

Desarrollo y validación de un método acoplado Análisis en flujo/Espectroscopía UV-visible para la cuantificación de maleato de enalapril

Carlos Ayala*, Eylhen's Rangel, Maribel Valero**, Baldeón Antonella,
Fernando Méndez, Luisana Miliani, Máximo Gallignani, Rosario Brunetto

Laboratorio de Espectroscopia Molecular, Departamento de Química, Facultad de Ciencias,
Universidad de Los Andes, La Hechicera, Mérida, 5101, Venezuela

(* carlosdaniel55@gmail.com (** maribelvalero46@gmail.com)

Recibido: 07/03/2024

Revisado: 25/03/2024

Aceptado: 29/04/2024

Resumen

El método acoplado de Análisis en Flujo con Espectroscopia de Absorción Molecular para la determinación de uniformidad de contenido de maleato de enalapril (antihipertensivo) en productos farmacéuticos, fue desarrollado basándose en una reacción con Permanganato de potasio en medio ácido. El criterio de medida seleccionado fue la lectura de absorbancia a 525 nm corregida mediante una línea base establecida entre 439 nm y 700 nm. El método permite determinar el en el intervalo de 14 y 50 mg L⁻¹, con un límite de detección de 4,00 mg L⁻¹. La metodología planteada ofrece múltiples ventajas buena precisión, repetitividad, exactitud y rapidez de análisis.

Palabras claves: enalapril; formas farmacéuticas sólidas; análisis en flujo; Espectroscopia UV

Abstract

Development and validation of a coupled Flow analysis/UV-visible spectroscopy method for the quantification of enalapril maleate. Coupled method of Flow Analysis with Molecular Absorption Spectroscopy for the determination of content uniformity of enalapril maleate (antihypertensive) in pharmaceutical products, was developed based on a reaction with potassium permanganate in an acidic medium. The measurement criterion selected was the absorbance reading at 525 nm corrected by a baseline established between 439 nm and 700 nm. The method allows enalapril maleate to be determined in the range of 14 and 50 mg L⁻¹, with a detection limit of 4.00 mg L⁻¹. The proposed methodology offers multiple advantages: good precision, repeatability, accuracy, and speed of analysis.

Keywords: Enalapril; Solid dosage forms; Flow analysis, UV spectroscopy

Introducción

El maleato de enalapril (ENM) es un medicamento que pertenece al grupo de los llamados inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) la cual cataliza la conversión de la angiotensina I a la sustancia hipertensora angiotensina II. Este fármaco es muy utilizado en el tratamiento de la hipertensión, la insuficiencia cardíaca, así como en la reducción de la incidencia de eventos isquémicos coronarios, incluido el infarto de miocardio¹.

El principio activo del ENM (figura 1), cuyo nombre IUPAC es (Z)-2-Butenodiato de (S)-1-[N-[1-(etoxicarbonil)-3-fenilpropil]-L-alanil]-L-prolina y fórmula molecular C₂₀H₂₅N₂O₅•CH₄O₄, es una sal del enalapril, el cual es un derivado de los aminoácidos L-alanina y L-prolina con un peso molecular de 492,5 g/mol².

Las industrias farmacéuticas utilizan métodos establecidos en las diferentes farmacopeas para el control de calidad de principios activos farmacéuticos para su comercialización. En el caso

de la uniformidad de contenido del ENM, se utiliza un método oficial basado en el uso de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con detección de ultravioleta^{4,5}. Estas propuestas, suelen presentar ciertas desventajas y condiciones, que se relacionan de forma directa con las limitaciones de las técnicas de detección y otras con el diseño metodológico o el procedimiento que plantean. Por ello, es común observar desarrollos metodológicos que pueden ser considerados como largos y monótonos, con muchas etapas en el procedimiento requerido, lo que ha conducido al desarrollo de nuevas filosofías de trabajo para la determinación de ENM que utilicen diversas técnicas instrumentales.

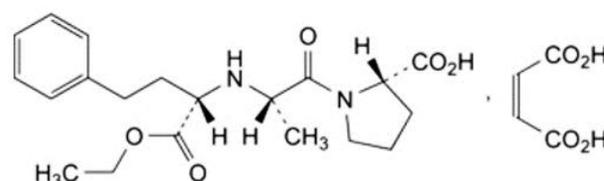


Fig. 1: Estructura molecular del maleato de enalapril³.

En la literatura especializada es posible encontrar diversos métodos de análisis para la cuantificación de ENM en formas farmacéuticas sólidas que involucran, el uso de la cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas⁶, ultravioleta⁷, resonancia magnética nuclear⁸ y espectroscopia infrarroja¹. Estas propuestas resultan costosas en instrumentación como para ser utilizadas en el análisis de rutina del control de calidad del fármaco.

Otros métodos más accesibles incluyen métodos de titulación y espectrofotométricos. Al respecto, Vinay y colab.⁹ plantearon dos métodos por titulación (A y B) y dos métodos espectrofotométricos (C y D) para la determinación de ENM en tabletas. El método A, involucra una oxidación directa ENM con permanganato de potasio en un medio ácido (H_2SO_4); el método B conlleva una titulación donde el principio activo farmacéutico se oxida con un exceso de permanganato de potasio conocido, seguido por una determinación del permanganato sin reaccionar mediante valoración con sulfato de amonio ferroso. En ambos métodos, la relación estequiométrica ENM: $KMnO_4$ fue de 1:2. En espectrofotometría, el ENM fue cuantificado a partir de la reducción del permanganato de potasio en medio neutro, midiendo el máximo de absorbancia en 340 nm (método C) y en medio ácido monitoreando la absorbancia a 550 nm (método D). Estos métodos se caracterizan por una alta precisión y exactitud y se pueden adoptar en laboratorios de control de calidad para análisis de rutina.

Por su parte El Sheikh y colab.¹⁰ validaron un método espectrofotométrico para la determinación de ENM en formas puras y de dosificación. Se basa en la formación de complejos de pares de electrones de color amarillo entre el analito y dos colorantes de ácido sulfonftaleína, el púrpura de bromocresol (BCP) y el azul de bromofenol (BPB); observando valores óptimos de absorbancia en una solución buffer NaOAc-HCl de pH 2,8 y 3,0 respectivamente, con un volumen de 2,0 mL del mismo. Así mismo, también se demostró que un exceso de reactivo (colorante) resulta ser indiferente para la cuantificación ya que la reacción misma proporciona un máximo de absorbancia entre el ENM y el colorante para luego comenzar a descender de manera constante.

Posteriormente, Neelkant Prasad, y colab.¹¹ describieron un método espectrofotométrico para la cuantificación de ENM en dosificaciones, mediante su oxidación con permanganato de potasio en medio de ácido sulfúrico. Para ello, prepararon seis soluciones con alícuotas de las muestras con concentraciones entre 350 y 500 $\mu g L^{-1}$. A cada alícuota le agregaron 1 mL de permanganato de potasio al 0,5%, una cantidad de ácido sulfúrico concentrado y enrasaron con agua. La reacción completa se llevó a cabo en un tiempo de 10 min. La curva fue preparada con patrones certificados y presentó un intervalo de linealidad desde 250 a 500 $\mu g. mL^{-1}$. Al ser analizadas las muestras lograron apreciar que presentaron un pico intenso a 267 nm el cual se consideró como λ_{max} para construir la curva de calibración. La misma presentó un coeficiente de correlación $r^2=0,9990$, $SD= 1,33 \times 10^{-3}$, $LOD= 2,19 \mu g mL^{-1}$, $LOQ = 6,65 \mu g mL^{-1}$ y

respecto a las muestras se obtuvieron porcentajes de recuperación de 100,01 % \pm 0,63 % - 101,16 % \pm 0,68 %.

De lo anterior, el analito bajo estudio ha sido cuantificado utilizando técnicas como: titulación, formación de complejos, determinación directa, extracción sólido - líquido, etc., potenciando a la espectroscopia UV-Visible como forma de detección. Sin embargo, estos métodos manuales suelen requerir de largos periodos de tiempos para que las reacciones sean completas, haciendo que la baja frecuencia de análisis sea una limitante para el uso de estos métodos en análisis de rutina. Por ello, las propuestas metodológicas automatizadas representan una alternativa muy atractiva para el analista cuando se enfrenta diariamente a un elevado número de muestras.

La técnica de análisis en flujo (AF)¹² es una herramienta que permite la automatización de los métodos químicos analíticos desarrollados manualmente y ha sido extensamente utilizada acoplada a diversos detectores, particularmente a un espectrofotómetro de absorción molecular en el UV/Vis. Hasta ahora esta articulación sigue siendo la más versátil y popular; y podría considerarse como uno de las de mayor importancia debido a la gran cantidad de especies capaces de absorber radiación en esta región. Entre las ventajas más sobresalientes de los sistemas AF se pueden mencionar su sencilla configuración, versatilidad y fácil operación. Al mismo tiempo, estos sistemas proporcionan una mayor reproducibilidad, incremento en la velocidad de análisis y reducción en el consumo de reactivos, junto con la disponibilidad instrumental y las ventajas económicas que aporta su incorporación a los laboratorios de investigación e industriales.

En conocimiento de los autores - hasta el momento - no se ha descrito un método automatizado para la determinación de ENM en productos farmacéuticos vía acoplamiento de la técnica análisis en flujo (AF- EAM-UV-Visible). Por lo anterior, el principal objetivo de este trabajo fue desarrollar una metodología simple para la determinación de ENM en formas farmacéuticas sólidas comercializadas en la ciudad de Mérida-Venezuela. El método propuesto se fundamenta en la reacción de oxido-reducción en medio ácido entre el permanganato de potasio y el enalapril (figura 2) en un sistema de flujo continuo. El fármaco reduce la señal de absorción del agente oxidante con el incremento de su concentración.

La necesidad de la propuesta nace a raíz de una problemática que afecta al sector farmacéutico en Venezuela y que se viene presentando con la crisis económica prolongada que vive el país. Este sector se ha visto afectado en lo que respecta a: la escasez y el alto costo de materia prima para la producción de

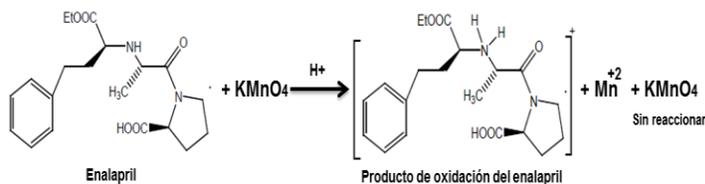


Fig. 2: Reacción química entre el ENM y el permanganato de potasio⁷.

fármacos por parte de los laboratorios nacionales y ausencia de productos farmacéuticos de marcas tradicionales y reconocidas a nivel mundial para el tratamiento de distintas enfermedades. Esto, ha conllevado a que en el mercado local (estado Mérida) se encuentren tanto en farmacias, como centros médicos, y ONG's; medicamentos de distintas marcas y procedencias sin la seguridad de saber si han sido sometidos a los distintos controles de calidad para ingresar al país. Es por esto, que el planteamiento de nuevas técnicas automatizadas de bajo costo en instrumentación y consumo de reactivos (muestras) y de fácil operación para la mejora del control de calidad del producto farmacéutico terminado, representa un tema de gran interés y relevancia para la investigación y desarrollo en la industria farmacéutica nacional, particularmente en tiempos de crisis.

Parte experimental

Equipos y accesorios

Las medidas de absorbancias fueron realizadas en el Laboratorio de Espectroscopia Molecular, de la Facultad de Ciencias, con un espectrofotómetro de absorción de radiación Ultravioleta/Visible, *Thermo Scientific*, Modelo Evolution 300, provisto una lámpara de xenón y un ancho de banda variable, monocromador modificado Ebert y detector dual de fotodiodos de silicio. El instrumento se controla a través del software "VISION-Pro". Adicionalmente, se utilizó una celda de flujo UV/Vis Perkin Elmer, Qz, B063-1150, 10mm, 300µL capacidad, bombas peristálticas programables Ismatec IPC de 4 canales, una balanza analítica electrónica, *A & D Company*, Modelo ER-180A, material de vidrio tipo A y misceláneos varios.

Para la validación y contraste del método propuesto se utilizó un (FT-IR), Perkin Elmer, modelo Spectrum 400 (Nolwack, CT, USA) controlado por un Software Spectrum v6.3.4

Reactivos, solventes y muestras

Todos los reactivos que se utilizaron en la realización del presente trabajo fueron de grado analítico. Todas las soluciones patrón, fueron preparadas a partir de un patrón de maleato de enalapril adquirido de la casa comercial Chemo (99%). Las diversas soluciones de trabajo se prepararon con agua de alta pureza de $18 \Omega \text{ ohm cm}^{-1}$ de resistividad, suministrada por un sistema Milli-Q-TOC de Millipore. El permanganato de potasio fue proporcionado por Merck (99%), ácido sulfúrico J.T. Baker, (99,08%).

Las siete (07) muestras comerciales (1 muestras de 5 mg, 2 muestras de 10 mg y 4 muestras de 20 mg) disponibles en la fecha del desarrollo de la metodología, del medicamento utilizadas en la presente investigación, fueron adquiridas en diferentes farmacias de la ciudad de Mérida.

Preparación de la solución de la muestra.

Con la finalidad de obtener una muestra representativa, se tomaron de forma aleatoria 10 tabletas del producto farma-

céutico, y se pesó cada una, obteniéndose así su peso promedio (\bar{x}) que para las presentaciones farmacéuticas utilizadas. Se trituran y se pulveriza hasta obtener un fino polvo homogéneo y representativo de la muestra. A continuación, por triplicado se pesan de este polvo cantidades equivalentes a la mitad del peso promedio de una tableta transfiriéndolo a balones aforados con tapa con la ayuda de agua, procurando que se encuentren en una concentración de 100 mg L^{-1} . Una vez disuelto el polvo y diluido con agua se lleva antes de aforar al ultrasonido por un tiempo de 25 minutos a una temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$, posteriormente se lleva a temperatura ambiente. Luego de esto se realiza el filtrado para separar los excipientes insolubles y así poder continuar con el enrasado adecuado con el medio de disolución acuoso. Finalmente se realizan las diluciones correspondientes llevando las muestras a una concentración aproximada a 30 mg L^{-1} .

Curva de calibración y soluciones de reactivos

La solución madre de maleato de enalapril fue preparada diariamente en medio acuoso a una concentración de 100 mg L^{-1} . A partir de esta solución se tomaron alícuotas para preparar 5 soluciones de concentración 14, 20, 30 40 y 50 mg L^{-1} y diluyendo luego con agua hasta el volumen final. Se preparó una solución de permanganato de potasio en una concentración de $1,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ y de ácido sulfúrico 1 mol L^{-1} .

Procedimiento general.

La figura 3, muestra el diagrama esquemático del montaje AFC-EAM-UV-Visible propuesto en este trabajo para la determinación de ENM en muestras farmacéutica. Consta de una bomba peristáltica de cuatro canales que propulsan la solución de permanganato de potasio, ácido sulfúrico y muestra (o estándares) a través de una tubería de Tygon; un serpentín de reacción y una celda de flujo de 1 cm de paso óptico y $300 \mu\text{L}$ de capacidad alineada al camino óptico del espectrofotómetro. Los reactivos y muestras se introducen en el sistema a través de sus respectivos canales, a temperatura ambiente, bajo las condiciones experimentales que se indican en la tabla 1. La bomba peristáltica permanece encendida durante todo el análisis propulsando un flujo continuo y constante.

El análisis involucra cuatro etapas: i) establecimiento de la señal de fondo, ii) introducción del agente oxidante, iii) introducción de estándares o muestras y iv) limpieza. La primera se

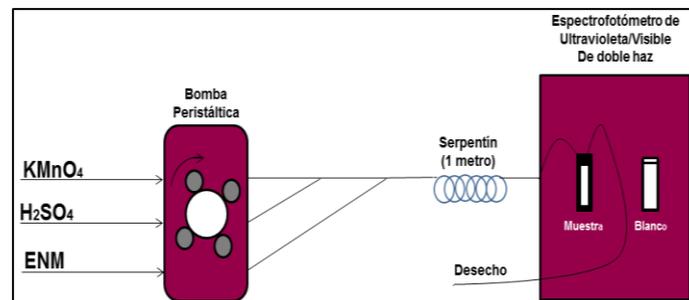


Fig. 3: Diagrama esquemático del montaje de Análisis en flujo continuo-UV/Vis utilizado para la determinación Enalapril.

realiza al iniciar cada sesión experimental de trabajo con el propósito de establecer la señal de fondo, es decir el “background” del sistema. Para ello, se coloca el ácido sulfúrico en su respectivo canal y agua destilada por los canales de la muestra y permanganato de potasio. Luego que se mezclen los tres canales en el serpentín de reacción, se realizan el espectro de absorción del blanco en forma continua entre 350 y 700 nm respectivamente, utilizando una velocidad de barrido de 960 nm min^{-1} .

En la segunda etapa, se introduce de manera continua el permanganato de potasio el cual se mezcla, con el ácido sulfúrico en el serpentín de reacción, manteniendo agua por el canal de introducción del ENM. Luego que se establezca el flujo, se le da orden al sistema para que tome el espectro de absorción. La tercera etapa consiste en introducir la muestra (o estándar) para que se mezcle con el ácido y permanganato en el serpentín de reacción donde se produce la oxidación del enalapril según la siguiente reacción:

En este punto la mezcla resultante, que contiene el producto del ENM oxidado y el permanganato de potasio remanente, fluye a través de la celda de flujo. En ese momento se procede a realizar el espectro de absorción y cuantificando luego con la banda asociada al permanganato de potasio sin reaccionar, es decir, se evalúa la disminución de la señal analítica del agente oxidante (KMnO_4) con el aumento de la concentración del ENM. Antes de introducir al sistema una nueva muestra o estándar, se realiza una etapa de limpieza colocando agua por el canal de la muestra, evitando así efectos de memoria. Es importante destacar que la adquisición de los respectivos espectros en la modalidad continua se lleva a cabo realizando al menos tres barridos en de forma secuencial e independiente.

Optimización de parámetros. Con el objeto de obtener la máxima información requerida con el mínimo coste y la máxima eficiencia para la optimización de las variables que maximizan la variable respuesta (absorbancia), se utilizó un diseño experimental basado en un diseño compuesto central 2^5-1 + estrella. Dicho diseño consiste en un diseño factorial o factorial fraccionado con puntos centrales que permite monitorear un grupo de puntos axiales (denominados puntos de estrellas) que facilitan la determinación de la curvatura. La ventaja que presenta este tipo de diseño es que permite estudiar los diferentes parámetros alrededor de un valor central para cada parámetro, y valores con valores superiores o inferiores a este valor central, y son utilizados cuando se espera que la forma de variación del parámetro en estudio se base en una curvatura (es decir, un incremento de la señal analítica hasta alcanzar un máximo y posterior disminución). Adicionalmente, vale indicar que el uso de este tipo de diseños permite monitorear simultáneamente todos los parámetros del sistema propuesto mediante el uso del análisis multivariado. Luego, para la evaluación de los resultados se necesitan ciertos algoritmos que permitan descomponer toda la data y permiten ver los cambios que ocurren que resultan difíciles de observar a simple vista con los métodos convencionales (método univariado).

Con base en lo anterior, las variables seleccionadas para el estudio fueron: la concentración de permanganato de potasio, resolución, temperatura de extracción, concentración de ácido sulfúrico y tiempo de extracción. Estos parámetros se variaron a cinco niveles: la concentración molar de KMnO_4 se ajustó a $(4, 6, 8, 10, 12) \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente, la resolución 0.5, 1, 1.5, 2, 4 cm^{-1} , la temperatura en 0, 18, 25, 30, $35 \text{ }^\circ\text{C}$, concentración de H_2SO_4 se fijó en 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 mol. L^{-1} y el tiempo de extracción se ajustó a 10, 15, 25, 30 y 40 min. Para el diseño se utilizó el software *Statgraphics Centurion XVII*.

Resultados y discusión

Estudios preliminares

Espectros de absorción de los reactivos, muestra y criterio de medida. Las experiencias preliminares tendiente a la caracterización espectral de los diversos reactivos involucrados, así como el efecto del ENM sobre el agente oxidante (KMnO_4) en medio $\text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{SO}_4$ (2:1), se llevaron a cabo fuera de línea y utilizando celdas estándar de cuarzo de 1cm de paso óptico y utilizando agua como referencia. Inicialmente, se estudió el espectro de absorción de la disolución $\text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{SO}_4$ en proporción de 2:1 y de una solución de la muestra fortalecida con ENM. La figura 4(a-b), ilustra el comportamiento de absorción de estas soluciones donde se observa la ausencia de bandas en la región comprendida entre 300-750 nm respectivamente.

En el caso del permanganato de potasio, este ha sido utilizado como un agente oxidante fuerte en medio ácido y presenta una banda de absorción en este mismo intervalo (figura 4c) caracterizada por dos máximos bien definidos en 525 y 546 nm respectivamente. Las figuras 4(d-e), muestran el efecto que sufren las bandas del agente oxidante en medio ácido en presencia de una solución de la muestra (d) y una muestra enriquecida con 5 mg.L^{-1} de ENM (e). Este efecto se presenta por una depresión de la señal de absorbancia, especialmente en los dos máximos que es proporcional a la concentración del ENM.

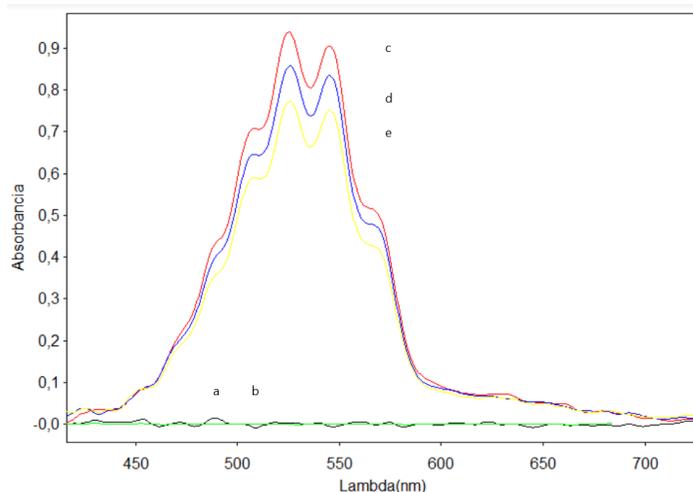


Fig. 4: Espectro de Absorción en el visible. a) $\text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{SO}_4$ (2:1), b) Solución de la muestra fortalecida con 5 mg ENM L^{-1} , c: $([\text{KMnO}_4]=1,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}, \text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{SO}_4$ (2:1), d) solución c en presencia una muestra ENM enriquecida con 5 mg ENM L^{-1} .

A fin de seleccionar la banda analítica entre estas dos longitudes de onda y el criterio de medida, se prepararon diversas soluciones permanganato de potasio en medio ácido con concentraciones variables ENM (concentración final entre 0 y 20 mg. L⁻¹). Los mejores resultados en términos de menor desviación estándar y sensibilidad se obtuvieron tomando la medida de absorbancia a 525 nm corregida por una línea base establecida entre 439 nm y 700 nm y por sustracción de la señal del blanco en esta misma región espectral.

Optimización de los parámetros involucrados en la metodología propuesta. Se optimizaron diversos parámetros correspondientes al acoplamiento del sistema en flujo continuo (AFC) (concentración del ácido y del agente oxidante), a la etapa de tratamiento de la muestra (extracción sólida-líquido) (temperatura y tiempo de extracción y los parámetros espectroscópicos-instrumentales inherentes al sistema de detección (intervalo espectral de trabajo y resolución nominal). En lo que respecta a los primeros, algunos parámetros como los caudales de los diversos canales, así como la longitud y diámetro de los tubos de transferencia y del serpentín de reacción fueron establecidos sobre la base de experiencias previas desarrolladas en el laboratorio en el acoplamiento de sistemas en flujo con técnicas de detección atómicas previa a la generación de vapor frío del analito^{13,14} y moleculares (EAM UV/Vis y FTIR)^{14,15} (ver tabla 1).

En la tabla 1, se resumen las condiciones experimentales óptimas para el sistema de Análisis en flujo-espectroscopia UV-visible propuesto en este trabajo.

Las diversas combinaciones de los parámetros mencionados a los niveles indicados arrojaron una data con 28 experimentos en forma aleatoria, resultando en un número bajo de experiencias, para poder evaluar cinco parámetros, en cinco niveles.

Tabla1. Condiciones de operación del sistema en flujo propuesto.

Espectrofotómetro	
Parámetros	Valor seleccionado
Velocidad de barrido (nm min ⁻¹)	960
Resolución (cm ⁻¹)	1,5
Intervalo espectral (nm)	439 - 700
Criterio de medida	La absorbancia a 525 nm corregida por una línea base entre 439-700
Sistema de análisis en flujo continuo (AFC)	
Flujo del del KMnO ₄ (mL.min ⁻¹)	1
Flujo del ácido sulfúrico	1
Flujo de muestras (estándares)	1
Longitud y diámetro del serpentín de reacción	100 cm (0,8 mm d.i)
Concentración de KMnO ₄ (mol.L ⁻¹)	1,2.10 ⁻⁴
Concentración de H ₂ SO ₄ (mol.L ⁻¹)	1

Tabla 2. ANOVA: Análisis de varianza para absorbancia

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Gl*	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A: [KMnO ₄]	1,36884x10 ⁻²	1	1,36884x10 ⁻²	46,42	0,0003
B: Resolución	2,59849x10 ⁻⁶	1	2,59849x10 ⁻⁶	0,01	0,9278
C: Temperatura	5,2414x10 ⁻⁵	1	5,24146x10 ⁻⁵	0,18	0,6859
D: [H ₂ SO ₄]	9,61959x 10 ⁻⁶	1	9,61959x10 ⁻⁶	0,03	0,8618
E: Tiempo de extracción	9,0636410 ⁻⁶	1	9,06364x10 ⁻⁶	0,03	0,8658
AA	7,1024810 ⁻³	1	7,10248x10 ⁻³	24,09	0,0017
AB	7,93469x10 ⁻⁵	1	7,93469x10 ⁻⁵	0,27	0,6199
AC	3,5397510 ⁻⁴	1	3,5397x510 ⁻⁴	1,20	0,3095
AD	2,915410 ⁻⁶	1	2,9154x10 ⁻⁶	0,01	0,9236
AE	9,7278410 ⁻⁵	1	9,72784x10 ⁻⁵	0,33	0,5837
BB	2,75371x10 ⁻⁵	1	2,75371x10 ⁻⁵	0,09	0,7688
BC	5,1658410 ⁻⁵	1	5,16584x10 ⁻⁵	0,18	0,6881
BD	1,4577210 ⁻⁴	1	1,45772x10 ⁻⁴	0,49	0,5047
BE	4,3898910 ⁻⁵	1	4,38989x10 ⁻⁵	0,15	0,7111
CC	7,1213410 ⁻⁷	1	7,12134x10 ⁻⁷	0,00	0,9622
CD	5,62151x10 ⁻⁴	1	5,6215110 ⁻⁴	1,91	0,2098
CE	6,6028410 ⁻⁷	1	6,60284x10 ⁻⁷	0,00	0,9636
DD	1,40067x10 ⁻³	1	1,40067x10 ⁻³	4,75	0,0657
DE	3,4709510 ⁻⁴	1	3,47095.10 ⁻⁴	1,18	0,3139
EE	7,71585x10 ⁻¹³	1	7,71585x10 ⁻¹³	0,00	1,0000
Error total	2,0639710 ⁻³	7	2,9485310 ⁻⁴		
Total (corr.)	4,6727810 ⁻¹	27			

*Gl: grados de libertad

Una vez realizados los distintos experimentos, utilizando una solución de muestra de maleato de enalapril $\approx 30 \text{ mg.L}^{-1}$, los resultados obtenidos (absorbancias) se evaluaron mediante un análisis de varianza (tabla 2). Este estudio descompone la variabilidad de absorbancia en fragmentos separados para cada uno de los efectos, entonces, prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este análisis se presentan 2 efectos que tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0% (filas resaltadas -en rojo- en la tabla 2). Adicionalmente, se puede inferir que solo un parámetro nos permite explicar el sistema (filas resaltadas -en azul- en la tabla 2) un 70,51 % de Razón-F, y como era de esperarse están relacionadas con la concentración del agente oxidante (KMnO_4), tanto en sus valores como la correlación que existe entre los niveles estudiados en este parámetro.

Asimismo, se puede observar en la figura 5 el diagrama de Pareto que permite estudiar la variación y correlaciones entre los parámetros en forma gráfica, que efectivamente la concentración del agente oxidante y la correlación entre los valores seleccionados para este parámetro, son los efectos que gobiernan el sistema, ya que ellos son los que superan el límite de tolerancia (línea azul en el diagrama) con un 95 % de confianza*. Adicionalmente, de la figura, se puede deducir que no existe correlación entre los demás parámetros, ya que se encuentran por debajo del valor del efecto estandarizado permitido. Esto también se puede corroborar en el ANOVA, donde se observa que los valores de P son mayores a 0,05 para estas evaluaciones.

Finalmente, en la tabla 3, se reportan los valores considerados óptimos por el diseño seleccionado para llevar a cabo el análisis propuesto.

Validación del método

Una vez identificados todos los parámetros que influyen en la reacción llevada a cabo, así como las posibles mejoras a la señal espectral por medio de la optimización, se procede a establecer las figuras de mérito del método, estudios de interferencia, así como los correspondientes estudios de precisión y exactitud.

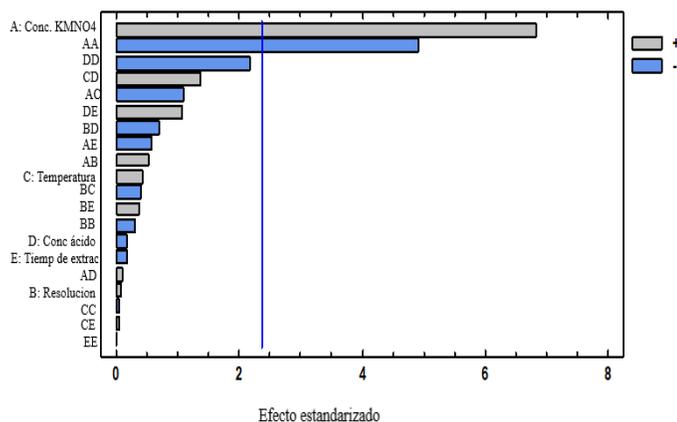


Fig. 5. Diagrama de Pareto estandarizado para absorbancia. La línea vertical indica el nivel de confianza de 95% ($p=0,05$).

Tabla 3. Factores establecidos y óptimos arrojados por el diseño compuesto central 2^5-1 + estrella

Factor	Valor establecido
$[\text{KMnO}_4]$ mol. L^{-1}	$1,2 \times 10^{-4}$
Resolución (cm^{-1})	1,5
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	30,0
$[\text{H}_2\text{SO}_4]$ mol. L^{-1}	1,0
Tiempo de extracción (min)	24,98

Características analíticas del método propuesto (figuras de mérito). Bajo las condiciones experimentales que se indican en las tablas 1 y 3 se caracterizó analíticamente el sistema en términos de respuesta lineal (hasta 80 mg L^{-1}), sensibilidad analítica, límite de detección y cuantificación. La curva de calibración se obtuvo preparando estándares de maleato de enalapril en concentraciones entre 14 y 50 mg L^{-1} . La curva incluyó una serie de cinco soluciones y el blanco y se midieron al menos tres veces cada una. En la figura 6, se muestran los resultados obtenidos de la curva de calibración sencilla (CCS), a partir de la cual se estableció la ecuación de la recta ($Y=-0,0029X + 0,9142$), la sensibilidad ($m = -0.0029$) y el coeficiente de determinación ($R^2 = 0,9998$). El límite de detección (LOD) definido como la concentración del analito cuya señal instrumental corresponde a tres veces la desviación estándar del blanco ($3\text{sd}/m$) fue de 4 mgL^{-1} y de cuantificación (LOQ) definido como la concentración del analito cuya señal instrumental corresponde a diez veces la desviación estándar del blanco ($10 \text{ sd}/m$) fue de $13,36 \text{ mg L}^{-1}$.

Estudios de efectos interferentes. Con el fin de evaluar la selectividad del método para medir exacta y específicamente la señal del analito en la matriz de la muestra sin interferencia por parte de impurezas, productos de degradación o excipientes que comúnmente se encuentran presentes en las formulaciones sólidas de este medicamento; se realizaron estudios de adición de estándar a un grupo de cinco muestras farmacéuticas de diferentes casas comerciales (muestras 1-5), en la modalidad clásica en la que se mantiene fija la cantidad de muestra, se varía la cantidad de estándar y se mantiene fijo el volumen total.

Una vez medidas las muestras, los resultados fueron graficados como se muestra en la figura 6a y para efectos del cálculo de la concentración del analito fue necesario normalizar las curvas que se obtiene experimentalmente que evidencia el desgaste de KMnO_4 para obtener una curva asociada al incremento de la concentración del ENM (figura 6b).

Posteriormente se llevó a cabo un estudio estadístico en el cual se compara la pendiente obtenida del método de calibrado sencillo (CCS) con las pendientes asociadas a cada muestra en las diferentes adiciones de estándar. Para ello se utilizaron las ecuaciones de las rectas de regresión obtenida por mínimos cuadrados que se muestra en la tabla 4. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5 e indican que no existen diferencias significativas entre las pendientes (t -Student 95% $< 2,57$, $n=5$), lo

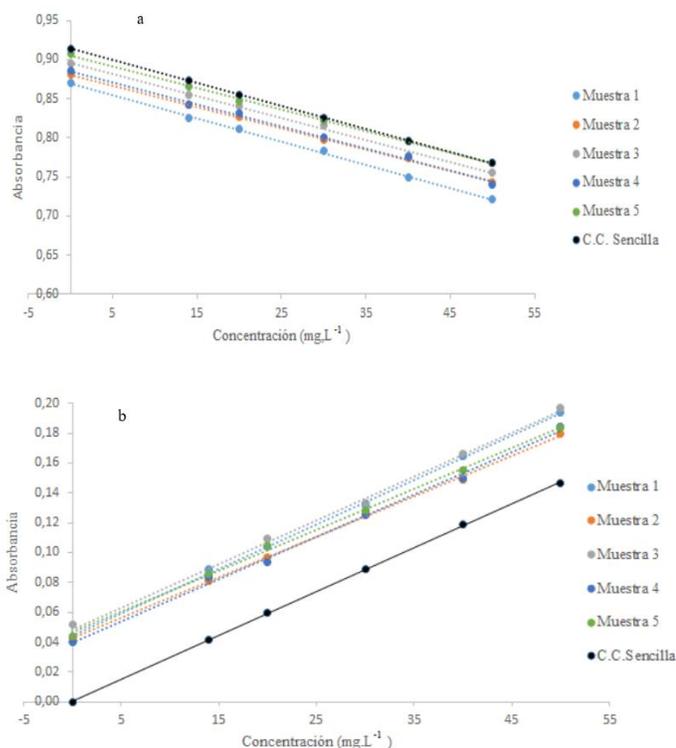


Fig. 6.a: CCS y CCAE directas para las cinco muestras seleccionadas obtenida por AF-EAM-UV-Visible, representando el desgaste del KMnO_4 con la concentración del ENM. **b:** CCS y CCAE inversas para las mismas muestras representando el incremento del ENM.

cual evidencia que los componentes de la matriz, así como el medio utilizado para la preparación de la solución de las muestras, no interfieren en la determinación del ENM en los comprimidos. En consecuencia, es posible la cuantificación del principio activo en el fármaco utilizando una curva de calibración sencilla construida utilizando soluciones del ENM preparadas en medio acuoso.

Tabla 4. Ecuaciones de las rectas de regresión de las figuras 6b

Muestra	Ecuación de la Recta	SD*	R ²
1	$Y=(0,0030 \pm 5.10^{-5})X + (0,0443 \pm 0,0014)$	0,0019	0,9991
2	$Y=(0,0027 \pm 4.10^{-5})X + (0,0424 \pm 0,0013)$	0,0019	0,9990
3	$Y=(0,0029 \pm 9.10^{-5})X + (0,0486 \pm 0,0028)$	0,0039	0,9960
4	$Y=(0,0028 \pm 7.10^{-5})X + (0,0400 \pm 0,0024)$	0,0034	0,9969
5	$Y=(0,0028 \pm 5.10^{-5})X + (0,0464 \pm 0,0016)$	0,0028	0,9984
C.C.S	$Y=(0,0029 \pm 2.10^{-5})X + (0,0003 \pm 0,0001)$	0,0018	0,9998

* SD: desviación estándar

Tabla 7. Comparación entre el método propuesto por UV/Visible y el método por FT-IR.

Muestra	Concentración nominal (mg)	Método de referencia FT-IR (mg)	Método propuesto AF-EAM-UV-visible (mg)	"t" crítico	"t" con un 95% de confianza
1	20	19,1	19,9		
4	20	18,8	19,1		
5	20	22,1	19,8	2,77	0,42
6	5	6,3	5,2		
7	10	9,6	10,5		

Tabla 5. Estudio comparativo de la pendiente de la CCS con las pendientes CCAE

Muestra	t (95% de confianza)	T crítico
1	0,02	2,57
2	0,04	2,57
3	0,00	2,57
4	0,03	2,57
5	0,02	2,57

Estudios de precisión. La precisión del método se evaluó a través de la desviación estándar relativa (RSD) realizando los respectivos estudios de repetibilidad (triplicado) con soluciones de muestras y soluciones de estándar con un contenido de ENM de 30 mg L^{-1} . Los resultados obtenidos fueron satisfactorios ya que estuvieron en un intervalo entre 0,47 y 0,66 % respectivamente; valores que se encuentran en el intervalo $\pm 2 \%$ que se considera satisfactorio por la farmacopea Estadounidense⁴

Estudios de exactitud:

Estudios de recuperación. Para estimar la exactitud del método a través de estudio de recuperación se utilizaron el mismo grupo de soluciones que sirvieron para los estudios de adición de estándar. Los resultados obtenidos de este estudio se presentan en la tabla 6 donde se observa que los mismos varían entre 89,3 y 103,6 % respectivamente. Exceptuando el valor más bajo, el resto resulta satisfactorio ya que se encuentran dentro del rango de aceptación ($\pm 10\%$) definido por la farmacopea estadounidense para el análisis de la uniformidad de contenido⁴.

Tabla 6. Estudios de recuperación

Muestra	[Analito] mg L^{-1} medido	[Analito] mg L^{-1} conocido	% Recuperación
1	9,2	10,0	92,3
2	4,9	5,0	98,1
3	10,5	10,0	104,7
4	8,9	10,0	89,3
5	10,4	10,0	103,6

Comparación con un método de referencia validado. Esta sección de trabajo consistió en comparar a través de las diferentes herramientas estadísticas, los resultados de la cuantificación de ENM por el método propuesto con los obtenidos mediante el uso de un método validado basado en la Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)¹⁶. Para ello se realizó un estudio de comparación de medias muestrales, mo-

nitoreando el estadístico “*t de Student*”, con un 95 % de confianza. Un total de cinco muestras fueron analizadas por ambos métodos y cada una fue medida tres veces. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7. Como el valor experimental del estadístico *t* con un 95 % de confianza es menor del valor “crítico, es posible inferir que no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos por ambos métodos¹⁷, lo que hace que esta nueva propuesta resulte atractiva para ser utilizada en el análisis de este tipo de fármacos.

Análisis de muestras

El método validado se aplicó satisfactoriamente para determinar el contenido de ENM en siete muestras farmacéuticas comercializadas en la ciudad y que declaran contener 5, 10 o 20 mg por cada comprimido. En la tabla 8, se puede observar que los resultados obtenidos se encuentran dentro de un rango estrecho de la unidad declarada para cada una de las muestras y además se encuentran dentro de los valores aceptados por la farmacopea estadounidense $41 (\pm 10\%)^3$. Acompañando a los resultados de concentración del analito, en la tabla 8, se encuentra su respectivo error absoluto determinado por la propagación de los errores asociados al número de réplicas medidas por muestra ($n=3$, intercepto y pendiente de la estimación lineal).

Tabla 8. Análisis de muestras utilizando el protocolo de análisis.

Muestra	CD (mg)	CE (mg)
1	20,0	(19,9 ± 0,8)
2	10,0	(9,3 ± 0,6)
3	20,0	(20,9 ± 2,4)
4	20,0	(19,1 ± 1,4)
5	20,0	(19,8 ± 1,6)
6	5	(5,2 ± 0,5)
7	10	(10,5 ± 1,1)

*(CE ± error absoluto) para $n=3$

CD: Cantidad declarada (mg), CE: Cantidad encontrada por cada comprimido utilizando AFC-EAM-UV-Visible.

Conclusiones

□ Se desarrolló un método alternativo basado en el acoplamiento análisis en flujo continuo - espectrometría de absorción molecular UV/Vis, para la cuantificación de maleato de enalapril en fármacos antihipertensivos.

□ Mediante el uso del diseño experimental Compuesto central 25-1 + estrella, se logró la optimización simultánea de los parámetros que influyen en el desarrollo de la metodología propuesta para la determinación de este principio activo farmacéutico.

□ El sistema análisis en flujo continuo, permitió la introducción de reactivos patrones y muestras de forma automática, minimizando la manipulación de los mismos por parte del operador.

Esto trajo como consecuencia mejoras en la precisión y exactitud en comparación con los métodos manuales.

□ La metodología planteada ofrece una gran reducción del uso de reactivos orgánicos respecto a la técnica oficial de HPLC con detección de UV/Vis establecida por las farmacopeas internacionales.

□ El procedimiento propuesto permite la cuantificación de la uniformidad de contenido sin ser necesarios tratamientos previos engorrosos, la optimización de variables llevada a cabo proporciona las mejores condiciones posibles para la metodología y la extracción del principio activo de la muestra farmacéutica.

□ Los resultados obtenidos durante el análisis de muestras fueron precisos y exactos, demostrando que el método proporciona una alternativa innovadora para la cuantificación de la uniformidad de contenido del analito respecto a los métodos convencionales, comprobándose que éste puede ser utilizado de forma rutinaria en los análisis de control de calidad en la industria farmacéutica.

Agradecimiento

Los autores agradecen al Laboratorio de Espectroscopia Molecular (LEM), Departamento de Química, Facultad de Ciencias (ULA-Mérida) por permitir el desarrollo de este proyecto.

Referencias

- SH Ahmadi, H Tavakoli, M Amirzadeh, MR Sangi. Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and enalapril maleate in pharmaceutical formulations using Fourier transform infrared spectrometry. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE)*, **33(4)**, 59-68 (2014).
- AA Patchett, T Harris, EW Tristam, MJ Wyvratt, Wyvratt, MT Wu, D Taub *et al.* A new class of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Nature*, **288**, 280-283 (1980).
- R Toporišič, Amlakar, J Hvala, Prislán, L Zupančič-Kralj. Identification of new impurities of enalapril maleate on oxidation in the presence of magnesium monoperoxyphthalate. *J. Pharm. Biomed. Analysis*, **52(2)** (2010).
- The United States of Pharmaceutical Convention. *Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 46- NF 41)*. Rockville, (2023).
- CE Daste. Control de Calidad en la Industria Farmacéutica (Bachelor's thesis). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Pontificia Universidad Católica del Ecuador (2015).
- S Lu, K Jiang, F Qin, X Lu, F Li. Simultaneous quantification of enalapril and enalaprilat in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study. *J. Pharm. Biomed. Analysis*, **49(1)**, 163-167 (2009).
- L Logoyda, A Megied, Y Kondratova, O Trofimenko, D Korobko, I Dakhym. Development and validation of HPLC method for the simultaneous determination of enalapril maleate in

- present of their impurities: Application to tablet analysis. **Int. J. Appl. Pharm.**, **10**, 98-102 (2018).
8. A Zoppi, M Linares, M Longhi. Quantitative analysis of enalapril by ¹H NMR spectroscopy in tablets. **J. Pharm. Biomed. Analysis**, **37(3)**, 627-630 (2005).
 9. K Vinay, H Revanasiddappa, P Shantala, K Basavaiah. Simple and sensitive titrimetric and spectrophotometric determination of enalapril maleate in pharmaceuticals using permanganate. **Eurasian Journal of Analytical Chemistry**, **5(2)**, 112-125 (2010).
 10. R El Sheikh, A Gouda, N Gouda. Validated spectrophotometric methods for determination of enalapril maleate in pure dosage forms. **Int. J. Pharm. Pharmaceutical Sci.**, **7(7)**, 190-197 (2015).
 11. N Prasad, R Kumar, V Kumar, R Roy. A simple UV Spectrophotometric method for Quantitative Estimation of Enalapril maleate. **Current Research in Pharmaceutical Sciences**, **6(1)**, 21-26 (2016).
 12. V Cerdà. Introducción a los métodos de análisis en flujo. Palma de Mallorca: SCIWARE, S.L. Departament de Química. Universitat de Illes Belears (2006).
 13. E Rothery. VGA-77 Vapor Generation Accessory. Operation Manual, Varian (1989).
 14. M Gallignani, M Valero, C Ayala, M Brunetto, A Sánchez, JL Burguera, M Burguera. Flow analysis-vapor generation-FTIR spectrometric determination of nitrite. **Talanta**, **64**, 1290-12980 (2004)
 15. M Gallignani, C Ayala, R Brunetto, JL Burguera, M Burguera. Flow analysis-hydride generation-Fourier transform infrared spectrometric determination of antimony in pharmaceuticals. **Talanta** **59**, 923-934 (2003).
 16. A Baldeón. Trabajo Especial de Grado. Desarrollo de una metodología para la cuantificación de Maleato de Enalapril en productos farmacéuticos antihipertensivos (tabletas y comprimidos) por Espectroscopia de Absorción Molecular en la región del infrarrojo. Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela (2023).
 17. JN Miller, JC Miller. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Cuarta ed. Madrid (España): Pearson Educación (2005).