles: 752 Operator: RAI Llanos/RS U       Vials: N.A.
# Starting Peak Width: 15 Threshold: 50 Area Threshold: 4500
# Instrument Type: DELTA 111290          Column Type: Percolon C 10, 10um
# Solvent Description: ACN:100 µl x 43155
# Conditions: 1.0 ml/min CLARAR No. 261
# Detector 1: Z1000          Detector 2: L11290
# Misc. Information: L1913021L, FBI, 1202
# Starting Delay: 0.00          Run Time: 5.00
*****

Ph  Ret      Peak      Area  L  Peak      Normalized Area
No.  Time      Area  T  Ht.      %      Height
-----
  1   3.350    1913021 100.0000 1137780    100.000    15.7

Total Area:      1913021 Area Reject:      0 One sample per: 1.500 sec.

Data File: Unop/52,119 Printed on 10-21-1993 at 08:14:15
Start Time: 0.00 min. Stop Time: 5.00 min. Offset: 0.00
Low Value: 0.073 uv High Value: 14.252 uv Scale Factor: 1.0

```

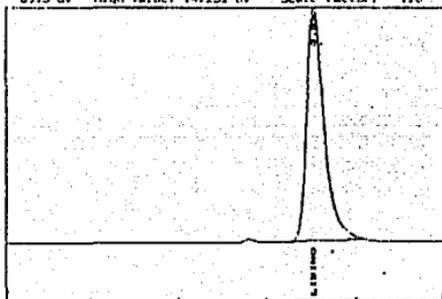


Figura 10. Cromatograma tipo obtenido en la linealidad del método para Lisinopril, por CLAR.

7.2.2.2. Especificidad del método

$\% R = 0$, por lo tanto, no existe interferencia para la determinación de Lisinopril en tabletas por parte del placebo; luego entonces, el método se considera específico.

```

***** (ALIAS) PERLINA REPUBLIC *****
*****
***** 10-19-1995 11:39:50 Version 5.1 *****
* Sample Name: LISINAPRIL                               Date File: 101902
* Date: 10-10-1995 14:39:19 Method: LIS
* Interface: LC1000i 602 Operator: ADM Channels: 0  Voltage: 11.0
* Starting Peak Width: 15 Threshold: 30 Area Threshold: 4500
*****
* Instrument Type: HPLC(LC100) Columns: Type: Description: C18, 150cm
* Solvent Description(s): A:ETANOL:B:0.1MNH4Cl pH 2.4:50:50
* Conditions: Column: C18(150) No. 261
* Detector: 0: ZINUS Detector: 1: LC100
* High. Interactions:
*****
Starting Delay: 0.00                               Run Time: 3.00

Pl. Int. Peak Area U Peak Normalized Area
No. Time Area % I Rt. % Height
-----
10191 1995 0 Area Rejects 0 this sample per 1.240 sec.

Date File = 101902.P18 Printed on 10-19-1995 at 11:39:15
Start Time 14:30 min. Stop Time 3:00 min. Inlets 0 mV.
Full Scale 100 millivolts

```

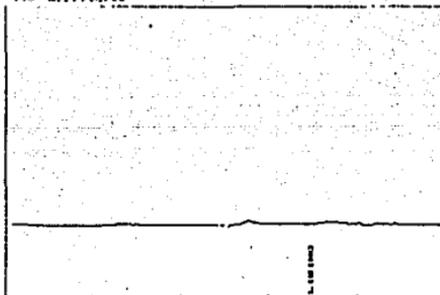


Figura 11. Cromatograma obtenido en la determinación de la especificidad del método, en el cual no se detecta interferencia alguna.

7.2.2.3. Exactitud y Repetibilidad al 100%

Cantidad adicionada X (mg)	Cantidad recuperada Y (mg)	% Recuperado
15	15.1154	100.7693
15	15.2124	101.4160
15	14.9546	99.6973
15	14.9595	99.7300
15	15.0674	100.4493
15	15.2688	101.7920

Tabla 10. Resultados de exactitud y repetibilidad al 100%.

Cálculos:

Prom. X = 15

Prom. Y = 100.6423

EX² = 1350

Y_{err} = 0.7851

EX = 90

Y_{err-1} = 0.8601

n = 6

EY² = 60776.9545

EY = 9057.8085

EY = 603.8539

Criterios: C.V._{exp.} < 1.5

C.V._{exp.} = 0.8546

t_{0.975, 5} < t(0.975, 5)

1.8409 < 2.5706

Intervalo de confianza para el % Recuperado

99.7454 < %R < 101.5392

***** AREA PERCENT REPORT *****

***** 10-21-1993 08:38:55 Version 5.1 *****

* Sample Name: LISINAPRIL Data File: Ginp705 *

* Date: 10-19-1993 17:52:40 Method: LIS *

* Interfac: 16 Cycle#: 705 Operator: NGA Channel#: 0 Vial#: N/A *

* Starting Peak Width: 15 Threshold: 50 Area Threshold: 4500 *

***** Instrument Type: DETECTOR LC290 Column Type: Porosphare C 10,10mc *****

* Solvent Description: NGRH2O pH 2 45:55 *

* Conditions: 1.0 ml/min COLUMN No. 261 *

* Detector 0: 210nm Detector 1: LC290 *

* Misc. Information: LOI:EXACTITUDE 1001 *

***** Starting Delay: 0.00 Run time: 5.00 *****

PK No.	Ret Time	Peak Area	Area %	Height	Normalized Area %	Area Height
1	3.725	157942	100.0000	1 96948	100.000	16.3

Total Area: 157942 Area Reject: 0 One sample per 1.500 sec.

Data File = Ginp705.PIS Printed on 10-21-1993 at 08:39:15

Start time: 0.09 min. Stop time: 5.05 min. Offset: 0 mv.

Low Value: 5104 uv High Value: 105925 uv Scale factor: 1.0

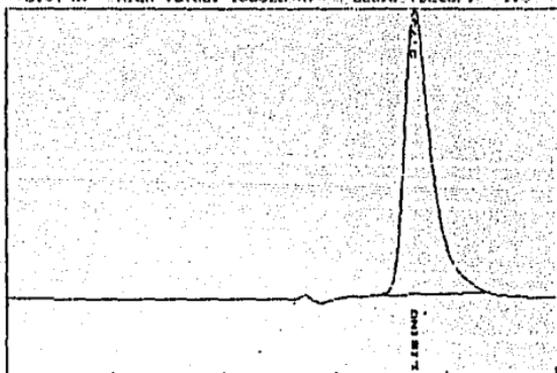


Figura 12. Cromatograma obtenido en la determinación de exactitud del método, en el que solo se identifica el pico principal del Lisinopril.

7.2.2.4. Precisión (Reproducibilidad)

Modelo estadístico: $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \delta_{j(i)} + \epsilon_{k(ij)}$

Hipótesis planteada:

Analista: $H_0: \alpha = \alpha_0$ Día: $H_0: \delta = \delta_0$ $H_a: \alpha \neq \alpha_0$ $H_a: \delta \neq \delta_0$

		ANALISTA	
		I	II
		99.3435	100.7788
D	I	98.4228	99.6102
		99.4521	98.8389
	I		
		100.3311	100.6426
A	II	98.8437	100.2327
		99.5972	99.8903

Tabla 11. Resultados de reproducibilidad en porcentos recuperados.

CALCULOS: $Y_{11.} = 297.2184$ $Y_{1..} = 595.9904$ $\text{Prom.} Y = 99.6652$ $Y_{12.} = 298.7720$ $Y_{2..} = 599.9931$ $n = 12$ $Y_{21.} = 299.2275$ $Y_{...} = 1195.9835$ $Y_{22.} = 300.7656$ $(Y_{...})^2 = 119204.1128$ $EY_{i,j.}^2 = 357600.5282$ $EEY_{i,jk}^2 = 1430376.5320$

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F _{cal}	F _t
ANALISTA	1	1.3750	1.3750	3.4851	18.51
DIA	2	0.7891	0.3945	0.8012	4.46
ERROR	8	3.9395	0.4924		

Tabla 12. Análisis de varianza para precisión del método.

CRITERIO: $F_{cal} < F_{t}$ y $F_{cal} < F_{d}$
 $3.4851 < 18.51$ y $0.8012 < 4.46$
D.E._{exp.} = 0.7427
C.V._{exp.} = 0.7473 < C.V._{t.} = 2%

El método analítico es reproducible por los analistas y también es reproducible en distintos días por un mismo analista; es decir, el analista no presenta efecto sobre la valoración y no existe efecto de los días para un analista en la valoración. Por lo tanto, se considera que el método es reproducible.

7.2.2.5. Estabilidad de la muestra analítica

MUESTRA	INICIAL	CONDICION-TIEMPO			
		TEMPERATURA AMBIENTE-HORAS			
		3	6	12	24
1	100	100.6558	100.4609	101.5588	102.0390
2	100	99.9436	100.1985	101.5328	100.9943
3	100	100.3865	99.7553	101.5464	102.0447
(Y _{1..})		100.3286	100.1411	101.5460	101.6926
Y _{1..}		300.9859	300.4233	304.6380	305.0778
RESULTADO		ESTABLE	ESTABLE	INESTABLE	INESTABLE

Tabla 13. Estabilidad de la muestra analítica en % recuperado para temperatura ambiente.

MUESTRA	INICIAL	CONDICION-TIEMPO			
		REFRIGERACION-HORAS			
		3	6	12	24
1	100	100.1006	100.5962	102.1052	102.5412
2	100	99.8840	99.6589	101.0814	102.2281
3	100	100.7870	100.0124	101.4876	101.8657
(Y _{1..})		100.2572	100.0891	101.5580	102.2116
Y _{1..}		300.7716	300.2673	304.6740	306.6348
RESULTADO		ESTABLE	ESTABLE	INESTABLE	INESTABLE

Tabla 14. Estabilidad de la muestra analítica en % recuperado para refrigeración.

CALCULOS:

	TEMPERATURA AMBIENTE	REFRIGERACION
$EY_{t,1} =$	122242.4802	122493.4921
$EY_{t,2} =$	366723.4463	367475.1537
t	4	4
r	3	3
SCe	1.3314	1.0000
MCE	0.1664	0.1250
gle	8	8
t_{de}	3.02	3.02

t_{DCA1}		
HORAS	TEMPERATURA AMBIENTE	REFRIGERACION
3	0.9867	0.8911
6	0.4237	0.3087
12	4.6426	5.3984
24	5.0828	7.6632

Tabla 15. t de Dunnet calculada para cada condición-tiempo.

INTERVALO DE CONFIANZA				
HORAS	TEMPERATURA AMBIENTE		REFRIGERACION	
	L.S.I.	L.I.I.	L.S.I.	L.I.I.
3	1.3342	0.6770	1.1287	0.6143
6	1.1467	0.8645	0.9606	0.7824
12	2.5516	0.5404	2.4295	0.6865
24	2.6982	0.6870	3.0831	1.3401

Tabla 16. Intervalos de confianza para cada condición-tiempo de la t de Dunnet calculada.

B. ANALISIS DE RESULTADOS

La modificación del método analítico para la determinación de Lisinopril en tabletas, por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución se realizó rigiéndose por las necesidades del laboratorio y por los parámetros mínimos establecidos por el mismo, de igual manera se efectuó la validación del método analítico; considerando también, los reglamentos mínimos establecidos para la validación de métodos analíticos editados por dependencias oficiales.

Las modificaciones que se hicieron al método, fueron eficaces y eficientes, ya que con éste se puede detectar muy bien el pico principal del lisinopril en el cromatograma y sobre todo que tiene un tiempo de corrida corto (5 minutos); lo que ayuda en gran medida al análisis cotidiano en el laboratorio.

La fase móvil que se encontró más adecuada al método compuesta de acetonitrilo-agua pH 2 45:55, es una mezcla de solventes no polar-polar, lo que hizo posible la separación en la práctica de la aplicación del método, aunado a esto, fue de mucha ayuda el hecho de que el medio de dilución fuera el mismo que la fase móvil, ya que con esto se evitan interferencias e interacciones entre las moléculas que forman parte con la muestra problema.

Con la columna utilizada C8 (octilsilano) que tiene una porosidad de 10 μm , mayor a la reportada en la literatura (5 μm), con la fase móvil ya mencionada y a una velocidad de flujo de 1.0 ml/min, con una longitud de onda de 210 nm, se obtuvo un

cromatograma en el que se detecta un solo pico correspondiente al lisinopril, que no está "coleado", se obtuvo un tiempo de retención de 3.20 a 3.60 minutos, ofreciendo esto un tiempo de corrida corto (5 minutos); lo que indica que la columna presentó una buena eficacia, llevando esto a una mejor separación de la muestra.

En lo referente a la validación del método analítico, con los resultados obtenidos, se encontró que el sistema es lineal y preciso, (Tablas 5, 6, 7 Gráfica 1) ya que existe una relación lineal entre cantidad adicionada y la respuesta obtenida por el equipo (CLAR), resultando una pendiente y una ordenada al origen satisfactorias para un modelo lineal simple; y se considera un sistema preciso porque cumple con el criterio de aceptación del coeficiente de variación en las condiciones establecidas ($0.5615 < 1.5$).

Para la evaluación del método analítico, los resultados detectan una relación lineal entre cantidad adicionada y cantidad recuperada, (Tabla 8, 9) considerando un modelo lineal simple, por lo tanto, el método es lineal; en los cromatogramas obtenidos en el estudio de especificidad (Figura 11) no se detecta ningún tipo de interferencia, ni por productos de degradación ni por excipientes de la formulación de las tabletas, por lo que puede considerarse para análisis rutinarios y también posiblemente como indicativo de estabilidad.

Observando los resultados, se encuentra que el método es exacto y repetible al 100%, (Tabla 10) por lo tanto, puede usarse para la determinación y cuantificación de lisinopril.

Al determinarse que el método es reproducible, (Tablas 11, 12) se puede aplicar al análisis de laboratorio por toda persona que labore como químico analista y en cualquier día.

En los resultados de estabilidad de la muestra se detectó que ésta es estable solo durante 6 horas ya sea a temperatura ambiente o en refrigeración y protegidas de la luz; a las 12 y 24 horas la muestra es inestable porque aumenta estadísticamente la concentración del principio activo en la misma (Tablas 13, 14, 15, 16), esto es probablemente debido a que el punto de evaporación del acetonitrilo es muy bajo o en el caso de las muestras en refrigeración; el cambio de temperatura hace que el acetonitrilo se evapore rápidamente, o probablemente que el principio activo se llegase a precipitar, esto fue observado como una evidencia experimental.

9. CONCLUSIONES

1. El método analítico bajo las condiciones establecidas en los resultados, es útil para la determinación de lisinopril, tabletas por CLAR.
2. La respuesta encontrada por el sistema es lineal y preciso.
3. Dentro de las condiciones de operación establecidas, estadísticamente, el método es lineal, específico, exacto, preciso (repetible y reproducible) y la muestra analítica es estable en un término de 6 horas bajo las condiciones de preparación establecidas.
4. El método que aquí se propone es específico para pruebas cotidianas en el laboratorio de control de calidad y posiblemente como indicativo de estabilidad ya que no se detectó interferencia o presencia de productos de degradación o con los excipientes de la formulación.

10. SUGERENCIAS

1. Realizar un estudio de estabilidad de la muestra analítica más cuidadoso, es decir, controlando la temperatura ambiental y de refrigeración, aumentando el tiempo en cada condición; y sobre todo manejar las muestras con suma precaución para evitar la posible evaporación del acetonitrilo del medio de dilución, para que de esta forma se tenga plena seguridad de los resultados obtenidos en esta prueba, y de ser posible llevar a cabo un estudio de manejo de las muestras en el que se detecte, tanto el mejor material que pueda ser usado como la forma de manejar las muestras para evitar pérdidas del activo o de tiempo al analizar el producto.
2. Realizar un estudio de especificidad completo, intentando encontrar los productos de degradación que se pudieran obtener por fotólisis, hidrólisis ácida o básica, para que se tenga la seguridad de que funcione como indicativo de estabilidad.
3. Plantear un estudio de estabilidad acelerada bajo condiciones de análisis de tiempo cero, treinta, sesenta y noventa días.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. U.S.P. XXII-NF, Third Supplement; (1990), 2355-56
2. U.S.P. XXII-NF, Fourth Supplement; (1990), 2475-76
3. Martindale, "The Extra Pharmacopeia"; 29^a.ed., Ed. James E.F. Reynolds., Published by: The Pharmaceuticals Press; London (1989), pp. 487.
4. "Diccionario de Especialidades Farmacéuticas"; 38^a ed., Ediciones PLM.; México, (1992), pp. 952-956.
5. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, SSA; México, (1992), pp. 1-10.
6. Guerra, J.; "Validation of Analytical Methods by FDA Laboratories"; Pharm. Technol.; 10 (3); pp. 74-84, 1986.
7. Connors, K. A.; "Curso de Análisis Farmacéutico"; 2^a. ed., Ed. Reverté; España, (1980), pp. 403-451.
8. Meyer, V.R.; "Practical High-performance Liquid Chromatography"; Ed. John Wiley & Sons; New York, (1988), pp. 1-39.

9. Jimenez, V. E.; "Un acercamiento a la validación de los métodos analíticos".; Pharma News.; 1 (5): pp. 16-17, 1990.
10. Jimenez, V. E.; "Parámetros estadísticos y procedimiento de validación. criterios de aceptación".; Pharma News.; 1 (6): pp. 15-20, 1990.
11. Sánchez, M. C. A. y Mendivil, V. P.; "El concepto actual en acabados sanitarios".; Pharma News.; 1 (3): pp. 25-26, 1990.
12. Johnston, D. y Duffin, D.; "Pharmacokinetics profiles of single and repeat doses of lisinopril and enalapril in congestive-heart-failure".; American Journal of Cardiology.; 70 (10): OCTB pp.C151-C153, 1992.
13. Ajayi, A. A. y otros.; "Pharmacodynamics and pharmacokinetics of enalapril and lisinopril".; Int. J. Clin. Pharmacol. Res.; 5 (6): pp. 419-427, 1985.
14. Lual.; "Componentes para un programa de validación de métodos analíticos".; Pharma News.; 4 (5): pp. 39-40, 1993.
15. Tortora, G. J. y Anagnostakos, N.P.; "Principios de Anatomía y Fisiología".; 3ª ed., Ed. Harla, México, (1984), pp. 405, 507-511.

16. Litter, M.; "Farmacología Experimental y Clínica".; 6a. ed., Ed. Ateneo, México, (1980). pp. 678-728.
17. Hwang, Y. S.; Yen, H. W.; "Efficacy of Once-Daily Lisinopril Monotherapy in Systemic Hypertension". Clinical Cardiology.; 16 (2): pp. 129-132, 1993.
18. Degaute, J. P; y otros.; "Acute and Chronic Effects of Lisinopril on Renal and Systemic Hemodynamics in Hypertension".; Cardiovascular Drugs and Therapy.; 6 (5): pp. 489-494, 1992.
19. Van Mieghem, W.; y otros.; "Acute Haemodynamic Effects of Lisinopril and Captopril in Patients with Severe Congestive Heart Failure".; Acta Cardiologica.; 48 (1): pp. 43-53, 1993.
20. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; "Introduction to Modern Liquid Chromatography".; 2a ed., Ed. John Wiley and Sons; New York, (1979). pp. 153-165.
21. Hancock, W. S.; "Handbook of HPLC for the Separation of Aminoacids, Peptides and Proteins".; 7a ed., Ed. CRC Press; United States, (1990). pp. 3-230.
22. Rampazzo, P.; "Standardisation and Validation of Analytical Methods in the Pharmaceutical Industry".; 11 Farmaco.; 45 (6): pp. 807-815, 1990.

23. Lee, M. L.; y otros.: "Statistical Evaluation of Quality Control Test".; Pharmaceutical Technology.; 12 (9): pp. 108-120. 1988.
24. Lual.: "Modelos estadísticos y validación de métodos analíticos. El sistema de medición".; Pharma News.; 1 (7): pp. 32-44. 1993.
25. Taylor, J. K.; "Quality Assurance of Chemical Measurements".; 7ª ed., Ed. Lewis Publishers; United States, (1990), pp. 13-92.
26. García, A. O.: "Procedimiento para la calibración de instrumentos de pesar de bajo alcance de medición".; Pharma News.; 2 (5): pp. 18-20.
27. Louis, W. B.; "Calibración de básculas de clase de exactitud media y ordinaria".; Pharma News.; 1 (4): pp. 38.
28. Bello, G.: "La Cromatografía Líquida de Alta Resolución".; Pharma News.; 1 (1): pp. 19-21, 1991.
29. Bello, G.: "La Cromatografía Líquida de Alta Resolución".; Pharma News.; 2 (2): pp. 19-21, 1991.
30. Cattori, P.: "Problemas, Causas y Remedios en HPLC".; Pharma News.; 1 (1): pp. 21-24, 1991.

31. Cattori, P.; "Problemas, Causas y Remedios en HPLC"; Pharma News; 2 (2): pp. 22-29, 1991.
32. Garrido, F. y Juárez, J. A.; "Sugerencias importantes en el manejo de su HPLC"; Pharma News; 2 (2): pp. 18, 1991.
33. Merck-México.; "The HPLC Manager Software, The Latest Version"; Pharma News; 2 (9): pp. 14-19, 1991.
34. Alcántara, A. P.; "Material de Apoyo al Curso de Validación de Métodos Analíticos"; Versión 02. LUAL Capacitación; México, (1993), pp. 139.
35. Nzerue, M. C.; "Angioedema Complicating Lisinopril Therapy"; Central African Journal of Medicine; 38 (9): pp. 391-392, 1992.
36. Smith, A. J., y otros.; "Randomized, Double-Blind Crossover Comparison of Once-Daily Captopril and Lisinopril in Patients with Mild to Moderate Hypertension a Community-Based Study". Clinical and Experimental Hypertension; 15 (2): pp. 423-434, 1993.
37. Gourlay, S., y otros.; "Diferences in the Acute Chronic Antihypertensive Effects of Lisinopril and Enalapril Assessed by Ambulatory Blood-Pressure Monitoring"; Clinical and Experimental Hypertension; 15 (1): pp. 71-89, 1993.

38. Modena, M. G., y otros.; "Effectiveness of the Antihypertensive Action of Lisinopril on Left-Ventricular Mass and Diastolic Filling".; European Heart Journal.; 13 (11): pp. 1540-1544, 1992.
39. Samuelsson, O., y otros.; "A Comparative-Study of Lisinopril and Atenolol on Low Degree Urinary Albumin Excretion, Renal-Function and Hemodynamics in Uncomplicated, Primary Hypertension".; European Journal of Clinical Pharmacology.; 43 (5): pp. 469-475, 1992.
40. Beermann, B., y otros.; "Lisinopril Steady-State Kinetics in Healthy-Subjects".; Journal of Clinical Pharmacology.; 25 (6): pp. 471, 1985.
41. Savino, L.E., Haushalter, N. M.; "Lisinopril-Induced Scalded Mouth Syndrome".; Annals of Pharmacotherapy.; 26 (11): pp. 1381-1382, 1992.
42. Hajjali A. F., Zimmerman, B. G.; "Enhanced Blood-Pressure and Renal Hemodynamic-Effect of Chronic Versus Acute Lisinopril Administration in the Rabbit".; Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.; 263 (1): pp. 158-162, 1992.
43. Disdier, P., y otros.; "Adult Schonlein-Henoch Purpura After Lisinopril".; Lancet.; 340 (8825): pp. 985, 1992.

44. Brilla, C. G., y otros.; "Advanced Hypertensive Heart-Disease in SHR-Lisinopril-Mediated Regression of Miocardial Fibrosis".; Circulation.; 86 (4): pp. 329, 1992.
45. Jensen, H. A.; "Efficacy and Tolerability of Lisinopril Compared with Extended Release Felodipine in Patients with Essential-Hypertension".; Clinical and Experimental Hypertension Part A-Theory and Practice.; 14 (6): pp. 1095-1110, 1992.
46. Osterziel, K. J., y otros.; "Effect of Captopril and Lisinopril on Circadian Blood-Pressure Rhythm and Renal-Function in Mild-To-Moderate Heart-Failure".; American Journal of Cardiology.; 70 (10): pp. C147-C150, 1992.
47. Geiger, H., y otros.; "Effects of Lisinopril on Brain Atrial-Natriuretic-Factor in Uremic Rats".; American Journal of Cardiology.; 70 (10): pp. C145-C146, 1992.
48. Hansen, O., Johansson, B. W.; "Effects of Hydrochlorothiazide, Amiloride and Lisinopril on the Metabolic, Hemodynamic and Electrocardiographic Responses to Increased Plasma Epinephrine".; American Journal of Cardiology.; 70 (10): pp. C140-C141, 1992.

12. ANEXOS

12.1. VALIDACION DEL METODO ANALITICO

12.1.1. Evaluación del Sistema

12.1.1.1. Precisión del sistema

$$C.V._{exp.} = \frac{Y_{exp.} - Prom.Y}{Prom.Y} \times 100$$

Criterio: $C.V._{exp.} \leq 1.5$; el sistema se considera preciso.

12.1.2. Evaluación del Método

12.1.2.1. Linealidad del método y del sistema

$$\text{Modelo estadístico: } Y_{ij} = \alpha_0 + \beta_0 X_i + \epsilon_{j,i}$$

donde: Y_{ij} = respuesta obtenida (cantidad recuperada de principio activo)

α_0 = ordenada al origen

β_0 = pendiente

X_i = cantidades adicionadas de principio activo

$\epsilon_{j,i}$ = error del sistema o método.

Por método de mínimos cuadrados.

$$\text{Pendiente } \beta = \frac{n(\sum XY) - \sum X(\sum Y)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2}$$

$$\text{Ordenada al origen } \alpha = \frac{\sum Y - \beta \sum X}{n}$$

Desviación estándar de la regresión

$$S_{y/x} = \sqrt{(\sum Y^2 - \alpha(\sum Y) - \beta(\sum XY)) / (n-2)}$$

Intervalo de confianza de la pendiente β

$$\beta \pm t_{(0.975, n-2)} \times S_{y/x} \times \sqrt{1 / (\sum X^2 - (\sum X)^2 / n)}$$

$$t_{\text{calc}} = \frac{\beta - 1}{S_{y/x} \times \sqrt{1 / (\sum X^2 - (\sum X)^2 / n)}}$$

$$t_{(0.975, n-2)} = t_{(0.975, 13)} = 2.1604$$

Intervalo de confianza para la ordenada al origen α

$$\alpha \pm t_{(0.975, n-2)} \cdot S_{y/x} \cdot \sqrt{(\text{Prom. } X^2 / (\sum X^2 - (\sum X)^2 / n) + 1/n)}$$

$$t_{\text{calc}} = \frac{\alpha}{S_{y/x} \cdot \sqrt{(\text{Prom. } X^2 / (\sum X^2 - (\sum X)^2 / n) + 1/n)}}$$

Coefficiente de determinación

$$r^2 = \frac{(n \sum XY - \sum X \sum Y)^2}{(n \sum X^2 - (\sum X)^2) (n \sum Y^2 - (\sum Y)^2)}$$

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALC
REGRESION	1	$\beta \sum XY + \alpha \sum Y - ((\sum Y)^2 / n)$	SCr/GLr	MCr/MCcr
ERROR DE REGRESION	n-2	$\sum Y^2 - \beta \sum XY - \alpha \sum Y$	SCer/GLer	
FALTA DE AJUSTE	n-2-(r ₁ -1)	SCer-SCep	SCfa/GLfa	MGfa/MCep
ERROR PURO	$\sum (r_i - 1)$	$\sum Y^2 - (\sum Y^2 / r_i)$	SCep/GLep	

Tabla 17. Análisis de varianza para linealidad del sistema o método

Prueba de hipótesis: $H_0: Y = \alpha + \beta X$

$$H_a: Y \neq \alpha + \beta X$$

Criterio: $F_{\text{calc}} > F_{\text{t}}$ y $F_{\text{calc}} < F_{\text{f}}$

$$F_{(1, 13, 0.99)} = F_{(1, 13, 0.99)} = 9.07, \quad \alpha = 0.01$$

$$F_{(1, 13, 0.95)} = F_{(1, 13, 0.95)} = 3.71, \quad \alpha = 0.05$$

12.1.2.2. Especificidad del método

% Respuesta = Prom. X/Y = 0; el método es específico.

12.1.2.3. Exactitud y Repetibilidad al 100%

Prueba de hipótesis: $H_0: \mu = \mu_0$

$H_1: \mu \neq \mu_0$

donde: μ = media poblacional de los recobros experimentales en porcentajes

μ_0 = valor real del parámetro.

$$t_{\text{calc}} = \frac{\text{Prom. Y} - \mu_0}{\text{C.V.} / \sqrt{n}}$$

Intervalo de confianza para % Recuperado

$$\text{Prom. Y} \pm t_{(0.975, n-1)} \cdot \text{D.E.} / \sqrt{n}$$

$$t_{(0.975, 5)} = 2.5706$$

12.1.2.4. Precisión (Reproducibilidad)

Modelo estadístico: $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \delta_{j(i)} + \epsilon_{k(ij)}$

donde: Y_{ijk} = ensayo del principio activo de la k-ésima muestra analizada por el i-ésimo analista en el j-ésimo día.

μ = media poblacional del ensayo del principio en la muestra.

α_i = efecto del analista en el ensayo (donde $i = 1 \dots a$)

$\delta_{j(i)}$ = efecto del día anidado en el analista (donde $j = 1 \dots d$)

$\epsilon_{k(ij)}$ = error del método analítico (repetibilidad donde $k = 1 \dots r$)

$Y_{i..}$ = Sumatoria de las combinaciones analista-día.

$Y_{i..}$ = Sumatoria para cada analista.

$Y_{...}$ = Sumatoria total de los datos.

$\sum Y_{ijk}^2$ = Sumatoria de cada dato elevado al cuadrado.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	$F_{\alpha; a-1}$	F_{α}
ANALISTA	$gla=a-1$	$((\sum Y_{i..}^2)/dr) - (Y_{...}^2/dra)$	SCa/gla	*	*
DIA	$gld=(d-1)a$	$(\sum Y_{.j.}^2)/r - (\sum Y_{i..}^2)/r$	SCd/gld	**	**
ERROR	$gle=(r-1)ad$	$(\sum Y_{ijk}^2) - (\sum Y_{i..}^2)/r$			

Tabla 18. Análisis de varianza para reproducibilidad (precisión)

$$* F_{\alpha; a-1} = MCa/MCd$$

$$* F_{\alpha} = F_{(gla, gld, \alpha)} = F_{(1, 2, 0.95)} = 18.51$$

$$** F_{\alpha; a-1} = MCd/MCe$$

$$** F_{\alpha} = F_{(gld, gle, \alpha)} = F_{(2, 8, 0.95)} = 4.46$$

donde: α = nivel de significancia = 0.05

d = número de días

r = número de replicaciones

a = número de analistas

D.E.T. = Desviación Estándar Total

$$D.E.T. = ((n \cdot \sum Y_{ijk}^2 - (Y_{...})^2) / (n(n-1)))^{1/2}$$

C.V.T. = Coeficiente de Variación Total

$$C.V.T. = (DE_T / \text{Prom. } Y) \cdot 100$$

CRITERIO: $F_{\alpha; a-1} < F_{\alpha}$ y $F_{\alpha; a-1} < F_{\alpha}$

El método analítico es reproducible por los analistas y en distintos días por un mismo analista.

12.1.2.5. Estabilidad de la muestra analítica

$$SCe = \sum Y_{i,j}^2 - (\sum Y_{i.} / r)$$

$$MCE = SCe / (t(r-1))$$

$$gle = t(r-1)$$

donde: SCe = Suma de Cuadrados del error

MCE = Media de Cuadrados del error

gle = grados de libertad del error

$\sum Y_{i,j}^2$ = Suma de los cuadrados de las valoraciones

$\sum Y_{i.}^2$ = Suma de los cuadrados del total de la combinación
condición-tiempo

t = Número de tratamientos

r = Número de replicaciones por tratamiento.

$$t_{0.05} = \frac{(\sum Y_{i.} / r) - 100}{(MCE(2/r))^*}$$

α = Nivel de significancia

α = 0.05

m = Número de combinaciones condición-tiempo

$$t_{0.05, m, \alpha} = t_{0.05, 4, 0.05} = 3.0211.$$