



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO
PARA CUANTIFICAR CLORHIDRATO DE L-LISINA POR
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

XÓCHITL ESPINOSA PÉREZ



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Helgi Helene Jung Cook
Vocal: Ricardo Rodríguez Saenz
Secretario: Juan Manuel Rodríguez
1° Suplente: Blanca Estela Rivero Cruz
2° Suplente: Kenneth Rubio Carrasco

Unidad Analítica
Laboratorio 10 del edificio F de la Facultad de Química

Asesor del tema: _____
M. en C. Juan Manuel Rodríguez

Supervisor técnico: _____
Dra. Blanca Estela Rivero Cruz

Sustentante: _____
Xóchitl Espinosa Pérez

DEDICATORIA

*A **mi Señor** por la fortaleza que me brinda cada día.*

*A **mis padres** Miguel y Sara por su amor, apoyo y consejo.*

*A mi hermano **Cuauhtémoc** por el cuidado que me ha brindado,
a mi hermana **Sara Cristina** por la alegría que me comparte y
a mi cuñada **Evelyn** por su cariño y ejemplo.*

*A mis tíos **Gilberto Álvarez** y **María Eugenia Pérez**
por el amor que me han dado durante toda mi vida.*

*A mis **tíos, tías** y **primos** por su cariño.*

*A **todos mis amigos** por los bellos momentos que hemos compartido.*

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Juan Manuel Rodríguez por su apoyo y confianza.

*A la Dra. Blanca Estela Rivero Cruz
por su guía durante el proyecto y por su bella amistad.*

*A la M. en C. Kenneth Rubio Carrasco
por su ayuda y por su linda amistad.*

A Schering Plough y a su personal por financiar el proyecto.

*A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
por brindarme la oportunidad de tener una formación de excelencia.*

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras.....	v
Índice de tablas	vii
Abreviaturas.....	ix
1. Introducción	1
2. Marco teórico.....	3
2.1. Nutrición	3
2.1.1 Suplementos alimenticios	3
2.1.2 Proteínas y aminoácidos	4
2.1.3 L-lisina	5
2.1.3.1 Importancia farmacológica	6
2.2 Cromatografía.....	6
2.2.1 Clasificación de los métodos cromatográficos.....	7
2.2.2 Mecanismo de las separaciones cromatográficas	9
2.2.2.1 Cromatografía de absorción	9
2.2.2.2 Cromatografía de reparto	9
2.2.2.3 Cromatografía de intercambio iónico	9
2.2.2.4 Cromatografía de exclusión por tamaño	10
2.2.3 Cromatografía de líquidos de Alta Resolución.	10
2.2.3.1 Instrumento	10
2.2.3.2 Componentes básicos del sistema de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	11
2.2.3.3 Elución en la columna cromatográfica	12
2.2.3.4 Fundamentos teóricos	13

2.3 Reacciones de derivatización	14
2.3.1 Formación de derivados	14
2.3.2 Agentes derivatizantes de aminoácidos	15
2.3.2.1 Ninhidrina	16
2.3.2.2 Ortoftaldialdehído (OPA)	16
2.3.2.3 Fenilisotiocianato (PITC)	16
2.3.2.4 Cloruro de dansilo (DNS-Cl)	17
2.3.2.5 Cloruro de dabsilo (DABS-Cl)	17
2.3.3 La fluorescamina como agente derivatizante de aminoácidos primarios ...	17
2.3.3.1 pH del medio de reacción	19
2.3.3.2 Disolventes de la fluorescamina	19
2.3.3.3 Concentración de la fluorescamina	20
2.3.4 Condiciones cromatográficas de derivatización reportadas en la literatura	20
2.4 Validación de métodos analíticos	21
2.4.1 Parámetros de desempeño	22
2.4.1.1 Verificación del sistema	22
2.4.1.2 Precisión del sistema.....	23
2.4.1.3 Linealidad del sistema.....	23
2.4.1.4 Especificidad/Selectividad	23
2.4.1.5 Exactitud del método.....	23
2.4.1.6 Linealidad e intervalo del método.....	24
2.4.1.7 Precisión del método	24
2.4.1.8 Límite de detección del método	24
2.4.1.9 Límite de cuantificación del método.....	24
2.4.1.10 Robustez del método.....	24

2.4.1.11 Tolerancia del método	25
3. Parte experimental.	
3.1 Recursos materiales.	26
3.1.1 Reactivos	26
3.1.2 Equipos	26
3.1.3 Instrumentos	26
3.1.4 Micropipetas.	26
3.2 Análisis cromatográfico.	27
3.3 Preparación de soluciones.	27
3.4 Desarrollo del método.	29
3.5 Validación del método analítico.	31
3.5.1 Linealidad del sistema.	31
3.5.2 Precisión del sistema.....	32
3.5.3 Robustez	32
3.6 Aplicación del método desarrollado	33
3.6.1 Derivatización del placebo cargado	33
3.6.2 Preparación del placebo.....	33
4. Resultados y análisis	34
4.1 Desarrollo del método analítico	34
4.1.1 Efecto del pH del medio de reacción en la respuesta del analito.....	34
4.1.2 Selección de la columna cromatográfica	35

4.1.3 Incremento del tiempo de retención y del área de la señal del derivatizado por medio de cambios en la velocidad de flujo y el volumen de inyección	38
4.1.4 Estudio del efecto del tiempo de espera de reacción en la respuesta del derivatizado	39
4.1.5 Cambio del ACN a MeOH en la fase móvil	40
4.1.6 Optimización de la reacción de derivatización	42
4.2 Condiciones cromatográficas y de derivatización desarrolladas para la cuantificación de clorhidrato de L-lisina.....	44
4.3 Validación del método analítico	44
4.3.1 Linealidad del sistema.	44
4.3.2 Precisión del sistema.	46
4.3.3 Robustez	47
4.4 Aplicación del método desarrollado	48
5. Conclusiones	51
6. Anexos	52
6.1 Anexo 1. Pesos y cálculos realizados durante la validación del método analítico	52
6.2 Anexo 2. Pesos y cálculos realizados durante la aplicación del método analítico	52
7 Bibliografía	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular del aminoácido L-lisina 5

Figura 2. Clasificación de los sistemas cromatográficos 8

Figura 3. Diagrama de los componentes de un equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución 11

Figura 4. Reacción de derivatización de la fluorescamina 18

Figura 5. Reacciones del derivatizado de la fluorescamina 19

Figura 6. Reacción de hidrólisis de la fluorescamina 20

Figura 7. Cromatograma obtenido con la solución estándar del medio de reacción a pH 8.5..... 35

Figura 8. Cromatograma obtenido con la solución estándar del medio de reacción a pH 9.0..... 35

Figura 9. Cromatograma obtenido con la solución estándar del medio de reacción a pH 9.3..... 35

Figura 10. Cromatograma obtenido con el estándar 1 y la columna LiChro AORT RP-18 4.0x125 mm, 5 µm..... 37

Figura 11. Cromatograma obtenido con el estándar 2 y la columna LiChro AORT RP-18 4.0x125 mm, 5 µm..... 37

Figura 12. Cromatograma obtenido con el estándar 1 y la columna Agilent C-18 4.6x50 mm, 1.8 µm 37

Figura 13. Cromatograma obtenido con el estándar 2 y la columna Agilent C-18 4.6x50 mm, 1.8 µm 38

Figura 14. Cromatograma obtenido con el estándar 1 al disminuir la velocidad de flujo y aumentar el volumen de inyección 39

Figura 15. Cromatograma obtenido con el estándar 2 al disminuir la velocidad de flujo y aumentar el volumen de inyección 39

Figura 16. Cromatograma obtenido con el estándar 1 durante el estudio del tiempo de espera de reacción 40

Figura 17. Cromatograma obtenido con el estándar 2 durante el estudio del tiempo de espera de reacción 40

Figura 18. Cromatograma obtenido con el estándar 1 y MeOH en lugar de ACN en la fase móvil 42

Figura 19. Cromatograma obtenido con el estándar 2 y MeOH en lugar de ACN en la fase móvil 42

Figura 20. Cromatograma obtenido durante la optimización de la reacción de derivatización utilizando el estándar 1..... 43

Figura 21. Cromatograma obtenido durante la optimización de la reacción de derivatización utilizando el estándar 2..... 43

Figura 22. Cromatograma obtenido con el blanco de reactivos 44

Figura 23. Gráfica de linealidad del sistema para la cuantificación de clorhidrato de L-lisina 46

Figura 24. Cromatograma obtenido con el placebo del multivitamínico 49

Figura 25. Cromatograma obtenido con el placebo cargado (Réplica 1).....49

Figura 26. Cromatograma obtenido con el placebo cargado (Réplica 2).....50

Figura 27. Cromatograma obtenido con la solución estándar 1 del clorhidrato de L-lisina50

Figura 28. Cromatograma obtenido con la solución estándar 2 del clorhidrato de L-lisina50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aminoácidos esenciales en los adultos y en los niños.	4
Tabla 2. Condiciones cromatográficas y de derivatización reportadas en la literatura	21
Tabla 3. Parámetros de desempeño analítico recomendados en la validación de métodos analíticos.....	22
Tabla 4. Curva de linealidad del sistema	29
Tabla 5. Variaciones en la reacción de derivatización	31
Tabla 6. Concentraciones de la curva patrón para linealidad del sistema	31
Tabla 7. Parámetros evaluados de robustez	32
Tabla 8. Efecto del pH.....	34
Tabla 9. Selección de la columna	36
Tabla 10. Efecto de la velocidad de flujo y el volumen de inyección.....	38
Tabla 11. Efecto del tiempo de espera de reacción	40
Tabla 12. Cambio de ACN a MeOH en la fase móvil	41
Tabla 13. Optimización de la reacción de derivatización.....	43
Tabla 14. Condiciones cromatográficas desarrolladas.....	44
Tabla 15. Linealidad del sistema para la cuantificación de clorhidrato de L-lisina.....	45
Tabla 16. Precisión del sistema	46
Tabla 17. Evaluación de la variación de la proporción de metanol en la fase móvil	47
Tabla 18. Evaluación de la variación de la concentración de TFA en ambos disolventes de la fase móvil.....	47
Tabla 19. Evaluación de la variación de la velocidad de flujo	48
Tabla 20. Recobro de los placebos cargados	49
Tabla 21. Datos de la curva 1 de linealidad del sistema	53
Tabla 22. Datos de la curva 2 de linealidad del sistema	53
Tabla 23. Datos de la curva 3 de linealidad del sistema	53
Tabla 24. Datos de precisión del sistema.....	54
Tabla 25. Datos de la variación de la proporción de metanol en la fase móvil	56

Tabla 26. Datos de la variación de la concentración de TFA en ambos disolventes de la fase móvil	56
Tabla 27. Datos de la variación de la velocidad de flujo	56
Tabla 28. Datos de los estándares de la aplicación del método desarrollado.....	57
Tabla 29. Datos de los placebos cargados.....	58
Tabla 30. Datos del por ciento de recobro.....	59

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés)
CV	Coefficiente de variación
FM	Fase móvil
Lys	Lisina
mAU	miliunidades de absorbancia
MeOH	Metanol
p.f.	Punto de fusión
r^2	Coefficiente de determinación
TFA	Ácido trifluoroacético
TR	Tiempo de retención

1. INTRODUCCIÓN

En México, durante la segunda Encuesta Nacional de Nutrición (ENN 1999) se documentó que el 27.2 % de los menores de cinco años presentaban anemia debida, principalmente, a deficiencias de hierro. Así mismo, se dio a conocer que existen deficiencias específicas de algunos micronutrientes como vitamina A, C, E, zinc, hierro, ácido fólico y yodo, por mencionar algunos. La mala nutrición provoca, entre otros factores, baja estatura, riesgos mayores de padecer enfermedades y bajo desempeño escolar. Además, la alimentación deficiente durante la infancia deja huellas irreversibles.¹

En este marco de referencia, la L-lisina es un aminoácido esencial para la dieta que se biosintetiza primordialmente en las plantas y en las células bacterianas. Sin embargo, el bajo contenido de L-lisina en los alimentos ha propiciado que su suministro sea complementado mediante el consumo de preparados farmacéuticos, entre los que destacan, los suplementos alimenticios.

Debido a la importancia que tiene este aminoácido en la dieta se requiere contar con métodos analíticos que sean exactos y precisos para cuantificar el aminoácido contenido en los productos farmacéuticos de venta al público. Para ello, durante el proyecto de investigación se planteó como objetivo principal el desarrollo y la validación de un método analítico conducente a evaluar el contenido de clorhidrato de L-lisina presente en una solución multivitamínica. Cabe mencionar que el presente trabajo formó parte de un convenio entre la industria farmacéutica y la UNAM, por lo tanto, la información de la validación del método analítico es confidencial y sólo se reportan la linealidad del sistema, la precisión del sistema y la robustez.

Para el cumplimiento del objetivo general se plantearon, los siguientes objetivos específicos:

- ❖ Desarrollar un método analítico para cuantificar clorhidrato de L-lisina por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detector UV-Visible.

- ❖ Caracterizar el desempeño del método analítico a través de la evaluación de los siguientes parámetros de validación: linealidad del sistema, precisión del sistema y robustez.
- ❖ Aplicar el método analítico en la cuantificación del clorhidrato de L-lisina presente en una matriz farmacéutica.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 NUTRICIÓN

La nutrición es la ingesta de alimentos con relación a las necesidades dietéticas del organismo. Una buena nutrición (una dieta suficiente y equilibrada combinada con el ejercicio físico regular) es un elemento fundamental de la buena salud. En los niños, la nutrición se manifiesta por su crecimiento y su desarrollo. Por otra parte, la mala nutrición, tanto en adultos como en niños, puede reducir la inmunidad, aumentar la vulnerabilidad a las enfermedades, alterar el desarrollo físico y mental y reducir la productividad.^{2,3}

2.1.1 Suplementos alimenticios

Los suplementos dietéticos o suplementos alimenticios son productos que se administran generalmente por vía oral y contienen ingredientes alimenticios que proveen suplementos a la dieta. Los suplementos alimenticios pueden encontrarse en diferentes formas como tabletas, cápsulas, cápsulas de gelatina blanda, líquidos, polvos e incluso en barras. En Estados Unidos, sin importar la forma en que se presenten los suplementos dietéticos la Dietary Supplement Health and Education Act (DSHEA) clasifica a los suplementos dietéticos como alimentos y no como medicamentos.⁴

En México, el artículo 168 del Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios define a los suplementos alimenticios como productos que podrán estar constituidos por carbohidratos, proteínas, aminoácidos, ácidos grasos, metabolitos, plantas, hierbas, algas, alimentos tradicionales deshidratados u otros que establezca la Secretaría, y que pueden presentarse ya sea en forma aislada o en combinación, adicionados o no de vitaminas o minerales y cuyo consumo no represente un riesgo para la salud. Por otra parte, la Norma Oficial Mexicana 131 (NOM-131-SSA1-1995, Bienes y servicios. Alimentos para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales) establece que para la elaboración de alimentos sólo podrán utilizarse las formas naturales “L” de los aminoácidos.^{5,6}

2.1.2 Proteínas y aminoácidos

Las proteínas son macromoléculas constituidas por largas cadenas de aminoácidos (desde dos hasta miles de aminoácidos), que pertenecen principalmente a la serie L. Los aminoácidos se unen entre sí por uniones peptídicas, las cuales se llevan a cabo entre el grupo carboxílico de un aminoácido y el grupo alfa amino del siguiente.⁷

Los aminoácidos están formados por un carbono central al cual están unidos por un extremo un grupo carboxilo y por el otro un grupo amino y una cadena lateral. Existen 20 cadenas laterales (20 aminoácidos diferentes); dichos aminoácidos se pueden agrupar en varias formas según sus cadenas laterales, por ejemplo: ácidos, básicos, polar sin carga y no polar, cargados positiva y negativamente, hidrófobos e hidrofílicos.⁷

Los aminoácidos se clasifican en esenciales y no esenciales (Tabla 1). Los aminoácidos esenciales reciben su nombre debido a que su esqueleto de carbón central no puede ser sintetizado por el organismo y debe obtenerse forzosamente de la dieta. Los esenciales, no siempre se sintetizan a la velocidad requerida por lo tanto, deben aportarse en la dieta. De los 10 aminoácidos esenciales, ocho son imprescindibles durante toda la vida y los dos restantes se necesitan en la dieta durante los periodos de crecimiento rápido, como la infancia.^{7,8}

Tabla 1. Aminoácidos esenciales en los adultos y en los niños.⁸

Aminoácidos esenciales para adultos	Aminoácidos esenciales en la infancia
Isoleucina	Arginina
Leucina	Histidina
Lisina	
Metionina	
Fenilalanina	
Treonina	
Triptófano	
Valina	

Las proteínas son consideradas como los principales componentes estructurales y funcionales de todas las células corporales, ya que, forman parte de una gran cantidad de

elementos y sustancias, como enzimas, coenzimas, ácidos nucleicos, transportadores de membrana celular, albúmina, colágeno y matriz intracelular; entre otros. Además, forman parte de las membranas, músculos, hormonas y otras sustancias que son indispensables para conservar la salud y la reproducción. Para lograr el crecimiento de los niños es necesario suministrar en su dieta grandes cantidades de proteína; los adultos, por su parte, necesitan reemplazar las proteínas que se pierden cada día durante las reacciones bioquímicas normales del organismo.^{7,9}

Así, en un individuo de 70 kg, el 15.7 % de su peso corresponden a proteínas (11 kg aproximadamente). Esta cantidad de proteínas se distribuye de la siguiente manera: 43 % de músculo estriado; 15 % de piel y sangre; 10 % en bazo e hígado y 32 % para otros órganos. Cabe mencionar, que estas proporciones varían según la edad y la constitución física del individuo, ya que los recién nacidos poseen menos músculo que un adulto y los atletas, por ejemplo, tiene mayor masa muscular. En las edades pediátricas, el óptimo apoyo nutrimental permite que el crecimiento y el desarrollo del niño continúen dentro de los límites normales.^{7,10}

2.1.3 L-lisina

La L-lisina (Lys, K) es un aminoácido esencial cuya cadena lateral contiene un grupo amino primario (NH_2) unido a un carbono ϵ -amino (Figura 1). Se trata de una base relativamente fuerte; a pH 7.0 la especie iónica predominante es el ion amonio ($-\text{NH}_3^+$). La molécula de L-lisina presenta tres valores de pK_a , el del grupo carboxilo es 2.18, el del grupo amino es 8.95 y el del amino de su cadena lateral es 10.53. Presenta un peso molecular de 146 g/mol.^{8,9,11}

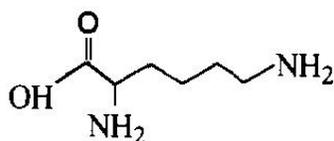


Figura 1. Estructura molecular del aminoácido L-lisina.

Propiedades físicas: cristales incoloros; soluble en agua, ligeramente soluble en alcohol, insoluble en éter. Ópticamente activo: L (+) lisina, p.f. 224°C con descomposición.¹²

2.1.3.1 Importancia farmacológica.

La L-lisina, es un aminoácido, que se requiere para el crecimiento y el desarrollo normal de un individuo. La L-lisina participa básicamente en la síntesis de proteínas y en la producción de tejido conjuntivo. La L-lisina mejora la función de la piel debido a que participa en la síntesis de colágeno. Además, el colágeno se encuentra en todos los tejidos y órganos a los que proporciona la estructura que les da forma y resistencia estructural, por ejemplo, constituye la piel, los huesos, los dientes, los vasos sanguíneos, los tendones, el cartílago y la córnea. El colágeno se encuentra en un 23 % del hueso cortical entero es por ello, que la L-lisina ayuda a prevenir la osteoporosis. Asimismo, la L-lisina participa en la síntesis de la elastina, que es una proteína que confiere a los tejidos y órganos la capacidad de estirarse sin llegar a desgarrarse. La elastina es abundante en ligamentos, pulmones, arterias y piel.^{8,13}

Desde el punto de vista bioquímico la L-lisina y la metionina intervienen en la formación de los derivados conjugados de la carnitina durante la β -oxidación de los ácidos grasos, de cadena media y larga, en las mitocondrias. Por otra parte, la L-lisina se requiere para producir acetil CoA, un componente crítico en el metabolismo de los carbohidratos para generar energía. También, estimula la liberación de la hormona del crecimiento humana. Por este motivo, se utiliza sola o combinada con otros aminoácidos, en niños para estimular su crecimiento y en ancianos para retrasar el envejecimiento. Igualmente la caída del cabello puede ocurrir como resultado de una deficiencia de L-lisina.^{8,14}

Finalmente, la participación de la L-lisina en la síntesis de proteínas, neurotransmisores, hormonas y tejidos convierte a este aminoácido como indispensable en la dieta de los seres humanos (la molécula intacta debe ser provista en la dieta).¹⁵

2.2 CROMATOGRAFÍA

La cromatografía comprende un grupo de métodos que se emplean para la identificación, la separación y la cuantificación de componentes químicos de mezclas complejas. La separación de los componentes depende de las afinidades diferenciales de los solutos

entre dos fases no miscibles. Una de las fases es un lecho fijo de gran área superficial mientras que la otra es un líquido, el cual se mueve a través de la superficie de la fase fija o sobre ella. La afinidad relativa de los solutos por cada una de las fases debe ser reversible para asegurar que ocurra la transferencia de masa durante la separación cromatográfica.^{14, 16}

La fase fija se denomina fase estacionaria y la otra fase móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido poroso o finamente dividido, o un líquido que ha sido colocado en una capa delgada sobre un material de soporte inerte. Es necesario que las partículas de la fase estacionaria sean lo más pequeñas y homogéneas posible para proveer una gran superficie de tal modo que la adsorción y la desadsorción de los solutos ocurran con frecuencia. Según el tipo de cromatografía empleada la fase móvil puede ser un líquido puro o una mezcla de soluciones o también, puede ser un gas puro o una mezcla homogénea de gases. Los componentes de la mezcla se pasan a través de la fase estacionaria mediante el flujo de la fase móvil y las separaciones están basadas en las diferencias en la velocidad de migración entre los componentes de la fase móvil.^{14, 16}

2.2.1 Clasificación de los métodos cromatográficos

Los métodos cromatográficos pueden clasificarse dependiendo de distintos factores: estado físico de las fases móvil y estacionaria (gas-líquido, líquido-líquido, etc.); soporte utilizado (columna, papel, etc.); mecanismo de separación (adsorción, reparto) e incluso, el tipo de soluto (cromatografía iónica, cromatografía de proteínas, etc.). En la Figura 2 se muestra una clasificación en función de algunos de los parámetros mencionados anteriormente.¹⁷

Según la naturaleza de la fase móvil los métodos cromatográficos se clasifican en cromatografía de líquidos y cromatografía de gases. En cromatografía de líquidos, cuando la fase estacionaria es polar y la fase móvil no-polar, se denominan sistemas normales o de fase normal. Asimismo, si la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil el sistema se designa como fase inversa.¹⁷

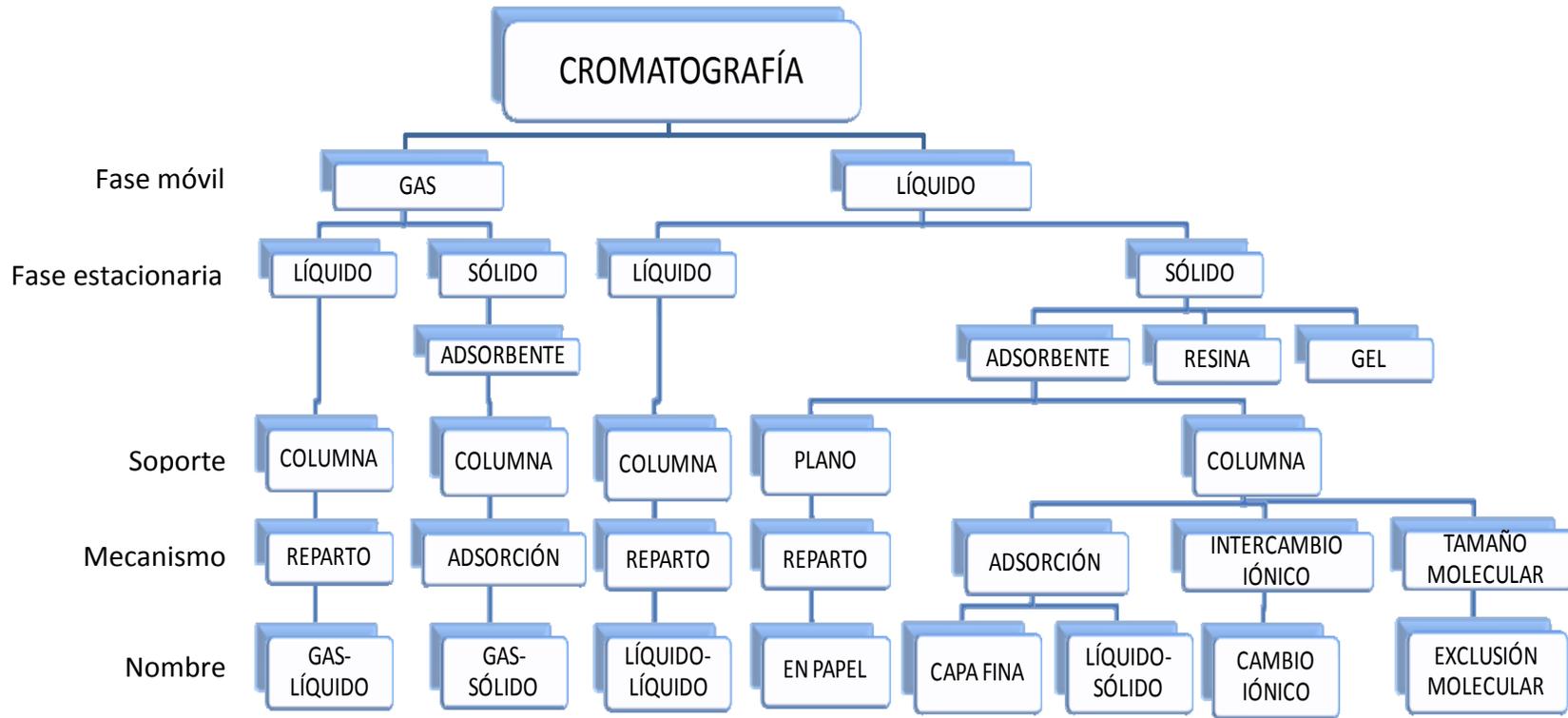


Figura 2. Clasificación de los sistemas cromatográficos.¹⁷

En cuanto al soporte pueden distinguirse dos categorías: plana y en columna. En la cromatografía plana, la fase estacionaria puede estar constituida por una capa de sólido distribuido uniformemente sobre una lámina de vidrio o aluminio (cromatografía en capa fina). Por otra parte, la fase estacionaria puede estar contenida en una columna (cromatografía en columna). En el caso de la cromatografía líquida en columna existen dos modalidades que pueden denominarse en función de su desarrollo cronológico como cromatografía clásica en columna y cromatografía de alta resolución.¹⁷

2.2.2 Mecanismo de las separaciones cromatográficas

La naturaleza de las interacciones entre los distintos componentes de la muestra, la fase móvil y la fase estacionaria, permite clasificar a los sistemas cromatográficos desde este punto de vista. Las fuerzas implicadas en estas interacciones suelen ser débiles tales como fuerzas de Van der Waals o enlaces de hidrógeno.¹⁷

2.2.2.1 Cromatografía de adsorción. Se tiene cuando la fase estacionaria es un sólido adsorbente de gran área superficial. Los centros activos situados sobre la superficie del sólido, por ejemplo, los grupos silanol, interaccionan con los grupos funcionales polares de los compuestos a separar. La separación se produce como consecuencia de la distinta intensidad de las interacciones mencionadas con los compuestos.¹⁷

2.2.2.2 Cromatografía de reparto. Tiene lugar cuando se utiliza un líquido como fase estacionaria. Para inmovilizar al líquido se utiliza un soporte sólido; para evitar que se mezclen las fases se emplean líquidos de polaridades muy diferentes. La separación se produce porque las moléculas de soluto se distribuyen entre las dos fases según su solubilidad relativa en cada una de ellas.^{17, 18}

2.2.2.3 Cromatografía de intercambio iónico. Tiene lugar cuando la fase estacionaria es una matriz rígida, que generalmente son resinas orgánicas sintéticas, en cuya superficie existen grupos funcionales cargados positiva o negativamente y contraiones. La fase móvil suele ser una solución acuosa amortiguada y la separación se produce por la competencia

que se establece entre los iones de la fase móvil y los iones del analito por los centros activos de la resina.¹⁷

2.2.2.4 Cromatografía de exclusión por tamaño. En ella, la fase estacionaria consiste en un sólido inerte que contiene pequeños poros en los que pueden penetrar las moléculas de tamaño reducido, pero no las grandes. El grado de retención depende del tamaño de las moléculas y del tamaño de los poros. Este tipo de cromatografía se emplea comúnmente para medir la agregación o la degradación de macromoléculas.^{17, 18}

2.2.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR o HPLC por su nombre en inglés) también llamada líquidos de alta presión, es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. Es la técnica más versátil y más utilizada de todos los tipos de cromatografía de elución. Los compuestos que se van a analizar se disuelven en un disolvente adecuado y la mayoría de las separaciones tienen lugar a temperatura ambiente. Por lo tanto, la mayoría de los fármacos, aún siendo compuestos no volátiles o térmicamente inestables, pueden analizarse sin descomposición o sin necesidad de hacer derivados volátiles y la mayoría de los análisis se completa dentro de 30 minutos.¹⁸

2.2.3.1 Instrumento

Un cromatógrafo de líquidos (Figura 3) consta de un recipiente que contiene la fase móvil, una bomba para forzar el paso de la fase móvil a través del sistema a alta presión, un inyector para introducir la muestra en la fase móvil, una columna cromatográfica, un detector y un dispositivo de colección de datos como una computadora o un registrador. Además de recibir y reproducir las señales enviadas por el detector, las computadoras se emplean para controlar las operaciones y los parámetros cromatográficos y permiten periodos largos de operación sin necesidad de supervisión.¹⁸

2.2.3.2 Componentes básicos del sistema de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

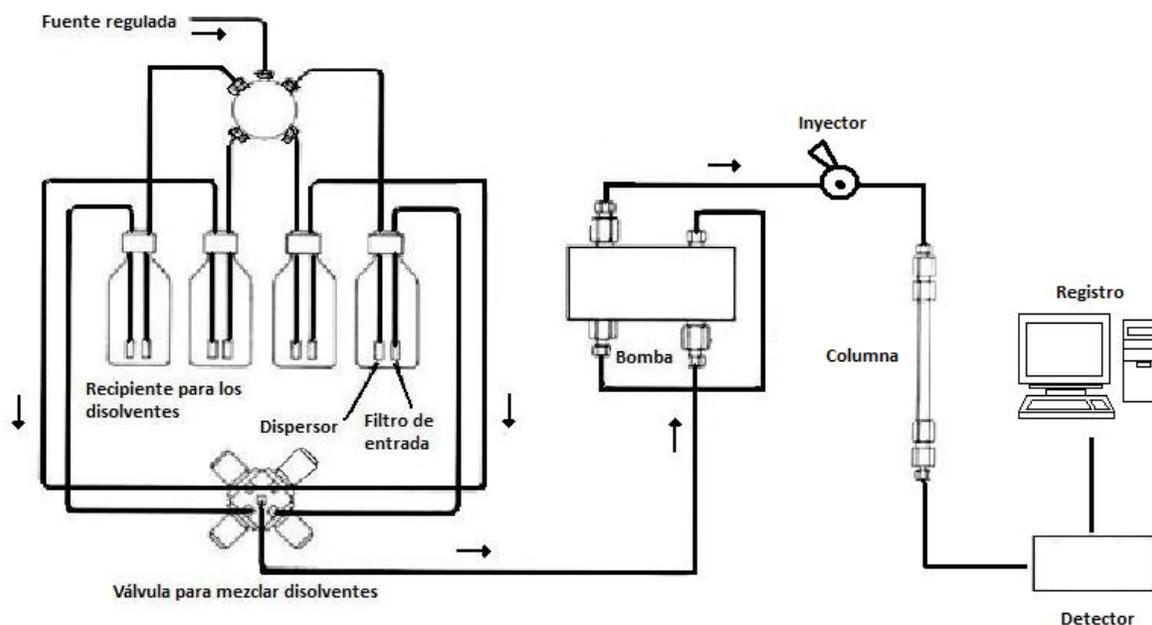


Figura 3. Diagrama de los componentes de un equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.^{16, 17}

Recipientes para la fase móvil. Los equipos modernos para HPLC vienen equipados con varios recipientes de vidrio o de acero inoxidable con capacidad de 500 mL o más para contener a los disolventes de la fase móvil. Los recipientes tienen que ser inertes, esto es, el disolvente no debe extraer especie alguna del material con que estén contruidos.^{16, 17}

Sistema de bombeo. Los sistemas de bombeo administran cantidades exactas de fase móvil desde los recipientes hasta la columna mediante una tubería y uniones adecuadas para altas presiones. Las bombas para cromatografía de líquidos deben cumplir con los siguientes requisitos: (1) estar libre de pulsos la presión de salida; (2) generar presiones de más de 6 000 psi; (3) proporcionar velocidades de flujo de 0.1 a 10 mL/min; (4) reproducir el flujo dentro de un valor relativo de 0.5 % o mejor y (5) ser inertes respecto a los disolventes empleados.^{16, 17, 18}

Sistema de inyección. El sistema de inyección introduce la muestra en la fase móvil que previamente pudo haber sido disuelta en la misma fase móvil o en un disolvente

adecuado. El método más ampliamente utilizado para la introducción de la muestra utiliza dispositivos en forma de bucle, que pueden introducir la muestra a presiones de hasta 7000 psi con una precisión aceptable. Los volúmenes que se emplean han de ser muy pequeños, de 5 μL hasta 500 μL .^{16, 17}

Columna cromatográfica. La columna consta de un tubo angosto empacado con un sólido inerte finamente dividido (empaquete) cuya superficie constituye la fase estacionaria. El material para las columnas generalmente es de acero inoxidable. La longitud de las columnas varía entre 3 y 30 cm, tienen un diámetro interno de 1 y 10 mm y los empaques tienen un tamaño de partícula de 3 a 10 μm . Las columnas cortas de diámetro interior pequeño que contienen un relleno denso de partículas de fase estacionaria permiten un intercambio rápido de los compuestos entre la fase móvil y la fase estacionaria.^{16, 18}

Detector. Para la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución no existe un sistema de detección de uso general porque el detector que se va a utilizar depende de la naturaleza de la muestra. Por ello, se utilizan distintos sistemas de detección que pueden elegirse con base en alguna propiedad física o fisicoquímica del analito, que generalmente no la presenta la fase móvil. No obstante, los detectores de absorbancia visible-ultravioleta cuyo fundamento es la espectrofotometría de absorción son los más utilizados en HPLC.^{16,17}

Registrador. El registrador o dispositivo de recolección de datos es la estación que recibe y almacena la señal de los detectores e imprime el cromatograma. También se emplea para programar la cromatografía de líquidos controlando la mayoría de las variables. El registrador más empleado es la computadora.¹⁸

2.2.3.3 Elución en la columna cromatográfica

Al inicio, se introduce por la parte superior de la columna una solución de la muestra que está contenida en la fase móvil. Con la primera introducción de la fase móvil la porción de la muestra se mueve hacia dentro de la columna, en donde se efectúa la partición simultánea entre la fase móvil y la fase estacionaria. Adiciones posteriores de disolvente

acarrear a las moléculas de soluto hacia abajo por la columna en una serie continua de transferencias entre las dos fases. Como el movimiento del soluto puede ocurrir sólo con la fase móvil, la velocidad promedio de migración del soluto depende de la fracción de tiempo que permanece en esa fase. Esta fracción es pequeña para solutos que son retenidos fuertemente por la fase estacionaria y es grande cuando es mayor la retención en la fase móvil. De manera ideal las diferencias que resultan en las velocidades hacen que los componentes de una mezcla se separen en bandas o zonas a lo largo de la columna. El asilamiento de las especies separadas se logra pasando una cantidad suficiente de fase móvil a través de la columna para hacer que las bandas individuales salgan hacia el extremo donde se puedan detectar.¹⁶

Si durante la elución se coloca en el extremo de la columna un detector que responda a la concentración del soluto y se hace un gráfico de la señal en función del tiempo se obtiene una serie de picos. Este gráfico es denominado cromatograma y es útil tanto para el análisis cualitativo como cuantitativo. La posición de los picos en el eje del tiempo se puede utilizar para identificar los componentes de la muestra; el área y la altura del pico son generalmente proporcionales a la cantidad de cada soluto eluido.^{16, 18}

2.2.3.4 Fundamentos teóricos

De manera general, las separaciones cromatográficas se basan en los siguientes conceptos.

- **Tiempo muerto.** Es el tiempo requerido para que una especie no retenida alcance el detector.¹⁷
- **Tiempo de retención.** Es el tiempo transcurrido desde la introducción de la muestra hasta que el componente alcanza el detector, está en función del largo de la columna. Es característico para las condiciones de operación constantes y, por tanto, es auxiliar en la identificación de los picos.^{14, 17, 19}
- **Factor de capacidad.** Es la razón de la cantidad de soluto en la fase estacionaria entre la cantidad en la fase móvil al equilibrio. Es igual a la relación del tiempo que el soluto permanece en la fase estacionaria respecto al tiempo en la fase móvil. El

factor de capacidad es independiente de la velocidad de flujo de la fase móvil y de las dimensiones de la columna.^{17,19}

- **Número de platos teóricos.** Se considera que en cada plato teórico se establece un equilibrio del componente entre la fase móvil y la fase estacionaria, y el desplazamiento del analito a través de la columna se trata como una transferencia de la fase móvil desde un plato al siguiente. El número total de platos teóricos de una columna representa el poder de separación de la columna. Una buena columna tiene un número alto de platos teóricos.^{17,19}
- **Selectividad.** Mide las diferencias relativas entre la interacción de dos solutos con la fase estacionaria. Un valor mayor de selectividad significa una columna más selectiva y mejor separación entre solutos.^{16,19}
- **Resolución.** Es la medida cuantitativa del grado de separación entre dos solutos.¹⁹

2.3 REACCIONES DE DERIVATIZACIÓN

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución es una técnica que permite la separación e identificación de los componentes químicos en mezclas complejas. Por lo general, esta técnica emplea detectores de absorbancia ultravioleta-visible, por lo cual, se requiere de estructuras moleculares que absorban al UV para ser detectadas. El clorhidrato de L-lisina no puede ser cuantificado directamente en un cromatógrafo de líquidos debido a que su estructura molecular no presenta un grupo cromóforo. No obstante, el clorhidrato de L-lisina puede reaccionar con un reactivo adecuado para formar un compuesto que sea fácilmente detectado por un detector UV-visible.

2.3.1 Formación de derivados

De manera general, los procedimientos de formación de derivados que emplean a la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, obedecen a los siguientes principios:

- Para permitir el análisis por cromatografía de compuestos que de otro modo no se podrían detectar con los instrumentos de uso común, como las aminas alifáticas, los alcoholes y los ácidos carboxílicos.

- Para mejorar la resolución mediante el agregado de un grupo funcional que aumenta la interacción de los solutos con la fase estacionaria, como la esterificación de los ácidos.
- Para mejorar la sensibilidad del método, como la formación de derivados fluorescentes de los aminoácidos.¹⁸

La mayoría de las reacciones de formación de derivados implican la formación de un agregado de un grupo fenilo sustituido para aumentar la capacidad de detección a 254 nm. Los derivados fluorescentes son especialmente útiles dado que, no sólo aumentan la sensibilidad, sino que también permiten la detección selectiva de compuestos que forman derivatizados en presencia de sustancias coeluyentes que no reaccionan con el reactivo.¹⁸

La formación de derivados se puede efectuar antes de introducir la muestra en la columna o después de que haya eluido. Hay piezas especiales del equipo que tienen la capacidad de agregar reactivo, calentar la mezcla de reacción y retardar el tiempo para permitir la formación cuantitativa de los derivados antes de introducir la muestra al detector. En comparación con la derivatización post-columna, la derivatización pre-columna ofrece mayor eficiencia y selectividad. Sin embargo, la selección del tipo de derivatización depende de los requerimientos específicos de la aplicación. Factores como la sensibilidad requerida, la cantidad de muestra disponible, el tipo de muestra, la fuente de la muestra, la rapidez del análisis e incluso consideraciones económicas influyen la elección entre derivatización pre- y post- columna.^{18, 20, 21}

En general, las reacciones de derivatización deben ser versátiles, rápidas y no deben requerir condiciones muy forzadas.²²

2.3.2 Agentes derivatizantes de aminoácidos

A diferencia de los péptidos, que tienen la ventaja de absorber a menos de 220 nm debido a la fuerte absorbancia del enlace peptídico, los aminoácidos libres presentan bajos coeficientes de extinción. Por lo tanto, los métodos de detección de aminoácidos dependen de la reacción del grupo amino primario del aminoácido para formar derivados

fluorescentes o coloridos. La derivatización se realiza antes o después de haber separado los aminoácidos. Existen varios agentes que son usados para la derivatización de aminas primarias y cinco de ellos se presentan a continuación.²¹

2.3.2.1 Ninhidrina

El primer sistema automatizado para el análisis de mezclas de aminoácidos fue reportado el 1958 por Spackman, Stein y Moore. Este método se basaba en una separación por cromatografía de intercambio iónico, seguida de una reacción con ninhidrina y su subsecuente detección en el rango del visible. La ninhidrina reacciona con todos los aminoácidos primarios para formar un cromóforo morado que presenta su máxima absorción a 570 nm y, con los aminoácidos secundarios forma un cromóforo amarillo que absorbe a 440 nm. La ninhidrina es inadecuada para una derivatización pre-columna porque forma el mismo complejo con todos los aminoácidos. Además, la metodología con ninhidrina está limitada a una sensibilidad de aproximadamente 100 picomoles.²¹

2.3.2.2 Ortoftaldialdehído (OPA)

El ortoftaldialdehído fue introducido originalmente como una alternativa a la ninhidrina en derivatización post-columna; no obstante, es usado en derivatizaciones pre-columna. El ortoftaldialdehído reacciona en medio alcalino con aminas primarias, no presenta fluorescencia por sí mismo y sus derivados producen una alta fluorescencia. Su reacción procede casi instantáneamente a temperatura ambiente, en pH alto y en presencia de un tiol para producir un derivado isoindólico. Sin embargo, los derivados son inestables y la respuesta del OPA con la L-lisina es muy débil.^{21, 23}

2.3.2.3 Fenilisotiocianato (PITC)

El fenilisotiocianato, también conocido como reactivo de Edman, ha sido utilizado durante un largo tiempo para secuenciar proteínas y polipéptidos. A pH alcalino reacciona con aminas primarias y secundarias para producir derivados que pueden ser monitoreados por detección UV (240-255 nm) con un límite de detección dentro de un rango de 5 a 50 picomoles. Todos los aminoácidos forman mono-derivados, excepto la cisteína y la L-lisina

que forman dos derivados. La principal desventaja de los derivados del fenilisotiocianato es que son afectados por la presencia de algunas sales, cationes divalentes, metales y iones de buffers.^{21, 23}

2.3.2.4 Cloruro de dansilo (DNS-Cl)

El cloruro de dansilo es un reactivo que fue introducido para el análisis de aminoácidos, péptidos y proteínas. El derivatizante reacciona con aminas primarias y secundarias para formar productos fluorescentes. Sin embargo, no sólo se forma el derivado del aminoácido, también se forman numerosos productos secundarios y algunos aminoácidos forman múltiples derivados. Además, requiere de un largo tiempo de reacción, por lo cual, aunque el cloruro de dansilo es frecuentemente empleado por investigadores, este método nunca ha sido ampliamente aceptado para el análisis automatizado de aminoácidos.^{22, 23}

2.3.2.5 Cloruro de dabsilo (DABS-Cl)

El cloruro de dabsilo es un reactivo que fue introducido para la detección de aminoácidos en el rango del visible y a un nivel de picomoles. Reacciona con aminas primarias y secundarias. La reacción se lleva a cabo a 70°C y pH 8-8.5. Una limitante del método es que la sensibilidad se ve afectada en presencia de metales, exceso de sal, iones de buffers y otros contaminantes.²¹

2.3.3 La fluorescamina como agente derivatizante de aminoácidos primarios

En 1972 Weigle y colaboradores introdujeron la fluorescamina (1) como un novedoso agente derivatizante para la cuantificación de aminoácidos y aminas primarias tanto alifáticas como aromáticas, empleando la detección de fluorescencia. La fluorescamina por sí misma no es fluorescente y reacciona con las aminas primarias para formar pirrolinonas del tipo 2 (Figura 4). También reacciona con aminos libres NH_3 , pero no se produce un derivado fluorescente. Además, la fluorescencia de una solución que contiene proteínas más fluorescamina es proporcional a la cantidad de grupos aminos presentes, siendo ésta la base de un ensayo de fluorescencia de proteínas.^{23, 24, 25, 26}

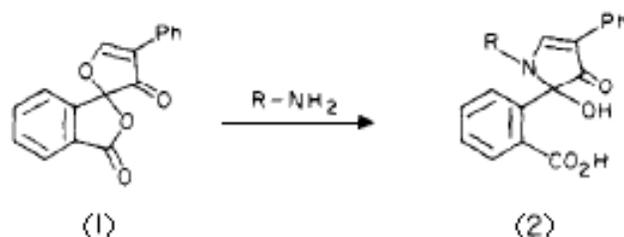


Figura 4. Reacción de derivatización de la fluorescamina.²⁴

La reacción de la fluorescamina procede eficientemente a temperatura ambiente en soluciones acuosas permitiendo la cuantificación de concentraciones picomolares de aminoácidos y nanomolares de proteínas con importancia biológica. Entre las aplicaciones de la fluorescamina se encuentran métodos de alta sensibilidad para el análisis automatizado de aminoácidos y para la cuantificación de proteínas. Otras aplicaciones de la fluorescamina incluyen la tinción de proteínas en electroforesis; la estimación de la actividad de enzimas proteolíticas; la cuantificación de apoproteínas y péptidos derivados de proteínas y el monitoreo de las fracciones de proteínas eluidas en las columnas. Por otra parte, la fluorescamina es empleada en la industria farmacéutica para el análisis de compuestos que contienen grupos aminos.^{22, 24, 25, 27}

Cada una de las clases de aminas primarias requiere de diferentes condiciones para obtener la fluorescencia máxima. Tanto el rendimiento de la reacción como, la fluorescencia de los derivatizantes dependen del pH del medio de reacción, del disolvente y de la concentración de la fluorescamina. Sin embargo, los valores óptimos de estas tres variables dependen más de la amina en estudio que de la fluorescamina. La más importante de estas variables es el pH del medio de reacción.²⁴

2.3.3.1 pH del medio de reacción

La mayoría de las aminas reacciona dentro de un rango reducido de pH (pH 8-9.5). Si el pH es muy bajo, la amina se protona y no reacciona y, si el pH es muy alto, la hidrólisis de la

fluorescamina predomina sobre la derivatización. La elección del pH exacto para llevar a cabo un ensayo depende de la amina. Las aminas alifáticas y los péptidos generalmente requieren pH entre 8 y 8.5, mientras los aminoácidos y las proteínas son cuantificados a pH entre 8.5 y 9.5. En medio ligeramente alcalino o neutro el fluoróforo es estable a temperatura ambiente durante horas y, durante días si se protege de la luz. En medios ácidos, la fluorescencia disminuye rápidamente debido a una serie de reacciones que abarcan la ciclación de hidroxiaácidos fluorescentes del tipo 2 (Figura 4) a lactonas no fluorescentes del tipo 3 (Figura 5) y finalmente se forman ácidos tetrámicos del tipo 4 (Figura 5).²⁴

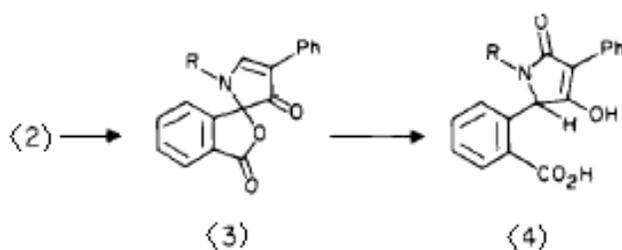


Figura 5. Reacciones del derivatizado de la fluorescamina.²⁴

La fluorescamina es capaz de reaccionar con el grupo N-terminal y con el grupo ϵ -amino de las proteínas para dar productos fluorescentes pero, sólo la reacción con el grupo amino terminal conduce a la producción de un derivado de alta fluorescencia. Cuando el grupo amino terminal tiene un pKa óptimo en el rango de pH 7, los grupos ϵ -amino tienen valores de pKa en un rango de pH 9, por tanto, requieren de un pH más alto para la reacción con la fluorescamina.²⁸

2.3.3.2 Disolventes de la fluorescamina

De Bernardo y colaboradores²⁴ encontraron que la acetona y el dioxano son dos disolventes adecuados para la fluorescamina debido a que están comercialmente disponibles en grados que tienen muy bajas cantidades de impurezas que presentan fluorescencia. Otros disolventes útiles que reportan los autores son el acetonitrilo, el dimetilsulfóxido y el tetrahidrofurano. También, estudiaron la estabilidad de una solución de fluorescamina 2 mM en acetona, acetonitrilo y dioxano, sus estudios mostraron que la

fluorescamina es estable a 4°C durante 12 semanas en acetona y en acetonitrilo y, sólo 2 semanas en dioxano. Algunos disolventes como el metanol forman productos con la fluorescamina, aunque su reacción es reversible, reduce drásticamente la reactividad de la fluorescamina con las aminas primarias.²⁴

2.3.3.3 Concentración de la fluorescamina

La concentración de la fluorescamina también es una variable que se debe considerar para obtener las condiciones óptimas de reacción. Se requiere un exceso de la fluorescamina debido a que ésta es rápidamente hidrolizada en un medio acuoso para formar productos no fluorescentes (Figura 6). La vida media de la reacción con péptidos es de 10-100 milisegundos, mientras que la reacción de hidrólisis toma de 1-10 segundos. No obstante, el reactivo y sus productos de hidrólisis no interfieren con la detección UV, por tanto, no se requiere purificar la muestra.^{22, 23, 24, 26, 29}

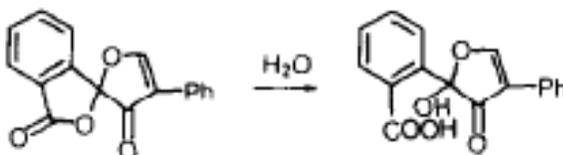


Figura 6. Reacción de hidrólisis de la fluorescamina.²⁹

2.3.4 Condiciones cromatográficas de derivatización reportadas en la literatura

La Tabla 2 condensa la información de las condiciones cromatográficas y de derivatización que se reportan en la literatura. Aunque, no cuantificaron L-lisina emplearon a la fluorescamina como agente derivatizante y sirvieron de base para iniciar la parte experimental de la presente tesis.

Tabla. 2. Condiciones cromatográficas y de derivatización reportadas en la literatura.

Investigadores	Condiciones cromatográficas	Características relevantes de la derivatización
McMahon y colaboradores ²³	Columna: Bondclone C-18 (300 x 3.9 mm), 10 µm; FM: Tetrahidrofurano:ACN:Buffer de fosfatos 15 mM, pH 3.5 (4:24:72); vel. flujo: 1 mL/min; λ: 385 nm; vol. inyección: 20 µL.	Derivatizante: fluorescamina en ACN 5 mM; medio de reacción: buffer de boratos 100 mM pH 9.2; tipo de agitación: vórtex; temperatura de reacción: ambiente.
Namjoshi y colaboradores* ²²	Columna: Phenomenex Jupiter C-18 (150 x 4.6 mm), 5 µm; FM: ACN (0.1 % TFA):H ₂ O (0.1 % TFA): (30:70); vel. flujo: 1 mL/min; vol. inyección: 10 µL.	Derivatizante: fluorescamina 0.1 %; medio de reacción: buffer de boratos 100 mM; tiempo de reacción: 10 min; temperatura de reacción: ambiente.

* En esta investigación se empleó un detector de fluorescencia.

2.4 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Un método analítico es la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de una muestra. Un analito es un componente específico en una muestra a medir en un análisis por lo que, un método analítico mide un analito en una muestra.³⁰

Los métodos analíticos utilizados para evaluar la calidad de los productos farmacéuticos, están sujetos a varios requisitos de acuerdo con la normatividad vigente, así como, con otros documentos normativos nacionales e internacionales. La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) es el documento legal instituido por la Ley General de Salud donde se establecen los métodos de análisis y los requisitos sobre la identidad, pureza, potencia y otras características de calidad que garanticen que los fármacos (principios activos), aditivos, medicamentos (preparados farmacéuticos), radiofármacos y productos biológicos sean eficaces y seguros.³¹

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006, *Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos*, los métodos analíticos que no sean farmacopeicos y que

sean utilizados para evaluar fármacos y aditivos; evaluar producto a granel; en proceso y terminado; validaciones y estudios de estabilidad deben ser validados de acuerdo a un protocolo de validación aprobado.³²

La validación de un método analítico es el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio; que las características de desempeño del método, satisfacen los requisitos para su aplicación analítica. La validación de métodos analíticos es parte fundamental del desarrollo de una nueva formulación y de la técnica de análisis de control de calidad de una nueva forma farmacéutica porque a través de sus pruebas se determina si el método cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado.^{30, 31}

2.4.1 Parámetros de desempeño

El proceso de validación de métodos analíticos puede comprender los parámetros de validación que se indican en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros de desempeño analítico recomendados en la validación de métodos analíticos.³¹

Verificación del sistema
Precisión del sistema
Linealidad del sistema
Especificidad
Exactitud del método
Linealidad e intervalo del método
Precisión del método
Límite de detección del método
Límite de cuantificación del método
Robustez del método
Tolerancia del método

2.4.1.1 Verificación del sistema. Verificación de que el sistema (instrumento, analista, equipo, sustancia de referencia, entre otros) opera con base a criterios preestablecidos, que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico. Esta verificación

permite establecer la confiabilidad del sistema, antes del procesamiento de las muestras durante el uso rutinario del método.³⁰

Las pruebas de verificación del sistema se basan en el concepto de que el equipo e instrumentos de medición, las operaciones analíticas y las muestras que van a ser analizadas constituyen un sistema integral, que puede ser evaluado como tal.³¹

2.4.1.2 Precisión del sistema. Es el grado de concordancia relativa de la respuesta analítica de soluciones de referencia de concentración o magnitud conocida. El sistema está compuesto por el analista, el equipo, los instrumentos de medición, las soluciones de referencia, etc., que en conjunto originan una variabilidad inherente asociado a la respuesta analítica (área del pico, altura del pico, entre otros) que en general es aditiva a la del método.³¹

2.4.1.3 Linealidad del sistema. Es una función $y = f(x)$, donde se relaciona la respuesta (y) y la concentración (x). Se define como la capacidad que tiene el método analítico para obtener resultados de prueba que son directamente proporcionales a la concentración del analito, en un intervalo de concentraciones pertinentes a la aplicación analítica. Cuando la relación entre la concentración y la respuesta del analito o sus transformaciones matemáticas no es lineal dentro del intervalo de trabajo da lugar a inexactitud del método analítico.^{30, 31}

2.4.1.4 Especificidad/Selectividad. Es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra que pueden estar presentes o que se pudieran presentar por efectos ambientales y/o interacción con los mismos componentes como impurezas, productos de degradación o componentes de la misma muestra. Para el caso de estudios de estabilidad, la evaluación de la selectividad es obligatoria.³¹

2.4.1.5 Exactitud del método. Es la concordancia absoluta entre el resultado obtenido con el método y la cantidad verdadera del analito presente en la muestra a una cantidad fija. La evaluación de la exactitud puede evaluarse de varias maneras, incluyendo la evaluación de la recuperación del analito en un intervalo de la valoración definido o evaluando la linealidad

de la relación entre las concentraciones estimadas y las reales. La exactitud del método debe ser determinada a todos los métodos de carácter cuantitativo.^{18,31}

2.4.1.6 Linealidad e intervalo del método. Es la capacidad de un método analítico para dar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo dado. Es necesario que el intervalo incluya los límites de especificación de la aplicación analítica del método.³¹

2.4.1.7 Precisión del método. Es el grado de concordancia relativa entre los resultados obtenidos al aplicar el método analítico, bajo las mismas condiciones analíticas (repetibilidad) o bajo diferentes condiciones analíticas (reproducibilidad) utilizando una muestra homogénea. La precisión de un método analítico generalmente se expresa como desviación estándar o como coeficiente de variación.³¹

2.4.1.8 Límite de detección del método. Es la mínima cantidad del analito en una muestra la cual puede ser detectada pero no cuantificada como un valor exacto. El límite de detección es 3 veces la señal del nivel de ruido del sistema determinado en un blanco. Es un parámetro de desempeño que debe determinarse cuando un método analítico se aplica como prueba límite.^{30,31}

2.4.1.9 Límite de cuantificación del método. Es la concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas del método.³⁰

2.4.1.10 Robustez del método. Los resultados de los métodos analíticos pueden variar por una serie de factores relacionados con las condiciones instrumentales o inherentes a éste, por ejemplo, la temperatura de la columna, el pH de las fases, etc., los cuales se presentan normalmente durante una corrida analítica, por lo que es necesario investigar su efecto bajo pequeños cambios deliberados, fijados por el analista, para asegurar la confiabilidad de los resultados. La robustez del método es su capacidad de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros normales de operación del método.³⁰

2.4.1.11 Tolerancia del método. Es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos, por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación, como puede ser: equipos, diferentes laboratorios, analistas, instrumentos, columna; específicamente se refiere a factores externos al método.³¹

La robustez y la tolerancia son conceptos diferentes, ya que el primero se refiere a la influencia de factores internos del método que pudiesen afectar la exactitud del método, mientras que la tolerancia, se refiere a factores externos del método, que pudieran afectar la reproducibilidad de éste.³¹

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 RECURSOS MATERIALES

3.1.1 Reactivos

- Fluorescamina al 98 % grado reactivo, marca Sigma-Aldrich, lote 70K4035.
- Borato de sodio decahidratado grado reactivo, marca CCI, lote 611502.
- Agua grado HPLC, marca J.T. Baker, lote 4218-03.
- MeOH grado HPLC, marca J.T. Baker, lote G30C04.
- ACN grado HPLC, marca J.T. Baker, lote B49C51.
- Ácido trifluoroacético grado reactivo, marca Sigma-Aldrich, lote 125 KO121.
- Placebo del multivitamínico, lote ME-83514-41.
- Clorhidrato de L-lisina materia prima con número de lote 0000030316 del proveedor Blanver. La materia prima fue empleada como estándar de referencia.

3.1.2 Equipos

- Agitador magnético, marca Civeq, modelo UB-2.
- Equipo de filtración con vacío, marca Gelman Sciences Pall.

3.1.3 Instrumentos

- Potenciómetro, marca Hanna Instruments, modelo HI 221.
- Balanza analítica, marca Ohaus, modelo AS200.

3.1.4 Micropipetas

- Micropipeta de 100-1000 μL , marca eppendorf.
- Micropipeta de 10-100 μL , marca eppendorf.

3.2 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución se realizó en un cromatógrafo de la marca Agilent, equipado con un detector de UV con arreglo de diodos. El control del equipo, la adquisición de los datos y el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa de software HP Chemstation. Se emplearon las columnas Agilent C-18 de 4.6 mm de diámetro interno, 50 mm de longitud y 1.8 μm de tamaño de partícula y LiChro AORT RP-18 de 4.0 mm de diámetro interno, 125 mm de longitud y 5 μm de tamaño de partícula. La detección fue a 385 nm y la columna se mantuvo a temperatura ambiente.

3.3 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Solución estándar de clorhidrato de L-lisina 2 mM

Pesar con exactitud 18.0 mg de clorhidrato de L-lisina materia prima. Transferir a un matraz ámbar de 50 mL y llevar a la marca con agua.

Solución de clorhidrato de L-lisina 2.2 mM (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

Pesar con exactitud 10.0 mg de clorhidrato de L-lisina materia prima. Transferir a un matraz de 25 mL y llevar a la marca con agua grado HPLC.

Solución de fluorescamina 2.5 mM

Pesar con exactitud 14.0 mg de fluorescamina. Transferir a un matraz ámbar volumétrico de 20 mL y llevar a la marca con acetonitrilo. La solución resultante fue almacenada a 4 °C.

Solución de fluorescamina 5.6 mM

Pesar con exactitud 16.0 mg de fluorescamina. Transferir a un matraz ámbar volumétrico de 10 mL y llevar a la marca con acetonitrilo grado HPLC.

Solución de borato de sodio decahidratado 53 mM, pH 8.5

Pesar con exactitud 503 mg de borato de sodio decahidratado. Transferir a un matraz aforado de 25 mL y llevar a la marca con agua. La solución resultante se ajustó a pH 8.5 con una solución de ácido bórico 10 mM.

Solución de borato de sodio decahidratado 53 mM, pH 9.0

Pesar con exactitud 503 mg de borato de sodio decahidratado. Transferir a un matraz aforado de 25 mL y llevar a la marca con agua. La solución resultante se ajustó a pH 9.0 con una solución de ácido bórico 10 mM.

Solución de borato de sodio decahidratado 53 mM, pH 9.3

Pesar con exactitud 503 mg de borato de sodio decahidratado. Transferir a un matraz aforado de 25 mL y llevar a la marca con agua. La solución resultante tiene un pH de 9.3.

Solución de ácido bórico 10 mM

Pesar con exactitud 12.4 mg de ácido bórico. Transferir a un matraz aforado de 20 mL y llevar a la marca con agua.

Fase móvil ACN: H₂O (30:70)

Verter 30 mL de ACN grado HPLC y 70 mL de agua grado HPLC en un frasco de vidrio de 100 mL. Filtrar y desgasificar la mezcla resultante durante 10 minutos antes de colocar en el cromatógrafo.

Fase móvil ACN (0.1 % de TFA): H₂O (0.1 % de TFA) 85:15

Verter 100 µL de TFA en un matraz volumétrico de 100 mL y aforar con ACN. Por otra parte, verter 20 µL de TFA en un matraz volumétrico de 20 mL y aforar con agua. Verter en un frasco 85 mL de la solución de ACN (0.1 % de TFA) y 15 mL de agua (0.1 % de TFA). Filtrar y desgasificar la mezcla resultante durante 10 minutos antes de colocar en el cromatógrafo.

Fase móvil MeOH (0.1 % de TFA): H₂O (0.1 % de TFA) 75:25

Verter 100 µL de TFA en un matraz volumétrico de 100 mL y aforar con MeOH. Por otra parte, verter 25 µL de TFA en un matraz volumétrico de 25 mL y aforar con agua. Verter en

un frasco 75 mL de la solución de MeOH (0.1 % de TFA) y 25 mL de agua (0.1 % de TFA). Filtrar y desgasificar la mezcla resultante durante 10 minutos antes de colocar en el cromatógrafo.

Solución stock de clorhidrato de L-lisina para evaluar la linealidad del sistema (5.6 mg/mL)

Pesar con exactitud 140.0 mg de clorhidrato de L-lisina materia prima. Transferir a un matraz de 25 mL y llevar a la marca con agua grado HPLC. Realizar por triplicado.

Curvas de linealidad del sistema con cinco niveles de concentración

Tomar diferentes alícuotas de la solución stock de clorhidrato de L-lisina 5.6 mg/mL como se indica en la Tabla 4 y llevar a la marca con agua. Realizar por triplicado.

Tabla 4. Curva de linealidad del sistema

Nivel (%)	Alícuota de la solución stock (mL)	Aforo (mL)
50	1.8	50
75	2.7	50
100	3.6	50
125	4.5	50
150	5.4	50

Solución de clorhidrato de L-lisina 4.8 mg/mL para la aplicación del método desarrollado

Pesar con exactitud 120.0 mg de clorhidrato de L-lisina materia prima. Transferir a un matraz de 25 mL y llevar a la marca con agua grado HPLC. Preparar por duplicado.

3.4 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

Reacción de derivatización. Para la formación del derivado se añadieron 600 µL de borato de sodio 53 mM pH 9.3, 200 µL de fluorescamina 2.5 mM y 200 µL de clorhidrato de L-lisina 2.0 mM en un vial ámbar de 1.5 mL. La solución resultante se agitó por 1 minuto

(aproximadamente a 700 rpm) y se esperó un tiempo de reacción total de 10 minutos a temperatura ambiente. La cuantificación de la cantidad de derivado de L-lisina generado se realizó por CLAR. Para ello, se emplearon columnas de fase reversa con diferentes longitudes, tamaño de partícula y diámetro interno. Se utilizó una velocidad de flujo de 1 mL/min y como fase móvil una mezcla binaria constituida por ACN-H₂O, en proporción 30:70. El volumen de inyección fue de 10 µL.

Blanco de reactivos. Se preparó siguiendo la misma metodología indicada para la reacción de derivatización, pero sin la adición de la solución de clorhidrato de L-lisina.

Para determinar las mejores condiciones cromatográficas y de derivatización se evaluaron las siguientes condiciones.

a) pH del medio de reacción: Se evaluaron tres soluciones amortiguadoras de boratos con 3 diferentes valores de pH (8.5, 9.0 y 9.3).

b) Selección de la columna cromatográfica. Se evaluaron dos columnas cromatográficas una LiChro AORT RP-18 de 4.0 mm de diámetro interno, 125 mm de longitud y 5 µm de tamaño de partícula y una Agilent C-18 de 4.6 mm de diámetro interno, 50 mm de longitud y 1.8 µm de tamaño de partícula. Ambas columnas se acondicionaron durante 30 minutos con la fase móvil ACN-H₂O, en proporción 30:70.

c) Velocidad del flujo y volumen de inyección. Se evaluó la velocidad de flujo de 0.5 mL/min y el volumen de inyección de 20 µL. Se empleó una fase móvil de ACN (0.1 % de TFA): H₂O (0.1 % de TFA), en proporción 85:15.

d) Tiempo de espera de reacción. Se evaluó la respuesta del derivado cuando se inyecta al cromatógrafo inmediatamente después de agitar por 1 minuto. Se empleó la fase móvil mencionada en el inciso c de esta sección 3.4.

e) Fase móvil. Se evaluaron dos fases móviles ACN (0.1 % de TFA): H₂O (0.1 % de TFA), en proporción 85:15 y MeOH (0.1 % de TFA): H₂O (0.1 % de TFA), en proporción 75:25.

f) **Optimización de la reacción de derivatización.** Se realizaron los siguientes cambios en la condiciones de derivatización (Tabla 5).

Tabla 5. Variaciones en la reacción de derivatización

Reactivo	Concentración (mM)	Alícuota (µL)
Fluorescamina	5.6	300
Clorhidrato de L-lisina	2.2	100

3.5 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Para la validación del método analítico desarrollado se realizaron tres pruebas: linealidad del sistema, precisión del sistema y robustez. La concentración central de clorhidrato de L-lisina fue de 400 µg/mL que es igual a 2.2 mM, ya que ésta es la concentración de las condiciones desarrolladas para la derivatización.

3.5.1 Linealidad del sistema

Para determinar la linealidad del sistema se prepararon tres curvas patrón a partir de tres soluciones stock (pesadas independientes). Cada curva tuvo 5 niveles de concentración, los cuales abarcan un intervalo de 200 a 600 µg/mL de clorhidrato de L-lisina. En la Tabla 6 se reportan las concentraciones analizadas y su nivel correspondiente.

Tabla 6. Concentraciones de la curva patrón para linealidad del sistema

Nivel (%)	Concentración del HCl L-lisina (µg/mL)
50	200
75	300
100	400
125	500
150	600

La relación entre la concentración de clorhidrato de L-lisina y su respuesta se determinó como el área bajo la curva. Se calculó el coeficiente de determinación, el valor de la pendiente y la ordenada al origen. El criterio de aceptación de la linealidad del sistema fue $r^2 \geq 0.98$.

3.5.2 Precisión del sistema

Para determinar la precisión del sistema se prepararon 6 soluciones al 100 % de clorhidrato de L-lisina (400 µg/mL) y fueron derivatizadas de acuerdo con las condiciones desarrolladas. Se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación del factor de respuesta (área bajo la curva/concentración). El criterio de aceptación de la precisión del sistema fue $CV \leq 1.5 \%$.

3.5.3 Robustez

Para la robustez se seleccionaron tres factores relacionados al propio método que se consideraron críticos:

- La proporción de metanol en la fase móvil.
- La concentración de TFA en la fase móvil, tanto en la parte acuosa como en la orgánica.
- La velocidad de flujo.

Para determinar la robustez se prepararon dos estándares derivatizados de 400 µg/mL de clorhidrato de L-lisina. Los estándares se analizaron bajo las condiciones normales de trabajo y también bajo las condiciones descritas en la Tabla 7. El criterio de aceptación fue $CV \leq 2.0 \%$.

Tabla 7. Parámetros evaluados de Robustez

PARÁMETRO	CONDICIÓN		
	Baja	Normal	Alta
Proporción de MeOH en la FM	73 %	75 %	77 %
Concentración de TFA	0.09 %	0.10 %	0.11 %
Velocidad de flujo	0.45 mL/min	0.5 mL/min	0.55 mL/min

3.6 APLICACIÓN DEL MÉTODO DESARROLLADO

Una vez desarrollado y validado el método analítico se llevó a cabo una aplicación del mismo. Para ello, se analizó una muestra de un multivitamínico para niños en solución oral que contenía clorhidrato de L-lisina.

Para realizar este ensayo se prepararon dos estándares independientes a una concentración de 400 µg/mL. Ambas soluciones fueron derivatizadas de acuerdo con la metodología descrita en la sección 4.2. El placebo y los placebos cargados se prepararon de la siguiente manera.

3.6.1 Preparación del placebo cargado

En un vaso de precipitados de 50 mL se pesaron aproximadamente 5.0 g del placebo del multivitamínico. A esta emulsión se adicionaron 4.2 mL de una solución de clorhidrato de L-lisina con una concentración de 4.8 mg/ml. Enseguida se adicionaron 25 mL de agua grado HPLC y se agitó durante 10 minutos. La solución resultante se transfirió cuantitativamente a un matraz aforado de 50 mL empleando para ello 3 enjuagues de 5 mL de agua al vaso de precipitados. Finalmente, la solución así obtenida se llevó a la marca de aforo con agua grado HPLC. La concentración final fue de 400 µg/mL de clorhidrato de L-lisina. Se preparó por duplicado.

3.6.2 Preparación del placebo

El placebo para este ensayo se preparó siguiendo la misma metodología indicada en el inciso 3.6.1 pero sin la adición de la solución de clorhidrato de L-lisina.

Con los resultados obtenidos se calculó el por ciento de recobro, la desviación estándar, el coeficiente de variación y la no interferencia de los principios activos presentes. El criterio de aceptación fue un $CV \leq 2.0$.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

4.1.1 Efecto del pH del medio de reacción en la respuesta del analito.

De acuerdo con la literatura²⁴ la variable que más afecta el rendimiento de la reacción y la fluorescencia del derivado es el pH del medio de reacción, por lo cual, durante la primera etapa del desarrollo del método se evaluó el efecto del mismo. Así, De Bernardo y colaboradores reportaron en 1974 que los aminoácidos requieren de un pH entre 8.5 y 9.5 para formar el derivado con fluorescamina. Por este motivo, se evaluaron 3 buffers de boratos con diferentes valores de pH (8.5, 9.0 y 9.3). Los resultados se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8. Efecto del pH

Señal	Tiempo de retención (min)	Área del pico (mAU)
Derivado del medio de reacción de pH 8.5	3.3	165.5
Derivado del medio de reacción de pH 9.0	2.9	819.0
Derivado del medio de reacción de pH 9.3	2.8	4395.4

Como se desprende de los resultados obtenidos, a pH 8.5 (Figura 7) casi no hay reacción de derivatización, a pH 9.0 (Figura 8) comienza a aumentar la formación del derivado pero su concentración es baja y a pH 9.3 (Figura 9) la reacción se lleva a cabo con una buena respuesta de absorbancia. En síntesis, al aumentar el pH del medio de reacción aumenta drásticamente la respuesta del derivado. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Garesse & colaboradores²⁸, ya que los autores reportan que cuando el grupo ε-amino tiene un valor de pKa en el rango de pH 9, se requiere de un pH más alto para que la reacción de derivatización se efectúe y el grupo ε-amino de la L-lisina tiene un pKa>9.

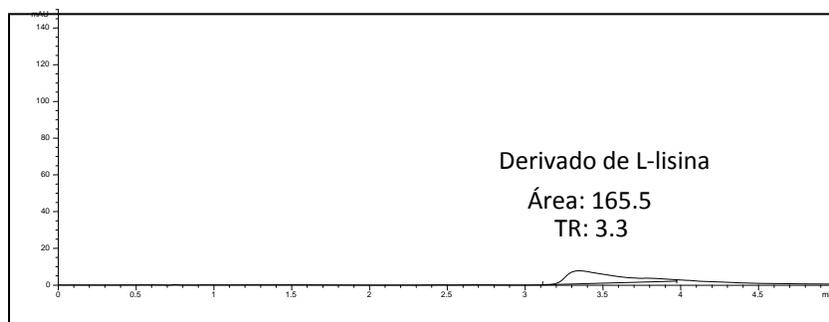


Figura 7. Cromatograma obtenido con la solución estándar del medio de reacción a pH 8.5

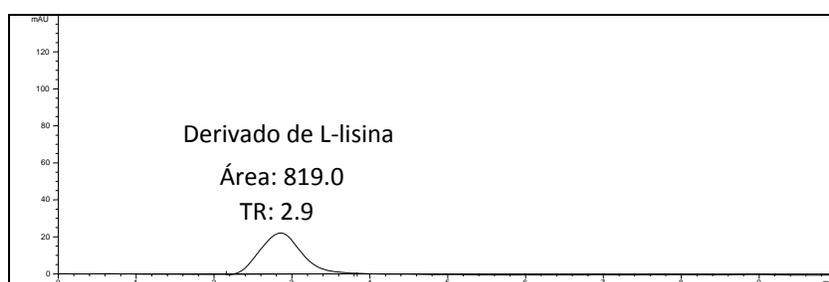


Figura 8. Cromatograma obtenido con la solución estándar con medio de reacción a pH 9.0

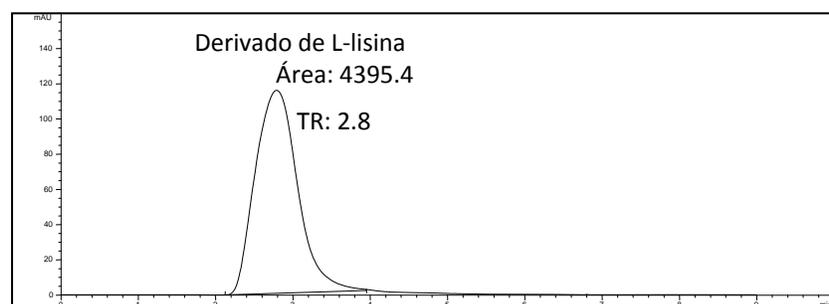


Figura 9. Cromatograma obtenido con la solución estándar con medio de reacción a pH 9.3

4.1.2 Selección de la columna cromatográfica.

Para seleccionar la columna cromatográfica se probaron dos columnas C-18 de diferentes dimensiones y diferente tamaño de partícula. Se probó una columna LiChro AORT RP-18 4.0x125 mm, 5 μ m, debido a que la literatura científica^{22, 23} describe el empleo de una

columna C-18 de dimensiones convencionales y se probó una columna Agilent C-18 4.6x50 mm, 1.8 μm porque, como se menciona en el marco teórico, las columnas cortas de diámetro interno pequeño permiten un intercambio rápido de los compuestos entre la fase móvil y la fase estacionaria obteniéndose tiempos de análisis más cortos.

Como se observa en la Tabla 9 con la columna LiChro AORT RP-18 4.0x125 mm, 5 μm , el tiempo de retención para la primera y segunda réplica fueron de 2.8 y 2.6 min., respectivamente (Figuras 10 y 11). Por otra parte, con la columna Agilent C-18 4.6x50 mm, 1.8 μm , el tiempo de retención disminuyó a 0.8 minutos (Figuras 12 y 13). Con base en estos resultados, se decidió continuar los estudios con la columna Agilent C-18 4.6x50 mm, 1.8 μm , porque el empleo de este tipo de columna implica beneficios como la disminución del gasto de fase móvil, la disminución de los desechos orgánicos y la disminución del tiempo de acondicionamiento de la columna.

Tabla 9. Selección de la columna

Columna	Señal	Tiempo de retención (min)	Área del pico (mAU)
LiChro AORT RP-18 4.0x125 mm, 5 μm	Estándar derivatizado réplica 1	2.8	2786.5
	Estándar derivatizado réplica 2	2.6	3545.9
Agilent C-18 4.6x50 mm, 1.8 μm	Estándar derivatizado réplica 1	0.8	1161.9
	Estándar derivatizado réplica 2	0.8	1141.0

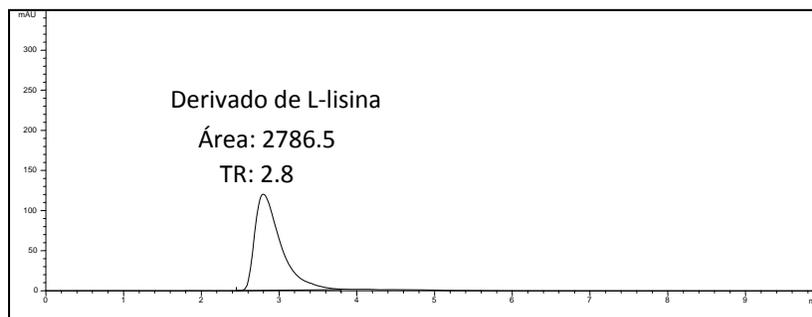


Figura 10. Cromatograma obtenido con el estándar 1 y la columna LiChro AORT RP-18 4.0x125 mm, 5 µm

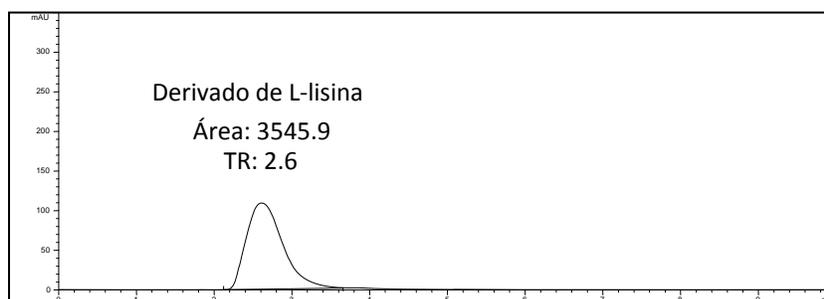


Figura 11. Cromatograma obtenido con el estándar 2 y la columna LiChro AORT RP-18 4.0x125 mm, 5 µm

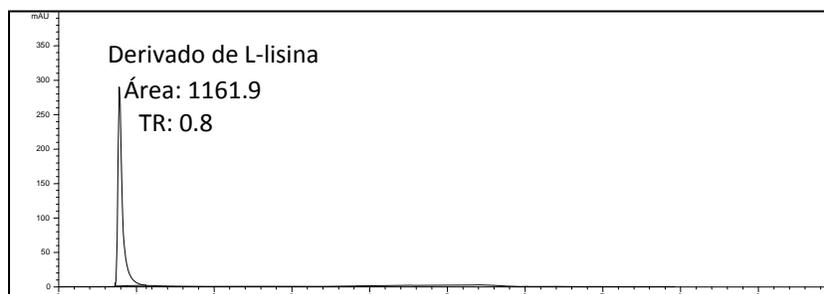


Figura 12. Cromatograma obtenido con el estándar 1 y la columna Agilent C-18 4.6x50 mm, 1.8 µm

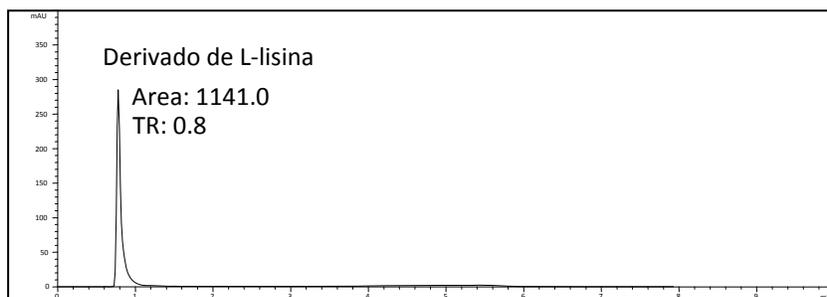


Figura 13. Cromatograma obtenido con el estándar 2 y la columna Agilent C-18 4.6x50 mm, 1.8 μ m

4.1.3 Incremento del tiempo de retención y del área de la señal del derivatizado por medio de cambios en la velocidad de flujo y el volumen de inyección.

Para incrementar el tiempo de retención y el área del pico de la señal se realizaron cambios en las condiciones cromatográficas y en el volumen de inyección de la muestra (de 10 a 20 μ L). Los resultados de esta determinación se encuentran resumidos en la Tabla 10. Como se desprende de estos resultados el área del derivado se incrementó notablemente en comparación con los resultados obtenidos en pruebas anteriores. Esto se debe a que la disminución de la velocidad de flujo de 1 a 0.5 mL/min incrementó el tiempo de retención a 1.8 min (Figuras 14 y 15). En general, con estas condiciones cromatográficas se obtuvieron: un mejor tiempo de retención y una mejor respuesta.

Tabla 10. Efecto de la velocidad de flujo y el volumen de inyección

Señal	Tiempo de retención (min)	Área del pico (mAU)
Estándar derivatizado réplica 1	1.9	8082.2
Estándar derivatizado réplica 2	1.9	8372.9

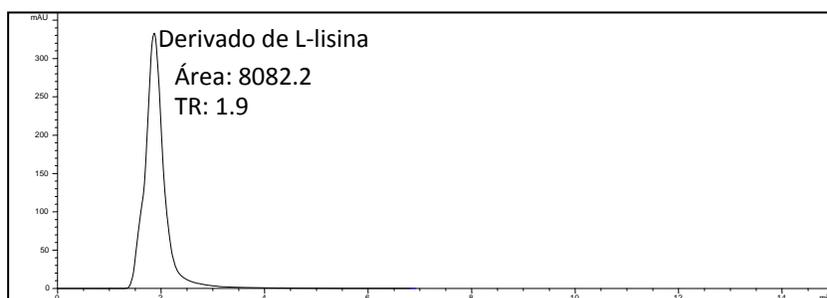


Figura 14. Cromatograma obtenido con el estándar 1 al disminuir la velocidad de flujo y aumentar el volumen de inyección

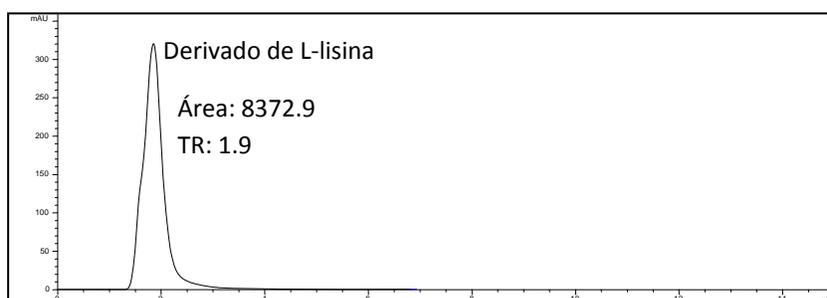


Figura 15. Cromatograma obtenido con el estándar 2 al disminuir la velocidad de flujo y aumentar el volumen de inyección

4.1.4 Estudio del efecto del tiempo de espera de reacción en la respuesta del derivatizado.

De acuerdo con la literatura²³ la reacción de la fluorescamina con las aminas primarias es instantánea a temperatura ambiente en medio alcalino y la absorbancia permanece constante durante una semana. Por lo cual, se evaluó el efecto del tiempo de espera de reacción preparando la reacción de derivatización siguiendo la misma metodología indicada en el inciso 3.4 de la sección experimental pero sin esperar 10 minutos antes de inyectar la muestra. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 11. Como se puede observar en las Figuras 16 y 17 la reacción se lleva a cabo instantánea y eficientemente, por lo tanto, después de agitar en vórtex la muestra se puede inyectar inmediatamente.

Tabla 11. Efecto del tiempo de espera de reacción

Señal	Tiempo de retención (min)	Área del pico (mAU)
Estándar derivatizado réplica 1	1.9	9542.6
Estándar derivatizado réplica 2	1.9	9668.3

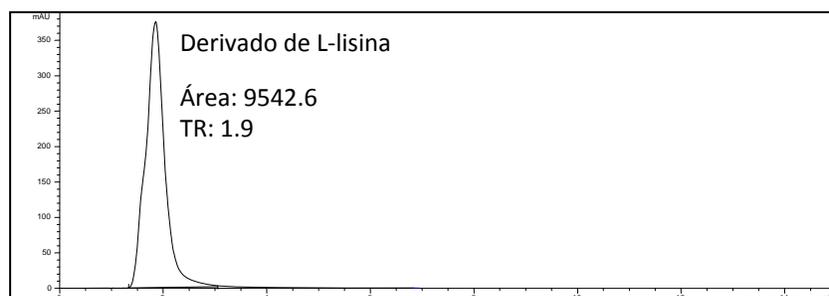


Figura 16. Cromatograma obtenido con el estándar 1 durante el estudio del tiempo de espera de reacción

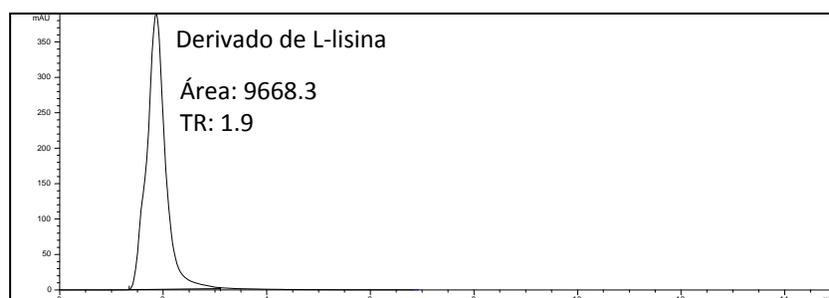


Figura 17. Cromatograma obtenido con el estándar 2 durante el estudio del tiempo de espera de reacción

4.1.5 Cambio de ACN a MeOH en la fase móvil.

Debido a causas financieras se tuvo que prescindir del uso del acetonitrilo. Para sustituir al ACN se evaluó el comportamiento del pico de interés empleando una fase móvil con metanol. Para determinar los porcentajes de MeOH:H₂O en primer lugar se calculó la polaridad de la fase móvil de ACN (0.1 % de TFA): H₂O (0.1 % de TFA) en proporción 85:15, encontrándose que el porcentaje de MeOH necesario para tener la misma polaridad es del

75 %. Por ello se empleó una fase móvil compuesta por MeOH (0.1 % de TFA): H₂O (0.1 % de TFA) en proporción 75:25. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

Como se puede observar en las Figuras 18 y 19 la reacción de derivatización estaba generando dos productos. Era probable que la reacción de derivatización no se estuviera llevando a cabo al 100 % y que se estuviera formando un producto intermedio. Por tal razón, se requirió optimizar la reacción de derivatización para obtener una reacción completa entre el clorhidrato de L-lisina y la fluorescamina.

El cambio de acetonitrilo a metanol cambió el tiempo de retención del pico principal de 1.8 a 2.8 min. El uso del metanol fue conveniente porque la forma del pico principal era adecuada. Por otra parte, el metanol además de ser más económico también es menos contaminante para el medio ambiente. Con base a estos resultados se decidió continuar con la fase móvil de MeOH (0.1 % de TFA): H₂O (0.1 % de TFA) en proporción 75:25.

Tabla 12. Cambio de ACN a MeOH en la fase móvil

Señal	Tiempo de retención (min)	Área del pico principal (mAU)
Estándar derivatizado réplica 1	2.8	2047.6
Estándar derivatizado réplica 2	2.8	2161.0

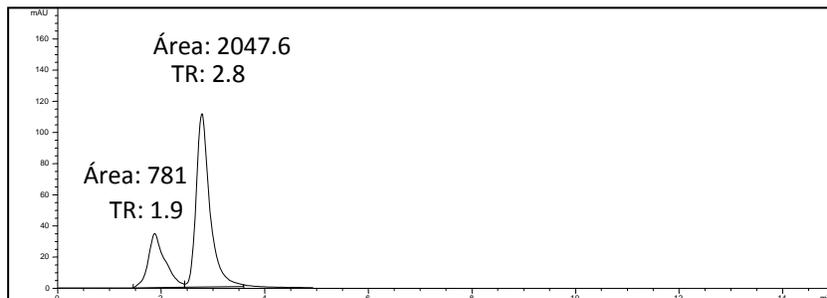


Figura 18. Cromatograma obtenido con el estándar 1 y MeOH en lugar de ACN en la fase móvil

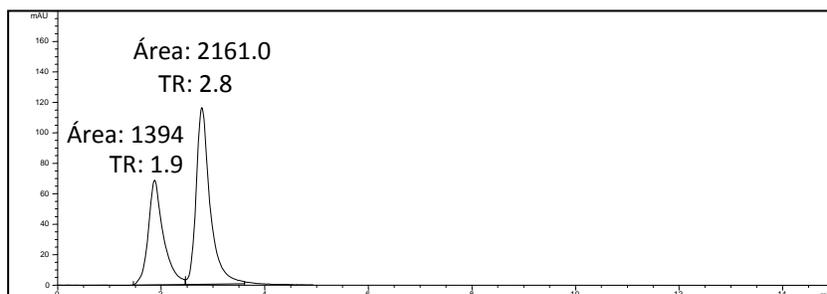


Figura 19. Cromatograma obtenido con el estándar 2 y MeOH en lugar de ACN en la fase móvil

4.1.6 Optimización de la reacción de derivatización.

Para optimizar la reacción de derivatización se aumentó la concentración y el volumen de adición de la fluorescamina (de 2.5 a 5.6 mM y de 200 a 300 μ L) y se disminuyó el volumen de adición del clorhidrato de L-lisina (200 a 100 μ L). Estos cambios se realizaron porque la literatura²⁹ reporta que algunas reacciones con fluorescamina llegan a requerir un exceso hasta del 500 % debido a la hidrólisis de la fluorescamina en medio acuoso. Como se desprende de los resultados indicados en la Tabla 13, con el exceso de fluorescamina la reacción de derivatización produjo sólo un derivado (Figuras 20 y 21). Como se observa en la Figura 22 la solución del blanco de reactivos no presenta ninguna señal de interferencia.

De esta manera se fijaron las características de la reacción de derivatización porque se obtiene una sola señal del derivado a los 2.9 min, que no es interferida por los reactivos de la reacción de derivatización y que permite su cuantificación exacta.

Tabla 13. Optimización de la reacción de derivatización.

Señal	Tiempo de retención (min)	Área del pico (mAU)
Blanco de reactivos	---	---
Estándar derivatizado réplica 1	2.9	2869.3
Estándar derivatizado réplica 2	2.9	2830.0

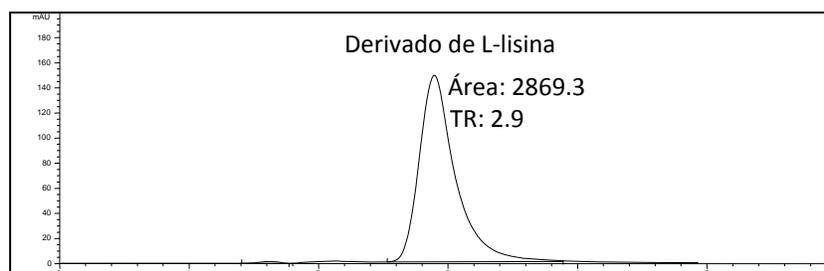


Figura 20. Cromatograma obtenido durante la optimización de la reacción de derivatización utilizando el estándar 1.

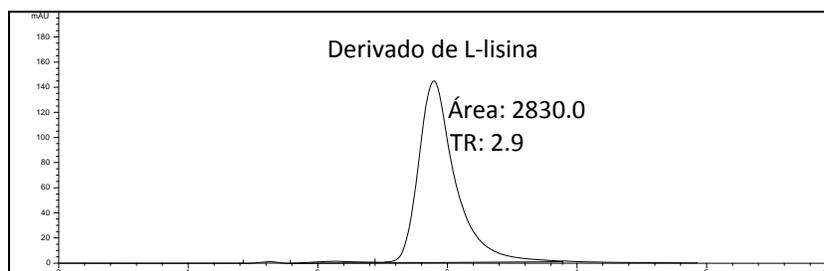


Figura 21. Cromatograma obtenido durante la optimización de la reacción de derivatización utilizando el estándar 2.

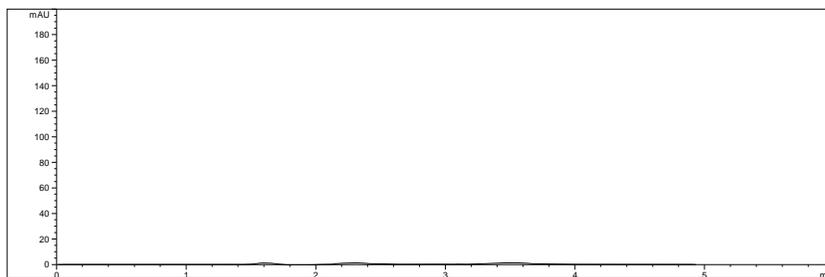


Figura 22. Cromatograma obtenido con el blanco de reactivos

4.2 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS Y DE DERIVATIZACIÓN DESARROLLADAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CLORHIDRATO DE L-LISINA.

En la Tabla 14 se reportan las condiciones cromatográficas finales del desarrollo del método analítico y las características de la reacción de derivatización. Con estas condiciones cromatográficas se realizó la validación del método.

Reacción de derivatización.

Para la formación del derivado añadir 600 μL de borato de sodio 53 mM pH 9.3, 300 μL de fluorescamina 5.6 mM y 100 μL de clorhidrato de L-lisina 2.2 mM en un vial ámbar de 1.5 mL. Agitar por 1 minuto (aproximadamente a 700 rpm) e inyectar al cromatógrafo.

Tabla 14. Condiciones cromatográficas desarrolladas

Columna	Agilent C-18 4.6x50 mm, 1.8 μm
Fase móvil	MeOH (0.1 % de TFA): H ₂ O (0.1 % de TFA) 75:25
Velocidad de flujo	0.5 mL/min
Volumen de inyección	10 μL
Longitud de onda	385 nm
Temperatura de la columna	Ambiente
Tiempo de corrida	6 min

4.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

4.3.1 Linealidad del sistema.

Para poder construir la gráfica de linealidad del sistema se calculó la concentración real del estándar derivatizado, los datos y los cálculos se encuentran reportados en el Anexo

1. En la Tabla 15 se muestra la concentración real de cada solución y su respuesta correspondiente (área bajo la curva).

Tabla 15. Linealidad del sistema para la cuantificación de clorhidrato de L-lisina

	Nivel (%)	Concentración real de HCl-L-lisina ($\mu\text{g/mL}$)	Área bajo la curva (mAU)
Curva 1	50	201.3	1363.4
	75	302.0	2112.0
	100	402.6	2796.9
	125	503.3	3585.8
	150	603.9	4286.0
Curva 2	50	201.5	1458.2
	75	302.2	2095.9
	100	402.9	2866.6
	125	503.6	3668.6
	150	604.4	4383.4
Curva 3	50	201.9	1410.6
	75	302.8	2212.7
	100	403.8	2771.0
	125	504.7	3496.8
	150	604.7	4171.8

Los datos se analizaron por medio de una regresión lineal encontrándose que la relación entre la concentración del derivado y el área bajo la curva, se ajusta a una línea recta (Figura 23). La ecuación de la línea recta es la siguiente:

$$Y = 7.1319x - 29.078 \quad (Y = mx + b)$$

Donde:

$$m = \text{pendiente} \quad 7.1319$$

$$b = \text{ordena al origen} \quad 29.078$$

$$r^2 = \text{coeficiente de determinación} \quad 0.9961$$

El coeficiente de determinación (r^2) de los datos es mayor a 0.98, por lo cual, cumple con el criterio de aceptación y por lo tanto, el método presenta un comportamiento lineal dentro del intervalo de trabajo (201.3 a 604.7 $\mu\text{g/mL}$).

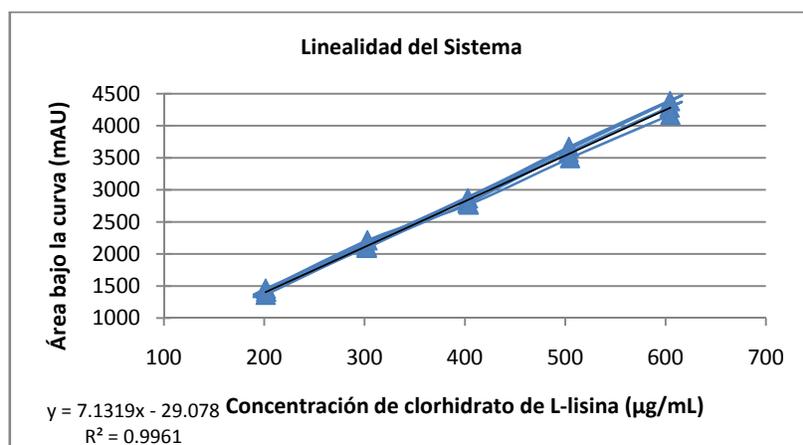


Figura 23. Gráfica de la linealidad del sistema para la cuantificación de clorhidrato de L-lisina

4.3.2 Precisión del sistema.

Para determinar el coeficiente de variación se calculó para cada estándar derivatizado su factor de respuesta. Los datos crudos y los cálculos se encuentran reportados en el Anexo 1. En la Tabla 16 se muestran los datos de la precisión del sistema. El coeficiente de variación encontrado es menor a 1.5, por lo tanto el sistema es preciso.

Tabla 16. Precisión del sistema

Réplica	Concentración real ($\mu\text{g/mL}$)	Área bajo la curva (mAU)	Factor de respuesta (Área/Concentración)
1	400	2875.2	7.19
2	400	2808.8	7.02
3	404	2901.8	7.18
4	400	2902.8	7.26
5	404	2926.8	7.24
6	404	2898.7	7.18
Promedio			7.18
Desviación Estándar			0.08
CV %			1.17

4.3.3 Robustez

En las Tablas 17, 18 y 19 se muestran los resultados obtenidos de las pruebas de robustez con variaciones de la proporción de metanol en la fase móvil, de la concentración de TFA y de la velocidad de flujo.

Tabla 17. Evaluación de la variación de la proporción de metanol en la fase móvil

Condición	Estándar	Concentración (µg/mL)	Área (mAU)	Factor de respuesta	Promedio	Desviación estándar	CV %
Baja (73 %)	1	404	2920.8	7.23	7.36	0.10	1.4
	2	412	3045.2	7.39			
Normal (75 %)	1	404	3017.6	7.47	7.50	0.12	1.7
	2	412	3027.6	7.35			
Alta (77 %)	1	404	3054.5	7.56	7.50	0.12	1.7
	2	412	3146.1	7.64			

Como se puede observar en la Tabla 17 tanto el coeficiente de variación de la condición baja como el de la condición alta son menores al 2.0 %. Por tanto, la respuesta del derivado (área bajo la curva) no se ve afectada por la variación en la proporción de metanol en la fase móvil en un rango de ± 2 %, es decir, entre el 73 % y el 77 %.

Tabla 18. Evaluación de la variación de la concentración de TFA en ambos disolventes de la fase móvil

Condición	Estándar	Concentración (µg/mL)	Área (mAU)	Factor de respuesta	Promedio	Desviación estándar	CV %
Baja (0.09 %)	1	404	2986.0	7.39	7.42	0.06	0.8
	2	412	3071.7	7.46			
Normal (0.1%)	1	404	3017.6	7.47	7.46	0.08	1.1
	2	412	3027.6	7.35			
Alta (0.11 %)	1	404	3017.1	7.47	7.46	0.08	1.1
	2	412	3108.4	7.54			

Como se observa en la Tabla 18 tanto el coeficiente de variación de la condición baja como el de la condición alta son menores al 2.0 %. Por lo tanto, la respuesta del derivado

(área bajo la curva) no se ve afectada por la variación en la concentración de TFA en un rango de $\pm 2\%$, es decir, entre 0.09 % y 0.11 %.

Tabla 19. Evaluación de la variación de la velocidad de flujo

Condición	Estándar	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Área (mAU)	Factor de respuesta	Promedio	Desviación estándar	CV %
Baja (0.45 mL/min)	1	404	3461.9	8.57	7.73	0.57	7.3
	2	412	3098.5	7.52			
Normal (0.5 mL/min)	1	404	3017.6	7.47	7.07	0.52	7.3
	2	412	3027.6	7.35			
Alta (0.55 mL/min)	1	404	2892.1	7.16	7.07	0.52	7.3
	2	412	2604.5	6.32			

Como se puede observar en la Tabla 19 el coeficiente de variación de la condición baja y el de la condición alta son mayores al 2.0 %. Por lo tanto, el método analítico no es robusto cuando se modifica la velocidad de flujo. Una pequeña variación del 2 % provoca una variación significativa en la respuesta del derivado. Por lo tanto, cuando se emplee el método se debe tener en cuenta que, si durante el análisis se presentara una variación en la velocidad de flujo, ésta afectaría la respuesta obtenida.

4.4 APLICACIÓN DEL MÉTODO DESARROLLADO

Para determinar el valor del coeficiente de variación se consideraron los pesos de los estándares, de los placebos y la concentración de la solución de clorhidrato de L-lisina. Los datos crudos y los cálculos realizados se encuentran resumidos en el Anexo 2. En la Tabla 20 se muestran los datos obtenidos durante la aplicación del método. Como se observa en la Figura 24 en la solución placebo ninguno de los componentes presentes en el multivitamínico interfieren con la cuantificación del clorhidrato de L-lisina. Las Figuras 25 y 26 corresponden a las muestras y las Figuras 27 y 28 a los estándares. De manera

adicional, el coeficiente de variación calculado posee un valor de 0.04 % cumpliendo de esta manera con el criterio de aceptación previamente establecido.

Tabla 20. Recobro de los placebos cargados

Muestra	Concentración teórica de HCL-Lys en el placebo (mg/mL)	Concentración experimental (mg/mL)	Por ciento de recobro (%)
1	4.036	4.028	99.8
2	4.036	4.030	99.9
		Promedio	99.8
		Desv. Est.	0.04
		CV%	0.04

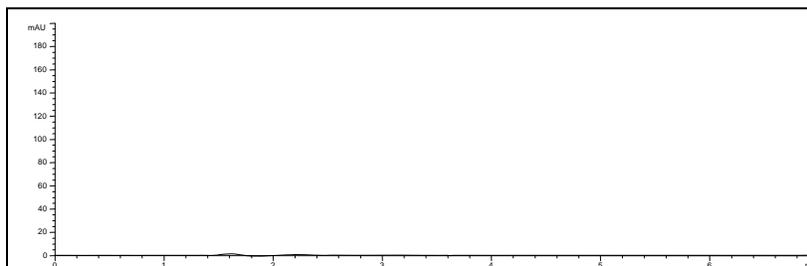


Figura 24. Cromatograma obtenido con el placebo del multivitamínico

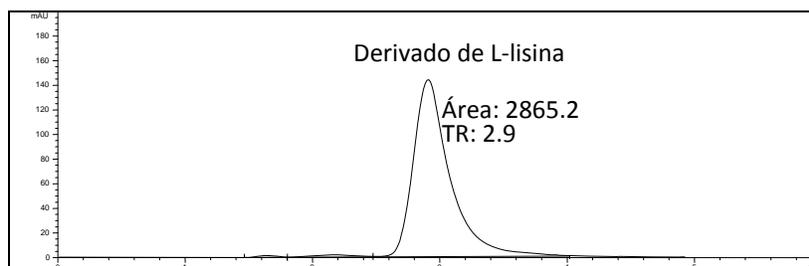


Figura 25. Cromatograma obtenido con el placebo cargado (réplica 1)

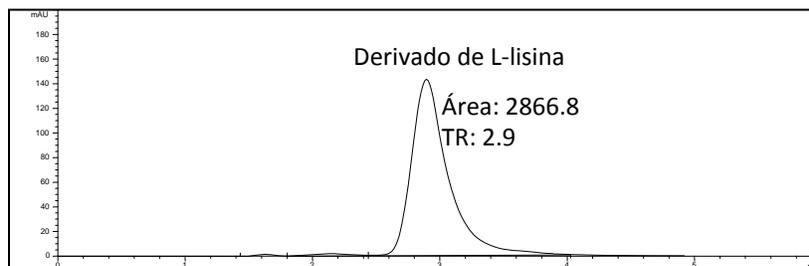


Figura 26. Cromatograma obtenido con el placebo cargado (réplica 2)

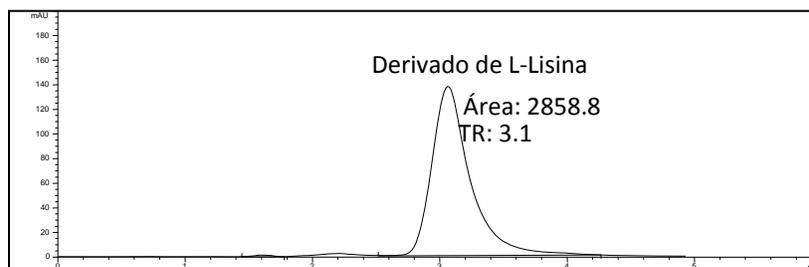


Figura 27. Cromatograma obtenido con la solución estándar 1 del clorhidrato de L-lisina.

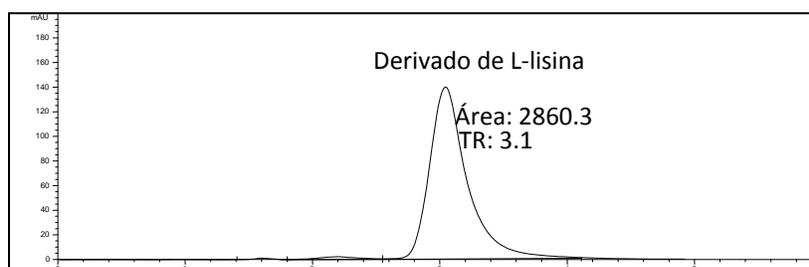


Figura 28. Cromatograma obtenido con la solución estándar 2 del clorhidrato de L-lisina.

5. CONCLUSIONES

- Se desarrolló un método analítico para la cuantificación de clorhidrato de L-lisina por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con un detector UV-visible.
- El método analítico desarrollado es específico, exacto, preciso y lineal en el intervalo de concentraciones de 200 a 600 $\mu\text{g/mL}$ y es no es robusto a cambios en la velocidad de flujo.
- El método analítico desarrollado es de utilidad para determinar el clorhidrato de L-Lisina presente en un multivitamínico, solución oral.

6. ANEXOS

6.1 ANEXO 1. PESOS Y CÁLCULOS

REALIZADOS DURANTE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

❖ Linealidad del sistema

Pesos de clorhidrato de L-lisina materia prima para las soluciones stock:

Solución 1= 139.8 mg

Solución 2=139.9 mg

Solución 3=140.2 mg

Cálculo de la concentración de las soluciones stock:

$$\frac{\text{Peso del HCl-L-lisina (mg)}}{\text{Volumen de aforo (mL)}} \times \frac{1000\mu\text{g}}{1 \text{ mg}} = \text{Concentración del stock}$$

Solución concentrada 1

$$\left(\frac{139.8 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} \right) \times \frac{1000\mu\text{g}}{1 \text{ mg}} = 5592 \mu\text{g/mL}$$

Solución concentrada 2

$$\left(\frac{139.9 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} \right) \times \frac{1000\mu\text{g}}{1 \text{ mg}} = 5596 \mu\text{g/mL}$$

Solución concentrada 3

$$\left(\frac{140.2 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} \right) \times \frac{1000\mu\text{g}}{1 \text{ mg}} = 5608 \mu\text{g/mL}$$

Ejemplo del cálculo de la concentración real de la solución del nivel al 50 % de la curva

1:

$$\frac{C1 \times V1}{V2} = \text{Concentración real de la solución}$$

$$\frac{5592\mu\text{g/mL} \times 1.8\text{ mL}}{50\text{ mL}} = 201.3\ \mu\text{g/mL}$$

Tabla 21. Datos de la curva 1 de linealidad del sistema

Nivel (%)	Concentración de la solución stock ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración real de la solución ($\mu\text{g/mL}$)
50	5592	201.3
75	5592	302.0
100	5592	402.6
125	5592	503.3
150	5592	603.9

Tabla 22. Datos de la curva 2 de linealidad del sistema

Nivel (%)	Concentración de la solución stock ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración real de la solución ($\mu\text{g/mL}$)
50	5596	201.5
75	5596	302.2
100	5596	402.9
125	5596	503.6
150	5596	604.4

Tabla 23. Datos de la curva 3 de linealidad del sistema

Nivel (%)	Concentración de la solución stock ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración real de la solución ($\mu\text{g/mL}$)
50	5608	201.9
75	5608	302.8
100	5608	403.8
125	5608	504.7
150	5608	604.7

Reacción de derivatización.

Para la formación del derivado se añadieron 600 μL de borato de sodio 53 mM pH 9.3, 300 μL de fluorescamina 5.6 mM y 100 μL de cada una de las soluciones de clorhidrato de L-lisina en un vial ámbar de 1.5 mL y se agitó por 1 minuto (aproximadamente a 700

rpm). Así, se mantuvieron constantes; los volúmenes de los reactivos, la concentración del derivatizante y la concentración de borato de sodio.

❖ Precisión del sistema

Los pesos de clorhidrato de L-lisina materia prima para las soluciones estándares se reportan en la Tabla 24. En seguida se presenta un ejemplo del cálculo de la concentración real del estándar y del factor de respuesta.

Ejemplo para la réplica 1:

Concentración real del estándar

$$\frac{\text{Peso del HCl-L-lisina (mg)}}{\text{Volumen de aforo (mL)}} \times \frac{1000\mu\text{g}}{1 \text{ mg}} = \text{Concentración de la réplica}$$

$$\left(\frac{10.0 \text{ mg}}{25 \text{ mL}}\right) \times \frac{1000\mu\text{g}}{1 \text{ mg}} = 400.0 \mu\text{g/mL}$$

Factor de respuesta

$$\frac{\text{Área bajo la curva (mAU)}}{\text{Concentración real del estándar } \mu\text{g/mL}} = \text{Factor de respuesta}$$

$$\text{Factor de respuesta} = \frac{2875.2}{400} = 7.19$$

Tabla 24. Datos de la precisión del sistema

Réplica	Peso del HCl-L-lisina (mg)	Concentración real ($\mu\text{g/mL}$)	Área bajo la curva (mAU)	Factor de respuesta
1	10.0	400.0	2875.2	7.19
2	10.0	400.0	2808.8	7.02
3	10.1	404.0	2901.8	7.18
4	10.0	400.0	2902.8	7.26
5	10.1	404.0	2926.8	7.24
6	10.1	404.0	2898.7	7.18
Promedio				7.18
Desviación Estándar				0.08
CV %				1.17

❖ **Robustez**

Los pesos de clorhidrato de L-lisina para las dos soluciones estándares se reportan en las Tablas 25, 26 y 27. En seguida se presenta un ejemplo del cálculo de la concentración y del factor de respuesta.

Ejemplo del estándar 1:

Concentración

$$\frac{\text{Peso del HCl-L-lisina (mg)}}{\text{Volumen de aforo (mL)}} \times \frac{1000\mu\text{g}}{1 \text{ mg}} = \text{Concentración del estándar}$$

$$\left(\frac{10.1 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} \right) \times \frac{1000\mu\text{g}}{1 \text{ mg}} = 404 \mu\text{g/mL}$$

Factor de respuesta

$$\frac{\text{Área bajo la curva (mAU)}}{\text{Concentración del estándar } \mu\text{g/mL}} = \text{Factor de respuesta}$$

$$\text{Factor de respuesta} = \frac{3017.6}{404} = 7.47$$

Coefficiente de variación

Se calculó el CV % de cada condición en estudio. Para ello, se tomaron los datos de los estándares bajo las condiciones normales y bajo las condiciones en estudio; por ejemplo, para el cambio de proporción de metanol condición baja (73 %) se analizaron los siguientes datos:

Factor de respuesta del estándar 1, condición normal (metanol 75%): 7.47

Factor de respuesta del estándar 2, condición normal (metanol 75%): 7.35

Factor de respuesta del estándar 1, condición baja (metanol 73%): 7.23

Factor de respuesta del estándar 2, condición baja (metanol 73%): 7.39

Promedio de los cuatro factores: 7.36

Desviación estándar: 0.10

Coefficiente de variación: 1.4

Tabla 25. Datos de la variación de la proporción de metanol en la fase móvil

Condición	Estándar	Peso (mg)	Aforo (mL)	Concentración (µg/mL)	Área (mAU)	Factor de respuesta	Promedio	Desviación estándar	CV %
Baja (73 %)	1	10.1	25	404	2920.8	7.23	7.36	0.10	1.4
	2	10.3	25	412	3045.2	7.39			
Normal (75 %)	1	10.1	25	404	3017.6	7.47	7.50	0.12	1.7
	2	10.3	25	412	3027.6	7.35			
Alta (77 %)	1	10.1	25	404	3054.5	7.56	7.50	0.12	1.7
	2	10.3	25	412	3146.1	7.64			

Tabla 26. Datos de la variación de la concentración de TFA en ambos disolventes de la fase móvil

Condición	Estándar	Peso (mg)	Aforo (mL)	Concentración (µg/mL)	Área (mAU)	Factor de respuesta	Promedio	Desviación estándar	CV %
Baja (0.09 %)	1	10.1	25	404	2986	7.39	7.42	0.06	0.8
	2	10.3	25	412	3071.7	7.46			
Normal (0.1 %)	1	10.1	25	404	3017.6	7.47	7.46	0.08	1.1
	2	10.3	25	412	3027.6	7.35			
Alta (0.11 %)	1	10.1	25	404	3017.1	7.47	7.46	0.08	1.1
	2	10.3	25	412	3108.4	7.54			

Tabla 27. Datos de la variación de la velocidad de flujo

Condición	Estándar	Peso (mg)	Aforo (mL)	Concentración (µg/mL)	Área (mAU)	Factor de respuesta	Promedio	Desviación estándar	CV %
Baja (0.45 mL/min)	1	10.1	25	404	3461.9	8.57	7.73	0.57	7.3
	2	10.3	25	412	3098.5	7.52			
Normal (0.5 mL/min)	1	10.1	25	404	3017.6	7.47	7.07	0.52	7.3
	2	10.3	25	412	3027.6	7.35			
Alta (0.55 mL/min)	1	10.1	25	404	2892.1	7.16	7.07	0.52	7.3
	2	10.3	25	412	2604.5	6.32			

6.2 ANEXO 2. PESOS Y CÁLCULOS REALIZADOS DURANTE LA APLICACIÓN DEL MÉTODO DESARROLLADO

❖ Estándares

Peso del estándar 1: 10.1 mg de clorhidrato de L-lisina

Peso del estándar 2: 10.0 mg de clorhidrato de L-lisina

Cálculo de la concentración de los estándares:

$$\frac{\text{Peso del HCl-L-lisina (mg)}}{\text{Volumen de aforo (mL)}} = \text{Concentración del estándar}$$

Estándar 1

$$\left(\frac{10.1\text{mg}}{25\text{ mL}}\right)=0.404\text{ mg/mL}$$

Estándar 2

$$\left(\frac{10.0\text{mg}}{25\text{ mL}}\right)=0.400\text{ mg/mL}$$

Tabla 28. Datos de los estándares de la aplicación del método desarrollado

Estándar	Área	Concentración del estándar (mg/mL)	FR (área/concentración)
1	2858.8	0.404	7076.2
2	2860.3	0.400	7150.8
		Promedio	7113.5
		Desv. Est.	52.7
		CV%	0.7

❖ Soluciones de clorhidrato de L-lisina 4.8 mg/mL

Peso de la solución 1: 120.1 mg

Peso de la solución 2: 120.1 mg

Aforo: 25 mL de agua

Cálculo de la concentración de las soluciones

$$\frac{\text{Peso del HCl-L-lisina (mg)}}{\text{Volumen de aforo (mL)}} = \text{Concentración del estándar}$$

Solución 1

$$\left(\frac{120.1\text{mg}}{25\text{ mL}}\right) = 4.804\text{ mg/mL}$$

Solución 2

$$\left(\frac{120.1\text{mg}}{25\text{ mL}}\right) = 4.804\text{ mg/mL}$$

Cálculo de los mg agregados de clorhidrato de L-lisina a los placebos:

$$\text{Concentración de la solución (mg/mL)} \times \text{Alícuota (mL)} = \text{mg agregados}$$

Ejemplo: Solución 1

$$4.804 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 4.2\text{mL} = 20.18\text{ mg de clorhidrato de L-lisina}$$

❖ Muestras

Peso del placebo 1: 5.0 g

Peso del placebo 2: 5.0 g

La densidad del placebo es 1 g/mL

Tabla 29. Datos de los placebos cargados

Muestra	Volumen de la muestra (mL)	Analito agregado (mg)	Concentración teórica del analito (mg/mL)
1	5.0	20.18	4.036
2	5.0	20.18	4.036

❖ **Recobro**

- Concentración encontrada experimentalmente

$$\frac{\text{Área de la muestra}}{\text{FR de los estándares}} \times \frac{\text{Aforo de la muestra}}{\text{mg agregados de HCL-L-lisina}} \times \text{Concentración teórica} = \text{Concentración encontrada}$$

Ejemplo para la muestra 1

$$\frac{2865.2}{7113.5} \times \frac{50 \text{ mL}}{20.18 \text{ mg}} \times 4.036 \text{ mg/mL} = 4.028 \text{ mg/mL}$$

- Cálculo del por ciento de recobro

$$\frac{\text{Área de la muestra}}{\text{FR de los estándares}} \times \frac{\text{Aforo de la muestra}}{\text{mg agregados de HCL-L-lisina}} \times 100 = \text{Por ciento de recobro}$$

Ejemplo para la muestra 1

$$\frac{2865.2}{7113.5} \times \frac{50 \text{ mL}}{20.18 \text{ mg}} \times 100 = 99.8 \%$$

Tabla 30. Datos del por ciento de recobro

Muestra	Área	Concentración teórica de HCL-Lys en el placebo (mg/mL)	Concentración experimental (mg/mL)	Por ciento de recobro (%)
1	2865.2	4.036	4.028	99.8
2	2866.8	4.036	4.030	99.9
			Promedio	99.8
			Desv. Est.	0.04
			CV%	0.04

7. BIBLIOGRAFÍA

- 1.** Página electrónica de la Secretaria de Salud: http://portal.salud.gob.mx/contenidos/publicaciones/manual_cont_sum_sup_alim/manualimportancia.html
- 2.** NORMA Oficial Mexicana NOM-008-SSA2-1993, Control de la nutrición, crecimiento y desarrollo del niño y del adolescente. Criterios y procedimientos para la prestación del servicio, numeral 4.1.
- 3.** Página electrónica de la OMS: <http://www.who.int/topics/nutrition/es/>
- 4.** Página electrónica de la FDA <http://www.fda.gov/Food/DietarySupplements/ConsumerInformation/ucm110417.htm#what>
- 5.** Reglamento de control sanitario de productos y servicios, Título décimo noveno, Suplementos Alimenticios, Capítulo único, artículo 168.
- 6.** NORMA Oficial Mexicana NOM-131-SSA1-1995, Bienes y servicios. Alimentos para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales, numeral 6.4.3.
- 7.** Arenas, M. H. y Anaya, P. R. (2007). Nutrición, enteral y paraenteral, Ed. McGraw Hill Iberoamericana, México, pp 1, 99-101.
- 8.** Montgomery, R., Conway, T. y Spector, A. (1992). Bioquímica, casos y textos, 5° edición, Ed. Mosby- Year Book Wolfe Publishing, pp 14-15.
- 9.** McMurry, J. (2004). Química Orgánica, 6° edición, Ed. Thomson, pp 989.
- 10.** Fuentes, T. S. (2004). Nutrición, cirugía y terapia intensiva, Ed. Manual Moderno, México, pp 813.

- 11.** Rawn, J.D. (1989). Bioquímica, Ed. Interamericana McGraw Hill, Vol. 1, pp 58.
- 12.** Irvingsax, N. y Lewis, R. (1993). Diccionario de química y productos químicos, Hawley, Ed. Omega, pp 614.
- 13.** Dvlin, T.M. (2004). Bioquímica, Libro de texto con aplicaciones clínicas, 4° edición, Ed. Reverté, pp 121-125, 815-816.
- 14.** (2003) Reminton Farmacia, 20° edición, Ed. Médica Panamericana, Vol. 1, Buenos Aires, pp 686.
- 15.** Tomé, D. y Bos, C. (2007). Lysine requirement through the human life cycle, *The journal of nutrition*, 6TH Amino acid assessment workshop, **137**, 1642S- 1645S.
- 16.** Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R. (2000). Química Analítica, 7° edición, Ed. McGraw Hill, pp 666-708.
- 17.** Hernández, L. y González, C. (2002). Introducción al análisis instrumental, 1° edición, Ed. Ariel, Barcelona, pp 331-335, 410-419.
- 18.** (2008). Farmacopea de los Estados Unidos de América 31, Formulario Nacional 26, Vol. 1, Edición anual en español, pp 261-262.
- 19.** Mendoza, S. (2006). Manual de Química Analítica Instrumental II PAPIME, Reforma de la enseñanza experimental, Facultad de química, UNAM, pp 42-45.
- 20.** Eggenreich, K., Zach, E., Beck, H. y Wintersteiger, R. (2004). Determination of 4-amino-m-cresol and 5-amino-o-cresol by high performance liquid chromatography and fluorescence derivation using fluoescamine, *Journal of Biochemical and biophysical methods*, **61**, 35-46.

- 21.** Heftamann, E. (1992). Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods, *Journal of Chromatography Library*, 5° edición, Vol. 51B chromatography, pp B75-B85.
- 22.** Namjoshi, S., Caccetta, R., Edwards, J. y Benson, H. (2007). Liquid chromatography assay for 5-aminolevulinic acid: Application to in vitro assessment of skin penetration via Dermaportation, *Journal of Chromatography B*, 852, 49-55.
- 23.** McMahon, G., O'Kennedy, R. y Kelly, M. (1996). High-performance liquid chromatographic determination of taurine in human plasma using pre-column extraction and derivatization, *Journal of Pharmaceutical and biomedical analysis*, **14**, 1287-1294.
- 24.** De Bernardo, S., Weigele, M., Toome, V., Manhart, K. Leimgruber, W., Böhlen, P., Stein, S. y Udenfriend, S., (1974). Studies on the reaction of fluorescamine with primary amines, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **163**, 390-399.
- 25.** Chen, R.F., Smith, P.D. y Maly, M. (1978). The fluorescence of fluorescamine-amino acids, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 189, **2**, 241-250.
- 26.** Página electrónica de Sigma Aldrich: http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/f9015pis.Par.0001.File.tmp/f9015pis.pdf.
- 27.** Funk, G.M., Hunt, C.E., Epps, D.E. y Brown, P.K. (1986). Use of a rapid and highly sensitive fluorescamine based procedure for the assay of plasma lipoproteins, *Journal of Lipid Research*, **27**, 792-795.
- 28.** Garesse, R., Castell, J.V., Vallejo, C.G. y Marco, R. (1979). A fluorescamine-based sensitive method for the assay of proteinases, capable of detecting the initial cleavage steps of a protein, *Journal Biochem*, **99**, 253-259.

- 29.** Handschin, U. E. y Ritschard, W.J., (1976). Spectrophotometric determination of fluorophor, protein, and fluorophor/protein ratios in fluorescamine and MDPF fluorescent antibody conjugates, *Analytical Biochemistry*, **71**, 143-155.
- 30.** Comisión de validación de métodos analíticos. (2002). Guía de Validación de Métodos Analíticos, editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C., pp 4, 19.
- 31.** (2008). Farmacopea de los Estados Unidos de Mexicanos, 9° edición, pp 2427- 2434.
- 32.** NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos, numerales 14.5.1-14.5.1.4.