

III. PARTE EXPERIMENTAL

PROTOCOLO DE VALIDACION

3.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS:

Materiales:

- Pipetas Volumétricas de 5, 10, 15 y 20 mL
- Probetas de 1 000 mL
- Vasos de precipitación
- Matraz de 250 y 1 000 mL
- Membranas filtrantes de hydrophilic polyethersulfone(0,20umx 25 mm)
- Filtros para jeringas: ACRODISC
- Jeringas descartables
- Viales de 2 mL
- Columna cromatografica

Reactivos:

- Fosfato de Sodio monobásico anhidro.
- Agua calidad HPLC
- Ácido fosforico al 85 % p/v
- Acetonitrilo grado HPLC LiChrosolv

Equipos: Los Equipos utilizados en la presente validación han sido calibrados y verificados, y se detalla a continuación:

a. Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC)

Marca : LaChrom Merck Hitachi

Equipado con los siguientes módulos:

a.1 Detector de Arreglos de Diodos (DAD)

Modelo L-7455; Serie 1110-036

a.2 Horno (Colum Oven)

Modelo L-7350; Serie 86307

a.3 Inyector automático (Programmable Autosampler)

Modelo L-7250; Serie 1125-028

a.4 Bomba Cuaternaria (Intelligent Pump)

Modelo L-7100; Serie 1157-084

a.5 Interface

Modelo D-7000; Serie 1125-001

a.6 Desgasificador de solventes

Modelo L-7612; Serie 911-11

b. Balanza Analítica:

Marca : Mettler toledo

Modelo : AB-204

Serie N° : 1115151168

c. Ultrasonido:

Marca : Branson

Modelo : 5210

Serie N° : No indica

d. Bomba de Vacío:

Marca : Gelman Little Glant

Modelo : 13156

Serie N° : 5KH35KN530HT

e. Purificador de Agua:

Marca : Millipore.
Modelo : Milli-Qplus.
Serie N° : F5HM96172F

3.2 METODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE

3.2.1 CONDICIONES CROMATOGRAFICAS.

- Equipo : Cromatógrafo líquido de Alta Resolución
- Columna : LiChroCART 250-4
LiChrospher RP-8 (5µm) con
guardacolumna
- Sistema : Isocrático
- Longitud de onda : 215 nm
- Temperatura : 50° C
- Flujo : 2 mL/min
- Volumen de inyección : 20 µl
- Tiempo de retención : aprox. 6,3 enalapril maleato
- Tiempo total de corrida : 14 minutos
- Método de cálculo : Estándar externo

3.2.2 PREPARACION DE LA FASE MOVIL.

Buffer pH 2,2.

Pesar exactamente 1,38 de Fosfato de sodio monobásico anhidro y disolver con 800 mL de agua HPLC, ajustar el valor de pH 2,2 con ácido fosforico 85 %. Diluir con agua HPLC cantidad suficiente para 1 litro y mezclar.

Fase Móvil.

Utilizar una mezcla filtrada y desgasificada de:

Buffer pH 2,2: Acetonitrilo

70: 30

3.2.3 PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO.

A. PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR

Transferir cerca de 20 mg de Enalapril maleato estándar, exactamente pesado a una fiola de 100 mL. Añadir 50 mL de agua HPLC para disolver, someter al ultrasonido por 10 minutos. Mezclar y llevar a volumen con agua HPLC.(Estándar al 100%, concentración aprox. 0,2 mg/mL).

Medir en fiola de 25 mL, 20 mL de la solución del estándar al 100% mezclar y llevar a volumen con agua HPLC.(Estándar al 80%, concentración aprox. 0,16 mg/mL).

B. PREPARACION DE LA MUESTRA

Pesar por separado 20 tabletas y determinar el peso promedio, moler hasta polvo fino y pesar por duplicado el equivalente a 20 mg de Enalapril maleato (aprox. 290 mg de molienda) y trasvasarlo a una fiola de 100 mL, adicionar 50 mL de agua HPLC y llevarlo al ultrasonido por 30 minutos y luego agitarlo mecánicamente por 30 minutos. Enrasar con agua HPLC y homogenizar, filtrar a través de membrana 0,2 um de porosidad e inyectar por duplicado.
(concentración aprox. 0,2 mg/mL)

3.2.4 CALCULOS Y RESULTADOS.

Al ingresar las variables de cálculo al método, se obtienen los resultados directamente por generación del programa. Se inyectan por duplicado tanto el estándar como la muestra para determinar el promedio.

3.3 . ENSAYO DE ADAPTABILIDAD DEL SISTEMA

Previo a la Validación del método analítico, se realiza un ensayo de adaptabilidad del sistema, el cual consiste en preparar una solución de adaptabilidad del sistema, según 3.3.2.

La adaptabilidad del sistema cromatografico, se realizo inyectando sucesivamente hasta diez veces la solución de adaptabilidad del sistema.

Mediante la determinación de los siguientes parámetros cromatograficos:

- Números de platos teóricos (N).
- Factor de cola (T)
- Resolución (R)
- Desviación estándar relativa (DSR).

se comprobó el funcionamiento de: El sistema de bombeo, inyector, horno y detector.

3.3.1 MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRFÍA LIQUIDA DE ALTA PERFORMANCE.

Las condiciones cromatograficas y la preparación de la fase móvil es según 3.2.1 y 3.2.2 respectivamente.

3.3.2 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO

A. SOLUCION ESTANDAR DE ENALAPRILATO.

Disolver exactamente alrededor de 10 mg de enalaprilato Estándar USP en fiola de 25 mL y enrasar con agua HPLC.

B. SOLUCION DE DICETOPIPERAZINA DE ENALAPRIL

Cuidadosamente colocar 20 mg de Enalapril Maleato USP en Beaker de 100 mL. Colocar el Beaker sobre una plancha a la mitad de la temperatura máxima de la plancha necesaria para fundir la muestra. Cuando se funda (cerca de 5 a 10 minutos de calentamiento), retirar inmediatamente de la plancha y dejar enfriar (evitar el sobrecalentamiento para evitar degradación por calor). Dejar enfriar el

residuo a temperatura ambiente, y añadir 50 mL de acetonitrilo y sonicar pocos minutos hasta disolver el residuo. La solución contiene entre 0,2 y 0,4 mg de Dicotopiperazina de enalapril.

C. SOLUCION ESTANDAR.

Transferir cerca de 20 mg de Enalapril maleato estándar USP, exactamente pesado a una fiola de 100 mL. Añadir 50 mL de agua HPLC para disolver, usando ultrasonido si fuese necesario. Añadir 0,5 mL de solución estándar de enalaprilato, mezclar y llevar a volumen con agua HPLC.

Concentración:

- Enalapril maleato estándar : 0,2 mg/mL
- Enalaprilato USP RS : 0,002 mg/mL

D. SOLUCION PARA LA ADAPTABILIDAD DEL SISTEMA

Transferir 0,5 mL de solución de Dicotopiperazina de Enalapril a un a fiola de 25 mL, diluir con la solución estándar al 100 % a volumen y mezclar.

3.3.3 PROCEDIMIENTO.

Inyectar sucesivamente hasta diez veces la solución de adaptabilidad del sistema. Los resultados se obtendrán directamente por generación del programa.

3.4 VALIDACION DEL MÉTODO ANALÍTICO

De acuerdo a los criterios mencionados en el punto 2.5.5, para el presente trabajo le corresponde el TIPO I, es decir se analizaran los siguientes parámetros:

- Selectividad
- Linealidad.
- Precisión.
- Exactitud.
- Rango.

3.4.1 MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE.

Todas las determinaciones se realizaron utilizando las condiciones cromatográficas y la fase móvil descritas en 3.2.1 y 3.2.2 respectivamente.

3.4.2 DESARROLLO DE LOS PARAMETROS DE VALIDACION

3.4.2.1 ENSAYO DE SELECTIVIDAD.

Este parámetro permite determinar, si el método es capaz de detectar únicamente el principio activo en una matriz determinada.

PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR AL 100%

Estándar Secundario:

Enalapril Maleato;

Potencia Tal Cual: 99,95 %

Factor: 1,001

Lote: 5111-02-034-B

MP 1557-03

Pesar exactamente 20,02 mg en fiola de 100 mL disolver y enrasar con agua HPLC (0,2 mg/mL). Filtrar por membrana 0,20 um e Inyectar por duplicado.

A. PREPARACION DE LOS PLACEBOS.

Preparación del placebo de excipientes

Preparar una cantidad para aproximadamente 200 tabletas, siguiendo las instrucciones de fabricación, el cual se obtiene mezclando todos los excipientes de la formulación excluyendo el principio activo. Las proporciones son las mismas que en la fórmula de elaboración del producto.

Preparación del placebo de excipientes sin laca amarilla

Preparar una cantidad para aproximadamente 200 tabletas, siguiendo las instrucciones de fabricación, el cual se obtiene mezclando todos los excipientes de la formulación excluyendo el principio activo y la laca amarilla. Las proporciones son las mismas que en la fórmula de elaboración del producto.

Preparación de la muestra, Placebo al 100 %

Preparar una cantidad para aproximadamente 200 tabletas, siguiendo las instrucciones de fabricación, el cual se obtiene mezclando todos los excipientes de la formulación. Las proporciones serán calculadas para obtener un placebo al 100 %.

B. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Pesar por duplicado exactamente 290 mg de cada uno de los placebos en fiola de 100 mL disolver y enrasar con agua HPLC (concentración:0,2 mg/mL).

Filtrar a través de membrana 0,2 μ m e inyectar cada uno de estas preparaciones por duplicado.

3.4.2.2 ENSAYO DE LINEALIDAD.

Sirve para determinar, la proporcionalidad entre la concentración del principio activo y su respuesta, demostrando la capacidad del método para obtener resultados lineales. Primero se determinara la Linealidad del sistema, en el cual solo se trabaja con estándares, por lo tanto lo único que se esta validando es el sistema (la bomba, el detector, etc). Seguidamente se determinara la Linealidad del método, en el cual se trabaja con estándares y con la matriz del producto, y se determina como influye la matriz en el proceso de extracción de la muestra.

A. LINEALIDAD DEL SISTEMA

Preparar cinco soluciones estándares en concentraciones crecientes a partir de una misma solución patrón (**solución madre**), el intervalo de concentración esta comprendido entre 50% y 150 % de la concentración final de trabajo.

Enalapril Maleato;

Potencia Tal Cual: 99,30 %

Factor: 1,007

Lote: 5111-02-093-B Número de análisis: MP 1321-02

A.1 SOLUCION MADRE N° 1

En fioles de 100 mL pesar exactamente 201,4 mg de Enalapril Maleato, disolver y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 2 mg/mL.

Estándar al 50 %:

Medir 5 mL de la solución madre N° 1 en fiola de 100 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,1 mg/mL.

Estándar al 75 %:

Medir 15 mL de la solución madre N° 1 en fiola de 200 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,15 mg/mL.

Estándar al 100 %:

Medir 10 mL de la solución madre N° 1 en fiola de 100 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,2 mg/mL.

Estándar al 125 %:

Medir 25 mL de la solución madre N° 1 en fiola de 200 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,25 mg/mL.

Estándar al 150 %:

Medir 15 mL de la solución madre N° 1 en fiola de 100 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,30 mg/mL.

A.2 SOLUCION MADRE N° 2

Preparar una segunda solución madre y hacer las mismas diluciones descritas en

A.1.

Filtrar a través de membranas de 0,20 μm e Inyectar cada uno de estas preparaciones por duplicado.

B. LINEALIDAD DEL METODO.

Sirve para determinar la proporcionalidad entre la concentración del principio activo y su respuesta en presencia de la matriz del producto.

Preparar una serie de soluciones placebo y adicionar a cada uno de ellos principio activo en el rango de: 50 %, 100 % y 150 %.

Estándar Secundario:

Enalapril Maleato;

Potencia Tal Cual: 99,95 %

Factor: 1,001

Lote: 5111-02-034-B

MP 1557-03

B.1 PREPARACION DEL ESTANDAR (solución madre)

En fiola de 100 mL pesar exactamente 200,2 mg de Enalapril Maleato, disolver y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 2 mg/mL.

Estándar al 50 %:

Medir 5 mL de la solución madre en fiola de 100 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,1 mg/mL.

Estándar al 100 %:

Medir 10 mL de la solución madre en fiola de 100 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,2 mg/mL.

Estándar al 150 %:

Medir 15 mL de la solución madre en fiola de 100 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,30 mg/mL.

Filtrar a través de membrana 0,2 um e Inyectar cada uno de estas preparaciones por duplicado.

B.2 PREPARACION DE PLACEBOS

B.2.1 Preparación del placebo de Excipientes mas el principio activo al 50 %.

Preparar una cantidad para aproximadamente 200 tabletas, siguiendo las instrucciones de fabricación, el cual se obtiene mezclando todos los excipientes de la formulación. Las proporciones serán calculadas para obtener un placebo al 50 %.

B.2.2 Preparación del placebo de Excipientes mas el principio activo al 100 %.

Preparar una cantidad para aproximadamente 200 tabletas, siguiendo las instrucciones de fabricación, el cual se obtiene mezclando todos los excipientes de la formulación. Las proporciones serán calculadas para obtener un placebo al 100 %.

B.2.3 Preparación del placebo de Excipientes mas el principio activo al 150 %.

Preparar una cantidad para aproximadamente 200 tabletas, siguiendo las instrucciones de fabricación, el cual se obtiene mezclando todos los excipientes de la formulación. Las proporciones serán calculadas para obtener un placebo al 150 %.

B.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Pesar por triplicado exactamente 290 mg de cada uno de las muestras preparadas (50%, 100 % y 150 %) en fiola de 100 mL disolver y enrasar con agua HPLC (concentración: 0,2 mg/mL).

Filtrar a través de membrana 0,2 um e inyectar cada uno de estas preparaciones por duplicado.

3.4.2.3 ENSAYO DE PRECISION.

Es la dispersión de la medida alrededor de un valor medio.

Primero se determinara la Precisión del sistema, en el cual solo se trabaja con estándares, Seguidamente se determinara la Precisión del método, en el cual se trabaja con estándares y con la matriz del producto.

A. PRECISION DEL SISTEMA.

Para ver si el método es capaz de dar resultados semejantes o alrededor de un valor medio cuando se hacen análisis REPETIDOS en una muestra homogénea.

Estándar Secundario:

Enalapril Maleato;

Potencia Tal Cual: 99,95 %

Factor: 1,001

Lote: 5111-02-034-B; Numero de análisis: MP 1557-03

A.1 PREPARACION DE LOS ESTANDARES (solución madre)

En fiola de 100 mL pesar exactamente 200,2 mg de Enalapril Maleato, disolver y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 2 mg/mL.

Estándar al 50 % :

Medir 5 mL de la solución madre en fiola de 100 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,1 mg/mL.

Estándar al 100 % :

Medir 10 mL de la solución madre en fiola de 100 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,2 mg/mL.

Estándar al 150 %:

Medir 15 mL de la solución madre en fiola de 100 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,30 mg/mL.

Filtrar a través de membrana 0,2 μm e inyectar cada uno de estas preparaciones por duplicado.

A.2 PREPARACION DE LA MUESTRA

Un analista prepara seis soluciones estándares al 100 % y lo inyecta por duplicado.

Enalapril Maleato;

Potencia Tal Cual: 99,30 %

Factor: 1,007

Lote: 5111-02-093-B; Numero de análisis: MP 1321-02

A.2.1 SOLUCION MADRE

Transferir cerca de 201,4 mg de Enalapril Maleato, exactamente pesado a una fiola de 100ml y añadir 50ml agua HPLC para disolver usando ultrasonido si fuese necesario. Llevar a volumen con agua HPLC y mezclar.

Concentración: 2 mg/mL.

Estándar al 100 %:

Medir 10 mL de la solución madre en fiola de 100 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,2 mg/mL.

Filtrar a través de membrana 0,2 μm e inyectar cada uno de estas preparaciones por duplicado.

B. PRECISION DEL METODO.

Es una medida de la REPRODUCIBILIDAD del método.

Este ensayo se analiza con el mismo lote utilizado para la repetibilidad.

METODO OPERATORIO.

Dos analistas diferentes, trabajaran seis muestras cada uno en diferentes días siguiendo el método propuesto.

Estándar Secundario:

Enalapril Maleato;

Potencia Tal Cual: 99,95 %

Factor: 1,001

Lote: 5111-02-034-B; MP 1557-03

B.1 PREPARACION DE LOS ESTANDARES ESTANDARES (solución madre)

En fiola de 100 mL pesar exactamente 200,2 mg de Enalapril Maleato, disolver y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 2 mg/mL.

Estándar al 50 % :

Medir 5 mL de la solución madre en fiola de 100 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,1 mg/mL.

Estándar al 100 % :

Medir 10 mL de la solución madre en fiola de 100 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,2 mg/mL.

Estándar al 150 %:

Medir 15 mL de la solución madre en fiola de 100 mL, mezclar y enrasar a volumen con agua HPLC. Concentración: 0,30 mg/mL.

Filtrar a través de membrana 0,2 μ m e inyectar cada uno de estas preparaciones por duplicado.

B.2 PREPARACIÓN DEL PLACEBO DE EXCIPIENTES MAS EL PRINCIPIO ACTIVO AL 100 %.

Preparar una cantidad para aproximadamente 200 tabletas, siguiendo las instrucciones de fabricación, el cual se obtiene mezclando todos los excipientes de la formulación. Las proporciones serán calculadas para obtener un placebo al 100 %.

B.3 PREPARACION DE LA MUESTRA

Pesar exactamente (de **B.2**) seis muestras de 290 mg cada uno, en fiola de 100 mL disolver y enrasar con agua HPLC (concentración: 0,2 mg/mL).

Filtrar a través de membrana 0,2 μ m e inyectar cada uno de estas preparaciones por duplicado.

Realizar el mismo test estadístico empleado en la precisión del sistema.

3.4.24 ENSAYO DE EXACTITUD (Error sistemático o Sesgo)

Mide el grado de concordancia entre los valores obtenidos y el valor verdadero.

Para este estudio se trabaja con los mismos estándares y muestras preparadas para determinar la **Linealidad Del método**. Cada muestra debe ser analizada (pesado) por triplicado e inyectado por duplicado.

3.4.2.5 RANGO

Cumplidas las especificaciones de Linealidad del sistema, Linealidad del Método, Precisión del sistema, Precisión del método y la Exactitud, queda establecido que el rango de este método analítico es de 50 % a 150 %, verificándose que el método analítico funciona correctamente cuando se aplican a muestras que contienen principio activo a concentraciones iguales a los extremos superior e inferior, así como dentro del intervalo de concentración definido.