

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA

CARLOS FRANCISCO PEDROSO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO POR CLAE,
PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE LOSARTANO E
ANLÓDIPINO EM ASSOCIAÇÕES UTILIZADAS NO TRATAMENTO
DA HIPERTENSÃO ARTERIAL**

**CURITIBA
2009**

CARLOS FRANCISCO PEDROSO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO POR CLAE,
PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE LOSARTANO E
ANLÓDIPINO EM ASSOCIAÇÕES UTILIZADAS NO TRATAMENTO
DA HIPERTENSÃO ARTERIAL**

Dissertação apresentada como
requisito parcial a obtenção do título
de mestre em Ciências Farmacêuticas,
Setor de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Roberto
Pontarolo

Co-orientador: Prof. Dr^a Ângela
Cristina Leal Badaró Trindade

**CURITIBA
2009**

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que de alguma maneira me ajudaram a conquistar mais esse degrau na minha vida, quero deixar claro que todos aqui citados, cada um da sua maneira, tiveram importância relevante durante essa caminhada.

Ao professor Roberto Pontarolo por acreditar em mim desde o período da graduação, me ajudando a crescer como pessoa e profissionalmente. Ao seu apoio incondicional e sua confiança durante esses anos de convivência.

A professora Ângela Cristina Leal Badaró Trindade e ao professor Alan Gonçalves pela grande ajuda na hora decisiva.

A Julcemara G. de Oliveira pela sua enorme ajuda na realização desse trabalho, pelo apoio e amizade.

A Francinete R. Campos pela sua ajuda crucial e apoio na hora decisiva.

Aos meus colegas de laboratório João Gasparetto, Marco Aurélio, Mario, Thais pela ajuda e pelo companheirismo de equipe.

Ao curso de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e ao CNPq que possibilitaram financeiramente a realização desse mestrado.

A minha mãe por sempre me incentivar, acreditar e me apoiar em todas as etapas da minha vida.

Ao meu pai e todos da minha família pelo apoio e ajuda durante esse período.

A Ivanna, minha noiva, pela sua compreensão, ajuda, paciência e principalmente pelo seu amor.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	3
2.1.1 Losartano.....	4
2.1.2 Anlodipino.....	6
2.1.3 Associações de Anlodipino e Losartano.....	7
2.2 METODOLOGIAS DE QUANTIFICAÇÃO.....	9
2.3 VALIDAÇÃO DE METODOS ANALITICOS	12
2.3.1 Seletividade.....	14
2.3.2 Linearidade.....	16
2.3.3 Intervalo.....	16
2.3.4 Exatidão.....	17
2.3.5 Precisão.....	18
2.3.5.1 Repetibilidade (precisão intra-corrída).....	18
2.3.5.2 Precisão intermediária (precisão inter-corrída).....	19
2.3.5.3 Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial).....	19
2.3.6 Limite de detecção (LD).....	20
2.3.7 Limite de quantificação (LQ).....	20
2.3.8 Robustez.....	21
3 OBJETIVOS	23
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	23
3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	23
4 MATERIAIS E METODOS	24
4.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	24
4.2 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA.....	25
4.3 CALCULO DOS PARAMETROS CROMATOGRAFICOS.....	26
4.4 METODO DE OBTENÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO.....	28
4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO.....	29
4.6 PREPARO DA AMOSTRA E PADRÃO.....	30

4.7	METODO DE VALIDAÇÃO.....	30
4.7.1	Seletividade.....	30
4.7.2	Linearidade.....	31
4.7.3	Precisão.....	31
4.7.4	Exatidão.....	32
4.7.5	Robustez.....	33
4.7.6	Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	33
4.8	COMPARAÇÃO DE METODOS.....	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	35
5.1	DESENVOLVIMENTO ANALITICO.....	35
5.2	OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO.....	47
5.3	VALIDAÇÃO.....	57
5.3.1	Seletividade.....	58
5.3.2	Robustez.....	63
5.3.3	Linearidade.....	65
5.3.4	Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	67
5.3.5	Precisão.....	67
5.3.5.1	Repetibilidade.....	68
5.3.5.2	Precisão Intermediaria.....	68
5.3.6	Exatidão.....	69
5.4	COMPARAÇÃO DE METODOS.....	70
6	CONCLUSÃO.....	73
7	REFERENCIAS.....	74
8	ANEXO.....	80

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ANVISA	- Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
AVC	- Acidente Vascular Cerebral
BPL	- Boas Práticas de Laboratório
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMD	- Concentração Média Determinada
DP	- Desvio Padrão
DPR	- Desvio Padrão Relativo
ECA	- Enzima Conversora de Angiotensina
FDA	- Food and Drug Administration
IC	- Inclinação da curva
ICH	- International Conference on Harmonisation
IUPAC	- International Union of Pure and Applied Chemistry
LD	- Limite de Detecção
LQ	- Limite de Quantificação
pH	- Potencial hidrogênico
USP	- United States Pharmacopeia
DAD	-Diodo Array Detector
MS	-Espectro de massa
MS/MS	-fragmentação massa massa
<i>m/z</i>	-relação massa carga
RMN	-Ressonância Magnética Nuclear
HSQC	-Heteronuclear Single Quantum Coherence
DMSO	-dimetil sulfoxido
ACN	-Acetonitrila
FM	-Fase Móvel
FC	-Footcandles (unidade de medida de luz Anglosaxonica)
CV%	-Coeficiente de variação
PA	-Padrão analítico
SPE	-Solid phase extration
ODS	-Octadecilsilano

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FÓRMULAS ESTRUTURAIS DO LOSARTANO POTÁSSICO E IMPUREZAS E e F.....	5
FIGURA 2 - FÓRMULAS ESTRUTURAIS DO BESILATO DE ANLODIPINO E IMPUREZA D.....	7
FIGURA 3 - DESCRIÇÃO DOS PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS.....	26
FIGURA 4 - PICO CROMATOGRÁFICO ASSIMÉTRICO.....	27
FIGURA 5 - ESPECTROS DE VARREDURA UV DO LOSARTANO E ANLODIPINO NO DAD.....	36
FIGURA 6 - CROMATOGRAMAS DO LOSARTANO E ANLODIPINO EM DIFERENTES pHs EM ELUIÇÃO GRADIENTE COM ACETONITRILA.....	38
FIGURA 7 - FATOR DE RETENÇÃO DO LOSARTANO E ANLODIPINO EM DIFERENTES pHs.....	39
FIGURA 8 - CROMATOGRAMAS DO LOSARTANO E ANLODIPINO EM pH 3,0 E 5,0, RESPECTIVAMENTE.....	40
FIGURA 9 - CROMATOGRAMAS DO LOSARTANO E ANLODIPINO EM pH 5,0 EM DIFERENTES COLUNAS.....	41
FIGURA 10 - CROMATOGRAMAS DO LOSARTANO E ANLODIPINO EM pH 3,0 EM DIFERENTES COLUNAS.....	42
FIGURA 11 - CROMATOGRAMAS DO LOSARTANO, ANLODIPINO E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO EM pH 3,0 EM DIFERENTES COLUNAS.....	45
FIGURA 12 - CROMATOGRAMA DO LOSARTANO E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO SEGUNDO O MÉTODO PROPOSTO POR HERTZOG E COLABORADORES (2002)	48
FIGURA 13 - ESPECTROS DE VARREDURA NA REGIÃO DO UV DO LOSARTANO E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO.....	48
FIGURA 14 - CROMATOGRAMA DO ANLODIPINO E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO SEGUNDO O MÉTODO PROPOSTO PELA BRITISH PHARMACOPOEIA, 2007.....	49
FIGURA 15 - ESPECTROS NA REGIÃO DO UV DO ANLODIPINO E IMPUREZA D.....	49
FIGURA 16 - ESPECTRO DE MS/MS DA IMPUREZA D.....	51
FIGURA 17 - ESPECTROS DE MS/MS DO COMPOSTO E e COMPOSTO F.....	52
FIGURA 18 - ESTRUTURAS QUÍMICAS NUMERADAS DO COMPOSTO E e F.....	53
FIGURA 19 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO COMPOSTO E (DMSO- D_6 , 400 MHz).....	54
FIGURA 20 - MAPA DE CORRELAÇÃO $^1\text{j } ^1\text{H}-^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO E, OBTIDO ATRAVÉS DO EXPERIMENTO DE HSQC (DMSO- D_6 , 400/100 MHz).....	54
FIGURA 21 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO COMPOSTO F (DMSO- D_6 , 400 MHz).....	55
FIGURA 22 - MAPA DE CORRELAÇÃO $^1\text{j } ^1\text{H}-^{13}\text{C}$ DO COMPOSTO F, OBTIDO ATRAVÉS DO EXPERIMENTO DE HSQC (DMSO- D_6 , 400/100 MHz).....	56
FIGURA 23 - CROMATOGRAMA DO LOSARTANO, ANLODIPINO E SEUS PRINCIPAIS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO.....	58
FIGURA 24 - CROMATOGRAMAS DA SOLUÇÃO DILUENTE, PLACEBO, SOLUÇÃO PADRÃO E AMOSTRA COMERCIAL.....	59

FIGURA 25 - ESPECTRO DE VARREDURA DE MASSAS DO ANLODIPINO.....	60
FIGURA 26 - ESPECTRO DE VARREDURA DE MASSAS DO LOSARTANO.....	61
FIGURA 27 - ESPECTRO DE MS/MS DO ANLODIPINO.....	62
FIGURA 28 - ESPECTRO DE MS/MS DO LOSARTANO.....	63
FIGURA 29 - CROMATOGRAMAS DO LOSARTANO E ANLODIPINO EM DIFERENTES CONDIÇÕES PARA AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO.....	65
FIGURA 30 - GRÁFICO DA LINEARIDADE E FAIXA LINEAR DO ANLODIPINO.....	66
FIGURA 31 - GRÁFICO DA LINEARIDADE E FAIXA LINEAR DO LOSARTANO.....	67

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA A QUANTIFICAÇÃO DO LOSARTANO POR CLAE-UV.....	10
QUADRO 2 - PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA A QUANTIFICAÇÃO DO ANLODIPINO POR CLAE-UV.....	11
QUADRO 3 – CLASSIFICAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS DE ACORDO COM A FINALIDADE.....	13
QUADRO 4 – ENSAIOS NECESSÁRIOS PARA A VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS DE ACORDO COM A SUA FINALIDADE.....	14
QUADRO 5 - GRADIENTE INICIAL VARIANDO SOLVENTE ORGÂNICO.....	37
QUADRO 6 - CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DOS RECHEIOS DAS COLUNAS TESTADAS.....	46
QUADRO 7 - GRADIENTE FINAL.....	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PARAMÊTROS CROMATOGRÁFICOS EM pH 3,0 e 5,0.....	40
TABELA 2 – VALORES DE RMN ENCONTRADOS PARA COMPOSTOS E e F.....	57
TABELA 3 - ADEQUABILIDADE DO SISTEMA.....	58
TABELA 4 - AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ EM RELAÇÃO A RECUPERAÇÃO DO MÉTODO.....	64
TABELA 5 - DADOS DE REPETIBILIDADE E RECUPERAÇÃO DO LOSARTANO.....	68
TABELA 6 - DADOS DE REPETIBILIDADE E RECUPERAÇÃO DO ANLODIPINO.....	68
TABELA 7 - DADOS DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA E RECUPERAÇÃO DO LOSARTANO.....	69
TABELA 8 - DADOS DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA E RECUPERAÇÃO DO ANLODIPINO.....	69
TABELA 9 – TEOR DAS ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS EM DIFERENTES MÉTODOS....	70

RESUMO

Ate o presente momento, não foi encontrado na literatura um método analítico que quantifique o losartano e anlodipino simultaneamente na mesma forma farmacêutica. Para isso, foi desenvolvido um método por CLAE que quantifique o losartano e anlodipino simultaneamente, durante o desenvolvimento foram avaliados diferentes solventes orgânicos e pH da fase móvel, fluxo, temperatura de forno e diferentes colunas octadecilsilano com mesmas dimensões. As melhores condições foram obtidas com uma fase móvel contendo acetonitrila e tampão fosfato pH 3,0 em eluição gradiente, num fluxo de 1 ml/min a temperatura ambiente. Durante o desenvolvimento foram realizados a identificação dos principais produtos de degradação dos fármacos por ultravioleta, espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear. O método validado apresentou linearidade na faixa de 50 a 150% da concentração de trabalho, com um coeficiente de correlação acima de 0,999 dos fármacos. A exatidão e precisão foram avaliadas na faixa de 70 a 130% da concentração de trabalho, com valores de recuperação de 98,8 a 100,5% para o losartano e de 96,4 a 101,3% para o anlodipino. A precisão avaliada para os dois fármacos foi abaixo de 5%. A seletividade do método foi avaliada por detecção DAD e espectrometria de massas. O método mostrou-se robusto. Ao comparar o método com outros que quantificam os fármacos unitariamente verificou-se que os resultados encontrados não apresentam diferenças. Portanto, o método proposto mostrou ser adequado para quantificação simultânea do anlodipino e losartano em formas farmacêuticas solidas.

Palavras-chave: Hipertensão arterial, Losartano, Anlodipino, Desenvolvimento analítico, Validação analítica, CLAE.

ABSTRACT

So far, it was not found in the literature an analytical method to quantify the losartan and amlodipine simultaneously in the same pharmaceutical dosage. For this, a method was developed by HPLC that quantifies the two drugs simultaneously. During the development were evaluated different organic solvents and pH of the mobile phase, flow rate, column temperature and different octadecylsilane columns with the same dimensions. The best conditions were obtained with a mobile phase containing acetonitrile and phosphate buffer pH 3.0 in gradient elution at a flow rate of 1 ml / min at room temperature. During the development were carried out to identify the main degradation products of pharmaceuticals by ultraviolet, mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. The validated method showed linearity in the range of 50 to 150% of the work concentration, with a correlation coefficient of 0.999 over the drugs. The accuracy and precision were assessed in the range of 70 to 130% of the working concentration, with recovery values from 98.8 to 100.5% for losartan and 96.4 to 101.3% for amlodipine. The accuracy evaluated for the two groups was below 5%. The selectivity of the method was evaluated by DAD detection and mass spectrometry. The method proved to be robust. When comparing the method with other drugs that quantify unitarily found that the results do not differ. Therefore, the proposed method proved to be suitable for simultaneous quantification of amlodipine and losartan in solid pharmaceuticals preparation.

Key words: Hypertension, Losartan, Amlodipine, Analytical development, Analytical validation, HPLC.

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial é responsável por cerca de 6% das mortes em todo o mundo e é o principal fator de risco para doenças cardiovasculares (WOLF-MAIER *et al.*, 2004). Segundo a Sociedade Brasileira de Hipertensão no ano de 2003, 27,4% dos óbitos ocorridos no Brasil foram decorrentes de doenças cardiovasculares. Além disso, segundo a mesma, em 2005 ocorreram mais de um milhão de internações por doenças cardiovasculares, com um custo global de mais de um bilhão de reais (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2006). Contudo, os avanços no tratamento da pressão arterial, nos últimos 30 anos, possibilitaram a diminuição de mortalidade por doenças relacionadas a hipertensão arterial como o caso de derrame cerebral e doenças cardiovasculares (WOLF-MAIER *et al.*, 2004).

Com o recente avanço dos tratamentos terapêuticos, cada vez mais tem sido utilizada a associação de fármacos para potencializar a ação do medicamento contra uma determinada enfermidade. No caso da hipertensão, estágios mais avançados da doença requerem um tratamento mais intenso, com uso de terapia combinada. (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2006).

O uso de associações de fármacos na mesma forma farmacêutica é uma prática relativamente nova, por isso, há poucas monografias nas Farmacopéias que apresentam associações de dois ou mais fármacos. Portanto, o fator determinante na escolha do tema foi a falta de metodologias analíticas validadas para análise de formas farmacêuticas sólidas contendo associações de anti-hipertensivos. Como exemplo de método de análise de associações podemos citar a Farmacopéia Americana 31^a edição, que apresenta uma monografia de análise da associação de enalapril e hidroclorotiazida (USP, 2008a). Mesmo assim, o método de quantificação desses fármacos na monografia são feitos de maneira independentes e com diferentes colunas e fases móveis, fato que não ajuda na agilidade de obtenção dos resultados. As demais associações de anti-hipertensivos existentes no mercado não constam nas monografias das Farmacopéias consideradas oficiais pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Até o momento não foi encontrada na literatura pesquisada um método de análise simultânea de besilato de anlodipino e losartano potássico associados em formas farmacêuticas sólidas, tanto por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou por qualquer outra metodologia analítica. O que há são métodos para determinação de associação de enalapril e hidroclorotiazida por CLAE (SEBURG *et al.*, 2006), por Espectrometria na região do Ultravioleta (EL WALILY *et al.*, 1995) e por Eletroforese Capilar (HILLAERT; VAN DEN BOSSCHE, 2001). Para a associação de losartano e hidroclorotiazida foram encontradas métodos por CLAE (CARLUCCI *et al.*, 2000, ERK, 2001, HERTZOG *et al.*, 2002) e por Eletroforese Capilar (QUAGLIA *et al.*, 2002).

Esta pesquisa visa contribuir na elaboração de um método que seja capaz de quantificar o losartano e anlodipino combinados, permitindo analisar qualquer um desses fármacos independente da forma com que eles estejam associados. Como consequência pretende-se otimizar o consumo de materiais, diminuir custos de análise, o tempo de resposta analítica, o tempo de desenvolvimento e a validação de método para os laboratórios de pesquisa, de Controle de Qualidade, Laboratórios de Equivalência Farmacêutica e para a Indústria Farmacêutica.

O problema está em como desenvolver e validar um método que permita quantificar simultaneamente o losartano e anlodipino em formas farmacêuticas sólidas contendo Anlodipino e Losartano associados ou não e ao mesmo tempo seja capaz de separar seus principais produtos de degradação. Para tentar resolver isso, no decorrer deste trabalho foram levados em consideração as características químicas e estruturais, a solubilidade, os valores de pKa, o peso molecular, os cromóforos dos fármacos e a grande diferença de massas entre os fármacos e seus produtos de degradação nas formas farmacêuticas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL

A pressão arterial é definida como produto do débito cardíaco pela resistência vascular periférica. A hipertensão (pressão arterial maior ou igual a 140/90 mm Hg) provoca alterações patológicas nos vasos sanguíneos e hipertrofia do ventrículo esquerdo. Suas principais consequências são: Acidente Vascular Cerebral (AVC), infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, insuficiência renal e aneurisma dessecante da aorta (OATES; BROWN, 2003).

Os principais fatores de risco que podem levar ao aumento da pressão arterial são: idade (quanto maior a idade maior a pressão), sexo (até aos 50 anos há maior prevalência em homens a partir da sexta década há maior prevalência em mulheres), etnia (mulheres afro descendentes tem maior probabilidade de hipertensão), fatores sócio-econômicos (níveis mais baixos tem maior prevalência de hipertensão), sedentarismo, consumo de álcool, consumo de cigarros, consumo elevado de sal, obesidade, predisposição genética e fatores ambientais (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2006).

O tratamento da hipertensão arterial pode ser medicamentoso e não medicamentoso.

O tratamento não medicamentoso consiste em hábitos saudáveis como: controle do peso através de dietas e da prática de exercícios físicos regularmente, redução do consumo de sal, redução da ingestão de álcool e abandono do tabagismo. Pode ser realizado principalmente quando a hipertensão arterial não é decorrente de síndrome metabólica. Contudo, como trata-se de adoção de um estilo de vida mais saudável é recomendado para todas as causas da doença (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2006).

O tratamento medicamentoso pode ser realizado por uma variedade de classes de medicamentos existentes no mercado: diuréticos, inibidores adrenérgicos, bloqueadores de canais de cálcio, inibidores da Enzima Conversora

de Angiotensina (ECA), bloqueadores de receptores AT1 da Angiotensina II, vasodilatadores diretos.

Os medicamentos estudados nesse trabalho são de diferentes classes: losartano (bloqueador de receptores AT1 da Angiotensina II) e anlodipino (bloqueador de canais de cálcio).

2.1.1 Losartano

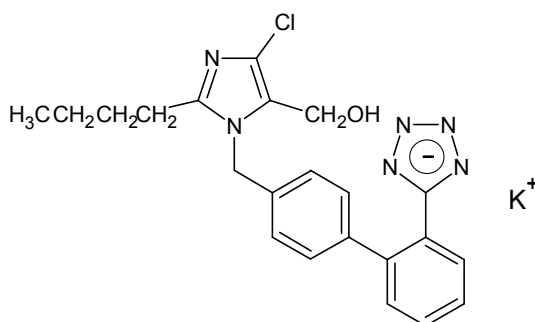
O losartano é um fármaco antagonista não peptídico do receptor da Angiotensina II, com alta afinidade ao receptor AT1. Não apresenta efeitos de abstinência após suspensão da terapia. O losartano é metabolizado pelo complexo Citocromo P450, produzindo um metabólito principal que é até 40 vezes mais potente que o próprio fármaco (AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM PHARMACISTS, 2006).

O losartano demonstrou ser superior no tratamento da hipertensão em comparação aos inibidores de receptores antagonistas peptídicos e que inibidores da ECA, pois é bem tolerado, específico e seletivo (CONLIN, 2001, SCHOENBERGER, 1995). Outra grande vantagem é devido à pouca incidência de efeitos adversos, por isso o losartano apresenta uma melhor adesão farmacêutica em relação à Anlodipino e Metaprolol (DÜSING; LOTTERMOSER; MENGDEN, 2001).

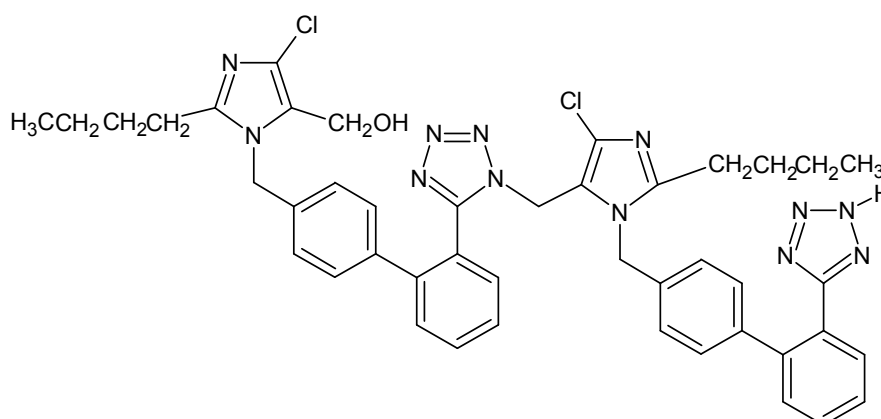
Sua indicação é para o tratamento da hipertensão, na forma isolada ou em associação. A dose usual para adultos, por via oral, varia de 25 a 100 mg ao dia (AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM PHARMACISTS, 2006).

O losartano potássico é um pó cristalino branco ou quase branco, solúvel em solventes orgânicos polares como álcool etílico (MERCK & COMPANY INCORPORATED, 2001). Apresenta valor de pKa de 4,9, uma massa molecular de 461 g/mol e de 422 g/mol na forma molecular. A fórmula molecular é $C_{22}H_{22}ClKN_6O$ e a fórmula estrutural está representada na Figura 1. Foram identificadas até o momento cinco impurezas principais sendo duas impurezas de processo (LUSINA *et al.*, 2005) e três de degradação (ZHAO *et al.*, 1999). As principais impurezas de

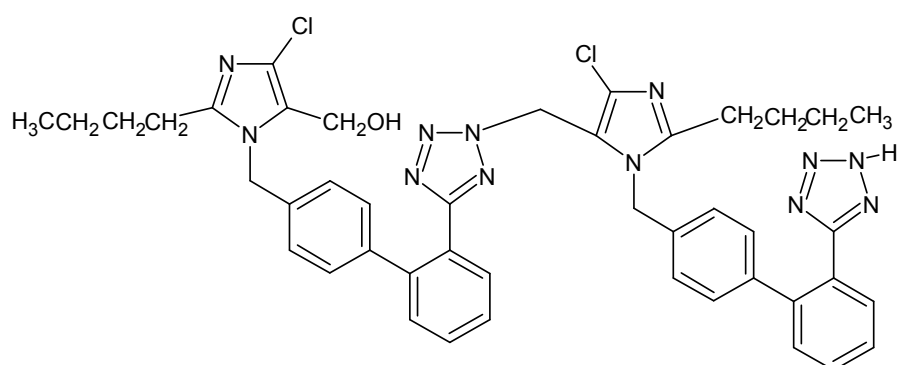
degradação são a Impureza E e F com a mesma massa molecular de 827 g/mol, Figura 1.



Losartano potássico



Impureza E (produto de degradação)



Impureza F (produto de degradação)

FIGURA 1 - FÓRMULAS ESTRUTURAIS DO LOSARTANO POTÁSSICO E IMPUREZAS E e F

2.1.2 Anlodipino

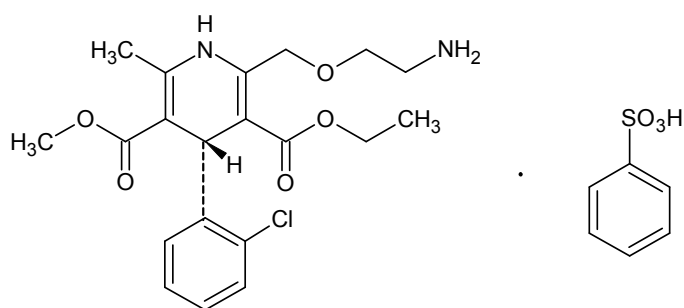
O Anlodipino é um fármaco bloqueador seletivo de canais de cálcio, inibindo o influxo de íons cálcio pela membrana, resultando na diminuição de cálcio intracelular e, como consequência farmacodinâmica, ocorre a dilatação das artérias periféricas. Essa dilatação reduz a resistência das artérias e, conseqüentemente, a pressão sistêmica (AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM PHARMACISTS, 2006). Contudo não promove a mesma vasodilatação venosa, fato esse que gera um desequilíbrio de forças hidrostáticas no capilar periférico, extravasando líquido no espaço intersticial que, por gravidade, provoca a formação de edemas nos membros inferiores, sendo esse o principal efeito adverso e responsável pelo abandono do tratamento (LAW *et al.*, 2003, KOHLMANN; GOMES, 2006, WEBSTER *et al.*, 1987). Uma prática terapêutica comum para diminuir a incidência desses efeitos adversos é a administração inicial de baixa dosagem com posterior aumento progressivo (WEBSTER *et al.*, 1987).

A dose usual para adultos, por via oral, varia de 2,5 a 10 mg ao dia (AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM PHARMACISTS, 2006), sendo este o único fármaco da classe dos derivados di-hidropiridínicos inibidores de canais de cálcio que podem ser administrados apenas em uma dose ao dia (WEBSTER *et al.*, 1987).

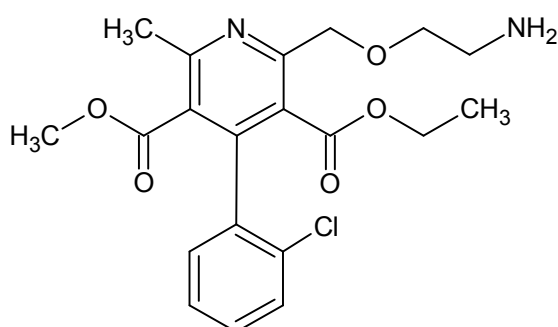
Estudos comparativos entre Anlodipino e Losartano (monoterapia) avaliaram a potência dos fármacos na redução da pressão arterial e mostraram que o anlodipino é mais efetivo que o losartano (PHILLIPS *et al.*, 2003, YOSHII *et al.*, 2003). Porém, o primeiro, por apresentar incidência maior de efeitos adversos apresenta uma taxa de abandono da terapia muito maior que a do losartano (OPARIL *et al.*, 1996, VOLPE *et al.*, 2003).

O besilato de anlodipino cuja fórmula molecular é $C_{26}H_{31}ClN_2O_8S$ (Figura 2), é um pó branco ou quase branco, pouco solúvel na água, facilmente solúvel em metanol, ligeiramente solúvel no etanol e pouco solúvel no 2-propanol (COMISSÃO DA FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 2002). Apresenta valor de pKa de 8,6 (MERCK & COMPANY INCORPORATED, 2001) uma massa molecular de 567 g/mol (besilato de anlodipino) e de 408 g/mol para a forma molecular. Apresenta quatro impurezas principais e seus enantiômeros, porém, a Impureza D (Figura 2) proveniente da

oxidação do anlodipino é a mais comum (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2007), com massa molecular de 406 g/mol.



Besilato de Anlodipino



Impureza D (produto de degradação)

FIGURA 2 - FÓRMULAS ESTRUTURAIS DO BESILATO DE ANLODIPINO E IMPUREZA D

2.1.3 Associações de Anlodipino e Losartano

A associações de fármacos ou a terapia combinada faz-se necessário toda vez que a mono-terapia não tenha sido eficaz no controle da pressão arterial. Em cerca de dois terços dos casos a mono-terapia não é eficaz na redução da pressão arterial, por isso, há uma tendência de já iniciar o tratamento utilizando associações de fármacos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2006).

As possíveis associações de anti-hipertensivos são aquelas que combinam fármacos com diferentes mecanismos de ação, exceto, o caso dos diuréticos. Portanto, pode-se associar diuréticos tiazídicos ou de alça com diuréticos poupadores de potássio, diuréticos com beta-bloqueadores, diuréticos e inibidores da ECA, diuréticos e bloqueadores do receptor AT1, diuréticos e medicamentos de ação central. Os bloqueadores de canais de cálcio podem ser combinados com: beta-bloqueadores, inibidores da ECA e bloqueadores do receptor AT1. Essas associações estão presentes no mercado em doses fixas, fato esse que facilita a adesão ao tratamento da hipertensão (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2006).

Dentre as associações descritas acima destaca-se a associação de besilato de anlodipino ao losartano potássico, que apresenta-se no mercado com as seguintes doses fixas: 2,5 mg e 50 mg; 5 mg e 100 mg, respectivamente.

Quando o losartano é associado com anlodipino ocorre uma sinergia dos fármacos na redução da pressão arterial, possibilitando controlar a hipertensão de forma mais eficaz mesmo em doses mais baixas que as utilizadas na mono-terapia, além disso, esses fármacos juntos têm a capacidade de proteção dos órgãos alvo, apresentando baixa incidência de eventos adversos (LAW *et al.*, 2003, KOHLMANN e GOMES, 2006).

Uma das vantagens da associação do anlodipino ao losartano em relação ao tratamento com anlodipino é a possibilidade de utilizar doses menores do antagonista de canal de cálcio, possibilitando menor aparecimento de efeitos adversos, como o caso de edemas nos membros inferiores (principal efeito adverso do anlodipino e responsável pelo abandono do tratamento com esse fármaco conforme descrito acima), uma vez que existe uma relação direta entre a dose do fármaco e a frequência e intensidade dos efeitos adversos. A menor incidência dos efeitos adversos, relacionada à administração do anlodipino, se deve ao fato que o losartano além de proporcionar uma redução da hipertensão arterial, promove também a venodilatação, equilibrando a pressão hidrostática dos capilares, diminuindo o aparecimento do edema e possibilitando a utilização de uma dose menor de anlodipino na forma farmacêutica (LAW *et al.*, 2003, KOHLMANN e GOMES, 2006).

Outra vantagem da associação desses fármacos no tratamento da hipertensão, em relação ao uso do losartano em mono-terapia, é que a associação é mais eficaz na redução tanto da pressão sistólica quanto diastólica no período de vigília e durante o sono, mostrando ser adequado para o controle da pressão arterial por 24 horas. Esses efeitos foram observados por um período longo, fato esse que facilita a adesão farmacêutica ao tratamento, pois permite que o paciente tome apenas um medicamento (associação com dois fármacos) uma vez ao dia (KOHLMANN e GOMES, 2006).

O uso prolongado da associação de losartano e anlodipino não altera os parâmetros do metabolismo glicídico e os lipídeos plasmáticos, portanto a associação mostrou-se segura para pacientes com síndrome metabólica, diabetes melito e dislipidemias (KOHLMANN e GOMES, 2006).

2.2 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO

Os métodos encontrados na literatura para quantificação dos fármacos e suas respectivas associações são em sua grande maioria realizadas por CLAE com detector UV-Vis, detector de massas ou, em alguns casos, detector de fluorescência. Contudo, há registros de outras técnicas como Eletroforese Capilar, UV-Vis simples, derivadas e multivariadas e cromatografia planar de alta eficiência.

Para quantificação do losartano em matéria-prima a USP 31 (USP, 2008b) descreve um método por CLAE com detecção por UV, porém, não define um método para comprimidos. As farmacopéias Brasileira, Européia e Japonesa não apresentam metodologia de quantificação do losartano até o momento. Por outro lado, foram encontradas na literatura metodologias para quantificação do losartano e seus produtos de degradação em comprimido por CLAE detector UV-Vis (HERTZOG *et al.*, 2002, LUSINA *et al.*, 2005). Os principais parâmetros cromatográficos encontrados estão descritos no Quadro 1. Também foi descrita uma análise por espectrometria de massas (ZHAO *et al.*, 1999). Há um trabalho que compara o uso de CLAE, de Eletroforese Capilar e de Cromatografia em Fluido Supercrítico para determinação do losartano (WILLIAMS *et al.*, 1996).

QUADRO 1 - PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA A QUANTIFICAÇÃO DO LOSARTANO POR CLAE-UV

Fármaco	Referência	Coluna	Fase Móvel	Fluxo (mL/min)	Comprimento de onda (nm)	Temperatura (°C)	Tempo de Corrida (min)
Losartano matéria-prima, doseamento	(USP, 2008b)	C18 (L1) - 250 x 4,0 mm, 3-10 µm	Mistura filtrada e degazeificada da solução 0,1% de ácido fosfórico em água e ACN (3:2)- Isocrático	1,0	254	35	---
Losartano matéria-prima, pureza cromatográfica	(USP, 2008b)	C18 (L1) - 250 x 4,0 mm, 3-10 µm	FM A: 0,1% H ₃ PO ₄ em água FM B: ACN Gradiente	1,0	220	Ambiente	---
Losartano comprimidos	(HERTZOG <i>et al.</i> , 2002)	Symmetry C8 150 x 3,9 mm 5 µm	FM A: Tampão fosfato 0,02M pH 7,0 (KH ₂ PO ₄ e Na ₂ HPO ₄) e ACN (85:15 v/v) FM B: ACN Gradiente	1,0	250	Ambiente	15

Para a quantificação de comprimidos contendo a associação de losartano e hidroclorotiazida foram encontrados três artigos (CARLUCCI *et al.*, 2000, ERK, 2001, HERTZOG *et al.*, 2002). Em matriz biológica, para essa mesma associação, há trabalhos publicados usando CLAE com detecção por UV-Vis (SOLDNER; SPAHN-LANGGUTH; MUTSCHLER, 1998, YEUNG *et al.*, 2000), com detector de fluorescência (FARTHING *et al.*, 1997, GONZALEZ *et al.*, 2002, NIE *et al.*, 2005, RITTER; FURTEK; LO, 1997) e com detector de massas (IWASA *et al.*, 1999, POLINKO *et al.*, 2003).

Para quantificação do besilato de anlodipino dentre as farmacopéias oficiais apenas a Farmacopéia Britânica relata uma metodologia de quantificação de matéria-prima por CLAE com detector UV (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2007). Não há até o presente momento nenhuma metodologia farmacopeica para quantificação

de comprimidos de anlodipino. Por outro lado, foram encontradas na literatura metodologias por CLAE utilizando detector UV-Vis para quantificação do anlodipino em comprimidos em associação com outros fármacos (MOHAMMADI *et al.*, 2007, NAIDU; KALE; SHINGARE, 2005, PATEL *et al.*, 1998). Os principais parâmetros cromatográficos utilizados estão descritos no Quadro 2.

QUADRO 2 - PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA A QUANTIFICAÇÃO DO ANLODIPINO POR CLAE-UV

Fármaco	Referência	Coluna	Fase Móvel	Fluxo mL/min	Comprimento de onda (nm)	Temperatura (°C)	Tempo de Corrida (min)
Anlodipino matéria-prima	(BRITISH PHARMACO POEIA, 2007)	C-18 150 x 3,9 mm, 5 µm	ACN, metanol e solução de trietilamina pH 3,0* (15:30:50). Isocrático	1,0	237	Ambiente	20
Anlodipino e Atorvastatina	(MOHAMMADI <i>et al.</i> , 2007)	Perfectsil ODS-3 250 x 4,6 mm, 5 µm	ACN e tampão NaH ₂ PO ₄ 0,025M pH 4,5 (55:45 v/v). Isocrático	1,0	237	25	20
Anlodipino e Benazeprila	(NAIDU; KALE; SHINGARE, 2005)	Zorbax SB C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm	Tampão fosfato de potássio di-hidrogênio pH 7,0 ajustado com KOH 1,0 N e ACN (65:35 v/v) Isocrático	1,0	240	28	25
Anlodipino matéria-prima	(KLINKENBERG; STREEL; CECCATO, 2003)	Purospher RP-18e, 125 x 4,0 mm, 5 µm	ACN, metanol e solução de trietilamina pH 3,0* (15:35:50)	1,0	237	25	12

* Solução de trietilamina: 7,0 mL de trietilamina R em 1000 mL de água, ajustar o pH com ácido fosfórico a 3,0.

As outras técnicas de análise do anlodipino encontradas na literatura foram quantificação de comprimidos de anlodipino por espectrometria na região do UV-Vis com complexação (BASAVIAH; CHANDRASHEKAR; PRAMEELA, 2003, RAHMAN; NASRUL HODA, 2003, RAHMAN; SINGH; HODA, 2004) e por derivação

(RAGNO; GAROFALO; VETUSCHI, 2002), por cromatografia delgada em fase reversa RPTLC (RAGNO; GAROFALO; VETUSCHI, 2002), utilizando matriz biológica com CLAE e detector por UV-Vis (ZARGHI *et al.*, 2005), de fluorescência (BAHRAMI; MIRZAEI, 2004, TATAR; ATMACA, 2001) e detector de espectrometria de massas (MA *et al.*, 2007, STREEL *et al.*, 2002).

Não foi encontrado, até o momento, nenhum método de quantificação simultânea do losartano e anlodipino. Essa associação apresenta alguns desafios analíticos como a grande diferença de concentrações dos fármacos na mesma forma farmacêutica (o losartano está cerca de 20 vezes mais concentrado). Além disso, são fármacos de comportamento ácido-básico diferenciados, o que representa uma grande dificuldade para cromatografia em fase reversa sem a utilização de par iônico e de supressão iônica.

2.3 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de um método tem como propósito garantir através de métodos experimentais que os resultados obtidos sejam confiáveis (ANVISA, 2003).

Para garantir a confiabilidade dos resultados por métodos cromatográficos deve-se garantir alguns pré-requisitos para sua validação dentre eles a qualificação dos equipamentos, a estabilidade das soluções analíticas e o teste de conformidade do sistema (SHABIR, 2003).

A qualificação dos equipamentos compreende desde a instalação correta, a qualificação operacional que atesta a operacionalidade do sistema, definido em especificações de exatidão, linearidade e precisão, e o desempenho do equipamento durante uma corrida (SHABIR, 2003).

A estabilidade das soluções (padrão, amostra, fase móvel) devem ser analisadas e comparadas com soluções preparadas recentemente. Neste parâmetro há uma tolerância de variação de até 2% em relação às soluções preparadas recentemente (SHABIR, 2003).

O teste de conformidade do sistema (sigla em inglês SST) estabelece que o equipamento é capaz de produzir dados de qualidade aceitável e é baseado no conceito do equipamento, eletrônica, operação analítica e constituintes das amostras

como parte integral do sistema (FDA, 2000, ICH, 2005, SEBURG *et al.*, 2006, SHABIR, 2003). É utilizado para verificar sensibilidade do detector, resolução dos analitos e reprodutibilidade (USP, 2008a).

Todo o experimento de cromatografia deve ter definido os parâmetros de conformidade e os critérios de aceitação para cada analito e esses devem se demonstrar apropriados durante a realização do mesmo. Esta demonstração se dá injetando amostras controles que podem ser a solução do padrão ou uma solução contendo uma quantidade conhecida de impureza ou excipientes. Os critérios a serem monitorados dentro de uma corrida analítica, para cada analito são: Fator Caudal (normalmente menor ou igual a 2), Retenção relativa (normalmente maior que 2), Resolução (maior que 2 entre o pico do analito e interferente mais próximo), Desvio Padrão Relativo (para $n=5$, $DPR < 2\%$) e Número de Pratos Teóricos (maior que 2000) (FDA, 2000, USP, 2008a). Normalmente, utiliza-se dois ou mais desses parâmetros para garantir a conformidade da corrida analítica (RIBANI *et al.*, 2004).

Apesar de todas essas referências apresentarem o mesmo conceito, a USP trata o SST no capítulo de cromatografia, já o ICH e o FDA tratam no capítulo de validação (SHABIR, 2003).

Os métodos analíticos podem ser classificados de acordo com a sua finalidade como mostra o Quadro 3:

QUADRO 3 – CLASSIFICAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS DE ACORDO COM A FINALIDADE

CATEGORIA	FINALIDADE DO TESTE
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias primas
II	Testes quantitativos ou ensaios limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

FONTE: ANVISA, 2003

Os parâmetros a serem analisados em um método a ser validado são: seletividade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade (limite de detecção), limite de quantificação, exatidão e robustez. Cada categoria descrita no Quadro 3 exige um determinado conjunto de parâmetros, conforme relacionados no Quadro 4:

QUADRO 4 – ENSAIOS NECESSÁRIOS PARA A VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS DE ACORDO COM A SUA FINALIDADE

PARÂMETRO	CATEGORIA I	CATEGORIA II		CATEGORIA III	CATEGORIA IV
		QUANTITATIVO	ENSAIO LIMITE		
ESPECIFICIDADE	Sim	Sim	Sim	*	Sim
LINEARIDADE	Sim	Sim	Não	*	Não
INTERVALO	Sim	Sim	*	*	Não
PRECISÃO	Sim	Sim	Não	Sim	Não
REPETIBILIDADE INTERMEDIÁRIA	**	**	Não	**	Não
LIMITE DE DETECÇÃO	Não	Não	Sim	*	Não
LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	Não	Sim	Não	*	Não
EXATIDÃO	Sim	Sim	*	*	Não
ROBUSTEZ	Sim	Sim	Sim	Não	Não

FONTE: ANVISA, 2003

NOTAS: * Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** Se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermidiária.

2.3.1 Seletividade

É a capacidade que um método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003, ICH, 2005)

Este parâmetro em cromatografia pode ser avaliado pela comparação dos resultados obtidos com somente o fármaco (analito) e o fármaco com excipientes e impurezas, demonstrando que o resultado não altera a resposta do detector na presença dos mesmos (ANVISA, 2003, ICH, 2005, INMETRO, 2003), apresentando todos os interferentes bem resolvidos em relação ao analito e às impurezas, dentro do limite de quantificação e cerca de 0,1% da área do analito de interesse (CDER, 1994). Quando não há disponibilidade de padrão de impurezas recomenda-se comparar o resultado do teste com o de uma metodologia validada. Essa comparação deve ser realizada com amostras contendo o analito, armazenadas sob condições de stress: luz, calor, umidade, oxidação e hidrólise ácida e básica

(ANVISA, 2003, ICH, 2005, INMETRO, 2003). Recomenda-se que essa exposição seja suficiente para degradar de 10 a 20% do analito de interesse. Para formas farmacêuticas sólidas as condições de stress mais utilizadas são: aquecimento de 50 a 60°C, com luz 600 FC, hidrólise ácida com ácido clorídrico 0,1 mol/L, hidrólise básica com hidróxido de sódio 0,1 mol/L e oxidação utilizando peróxido de hidrogênio 3% (SHABIR, 2003).

A utilização de detectores de arranjos de fotodiodos, fluorescência e espectrofotômetros de massa são ferramentas muito úteis na determinação da seletividade, pois ajuda na determinação da pureza do pico (ANVISA, 2003, LANÇAS, 2004, RIBANI *et al.*, 2004)

Em cromatografia a seletividade é obtida na prática otimizando as condições cromatográficas: polaridade e pH da fase móvel, fluxo de eluição, temperatura da coluna, recheio e fabricantes de coluna etc (LANÇAS, 2004). Concomitantemente são avaliados parâmetros cromatográficos como: resolução, retenção relativa, fator de capacidade, simetria do pico e número de pratos teóricos (ANVISA, 2003, INMETRO, 2003).

Seletividade e especificidade são definidos pelo ICH e ANVISA com o mesmo significado. Apesar de gerar certa confusão, deve-se utilizar apenas o termo seletividade, como sugerido pela IUPAC. Um método de separação que produz uma resposta para uma única substância de interesse pode ser chamado específico e um método que produz resposta para vários compostos químicos, com uma característica em comum, pode ser chamado de seletivo, exibe degraus de preferência para o analito (RIBANI *et al.*, 2004, VESSMAN, 1996). Na realidade são poucos os métodos específicos existentes. O detector UV-Vis, o mais comumente utilizado em CLAE, é um método seletivo, por isso, a denominação mais adequada para realização desse teste seja mesmo, a de seletividade (LANÇAS, 2004).

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método analítico, devendo ser reavaliada constantemente. Caso a seletividade do método não seja assegurada, os demais parâmetros de validação ficam comprometidos (RIBANI *et al.*, 2004, VESSMAN, 1996).

2.3.2 Linearidade

Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2003, ICH, 2005).

Esse parâmetro é estabelecido pela análise de no mínimo cinco concentrações diferentes, cada uma em triplicata, sem a inclusão do ponto zero. Os dados obtidos são plotados num gráfico da concentração encontrada pela resposta do detector. Para análise da linearidade há necessidade de tratamento estatístico da reta encontrada, determinando o coeficiente de correlação, intersecção com o eixo y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo (recomendado menor que 2,0%) (ICH, 2005, SHABIR, 2003). O coeficiente de correlação fornece uma estimativa da qualidade da curva, pois quanto mais próximo do valor um, menor é a dispersão dos resultados e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI *et al.*, 2004). Os critérios mínimos aceitos pela ANVISA são de um coeficiente de correlação maior que 0,99, contudo o FDA preconiza um coeficiente de correlação maior que 0,999.

2.3.3 Intervalo

É a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico, que possa ser determinada com precisão, exatidão e linearidade adequada (ANVISA, 2003, ICH, 2005).

É derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. Conforme o tipo de ensaio, diferentes intervalos podem ser especificados (ANVISA, 2003, ICH, 2005).

Para determinação quantitativa de matéria-prima ou produto acabado, o intervalo normalmente é de 80-120% da concentração teórica do teste (ANVISA, 2003, ICH, 2005).

Para a determinação de impurezas o intervalo do nível de impureza esperado é de até 120% do limite máximo especificado (ANVISA, 2003, ICH, 2005); Contudo, a USP determina de 50 a 120% do nível de impureza especificado (USP, 2008a)

Para ensaio de uniformidade de conteúdo: de 70% a 130% da concentração técnica do teste (ANVISA, 2003, ICH, 2005).

Para ensaios de dissolução é de $\pm 20\%$ sobre o valor especificado no intervalo (ANVISA, 2003, ICH, 2005).

Um modo de determinar matematicamente o intervalo de uma curva analítica é dividir o sinal do detector (unidades de área ou altura, para CLAE) pela sua respectiva concentração, fornecendo respostas relativas. Essas respostas relativas (eixo y) juntamente com o logaritmo das concentrações (eixo x) formam um gráfico em linha horizontal por toda a faixa linear. Concomitantemente, faz-se duas linhas horizontais paralela ao gráfico de $\pm 5\%$ da linha da faixa linear, aceitando-se como linear o método em que a linha flutuar dentro desse intervalo (HUBER, 1998).

2.3.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro (ANVISA, 2003, ICH, 2005).

Várias metodologias de avaliação da exatidão estão disponíveis (ANVISA, 2003, ICH, 2005)

Para fármacos a determinação da exatidão ocorre pela aplicação da metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência) ou pela comparação dos resultados obtidos com aqueles resultantes de uma segunda metodologia bem caracterizada, cuja exatidão tenha sido estabelecida (ANVISA, 2003, ICH, 2005).

Para forma farmacêutica acabada a determinação ocorre pela análise de uma amostra em que quantidade conhecida do fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado) ou, na indisponibilidade de todos os componentes do medicamento, a análise pelo método de adição de padrão, em que se adiciona quantidade conhecida do analito (padrão de referência) ao medicamento (ANVISA, 2003, ICH, 2005).

O ICH e a ANVISA estabelecem que um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração deve ser

obedecido. Todas essas concentrações devem estar dentro do intervalo do método, sendo que para determinação da exatidão é preciso primeiramente determinar a seletividade, a linearidade e o intervalo do método (ANVISA, 2003, FDA, 2000, ICH, 2005, USP, 2008a).

A exatidão deve ser expressa como o percentual de fármaco recuperado no ensaio, em relação ao valor aceito como verdadeiro que corresponde a 100% (ICH, 2005). O FDA recomenda uma recuperação em torno de $\pm 2\%$ do valor real para matéria-prima, nas três concentrações testadas dentro do intervalo linear do método (SHABIR, 2003). Porém a ANVISA e ICH não definem valores de recuperação.

2.3.5 Precisão

A precisão consiste na avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (ANVISA, 2003, ICH, 2005).

A precisão pode ser considerada em três níveis: repetibilidade (precisão intra-corrída), precisão intermediária (precisão inter-corrída) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial).

2.3.5.1 Repetibilidade (precisão intra-corrída)

A repetibilidade é grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas dentro de um curto período de tempo, efetuada por um mesmo analista, mesma instrumentação e mesmo método. A repetibilidade pode ser verificada pela avaliação do desvio padrão relativo ou coeficiente de variação, de um mínimo de nove determinações em três níveis de concentrações (alta, média e baixa), de acordo com o intervalo especificado, ou num mínimo de seis determinações para uma única concentração teste (ANVISA, 2003, ICH, 2005). Para alguns autores a repetibilidade deve ter um desvio padrão relativo menor ou igual a 1% (GREEN, 1996, HUBER, 1998, SHABIR, 2003)

A repetibilidade é o termo utilizado pela ANVISA, porém, este parâmetro é normalizado pelo INMETRO como repetitividade.

O cálculo da repetibilidade para um intervalo de confiança de 95%, para uma amostra mínima de seis, pode ser feito utilizando a seguinte fórmula (CIENFUEGOS, 2005, INMETRO, 2003, LANÇAS, 2004):

$$R = 2,8 \times S \text{ (desvio padrão)} \quad (1)$$

Em cromatografia a repetibilidade muitas vezes é confundida com a precisão do instrumento, na qual, são feitas várias injeções da mesma amostra (RIBANI *et al.*, 2004). A partir da resposta do detector para essas análises é calculado o desvio padrão relativo, para esse tipo de precisão do instrumento, o FDA preconiza, no mínimo, 10 injeções de uma mesma amostra com um DPR menor ou igual a 1 (CDER, 1994).

2.3.5.2 Precisão intermediária (precisão inter-corrída)

A precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas ou equipamentos diferentes. Recomenda-se um mínimo de dois dias diferentes, com analistas ou equipamentos diferentes (ANVISA, 2003, ICH, 2005). Para alguns autores a precisão intermediária deve ter um desvio padrão relativo menor ou igual a 2% (GREEN, 1996, SHABIR, 2003). A precisão intermediária tem maior representatividade na variabilidade dos resultados do método em comparação a repetibilidade (RIBANI *et al.*, 2004).

2.3.5.3 Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial)

A reprodutibilidade é a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes. Refere-se aos resultados de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, em farmacopéias (ANVISA, 2003, ICH, 2005).

A ICH e a ANVISA sugerem um mínimo de nove determinações em três níveis de concentrações, de acordo com o intervalo especificado, ou um mínimo de seis determinações para uma única concentração teste. (ANVISA, 2003, ICH, 2005).

O valor aceitável deve ser definido de acordo com o método, porém, não se admite valores de DPR superiores a 5% (ANVISA, 2003).

2.3.6 Limite de detecção (LD)

O LD é a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental, dado pela fórmula:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad (2)$$

Onde DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo y de no mínimo três curvas de calibração construídas contendo a concentração do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio também pode ser obtido também a partir da análise de um número apropriado de amostras do branco. O IC é a inclinação da curva (ANVISA, 2003, ICH, 2005).

O limite de detecção para métodos como CLAE pode ser determinado com base na relação de três vezes o ruído da linha de base (ANVISA, 2003, ICH, 2005).

O INMETRO define limite de detecção como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95 ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero.

2.3.7 Limite de quantificação (LQ)

O LQ é a menor concentração da substância em exame que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad (3)$$

Onde DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo y de no mínimo três curvas de calibração construídas contendo a concentração do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio pode ser obtido também a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco. O IC é a inclinação da curva (ANVISA, 2003, ICH, 2005).

O limite de quantificação para métodos como CLAE pode ser determinado com base na relação de 10 vezes o ruído da linha de base (ANVISA, 2003, ICH, 2005).

O método de determinação do limite de quantificação descrito pela EURACHEM é um pouco diferenciado dos demais: primeiro define-se um valor máximo de precisão, depois prepara-se a amostra com a matriz, injeta-se seis vezes, calcula-se o desvio padrão relativo, plota o gráfico de precisão (variável dependente) por concentração (variável independente), a partir do valor máximo de precisão esperado e verifica-se qual a concentração correspondente ao limite de quantificação (HUBER, 1998).

2.3.8 Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações, quando não é afetada por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros, indicando sua confiança (ANVISA, 2003, ICH, 2005).

A ANVISA recomenda alguns fatores que devem ser variados para cromatografia líquida: variação do pH da fase móvel, variação da composição da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, e variações na temperatura e fluxo da fase móvel. Porém, não determina quanto cada fator citado pode ser variado, mas que essa variação não é significativa para influenciar na corrida analítica e a quantificação, contudo GREEN (1996) afirmou que a variação do solvente orgânico na fase móvel deve ser de $\pm 2\%$, que o pH da fase móvel deve ser

variado $\pm 0,1$ unidade e a variação da temperatura do forno da coluna deve ser de $\pm 5^{\circ}\text{C}$.

Métodos que tiveram durante seu desenvolvimento analítico variações de marca, fornecedores e equipamentos sem alteração significativa dos resultados apresentam uma robustez intrínseca (RIBANI *et al.*, 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Desenvolver e validar um método, por CLAE, que quantifique simultaneamente os fármacos usados no tratamento da hipertensão: besilato de anlodipino e losartano potássico.

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Identificar o conjunto de parâmetros cromatográficos que produza os melhores resultados, levando em consideração o tempo de corrida, gasto de fase móvel, tipo de eluição (isocrático ou gradiente), eficiência da coluna, e facilidade de execução da metodologia;

Obter e identificar os principais produtos de degradação dos fármacos;

Realizar ensaios para validação do método, atendo as normas vigentes pela ANVISA e normas internacionais;

Realizar estudos comparativos do método desenvolvido com outros métodos para os fármacos existentes no mercado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Os fármacos utilizados (losartano potássico e besilato de anlodipino) no desenvolvimento da metodologia foram doados por uma Indústria, sendo todos padrões secundários, validados do padrões USP, com fator de pureza de 99,9 e 100,2%, respectivamente, e dentro do prazo de validade.

As formas farmacêuticas foram comprimidos de losartano potássico e besilato de anlodipino de 50 / 2,5 mg e 100 / 5 mg (Lotar®), fabricado pela Biossintética Farmacêutica Ltda; losartano potássico 50 mg (Cozaar®), fabricado pela Merck Sharp&Dohme Farmacêutica Ltda; besilato de anlodipino 5,0 mg (Norvasc®), fabricado pelo Laboratório Pfizer Ltda.

Os excipientes, grau farmacêutico, utilizados foram: Lactose, Amido, Celulose micro-cristalina, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, álcool polivinílico, macrogol, silicato de magnésio, dióxido de titânio, corante amarelo n° 6 laca de Alumínio e Corante laca azul brilhante FCF.

As vidrarias volumétricas utilizadas estavam calibradas. As filtrações foram realizadas em membrana de éster de celulose 0,45 µm com 47 mm de diâmetro e PVDF 0,45 µm com 33 mm de diâmetro (Millex®), ambos adquiridos da Millipore. As pipetagens foram realizadas com pipetas analíticas Gilson modelos U5000, U1000 e U200, calibradas.

Os reagentes utilizados para o desenvolvimento da fase móvel e solução diluente foram: água ultra-pura, fosfato de sódio monobásico PA, ácido fosfórico 85% PA, acetonitrila e metanol J.T. Baker grau HPLC, DMSO-*d*₆ (Merck) acetato de amônio, formiato de amônio 97%, ácido fórmico 88% e ácido acético glacial (J.T. Baker), TMS (Aldrich). Os tampões padrões utilizados para calibração do pHmetro foram Certipur pH 4,00 e 7,00 (Merck).

As colunas analíticas utilizadas foram Waters Spherisorb® 5 µm ODS2 4,6 x 150 mm com número de Lote 0161373041 e 0160372281; Waters XBridge™ C18 5 µm, 4,6 x150 mm com número de Lote 0115370461; Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 5 µm, 4,6 x150 mm com número de Lote B05065; VARIAN Microsorb-MV

100-5 C18 5 μm 3,9 x150 mm com número de Lote 253156; Waters Symmetry® C18 5 μm 3,9 x150 mm com número de Lote W32181U e Waters XBridge™ C8 5 μm , 4,6 x150 mm com número de Lote 0104370461. O cartucho de extração em fase sólida utilizado foi Waters OASIS® HLB 1cc Lote n° 071A37029A.

Os equipamentos utilizados foram ultra-purificador de água Milli-Q A10 Gradiente, banho de ultra-som Branson 2510, balança analítica Mettler Toledo XP 205, pHmetro digital HI8519N Hanna, espectrofotômetro UV-VIS Agilent 8452, cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent 1100 Series equipado com detector DAD e software ChemStation® versão A.10.02, espectrômetro de massas Applied Biosystems API 3200 e software Analyst®, espectrômetro de RMN Bruker AVANCE DRX 400 de 9,4 T.

4.2 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO

A primeira etapa do desenvolvimento do método consistiu na obtenção do espectro de varredura na região do UV-Vis dos fármacos, para obtenção do melhor comprimento de onda a ser usado na quantificação dos fármacos nas associações.

Para desenvolvimento do método escolheu-se a coluna Waters Spherisorb ODS2 de 150 x 4,6 mm, com diâmetro de partícula de 5 μm . Posteriormente, na otimização foram testadas as outras colunas, de diferentes lotes e fabricantes. Os critérios de comparação entre as colunas foram os parâmetros cromatográficos obtidos para os fármacos e seus principais produtos de degradação, tais como; tempo de retenção, fator de capacidade, eficiência da coluna (medida em número de pratos teóricos), resolução, fator caudal e, por fim tempo, de corrida.

Após definição da coluna inicial fez-se a seleção da fase móvel que apresentasse a melhor capacidade de eluição dos fármacos de forma resolvida dentro de um período de tempo aceitável para uma corrida analítica. Para tanto foram avaliadas as diferentes combinações de soluções aquosas com solventes orgânicos para compor a fase móvel. As soluções aquosas testadas foram: solução de ácido fosfórico pH 2,0, tampão fosfato pH 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,0 e 7,0, tampão acetato pH 3,0, tampão formiato de amônio pH 3,0. Após a escolha do melhor tampão e pH verificou-se a influência da concentração do mesmo (5, 10 e 20

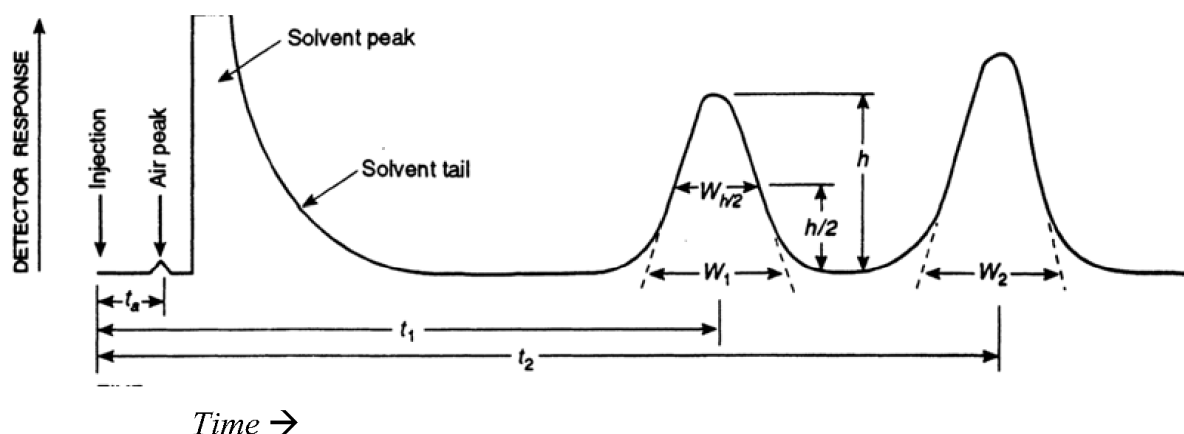
mmol/L). Os solventes orgânicos utilizados foram acetonitrila e metanol. Essas fases móveis foram eluídas em diferentes proporções na forma isocrática e gradiente.

Juntamente com o desenvolvimento da fase móvel foram testados diferentes fluxos, verificando a influência nos resultados cromatográficos, a pressão do sistema, o consumo de fase móvel e o tempo de análise.

A temperatura do forno foi variada de ambiente a 50°C e os parâmetros cromatográficos foram monitorados para obtenção dos melhores resultados.

4.3 CÁLCULO DOS PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS

Para cada variável testada foram analisados os seguintes parâmetros cromatográficos: tempo de retenção (t_R), fator de retenção (K'), resolução (R_s), número de pratos teóricos (N) e fator caudal (T). Esses parâmetros foram calculados segundo a Farmacopéia Americana 31ª edição (USP, 2008b), Figuras 3 e 4 e equações 6 a 9, e a eficiência da separação foram monitoradas pelos parâmetros N , R_s e T .



Fonte: USP, 2008b

T_1 : tempo de retenção do pico 1;
 T_2 : tempo de retenção do pico 2;
 W_1 : largura da base do pico 1;
 $W_{h/2}$: largura da base do pico em meia altura;
 W_2 : largura da base do pico 2;
 h : altura do pico;
 $h/2$: meia altura do pico;

FIGURA 3 - DESCRIÇÃO DOS PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS

Cálculo do fator de capacidade da coluna:

$$K' = \frac{t_R - t_0}{t_R} \quad (4)$$

Onde: t_r é o tempo de retenção do composto e t_0 é o tempo morto da coluna.

Cálculo da resolução entre os picos (R_s):

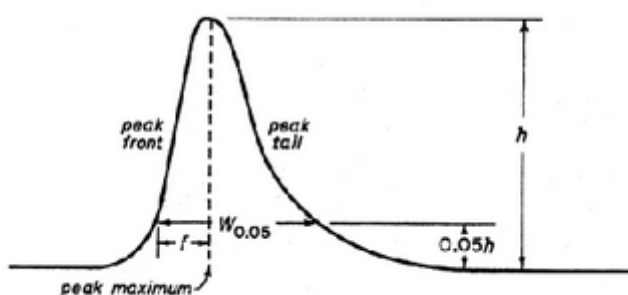
$$R_s = \frac{2 \times |t_1 - t_2|}{W_1 + W_2} \quad (5)$$

Onde: t_1 é o tempo de retenção do composto 1 e t_2 é o tempo de retenção do composto 2, W_1 é a largura da base do pico do composto 1 e W_2 é a largura da base do pico do composto 2.

Cálculo do número de pratos teóricos da coluna (N):

$$N = 16 \times (t_r / W_1)^2 \quad (6)$$

Onde: t_1 é o tempo de retenção do composto 1 e W_1 é a largura da base do pico do composto 1.



Fonte: USP, 2008b

$W_{0,05}$: largura da base do pico em 5% da altura do pico;

h : altura do pico;

$0,05h$: 5% da altura do pico;

f : largura da base da parte frontal do pico.

FIGURA 4 - PICO CROMATOGRÁFICO ASSIMÉTRICO

Cálculo do fator caudal do pico:

$$T = \frac{W_{0,05}}{2f} \quad (7)$$

4.4 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Até o fim da realização desse trabalho não havia disponível no mercado os padrões de produtos de degradação do losartano e do anlodipino, por esse motivo, foram realizados métodos de estresse definidos na literatura para cada fármaco individualmente.

O método de obtenção dos principais produtos de degradação do losartano potássico foi realizado seguindo a metodologia proposta por Hertzog e colaboradores (2002) pesando 50 mg de padrão e diluído em 10 mL ácido clorídrico 1mol/L. Essa solução foi levada à estufa a 105°C por 2 h (estresse ácido / térmico). Posteriormente, diluiu-se em diluente (acetonitrila e tampão fosfato pH 3,0 10mmol/L) para uma concentração de 0,25 mg/mL de losartano, essa solução contém aproximadamente 0,2-0,5 % de composto E e F (Figura 1, pág. 5).

O método de obtenção da principal impureza do anlodipino (impureza D) foi realizado com 5 mg da amostra em 5 mL de solução concentrada de peróxido de hidrogênio (33%). Esta solução foi aquecida a 70 °C durante 45 min (estresse oxidativo/térmico). (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2007). Posteriormente, diluiu-se em diluente (acetonitrila e tampão fosfato pH 3,0 10mmol/L) para uma concentração de 0,25 mg/mL de anlodipino.

Essas duas soluções foram misturadas no mesmo vial para obter os fármacos e produtos de degradação na mesma corrida analítica e imediatamente injetadas e analisadas, visto que, com o passar do tempo, ocorre a oxidação dos fármacos e produtos de degradação.

4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

A identificação dos produtos de degradação do losartano foi realizada primeiramente através do método original proposto por Hertzog e colaboradores (2002), verificando quantos produtos de degradação se formaram, a ordem de eluição e se haviam diferenças significativas de formação de composto em relação a outro. Como tanto losartano, composto E e composto F apresentam o mesmo cromóforo (Figura 1, pág. 5) e conseqüentemente, o mesmo espectro de varredura sua, identificação não foi possível com um detector do tipo DAD.

A identificação da impureza do anlodipino foi realizada inicialmente pelo método proposto pela Farmacopéia Britânica, verificando-se a quantidade de produtos de degradação, ordem de eluição e proporção de impurezas formadas. A impureza D (principal impureza formada) e o anlodipino por apresentarem cromóforos diferentes, puderam ser identificados por detector do tipo DAD.

Para garantir a pureza cromatográfica dos picos no método proposto foram realizadas coletas de frações correspondentes a cada composto. Posteriormente cada fração foi purificada e concentrada por SPE e analisada em espectrômetro de massas. As impurezas E e F por serem isômeros de posição apresentaram a mesma relação massa/carga e mesmos fragmentos no espectro de massas. Para conseguir identificá-los foi realizada a ressonância magnética nuclear (RMN) 1D e 2D.

A SPE foi realizada lavando-se o cartucho com 1 mL de acetonitrila, equilibrando-se a coluna com 1 mL de água ultra-pura, aplicando-se 1 mL da amostra, lavando-se com 3 mL de água ultra-pura e eluindo-se as impurezas com 1 mL de acetonitrila. Várias alíquotas foram unidas.

Para análise por espectrometria de massas as impurezas e fármacos foram diluídos em acetonitrila: formiato de amônio 5 mmol/L (1:1) e injetadas por infusão, em modo de ionização positiva por eletrospray, numa concentração de aproximadamente 1 µg/mL. Os parâmetros da fonte de íons foram: potencial de orifício (DP): 50 V (losartano, anlodipino e impureza D), 58 V (composto E e composto F), e 5500 V (IS); energia de colisão (CE): 20 eV (losartano), 50 eV (anlodipino), 30 eV (impureza D), 40 eV (composto E e composto F); potencial de entrada (EP) 10 V; potencial de saída da célula de colisão (CXP) 3.8 V; voltagem do capilar, 5500 V e temperatura da fonte 300°C. As pressões do gás de nebulização

(nitrogênio) (NEB), cortina de gás (CUR) e gás de colisão (CAD) foram 40, 10, 5 psi, respectivamente.

Para análise por RMN de 1D e 2D o solvente das amostras foi evaporado e as mesmas foram dissolvidas em DMSO- d_6 , utilizando-se TMS como referência. As análises foram realizadas em 293 K, observando ^1H em 400.13 e ^{13}C em 100.61 MHz.

4.6 PREPARO DA AMOSTRA E PADRÃO

O preparo da amostra e do padrão foi realizado da mesma maneira, pesando-se exatamente, cerca de 3,5 mg de besilato de anlodipino e 50 mg de losartano potássico, num balão volumétrico de 50 mL. Posteriormente dissolveu-se com diluente (50% tampão fosfato 10 mmol/L pH 3,0 e 50% ACN) em banho de ultra-som por 10 min, completado o volume com o mesmo, homogeneizado e filtrado. Pipetou-se 0,4 mL dessa solução transferindo para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com diluente e homogeneizado. A concentração final anlodipino foi de 0,0028 mg/mL (2,8 $\mu\text{g/mL}$) e do losartano foi de 0,040 mg/mL (40 $\mu\text{g/mL}$).

4.7 MÉTODO DE VALIDAÇÃO

O estudo de validação é a verificação de todos os parâmetros especificados: seletividade, linearidade, intervalo, precisão, exatidão, limite de quantificação e de detecção, e robustez. Este estudo foi desenvolvido com base na norma do ICH e a legislação brasileira de validação de métodos analíticos vigente redigida pela ANVISA.

4.7.1 Seletividade

A seletividade do método foi determinada no período de desenvolvimento do método, verificando se o mesmo foi capaz de distinguir (resolver) o analito dos seus compostos de degradação, substâncias químicas aparentadas e excipientes, sem que houvesse prejuízo na quantificação.

4.7.2 Linearidade

Tanto a Legislação Brasileira quanto o ICH recomendam que o teste de linearidade deva ser determinado com, no mínimo, cinco concentrações diferentes e cada ponto (concentração) em triplicata. Porém, no método validado foram verificados nove pontos (concentrações) variando de 50 a 150% da concentração de trabalho.

Os valores médios encontrados foram plotados em um gráfico da concentração da amostra (eixo x) pela resposta do detector (eixo y) para verificar a linearidade do método nas concentrações testadas. Essa verificação ocorreu por tratamentos estatísticos: coeficiente de correlação, interseção no eixo y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear.

O método proposto por Huber (1998) também foi aplicado para verificar a faixa linear para os medicamentos estudados.

4.7.3 Precisão

A precisão foi obtida através da avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma mesma amostra. Estatisticamente é obtido através do desvio padrão relativo ou coeficiente de variação. Como descrito anteriormente (item 2.3.5, pág 18) existem três tipos de precisão: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (ANVISA, 2003).

A verificação da repetibilidade foi realizada considerando-se cinco concentrações (70, 80, 100, 120, 130% da concentração de trabalho), em triplicatas,

do placebo com adição do padrão. Para cada concentração foi calculado o desvio padrão relativo, com ajuda do Microsoft Excel, segundo a fórmula:

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP} \times 100}{\text{CMD}} \quad (8)$$

Em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. (ANVISA, 2003).

A precisão intermediária foi verificada pelo teste de análise da variância dos resultados (USP, 2008a) o DPR, calculado do mesmo modo descrito acima, em dois dias seguidos.

4.7.4 Exatidão

Como definido no item 2.3.4 (pág 17), a exatidão mede a proximidade dos valores encontrados com os valores reais. Como o objeto de estudo desse trabalho são formas farmacêuticas sólidas, o método consistiu na recuperação dos fármacos, ou seja, adicionou-se uma quantidade conhecida de padrão numa mistura com excipientes (placebo do Lotar®). Após determinação quantitativa dos fármacos, a diferença entre a resposta obtida para a quantidade adicionada com a quantidade recuperada foi chamada de recuperação ou exatidão do método. Sua determinação foi feita em cinco concentrações (70, 80, 100, 120, 130% da concentração de trabalho) em triplicata cada. Os cálculos de dispersão e recuperação foram feitos segundo a equação abaixo, com ajuda do Microsoft Excel.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (9)$$

4.7.5 Robustez

Conforme descrito no item 2.3.8 (pág 21), a robustez é a capacidade que um método tem em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos. Durante o desenvolvimento e validação do método os parâmetros: K' , N , T , R_s e recuperação; foram avaliados em função de algumas mudanças, como fluxo ($\pm 10\%$), temperatura do forno da coluna (variou de $\pm 5^\circ\text{C}$), pH da fase móvel ($\pm 0,2$ unidades), concentração do tampão da fase móvel (de 5 mmol/L a 20 mmol/L), concentração da porcentagem de acetonitrila ($\pm 2\%$) e diferentes colunas conforme descrito no desenvolvimento.

4.7.6 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O LD e LQ do método foram determinados somente para o anlodipino, visto que esse fármaco apresenta em menor quantidade na forma farmacêutica. Desta maneira fez diluições sucessivas até os supostos LQ (determinado pela relação sinal/ruído maior que 3) e LD (determinado pela relação sinal/ruído maior que 10), em quintuplicata.

4.8 COMPARAÇÃO DE MÉTODOS

Para avaliar o método proposto foram realizadas corridas cromatográficas das formas farmacêuticas contendo losartano potássico e besilato de anlodipino associados e na forma simples: Lotar®, Cozzar® e Norvasc®, respectivamente. No método proposto pelo autor foram analisados o Lotar®, Cozzar® e Norvasc®, no método proposto por Hertzog e colaboradores (2002) para quantificação de losartano em comprimidos foram analisados Lotar® (losartano apenas) e Cozzar®, no método proposto por Mohammadi e colaboradores (2007) para quantificação de anlodipino em comprimidos foram analisados o Lotar® (anlodipino apenas) e Norvasc®.

Os comprimidos de cada especialidade farmacêutica foram pesados e determinados o peso médio. Posteriormente foram pulverizados e pesados. Foram realizadas análises em quintuplicatas independentes de pesagem conforme cada método. Os resultados foram plotados e calculados em porcentagem.

A comparação dos métodos foi realizada através dos resultados obtidos em porcentagem de teor e o desvio padrão relativo para cada especialidade farmacêutica em cada metodologia, utilizando-se de ferramentas estatísticas disponíveis no Microsoft Excel (teste F e teste t).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO ANALÍTICO

Para início do desenvolvimento da metodologia, foram definidos os parâmetros cromatográficos iniciais, baseados nos dados da revisão bibliográfica, nos pontos em comum entre as metodologias existentes de quantificação do losartano e anlodipino.

A coluna inicial de escolha foi uma octadesilsilano (ODS ou C18) de 150 x 4,6 mm, 5 µm (Waters Spherisorb ODS2). Esse tipo de recheio é o mais utilizado e difundido em análises em cromatografia de fase reversa, fato esse que favorece a C18 como coluna de primeira escolha. Além disso, é indicada por alguns autores como Snyder e colaboradores (1997) como coluna de primeira escolha para fármacos com grupos ionizáveis. A coluna analítica de 150 mm de comprimento e 5 µm de diâmetro de partícula é uma boa escolha inicial para desenvolvimento da metodologia, pois apresenta boa relação entre eficiência cromatográfica e tempo de análise (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Concomitantemente, fez-se uma corrida analítica para analisar do espectro de varredura dos fármacos através do detector DAD (Figura 5) e, conseqüentemente, determinar o melhor comprimento de onda para o método, que levasse em consideração a sensibilidade do método e a diferença de concentração de cada fármaco nas associações existentes no mercado. Em comprimentos de onda muito próximos de 200 nm (valores máximos de absorvidade molar encontrados para o anlodipino e losartano) ocorrem muita interferência dos solventes e suas impurezas. Portanto, para tentar minimizar essas interferências sem prejudicar a quantificação dos fármacos nas formas farmacêuticas, o comprimento de onda de escolha foi o de 237 nm, que favorece a quantificação do anlodipino que se encontra na forma farmacêutica em uma massa cerca de 20 vezes menor que o losartano.

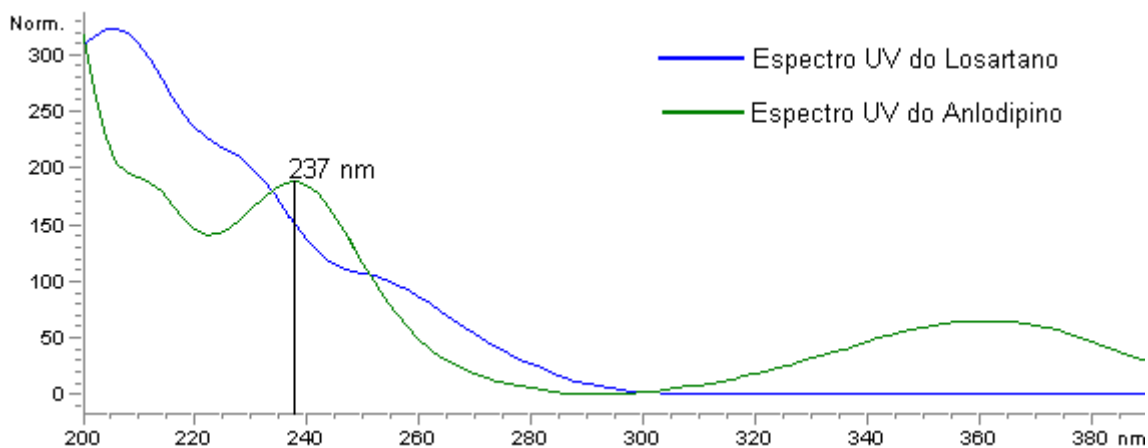


FIGURA 5 - ESPECTROS DE VARREDURA UV DO LOSARTANO E ANLODIPINO NO DAD

Após a definição da coluna e do comprimento de onda de análise, iniciou-se o desenvolvimento da fase móvel, de modo a obter um cromatograma adequado em relação aos parâmetros cromatográficos do losartano, do anlodipino e seus produtos de degradação impureza D, composto E e composto F. Foram testadas várias combinações de acetonitrila e metanol com soluções tampões de diferentes valores de pH, conforme descrito no item 4.2 (pág. 25).

Primeiramente, fixou-se a utilização da solução tampão de fosfato de sódio pH 3,0, fluxo de 1,0 mL/min e temperatura de coluna 25 °C, para determinar em sistema gradiente qual solvente orgânico apresentaria melhores resultados cromatográficos (acetonitrila ou metanol). A escolha inicial do pH ácido (pH 3,0) da fase móvel levou em consideração o método farmacopéico de quantificação do anlodipino matéria-prima (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2007) e losartano matéria-prima (USP, 2008b). A opção por iniciar o desenvolvimento do fluxo de 1 mL/min foi devido sua comprovada eficiência para essas medidas de coluna. A temperatura de 25°C foi escolhida, porque se encontra a 3°C acima da temperatura ambiente do laboratório podendo ser controlada independente da flutuação da temperatura do ambiente.

Os resultados obtidos mostraram que o acetonitrila elui os analitos e produtos de degradação num tempo de corrida mais adequado (cerca de 15 minutos) se comparado com o metanol (mais de 30 min), no gradiente descrito no Quadro 5; descartando-se assim a utilização do metanol.

QUADRO 5 - GRADIENTE INICIAL VARIANDO SOLVENTE ORGÂNICO

Tempo (min)	Tampão Fosfato pH 3,0 (%)	Acetonitrila ou Metanol (%)	Eluição
0	60	40	
5-10	60-40	40-60	Gradiente linear
10-15	40-60	60-40	Gradiente linear
15-20	60	40	Reequilíbrio

Posteriormente, baseando-se na retenção dos compostos no cromatograma com o gradiente, tentou-se eluir os fármacos e produtos de degradação de forma isocrática. Para tanto, foram testados várias combinações de tampão fosfato pH 3,0 e acetonitrila: 70% e 30%; 60% e 40%; 50% e 50%; 40% e 60%, respectivamente. Porém, nenhuma dessas combinações possibilitou eluir e resolver os fármacos e produtos de degradação com eficiência aceitável. O sistema isocrático 60% de tampão fosfato e 40% de acetonitrila foi o que conseguiu eluir e resolver bem os fármacos em menos de 10 minutos de corrida, porém essa proporção de solvente orgânico não tem força elutropica suficiente para retirar os produtos de degradação do losartano (composto E e F). Quando aumentou-se a proporção de acetonitrila (60%) para tentar retirar os produtos de degradação do losartano, os fármacos co-eluíram, impossibilitando a corrida de forma isocrática.

Uma vez pré-definido o solvente orgânico e o gradiente, testou-se diferentes pH com tampão fosfato: pH 3,0; pH 4,0; pH 4,5; pH 5,0 e pH 7,0, conforme a Figura 6.

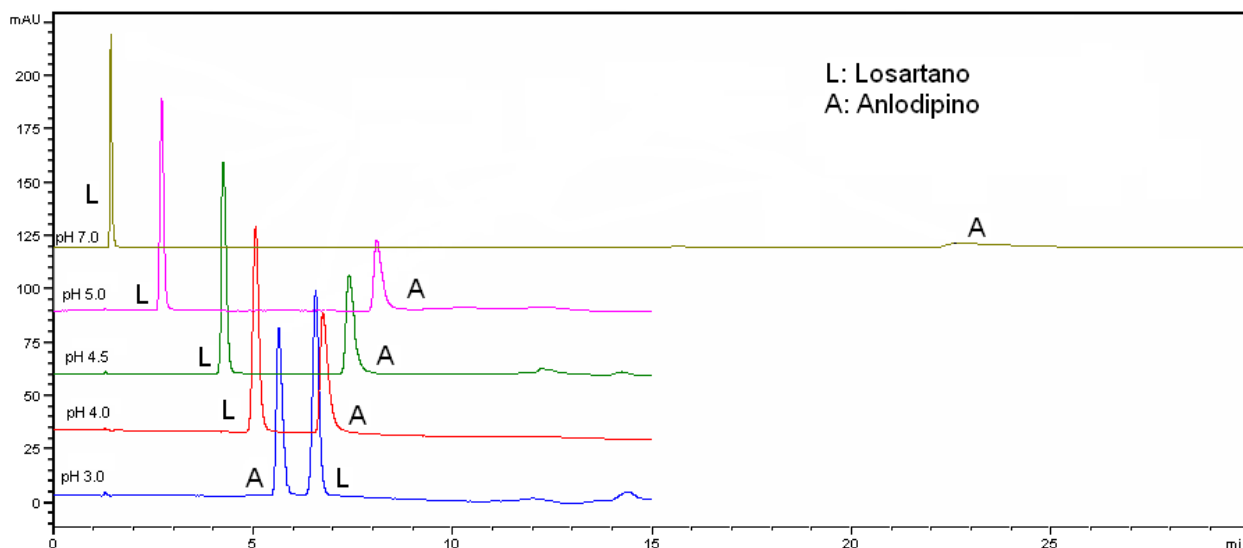


FIGURA 6 - CROMATOGRAMAS DO LOSARTANO E ANLODIPINO EM DIFERENTES pHs EM ELUIÇÃO GRADIENTE COM ACETONITRILA

A Figura 6 mostra que nas condições de gradiente e em diferentes pH da fase móvel testadas foi possível resolver bem ($R_s > 2,0$) os fármacos. Porém, os tampões fosfato pH 3,0; 4,0; 4,5; 5,0 apresentaram as melhores condições para separar os fármacos com boa eficiência cromatográfica. Já o tampão pH 7,0 nas mesmas condições cromatográficas não reteve o losartano que eluiu no tempo morto da coluna e o anlodipino teve uma retenção muito alta com grande perda de eficiência cromatográfica (grande aumento da largura da base do pico).

A diferença de comportamento cromatográfico dos fármacos observado na Figura 6 se deve às diferentes características químicas dos grupos ionizáveis dos mesmos.

O losartano, composto de caráter levemente ácido ($pK_a = 4,9$) em pH da fase móvel ácido apresenta-se predominantemente na forma molecular, fato esse, que acarreta numa maior retenção em fase reversa. O mesmo em pH da fase móvel básico apresenta uma menor retenção, pois está predominantemente na forma iônica. O contrário ocorre com o anlodipino que é um composto com caráter básico ($pK_a = 8,6$), em pH da fase móvel ácido apresenta-se predominantemente na forma iônica, tendo uma retenção menor. Em contra-partida em pH básico da fase móvel, apresenta-se predominantemente na forma molecular e, conseqüentemente, uma retenção maior, nesse caso com grande perda de eficiência (alargamento da base), como pode ser visto na Figura 6.

O comportamento da retenção dos dois fármacos pode ser melhor visualizado na Figura 7, podemos perceber que o fator de retenção dos fármacos (k) tem maior variação quando o pH da fase móvel encontra-se próximo do pKa dos fármacos. Segundo Snyder e colaboradores (1997) o pH da fase móvel exerce mudança significativa na retenção do analito e seletividade do método quando encontra-se $\pm 1,5$ unidades do valor do pKa do analito. Desta forma pode-se aumentar ou diminuir a retenção e seletividade alterando somente o pH da fase móvel.

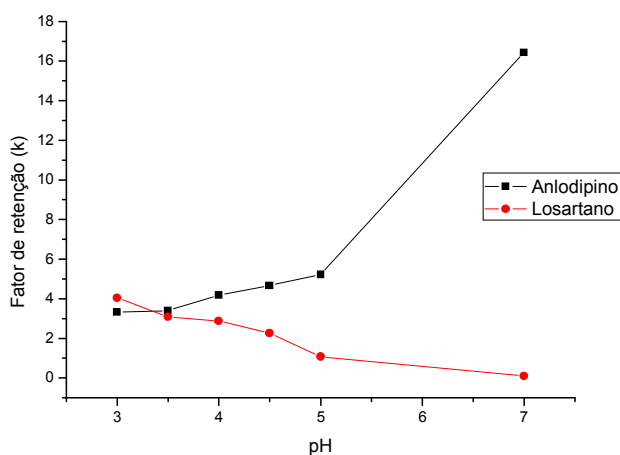


FIGURA 7 - FATOR DE RETENÇÃO DO LOSARTANO E ANLODIPINO EM DIFERENTES pHs

Os valores de pHs que apresentaram melhores resultados (3,0; 4,0; 4,5; 5,0) para separação e quantificação dos fármacos foram avaliados na presença dos produtos de degradação. Apenas as fases móveis com pH 3,0 e 5,0 conseguiram a separação da impureza D, compostos E e F dentro do tempo de 15 minutos (Figura 8). Ao comparar as eficiências cromatográficas obtidas nesses pHs (tabela 1) podemos notar que no todo em pH 3,0 foram obtidos os melhores valores de números de pratos teóricos (N) e fator caudal (T).

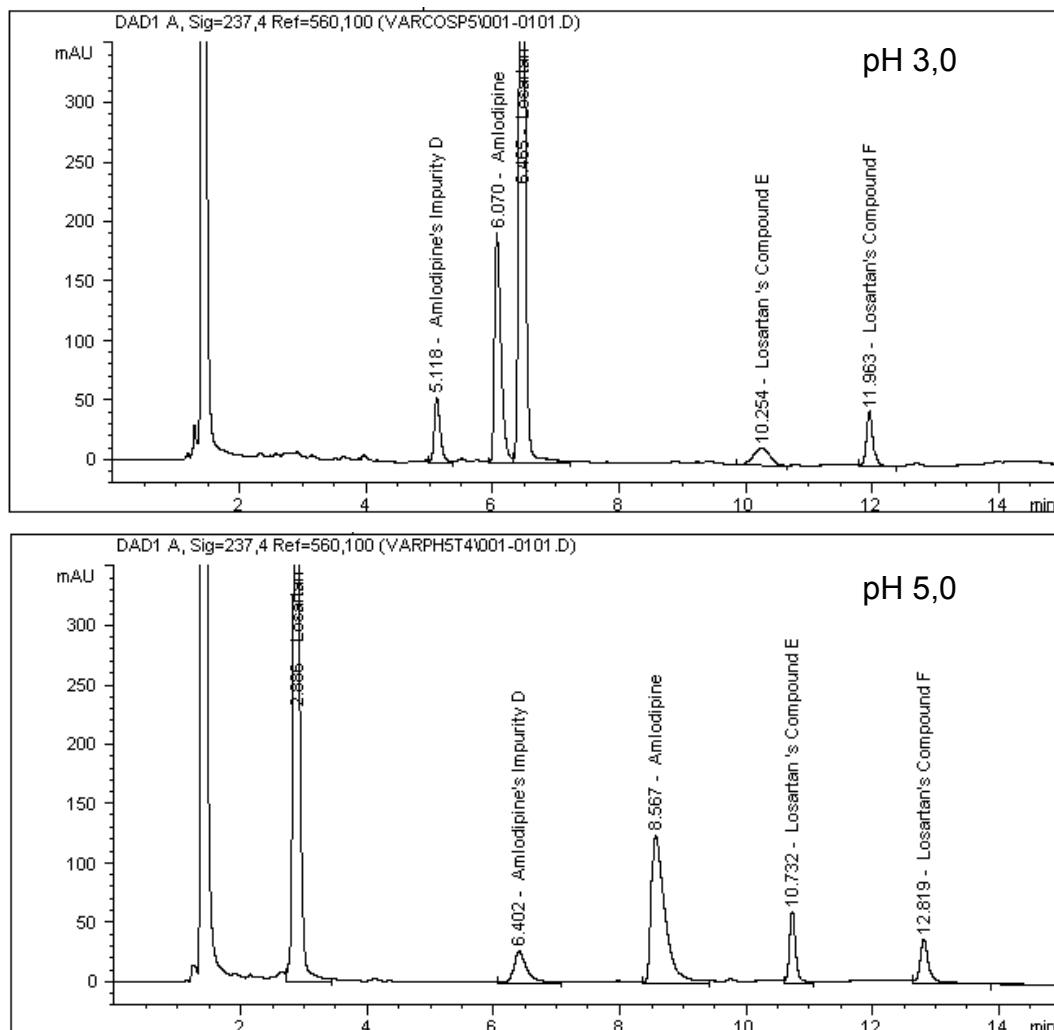


FIGURA 8 - CROMATOGRAMAS DO LOSARTANO E ANLODIPINO EM pH 3,0 E 5,0, RESPECTIVAMENTE

TABELA 1 - PARAMÊTROS CROMATOGRÁFICOS EM pH 3,0 e 5,0

pH	Losartano			Composto E			Composto F			Anlodipino				Impureza D		
	K'	T	N	K'	T	N	K'	T	N	K'	T	N	Rs	K'	T	N
3,0	3,97	1,12	29086	6,89	0,94	7888	8,2	1,13	69847	3,67	1,64	16071	5,35	2,94	1,35	13832
5,0	1,91	1,06	6383	9,84	1,2	54749	12	2,12	54749	7,65	2,12	8409	6,07	5,47	1,55	5541

*K', T, N; definidos nos materiais e métodos

Concomitantemente para a determinação do pH da fase móvel mais adequado, verificou-se a robustez do método nos dois pHs, em diferentes colunas cromatográficas com as mesmas dimensões, conforme descrito no item 4.1 (pág 24)

(Coluna do Tipo L1, classificação USP). Os resultados obtidos mostraram que em pH 5,0 ocorreu grande variação de seletividade e eficiência de coluna para coluna, como mostra Figura 9, chegando até a não resolver os fármacos na coluna Zorbax Eclipse. Um dos motivos que diminui a robustez do método em pH 5,0 é a atividade silanol das colunas, compostos com caráter básico apresentam uma maior retenção em fase reversa devido as interações secundárias de troca iônica entre o cátion do silanol e a base protonada (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). A intensidade dessa interação depende da quantidade de grupos silanóis livres na coluna, por isso, colunas diferentes apresentam quantidade de silanóis livres diferentes como consequência ocorre essa grande variação de retenção do anlodipino (composto de caráter básico) de uma coluna para outra. Outro fato que diminui a robustez do método em pH 5,0 é fato da fase móvel ter um valor de pH menor ou maior que $pK_a \pm 1,5$ (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). O pH da fase móvel de 5,0 é quase o mesmo do pK_a do losartano, fato esse que promove grande dispersão de um lote de fase móvel para outro, pois pequenas variações no pH acarretam numa grande alteração da retenção.

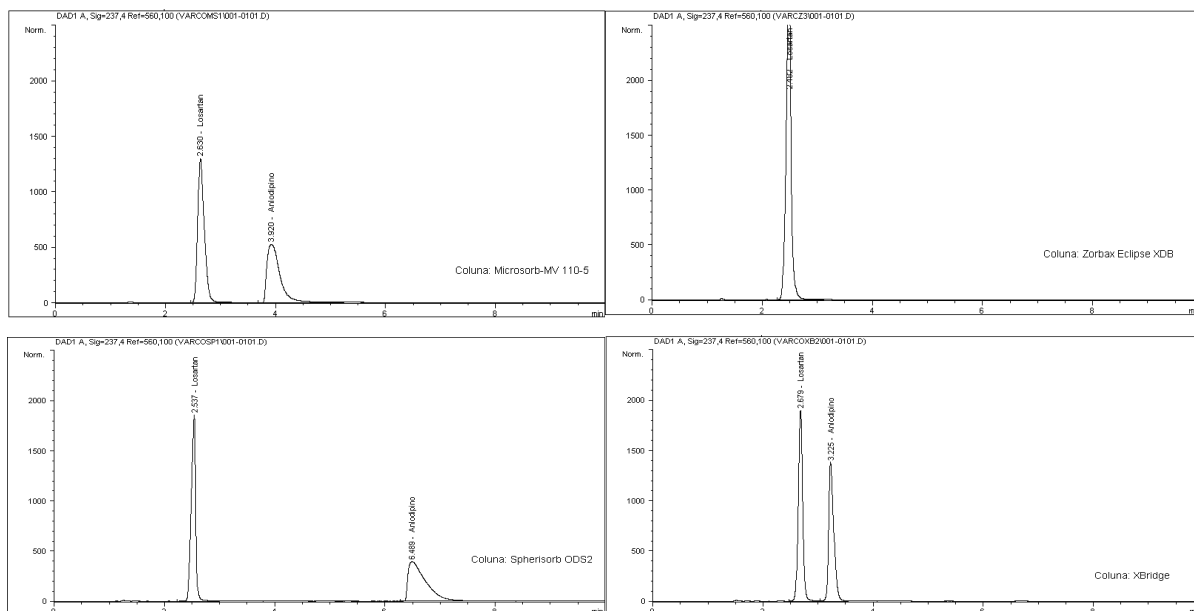


FIGURA 9 - CROMATOGRAMAS DO LOSARTANO E ANLODIPINO EM pH 5,0 EM DIFERENTES COLUNAS

Contudo, essa grande variação de retenção não ocorreu em pH 3,0, como mostra a Figura 10. Nesse valor de pH de fase móvel os silanóis estão predominantemente na forma molecular, o que dificulta a interação com compostos básicos, diminuindo as interações secundárias de troca iônica como descrito para pH 5,0. Como consequência, ocorreu uma menor dispersão na retenção quando muda-se de modelo e fabricante. Embora não seja possível justificar as diferenças de retenção entre as colunas analisando apenas a atividade silanol, outras características importantes das colunas devem ser verificadas como a porcentagem de carbono ligado, área superficial etc (Quadro 6);

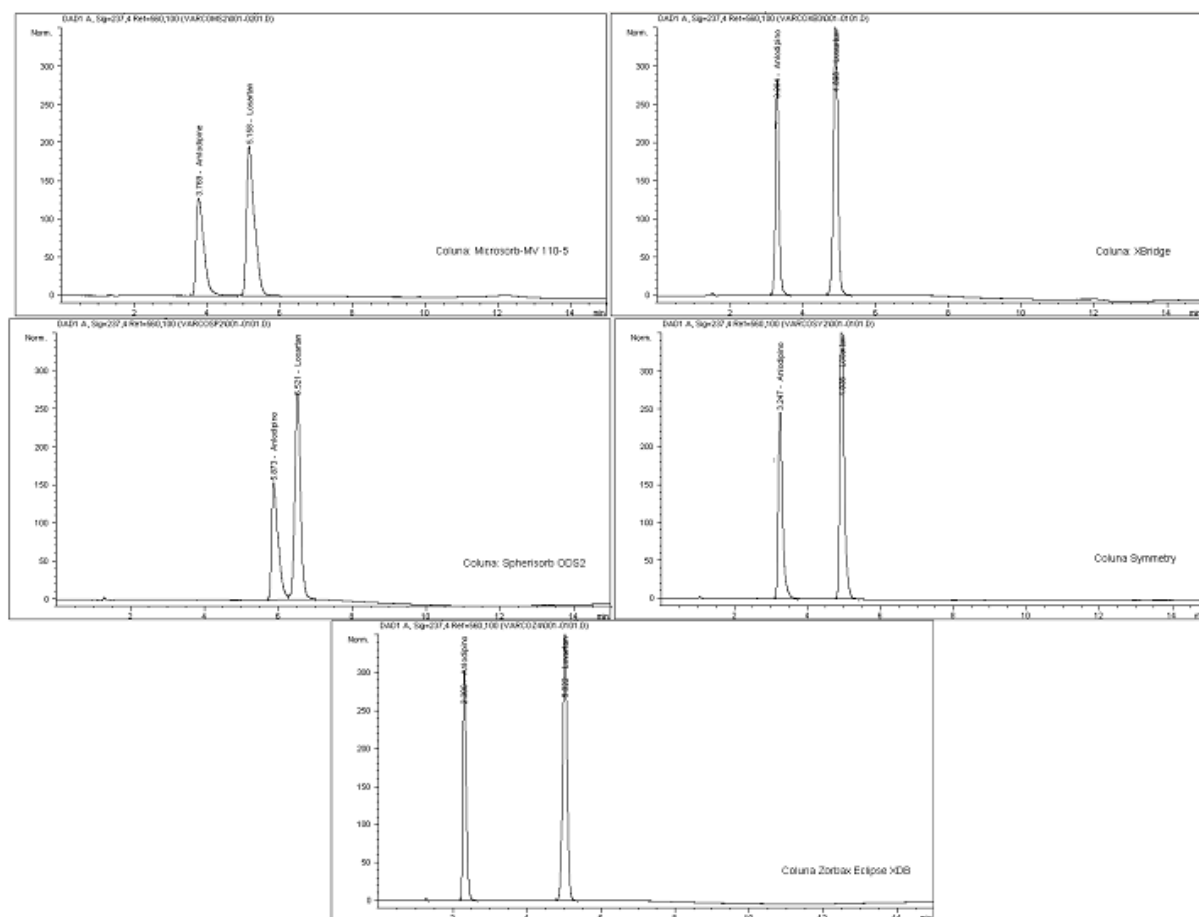


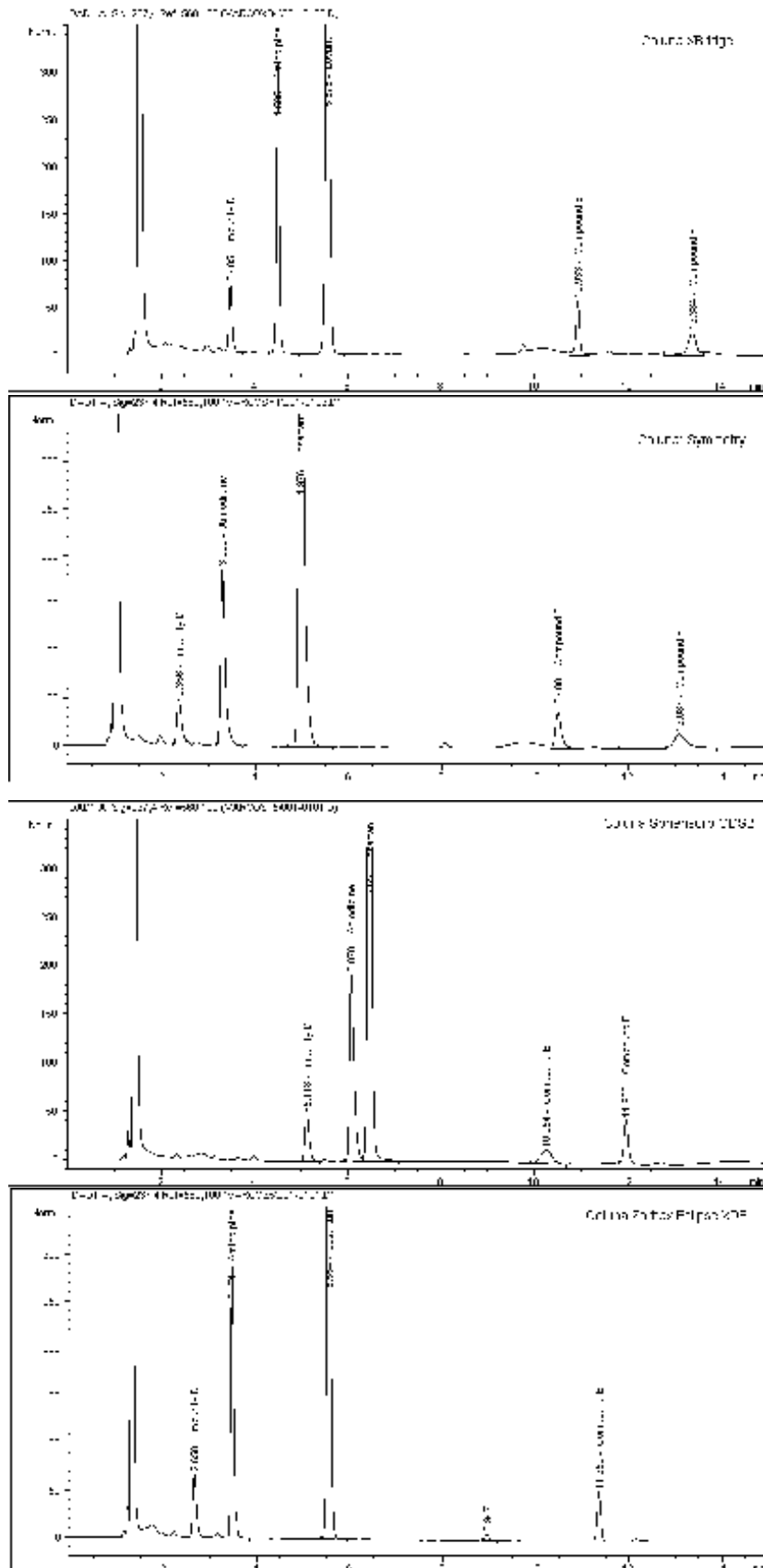
FIGURA 10 - CROMATOGRAMAS DO LOSARTANO E ANLODIPINO EM pH 3,0 EM DIFERENTES COLUNAS

O cromatograma obtido com o uso de tampões de acetato e formiato pH 3,0 10mmol/L não apresentaram bons resultados quando comparados ao fosfato,

indicando que não é apenas o pH o responsável pela eficiência cromatográfica (dados não mostrados).

O mesmo ocorreu com a troca de acetonitrila por metanol. O metanol não tem força elutropica para retirar os fármacos dentro de um tempo de corrida aceitável. Portanto a fase móvel que apresentou melhores resultados foi composta por tampão fosfato pH 3,0 (0,01mmol/L) e acetonitrila em gradiente de polaridade, conforme descrito no Quadro 5.

Uma vez definido tampão, pH e solvente orgânico foram analisadas as eficiências cromatográficas das cinco colunas na presença dos produtos de degradação (Figura 11) para definição da coluna de melhor desempenho para a validação do método. As colunas XBridge, Symmetry e Spherisorb foram as que conseguiram separar melhor os produtos de degradação dentro do tempo de 15 min. A coluna Zorbax Eclipse apresentou uma ótima eficiência para o losartano, anlodipino, impureza D e composto E; contudo, para o produto de degradação do losartano, o composto F, que apresenta menor polaridade e, conseqüentemente, maior retenção em fase reversa, não houve eluição dentro do período de 15 minutos. Já a coluna Microsorb MV110-5 não conseguiu resolver adequadamente os produtos de degradação do losartano, compostos E e F, além de apresentar eficiência cromatográfica inferior as demais colunas para os fármacos.



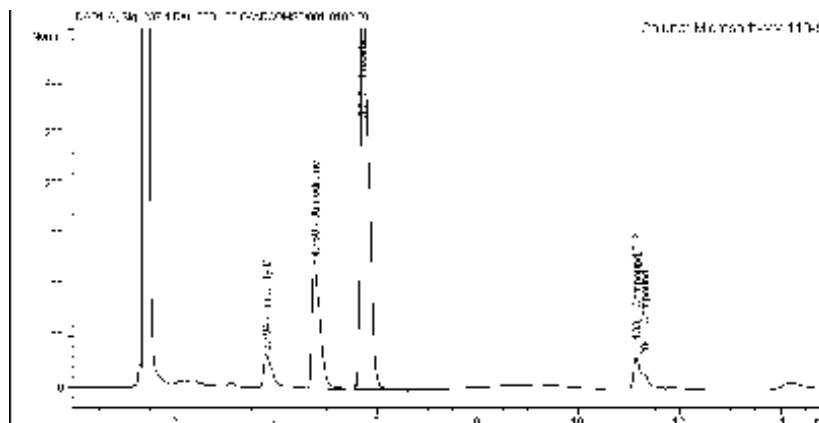


FIGURA 11 - CROMATOGRAMAS DO LOSARTANO, ANLODIPINO E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO EM pH 3,0 EM DIFERENTES COLUNAS

A coluna que apresentou melhores resultados foi a XBridge, tendo em vista que é uma coluna que apresenta uma nova tecnologia de partícula híbrida de sílica (polietoxisilano), o que produz melhores resultados principalmente para compostos com caráter básicos, com é o caso do anlodipino, por apresentar um número de silanóis residuais muito inferior, devido suas características estruturais. As colunas Symmetry e Spherisorb apresentaram também bons resultados o que permite afirmar que também podem ser utilizadas sem que haja necessidade de adequação da metodologia. Já as colunas Zorbax Eclipse e Microsorb MV 110-5, para separarem os produtos de degradação precisam de adequações na fase móvel. Contudo, para a simples quantificação dos fármacos elas são adequadas, como mostrado na Figura 10.

As diferenças encontradas nos cromatogramas entre as colunas com as mesmas dimensões e tipo de recheio (L1 USP) podem ser melhores entendidas se analisadas as seguintes características: porcentagem de carbono ligado (quanto maior a quantidade de carbono ligado mais hidrofóbica é a coluna, maior retenção de fármacos com caráter lipofílico), área superficial (quanto maior a área, maior eficiência de transferência de massa), tamanho do poro, substrato da partícula (podendo ser de sílica, sílica ultra-pura ou híbrido de sílica com um polímero), presença do “endcapped” e sua eficiência na blindagem dos silanóis (Quadro 6).

QUADRO 6 - CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DOS RECHEIOS DAS COLUNAS TESTADAS

Fabricante	Modelo	Formato da partícula	Tamanho do poro (Å)	Área superficial (m ² /g)	% Carbono ligado	Substrato da partícula	"Endcapped"
Waters	XBridge	esférica	135	185	17,5	híbrido	sim
Waters	Symmetry	esférica	100	335	19,1	sílica	sim
Waters	Spherisorb ODS 2	esférica	80	220	11,5	sílica	sim
Agilent	Zorbax Eclipse XDB	esférica	80	180	10	sílica ultra-pura	sim
Varian	Microsorb-MV 110-5	esférica	100	Não encontrado	12	sílica	sim (trimetilsilil)

Uma vez definido o melhor comprimento de onda, a fase móvel e a coluna com os melhores parâmetros cromatográficos o passo seguinte foi a otimização do sistema, fazendo pequenas adequações em cada variável testada de modo a obter as melhores condições de análise para combinação dos fármacos, melhorando o desempenho analítico, juntamente com a avaliação de alguns parâmetros de validação do método.

Primeiramente otimizou-se o gradiente de polaridade da corrida diminuindo a polaridade inicial da fase móvel e aumentando no final, conforme Quadro 7.

QUADRO 7 - GRADIENTE FINAL

Tempo (min)	Tampão fosfato pH 3,0 (%)	Acetonitrilal (%)	Eluição
0	65	35	
0-10	65-35	35-65	Gradiente linear
10-15	35-65	65-35	Gradiente linear
15-20	65	35	Reequilíbrio

Os fluxos testados na otimização variaram de 0,5 a 1,5 mL/min. O fluxo de 0,5 mL/min acarretou em aumento significativo da retenção dos fármacos, aumentando o tempo de corrida, fato indesejado, uma vez que procuramos corridas cromatográficas mais rápidas com boa eficiência. Em fluxo de 1,5 mL/min houve um aumento da pressão do sistema e um consumo maior de solventes sem que houvesse ganho efetivo em tempo de análise. Contudo, houve um aumento eficiência da corrida, porém, não foi relevante para escolha do fluxo, tendo em vista que, com o fluxo de 1 mL/min o cromatograma apresentou boa eficiência, consumo menor de

solvente e tempo de corrida de 15 min. Segundo a curva de van Deemter para uma coluna de diâmetro interno de 4,6 mm e diâmetro de partícula de 5 μm , a eficiência máxima é obtida em fluxos que variam de 1,0 a 2,0 mL/min, mostrando que o fluxo de escolha apresenta boa eficiência com responsabilidade ambiental.

As temperaturas de forno avaliadas foram: 20, 25, 35 e 50°C. Os fármacos losartano e anlodipino não sofreram influências significativas em seus parâmetros cromatográficos com o aumento da temperatura. Portanto, a temperatura de escolha foi a mais simples, a ambiente.

Desta maneira a metodologia desenvolvida teve as seguintes condições:

Coluna: Waters XBridge 150 x 4,6 mm, 5 μm ;

Fase móvel: Tampão fosfato pH 3,0 10mmol/L e acetonitrila, gradiente conforme descrito no Quadro 7;

Comprimento de onda: 237 nm;

Fluxo da fase móvel: 1 mL/min;

Temperatura de forno: ambiente;

Volume de injeção: 20 μL .

5.2 OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

A obtenção e identificação dos produtos de degradação do losartano foram realizadas, inicialmente, conforme descrito na literatura por Hertzog e colaboradores (2002). O cromatograma obtido no laboratório (Figura 12) foi muito semelhante ao descrito no artigo, tanto em tempo de retenção dos analitos, quanto em eficiência cromatográfica e quanto a obtenção dos produtos de degradação (compostos E e F).

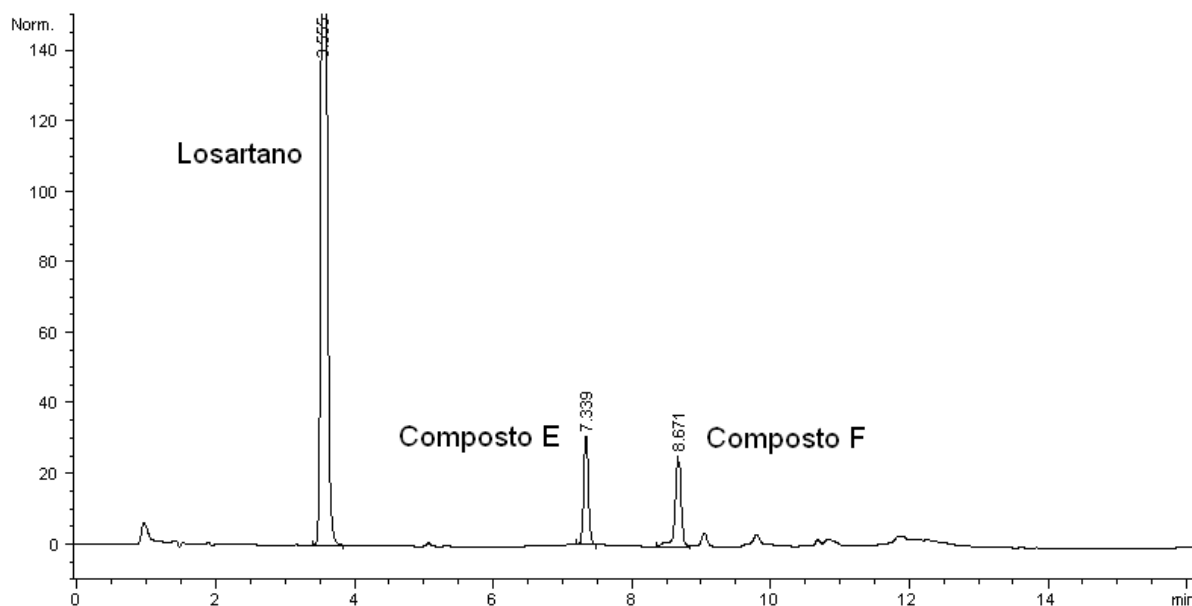


FIGURA 12 - CROMATOGRAMA DO LOSARTANO E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO SEGUNDO O MÉTODO PROPOSTO POR HERTZOG E COLABORADORES (2002)

Com objetivo de tentar identificar os compostos E e F foram realizados varredura na região do UV com o detector DAD das impurezas, porém, tanto o losartano quanto os compostos E e F apresentaram o mesmo cromóforo impossibilitando a identificação por UV (Figura 13). Esse fato já era previsto, pois os produtos de degradação são dímeros do losartano.

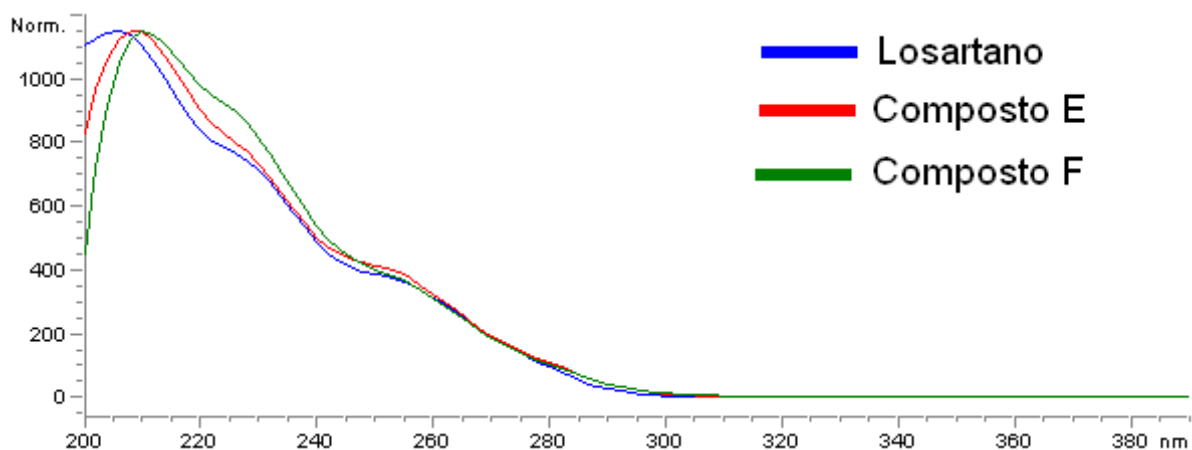


FIGURA 13 – ESPECTROS DE VARREDURA NA REGIÃO DO UV DO LOSARTANO E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

A obtenção e identificação dos produtos de degradação do anlodipino foram feitos segundo a metodologia de besilato de anlodipino matéria-prima descrita na

BRITISH PHARMACOPOEIA, 2007. Foi possível verificar que o stress oxidativo do anlodipino produz uma impureza majoritária a impureza D (Figura 14).

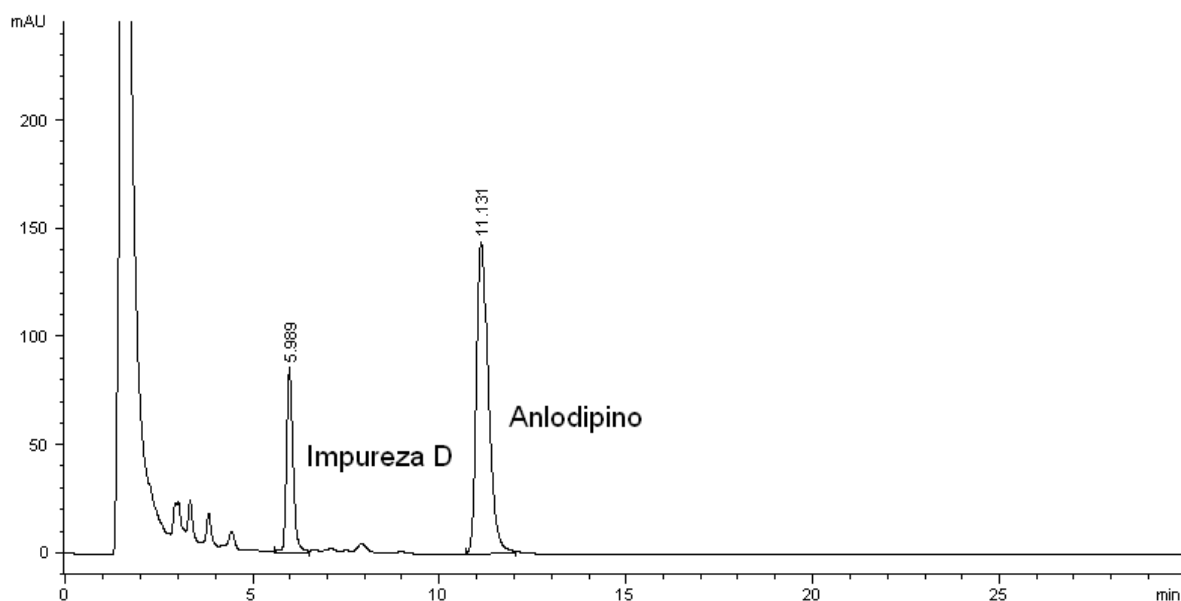


FIGURA 14 - CROMATOGRAMA DO ANLODIPINO E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO SEGUNDO O MÉTODO PROPOSTO PELA BRITISH PHARMACOPOEIA, 2007

A identificação da impureza D e a do anlodipino pode ser realizada por um detector do tipo DAD, pois, ambos apresentam um espectro de absorção no UV característico (Figura 15). Esses espectros foram armazenados na biblioteca do software do cromatógrafo, para futuras comparações e identificações.

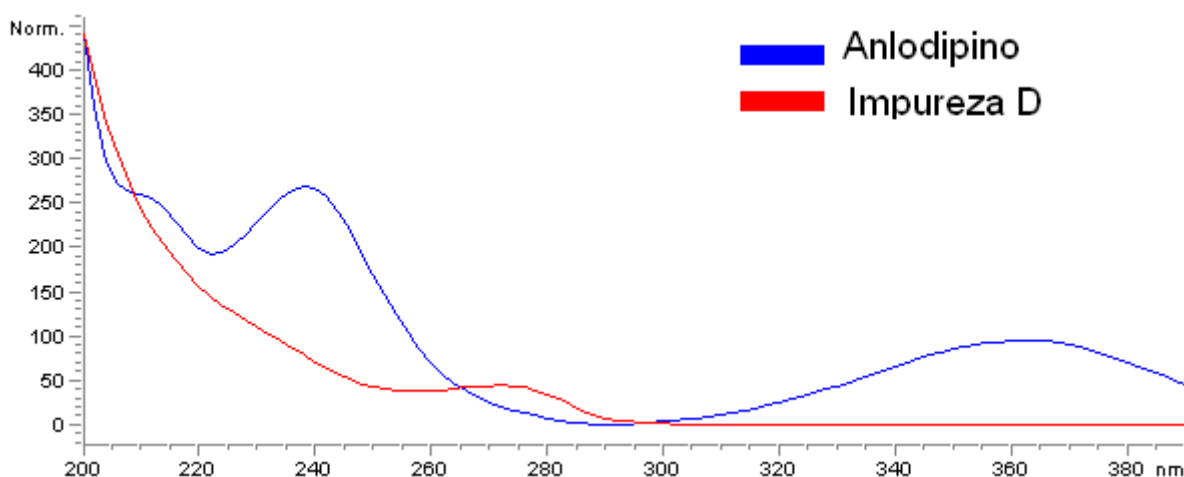


FIGURA 15 – ESPECTROS NA REGIÃO DO UV DO ANLODIPINO E IMPUREZA D

Ao transferir o modo de preparo dos produtos de degradação para o método desenvolvido, houve a necessidade de se identificar novamente os produtos de degradação no cromatograma no método novo.

Para a impureza D essa identificação foi possível através da comparação de espectros na região do UV da biblioteca do equipamento. Contudo, os picos do composto E e F não puderam ser identificados por UV e pelo fato de não haver padrões disponíveis, não foi possível identificar por tempo de retenção. Dessa maneira, houve a necessidade de utilizar técnicas de Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear para identificação desses compostos.

As frações coletadas dos picos referentes picos dos produtos de degradação impureza D, composto E e F foram injetadas no espectrômetro de massas para obtenção do espectro de massas para verificação da existência do íon de interesse. Uma vez detectado esse íon realizou-se o experimento de fragmentação (MS/MS) para identificação.

O espectro de massas da impureza D apresentou o íon quasi-molecular de m/z 407 ($[M+H]^+$), condizente com a sua massa molecular (Fig. 2, pág. 7). Posteriormente realizou-se o experimento de fragmentação (MS/MS), no qual, foram observados no espectro três íons produtos majoritários: m/z 258, m/z 286, m/z 318 (Figura 16). O íon de m/z 318 ($[M+H^+ - 89]$) representa, provavelmente, a perda neutra de um grupo metila (CH_3) e C_3H_8ON do íon precursor (representado em vermelho na Figura 16). O íon de m/z 286 ($[M+H^+ - 121]$) originou também do íon precursor, provavelmente da perda neutra dos grupos $C_2H_3O_2$ e C_3H_8ON (representado em verde na Figura 16). O íon de m/z 258 ($[m/z$ 318 - 60]) originou-se da perda neutra do grupo etila (C_2H_5) e metoxila (CH_3O) a partir do íon m/z 318, (representado em azul na Figura 16).

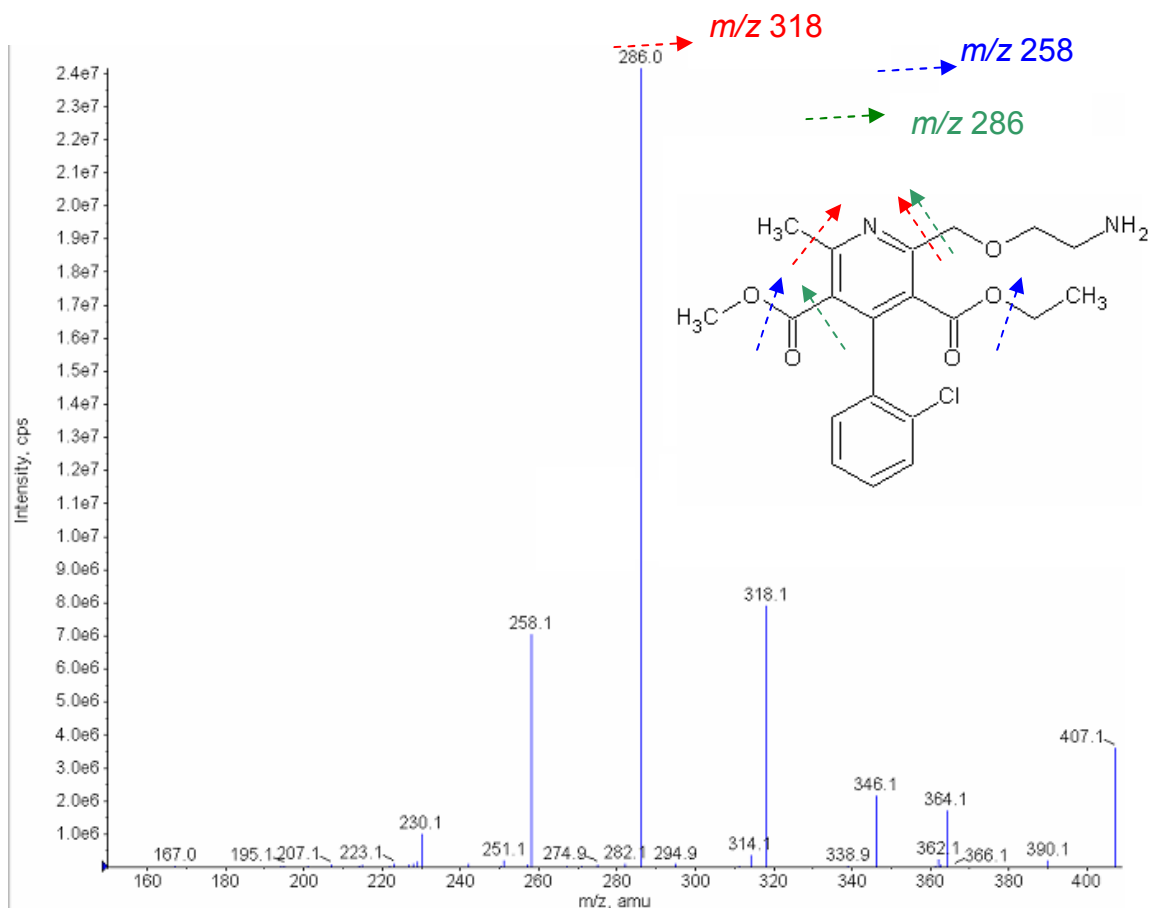


FIGURA 16 - ESPECTRO DE MS/MS DA IMPUREZA D

O espectro de varredura de massas dos compostos E e F que são isômeros de posição apresentou o íon quasi-molecular de m/z 827 ($[M+H]^+$), condizente com a sua massa molecular (Fig. 1 pág. 5). Posteriormente, realizou-se o experimento de fragmentação para ambos, nos quais, foram observados o mesmo perfil de fragmentação, apresentando os íons produtos majoritários de m/z 405, m/z 377 e m/z 207; conforme apresentado na Figura 17. Esses mesmos íons foram observados por Zhao e colaboradores (1999), mostrando que realmente se trata desses compostos. Porém, pela espectrometria de massas não foi possível diferenciar o composto E e F. Para isso, fez-se necessário à utilização da RMN.

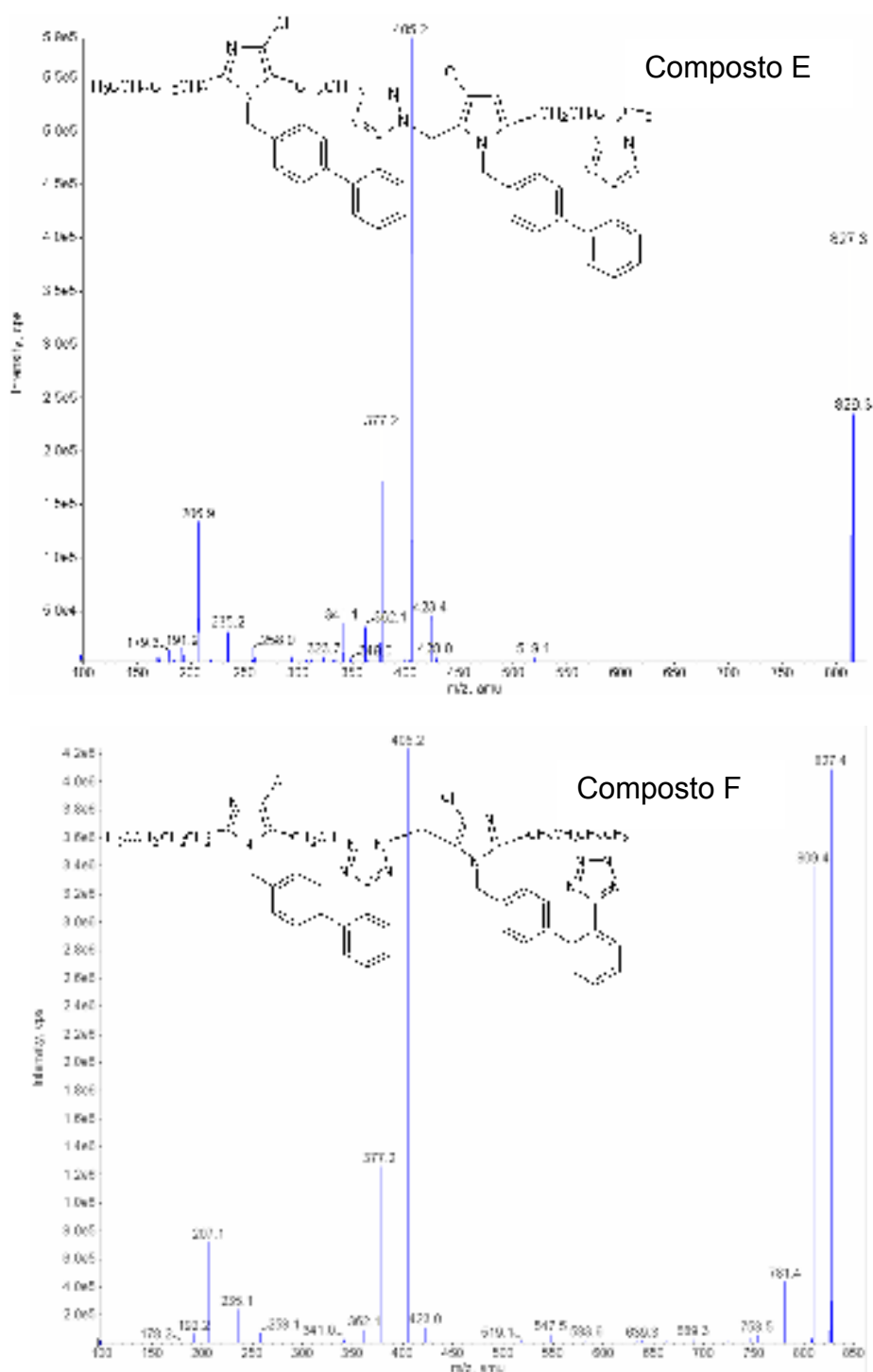


FIGURA 17 - ESPECTROS DE MS/MS DO COMPOSTO E e COMPOSTO F

Os compostos E e F foram submetidos a análise de RMN 1D e 2D para identificação dos compostos (Figura 18). Esses compostos apresentaram bastante semelhantes em relação aos deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C .

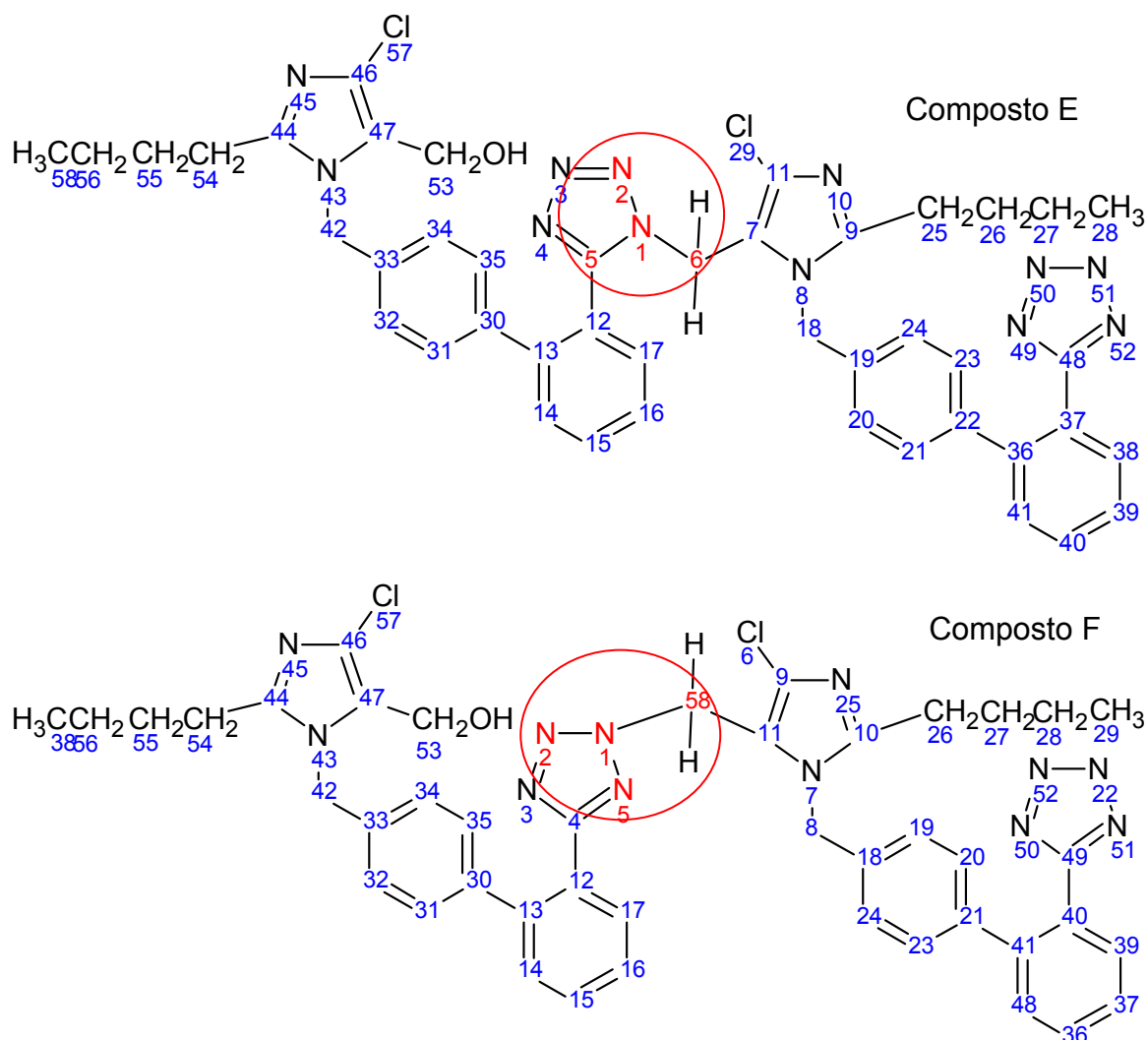
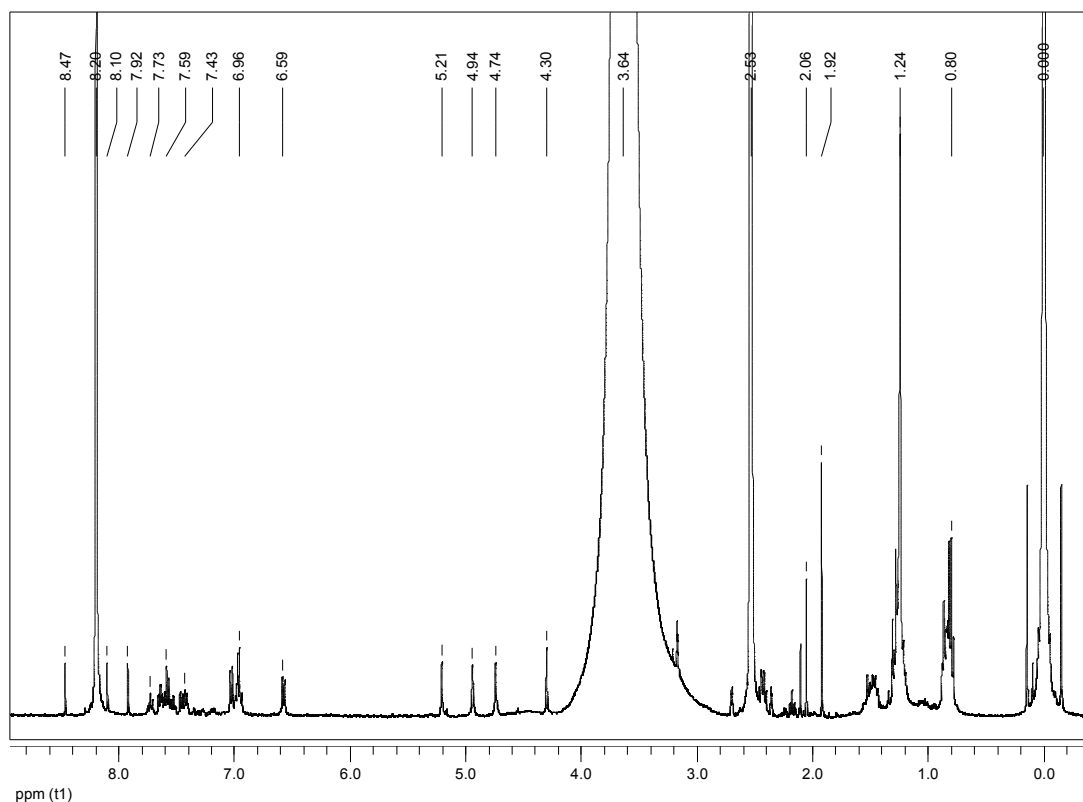
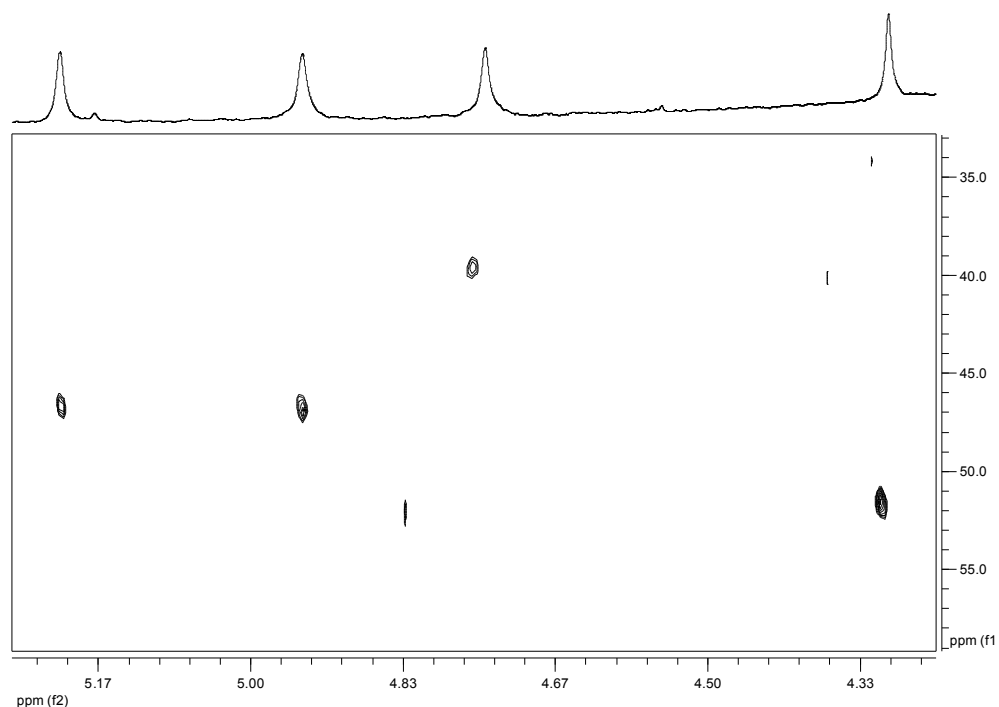


FIGURA 18 – ESTRUTURAS QUÍMICAS NUMERADAS DO COMPOSTO E e F

No espectro de RMN de ^1H do composto E (Figura 19) foi observado na região de 4,00 a 5,50 ppm, quatro sinais de hidrogênios de metileno a δ 4,30, 5,21, 4,94 e 4,74 ppm, que correspondem aos carbonos δ 51,5 (C-53); 46,5 (C-42); 46,7 (C-18) e 39,5 (C-6) ppm, respectivamente, como pode ser evidenciado no experimento por HSQC na correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C (Figura 20).

FIGURA 19 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO COMPOSTO E (DMSO- D_6 , 400 MHz)FIGURA 20 - MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C DO COMPOSTO E, OBTIDO ATRAVÉS DO EXPERIMENTO DE HSQC (DMSO- D_6 , 400/100 MHz)

Para o composto F foram observados também no espectro de RMN de ^1H na região de 4,00 a 5,50 ppm, quatro sinais de metileno a δ 4,35, 5,22, 5,24 e 5,78 ppm (Figura 21), que correspondem aos carbonos δ 51,5 (C-53), 47,1 (C-8), 46,9 (C-42) e 45,2 ppm (C-58), respectivamente, como pode ser evidenciado no experimento por HSQC na ligação heteronuclear ^1H - ^{13}C (Figura 22).

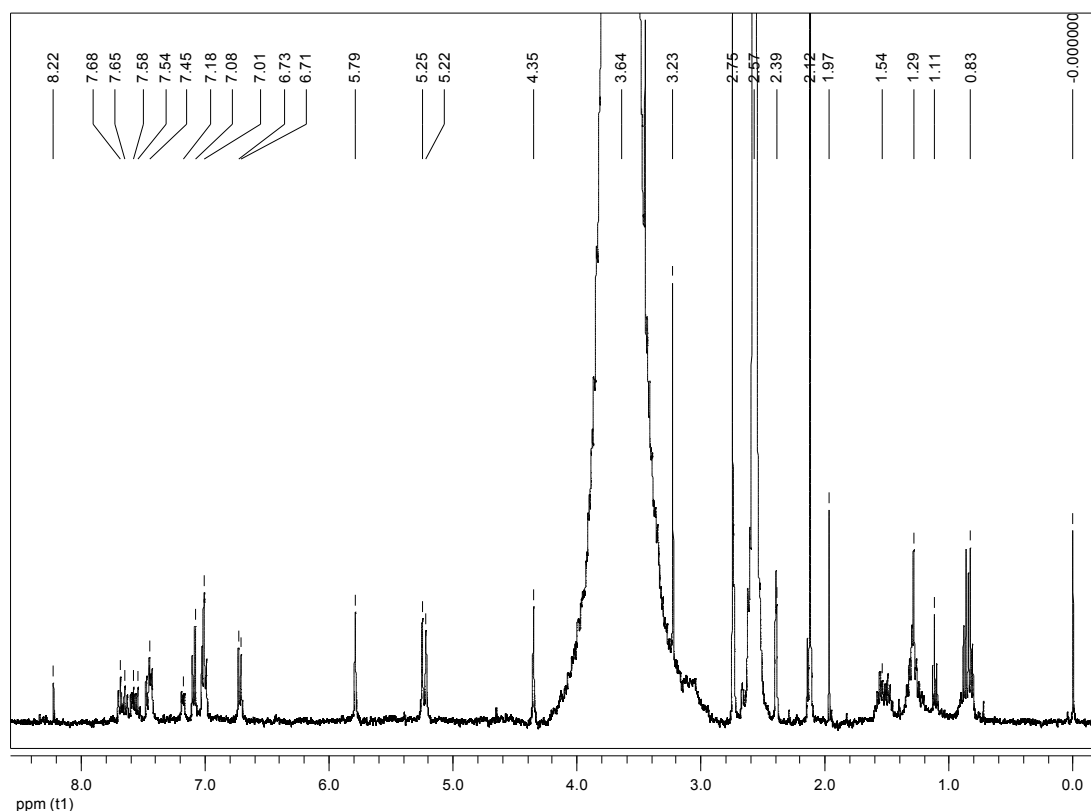


FIGURA 21 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO COMPOSTO F (DMSO- D_6 , 400 MHz)

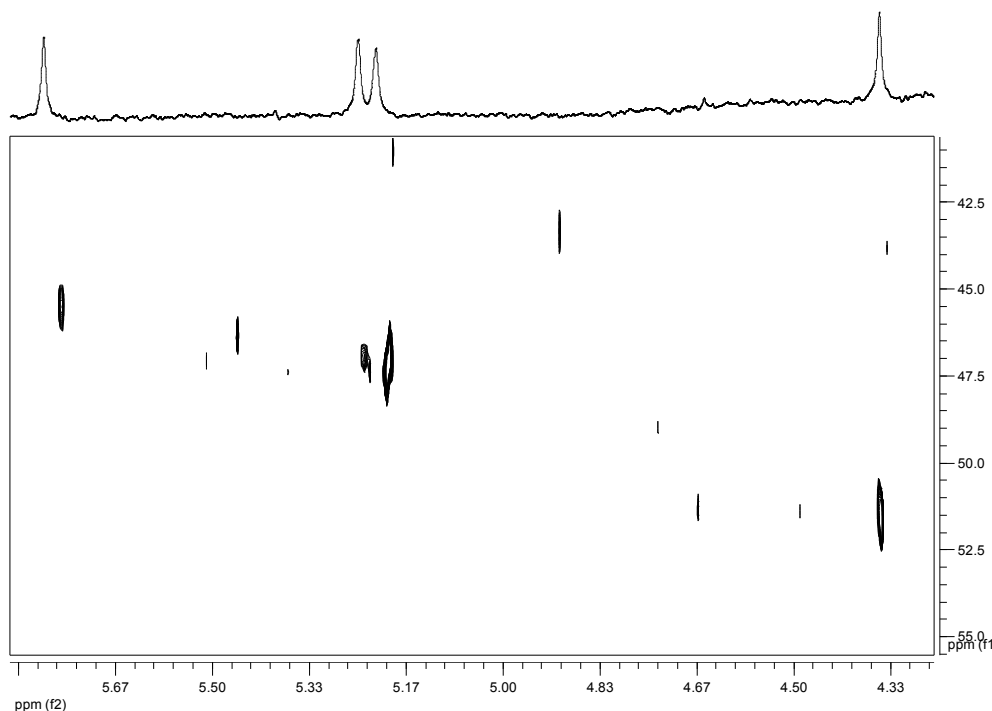


FIGURA 22 - MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C DO COMPOSTO F, OBTIDO ATRAVÉS DO EXPERIMENTO DE HSQC (DMSO- D_6 , 400/100 MHz)

As principais diferenças encontradas nos experimentos de RMN para os compostos E e F foram os deslocamentos químicos observados para os C-6 e C-58 e seus respectivos hidrogênios (Tabela 2). Como observado na figura 18, no composto F o C-58 está ligado diretamente a um átomo de nitrogênio (N-1), que por sua vez está ligado a outros dois átomos de nitrogênio (N-5 e N-2), por esse motivo quando comparado ao composto E (C-6) o efeito indutivo eletro atrator dos nitrogênios são menores para o composto F, que apresenta uma menor blindagem e conseqüentemente um valor de deslocamento químico do C-58 maior que o observado para composto E (C-6). O C-6 (composto E) está ligado diretamente a um átomo de nitrogênio (N-1), que por sua vez está ligado a outro átomo de nitrogênio (N-2) e a um átomo de carbono (C-5) (Figura 18), apresentando um efeito indutivo eletro atrator maior e conseqüentemente maior blindagem, acarretando um deslocamento químico C-6 mais baixo quando comparado com o C-58 do composto F. Outro provável motivo do maior valor de deslocamento químico do C-58 se deve a estereoquímica do composto F, que favorece a interação entre o hidrogênio do C-58 e o Cloro-8. Portanto, ambos os produtos de degradação do losartano só puderam ser identificados por meio dos experimentos de RMN.

TABELA 2 – VALORES DE RMN ENCONTRADOS PARA COMPOSTOS E e F

Posição	RMN de ^1H		RMN de ^{13}C	
	Composto E (ppm)	Composto F (ppm)	Composto E (ppm)	Composto F (ppm)
6/58	4,74	5,78	39,5	45,2
18/08	4,94	5,22	46,7	47,1
42	5,21	5,24	46,5	46,9
53	4,30	4,35	51,5	51,5

5.3 VALIDAÇÃO

Para validação do método primeiramente verificou-se a qualificação do CLAE que estava dentro prazo de validade. Posteriormente verificou-se a estabilidade das soluções e a adequabilidade do sistema cromatográfico.

A avaliação da estabilidade dos fármacos em solução mostrou que em temperatura ambiente do laboratório (20 a 25 °C) e a condições de luz artificial branca, as soluções, no vial, tanto do padrão quanto da amostra, apresentaram-se estáveis por três dias. As amostras foram injetadas diariamente (n=5) e tiveram uma diferença de recuperação inferior a 1%. No quinto dia essa diferença ficou acima de 3% tanto para o anlodipino, que segundo a literatura é fotossensível (KAWABE *et al.*, 2008), quanto para o losartano.

A estabilidade da solução tampão fosfato 10 mmol/L pH 3,0 também foi avaliada e foi observado que em 5 dias não houve diferença na eficiência cromatográfica e na pressão do sistema.

Os parâmetros de adequabilidade do sistema (SST) foram definidos em relação ao cromatograma dos fármacos e produtos de degradação (Figura 23). Pode-se perceber que todos os analitos apresentaram-se bem resolvidos. Os parâmetros de medida de eficiência cromatográfica encontrados foram superiores aos mínimos estabelecidos pelo FDA (2000) e USP (2008) e estão descrito na Tabela 3. Na monografia individual do anlodipino matéria-prima (teste substâncias relacionadas), a adequabilidade do sistema é a resolução entre o anlodipino e impureza D acima de 4,5, como podemos ver na Tabela 3. No método desenvolvido, a resolução entre eles foi de 7,8. Já na monografia do losartano matéria-prima (teste de doseamento) a adequabilidade do sistema é dada com número de pratos teóricos

superior a 5600, fator caudal menor que 1,4 e DPR menor que 0,5%, todos esses requisitos foram superados na presente metodologia, mostrando que o sistema encontrou-se adequado para a realização da validação do método.

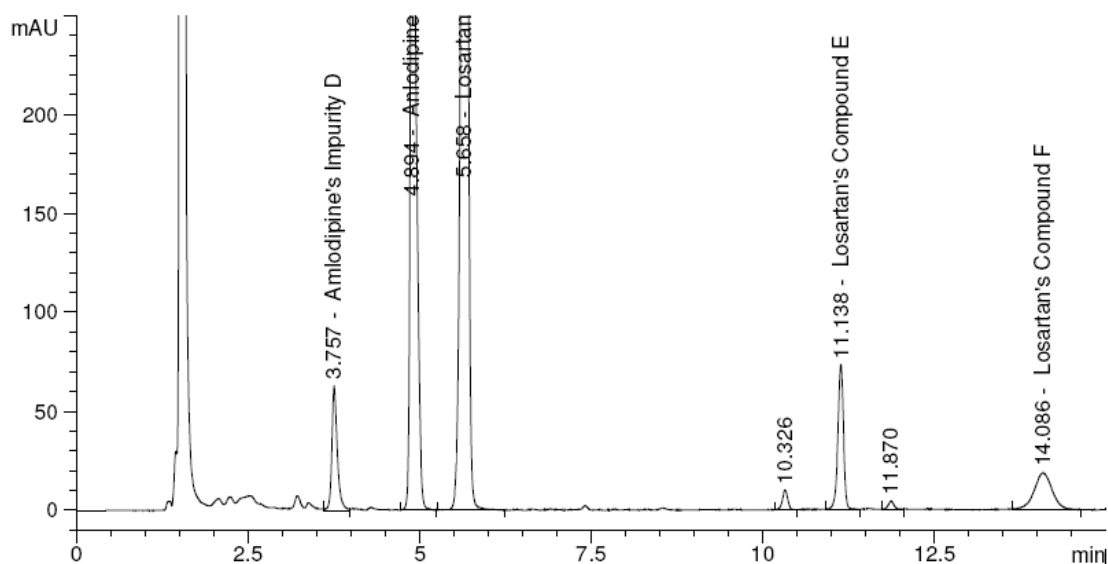


FIGURA 23 - CROMATOGRAMA DO LOSARTANO, ANLODIPINO E SEUS PRINCIPAIS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

TABELA 3 - ADEQUABILIDADE DO SISTEMA

	Impureza D	Anlodipino	Losartano	Composto E	Composto F
t_R (min)	3.757	4,894	5,658	11,138	14,086
K'	1,89	2,76	3,35	7,57	9,84
Fator caudal (T)	1,35	1,32	0,94	0,93	0,97
N	11881	16739	24383	91800	14038
Largura da base do pico (W)	0,138	0,151	0,145	0,147	0,476
R_s	----	7,8	5,158	-----	-----
DPR (%)	0,54	0,1	0,2	0,87	0,22

5.3.1 Seletividade

Na seletividade foram avaliados se os excipientes, solução de diluição da amostra e os principais produtos de degradação dos fármacos influenciam na quantificação dos fármacos. No placebo todos os excipientes que se solubilizaram na solução diluente da amostra acabaram não retidos na coluna e não absorvem na

região do UV. A solução diluente também não apresentou nenhum pico que pudesse afetar a qualidade da quantificação (Figura 24).

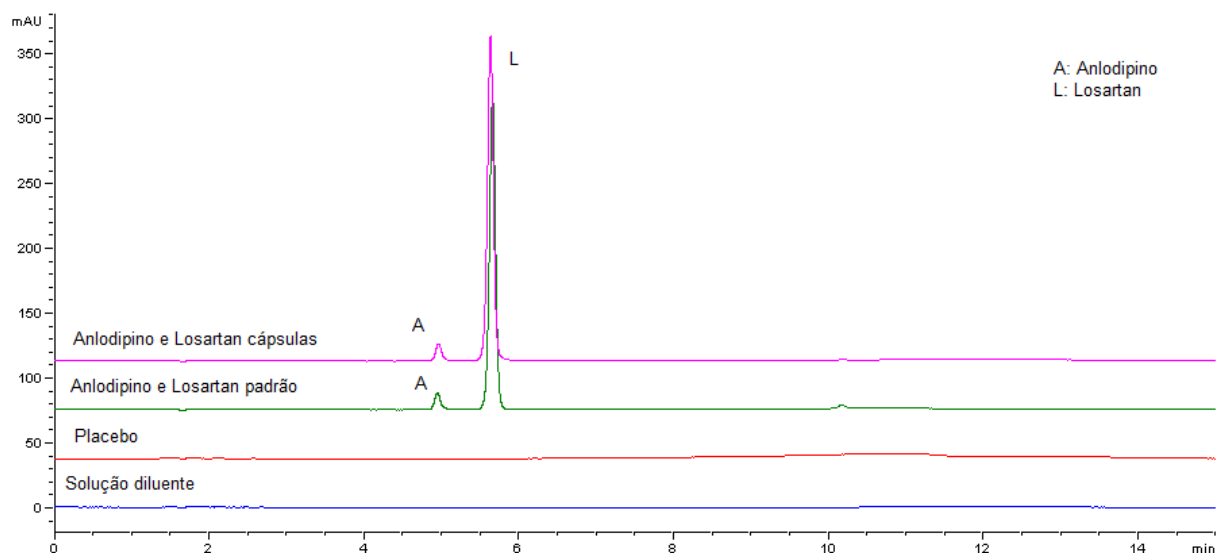


FIGURA 24 - CROMATOGRAMAS DA SOLUÇÃO DILUENTE, PLACEBO, SOLUÇÃO PADRÃO E AMOSTRA COMERCIAL

A avaliação dos principais produtos de degradação mostrou que nenhum deles co-eluem com os fármacos, fato esse que pôde ser observado na Figura 23.

Com o propósito de avaliar e assegurar que o método desenvolvido é realmente seletivo aos fármacos foram injetados no espectrômetro de massas frações correspondentes ao pico de cada fármaco.

O espectro de varredura de massas do anlodipino apresentou o íon quasi-molecular de m/z 409 ($[M+H]^+$), condizente com a sua massa molecular (Figura 25), os demais íons apresentadas no espectro são referentes ao diluente e a resíduos do tampão, pois estão presentes também no espectro da amostra branco. Assim foi possível afirmar que o pico referente ao anlodipino no método desenvolvido apresentou-se puro.

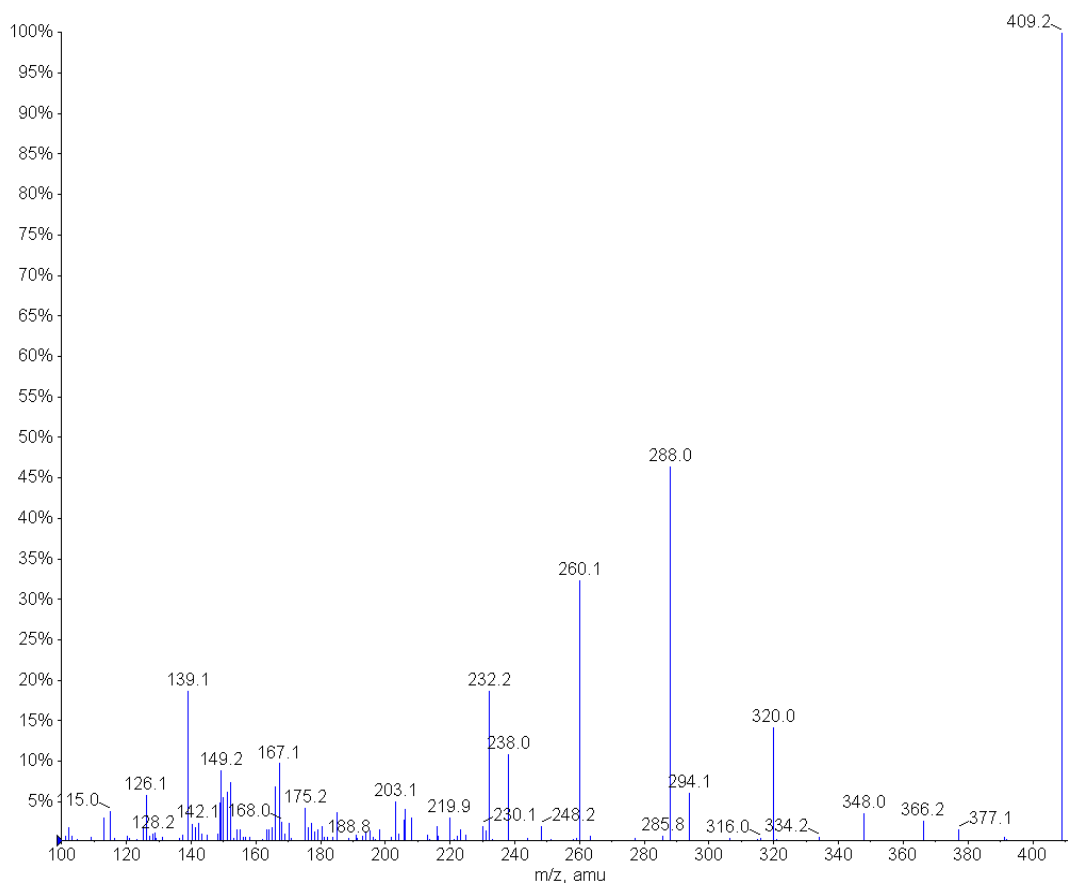


FIGURA 25 - ESPECTRO DE VARREDURA DE MASSAS DO ANLODIPINO

O mesmo procedimento foi adotado para o losartano que apresentou o íon quasi-molecular de m/z 423 ($[M+H]^+$), condizente com a sua massa molecular (Figura 26), os demais íons apresentados no espectro são referentes ao diluente e a resíduos do tampão, pois estão presentes também no espectro da amostra branco, exceto o íon de m/z 405 (perda de uma molécula de água do losartano) que é decorrente da fragmentação do losartano, provavelmente, na fonte de ionização, devido a alta energia e temperatura.

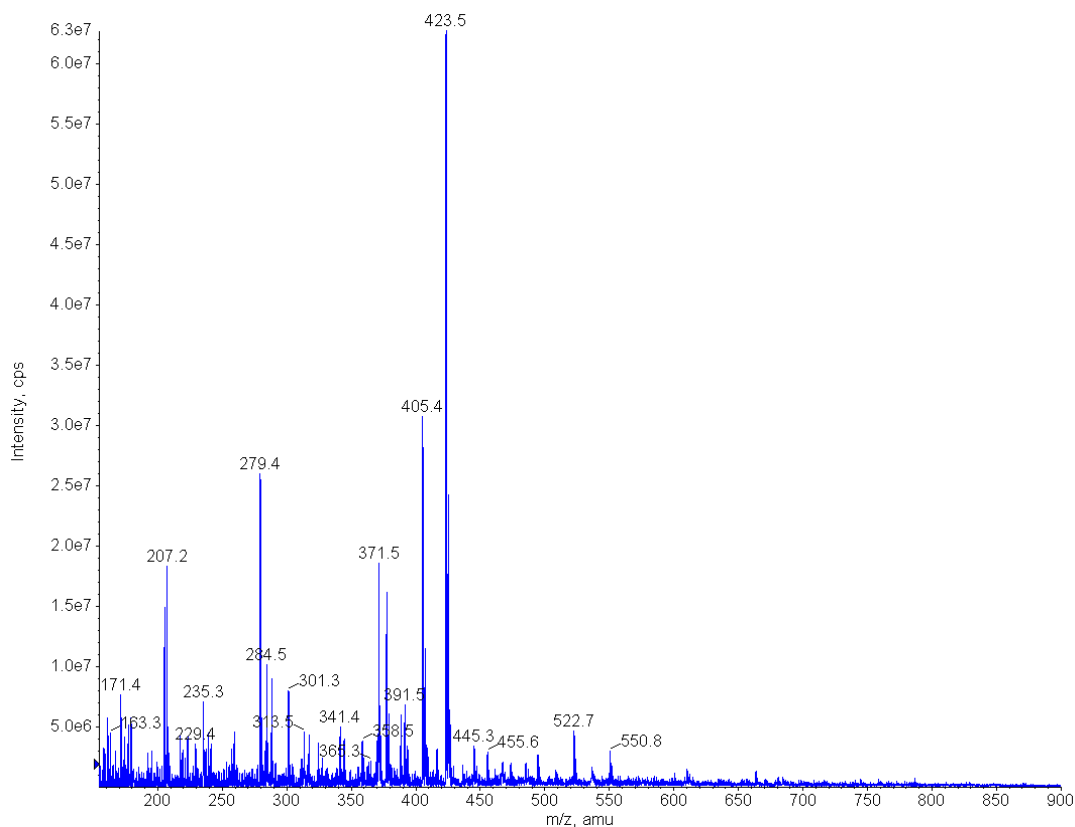


FIGURA 26 - ESPECTRO DE VARREDURA DE MASSAS DO LOSARTANO

Posteriormente, foi realizado o experimento de fragmentação (MS/MS) dos analitos para confirmação mais exata da sua identidade e comparou-se com os descritos na literatura.

No experimento de fragmentação (MS/MS) do anlodipino foram observados íons produtos característicos: m/z 377 e m/z 294 (Figura 27). Esses mesmos fragmentos foram encontrados por outros autores quando analisaram o anlodipino por espectrometria de massas (MA *et al.*, 2007, STREEL *et al.*, 2002). O perfil dos principais íons produtos obtidos pelo anlodipino são semelhantes ao obtidos com a impureza D (descrito anteriormente), diferindo apenas em duas unidades de massa molecular (os dois hidrogênios a mais existente na molécula).

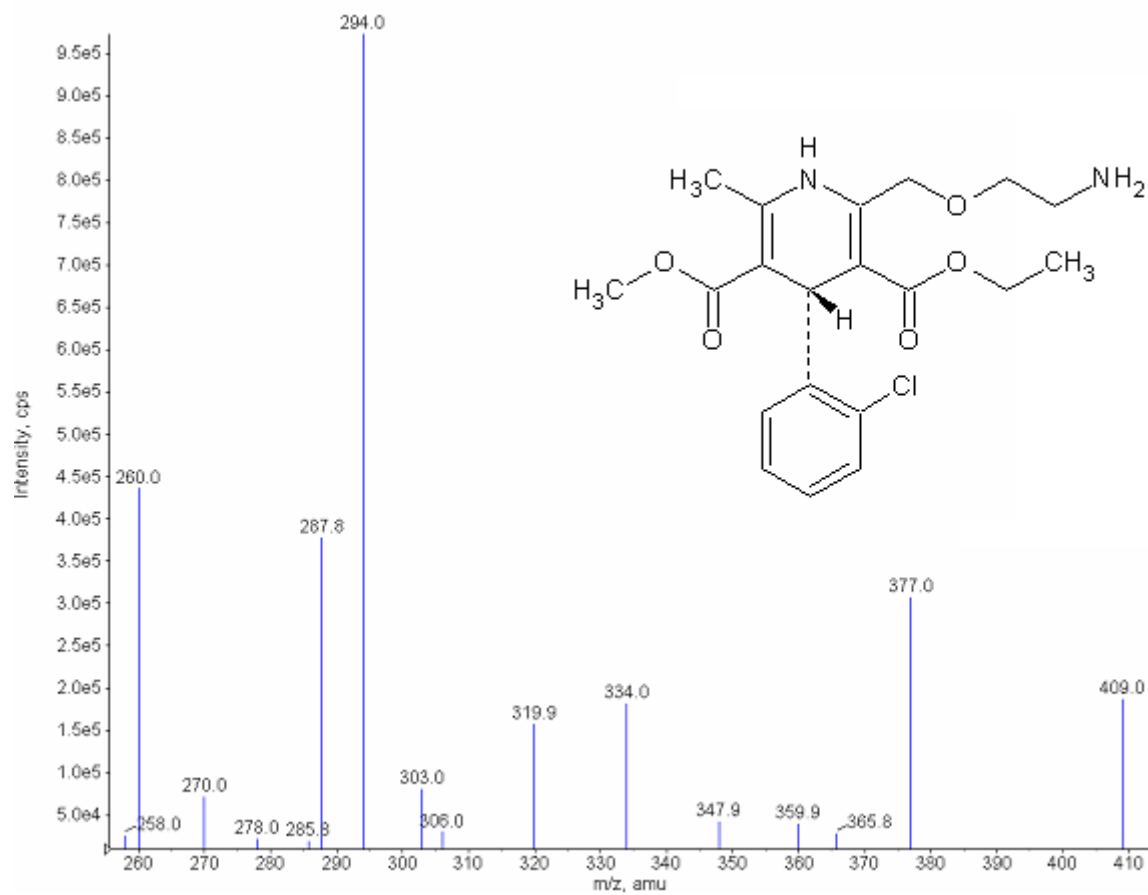


FIGURA 27 - ESPECTRO DE MS/MS DO ANLODIPINO

O espectro de fragmentação (MS/MS) do losartano apresentou íons produtos característicos do losartano e já demonstrado por Zhao e colaboradores (1999), sendo os principais encontrados: m/z 405, m/z 377, m/z 207, m/z 235, m/z 192 (Figura 28).

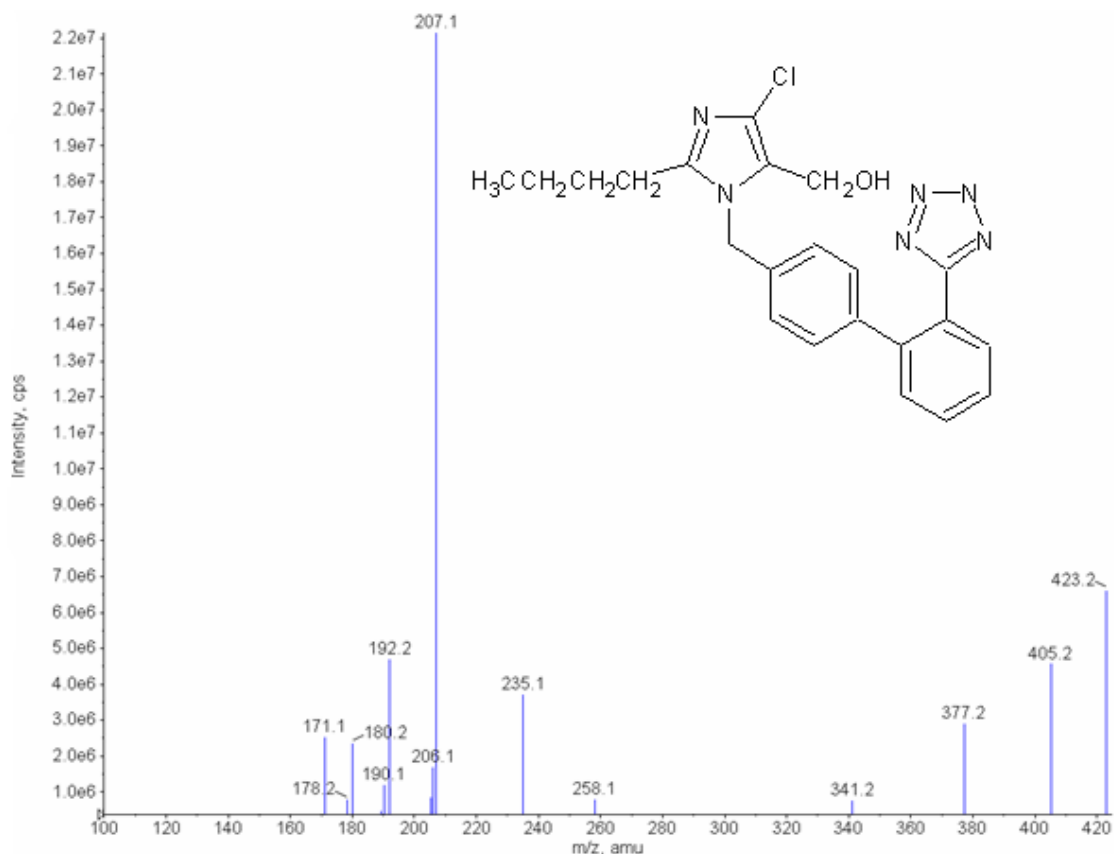


FIGURA 28 - ESPECTRO DE MS/MS DO LOSARTANO

O uso da espectrometria de massas possibilitou a utilização de outra técnica mais exata para avaliação da seletividade do método para os analitos através da verificação da pureza dos picos pelo espectro de varredura de massas e pela fragmentação característica. O fato de não haver interferentes na matriz (placebo) e produtos de degradação dos fármacos que não interferem na quantificação dos analitos, juntamente com os espectros de massas descritos acima, mostraram a seletividade do método desenvolvido para os fármacos.

5.3.2 Robustez

Os parâmetros de robustez avaliados (fluxo, pH do tampão, concentração do tampão, porcentagem de acetonitrila e temperatura) mostraram que o método consegue suportar pequenas e deliberadas variações sem que haja mudanças

significativas na recuperação dos fármacos (Tabela 4) e na eficiência cromatográfica (Figura 28).

Os valores de recuperação encontrados tanto para o losartano quanto para o anlodipino, na concentração de trabalho, estão dentro da variação do próprio método (será discutido adiante). Portanto, pode-se afirmar que as mudanças provocadas não interferiram na recuperação do método (Tabela 4).

TABELA 4 - AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ EM RELAÇÃO A RECUPERAÇÃO DO MÉTODO

Parâmetro	Modificação	Recuperação (%), (n=3)	
		Anlodipino	Losartano
Fluxo (mL/min)	0,9	97,71 ($\pm 0,129$)	100,40 ($\pm 0,077$)
	1,0	100,12 ($\pm 0,284$)	100,42 ($\pm 0,055$)
	1,1	98,84 ($\pm 0,104$)	100,53 ($\pm 0,048$)
pH	2,8	99,74 ($\pm 0,309$)	100,30 ($\pm 0,102$)
	3,0	100,12 ($\pm 0,284$)	100,42 ($\pm 0,055$)
	3,2	99,89 ($\pm 0,352$)	100,51 ($\pm 0,086$)
Concentração do tampão (mmol/L)	5	99,57 ($\pm 0,352$)	100,74 ($\pm 0,063$)
	10	100,12 ($\pm 0,284$)	100,42 ($\pm 0,055$)
	20	97,32 ($\pm 0,391$)	100,39 ($\pm 0,054$)
Porcentagem inicial de acetonitrila na fase móvel (%)	33	97,05 ($\pm 0,275$)	100,53 ($\pm 0,137$)
	35	100,12 ($\pm 0,284$)	100,42 ($\pm 0,055$)
	37	99,05 ($\pm 0,287$)	100,54 ($\pm 0,157$)
Temperatura ($^{\circ}$ C)	20	97,00 ($\pm 0,245$)	100,76 ($\pm 0,146$)
	25	100,12 ($\pm 0,284$)	100,42 ($\pm 0,055$)
	30	99,82 ($\pm 0,277$)	100,45 ($\pm 0,056$)

Ao analisarmos a Figura 29, pode-se perceber que as variáveis que interferiram mais na retenção dos analitos são o fluxo e a porcentagem de acetonitrila na fase móvel, porém, essa variação ocorreu quase que na mesma proporção, tanto para o anlodipino quanto para o losartano, sem que houvesse prejuízo significativo na eficiência cromatográfica, mantendo a R_s entre eles acima de 2,0 e com eficiência cromatográfica medida em número de pratos com pequena alteração da original devido à mudança do tempo de retenção. As demais variáveis (pH, concentração do tampão e temperatura) não apresentaram mudanças significativas no cromatograma.

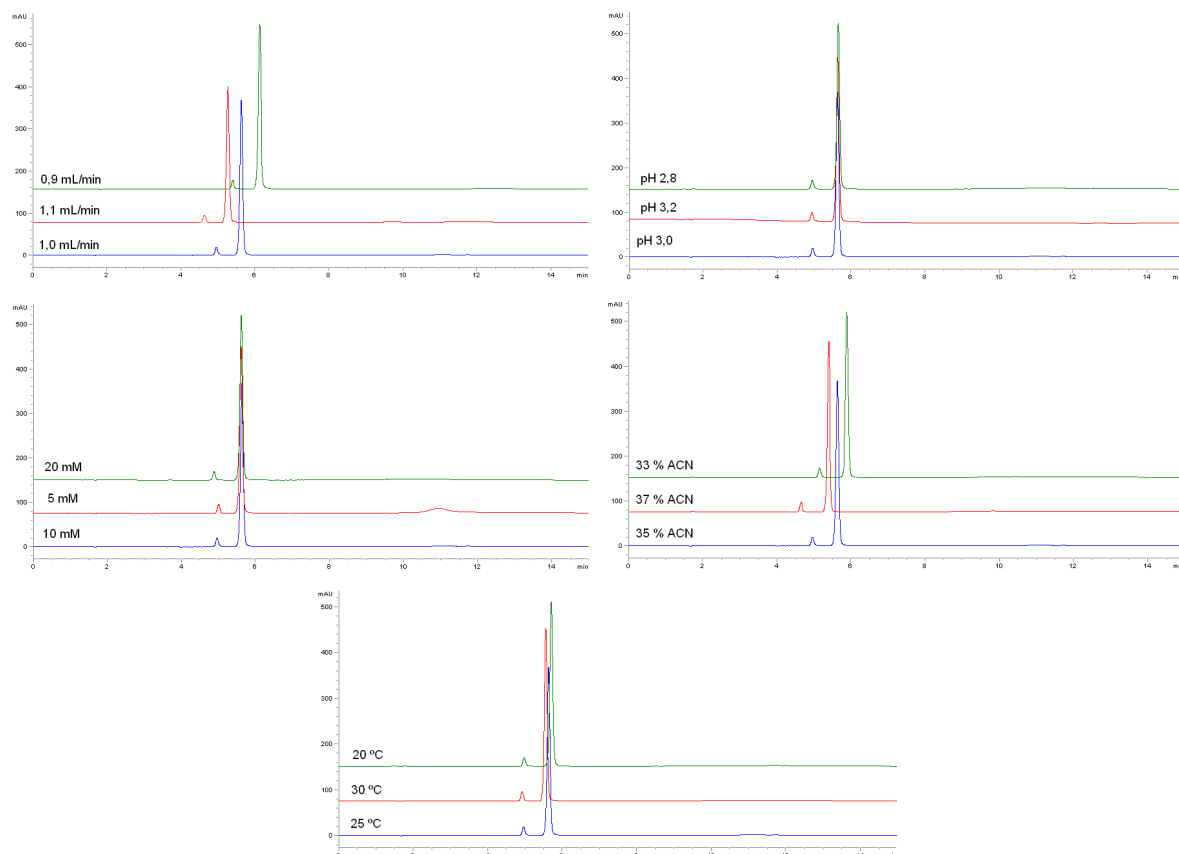


FIGURA 29 - CROMATOGRAMAS DO LOSARTANO E ANLODIPINO EM DIFERENTES CONDIÇÕES PARA AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO

Além dessas variáveis, foram avaliadas colunas de diferentes fabricantes com a mesma especificação (Classificação L1 USP) citadas e discutidas no desenvolvimento.

5.3.3 Linearidade

O estudo da linearidade foi realizado para os dois fármacos variando de 50 a 150% da concentração de trabalho. Os dados de concentração e de unidades de área foram plotados em um gráfico e determinada a equação da reta e o coeficiente de correlação.

A faixa de concentração do anlodipino variou de 1,4 a 4,2 $\mu\text{g/mL}$. Esses dados foram plotados para obter a equação da reta: $y = 36,87527x + 0,972512$ com coeficiente de correlação (r) 0,99964, conforme Figura 30. O valor do coeficiente de

correlação do anlodipino apresentou-se acima do exigido pela legislação nacional e internacional para determinação da linearidade. Concomitantemente, fez-se o gráfico da faixa linear proposto por Green (1996); que mostra que o método é linear se a resposta ficar dentro do faixa de 95 a 105%, desta maneira pode-se observar que dentro da faixa de 50 a 150% da concentração de trabalho do anlodipino o método apresentou linearidade para diferentes testes.

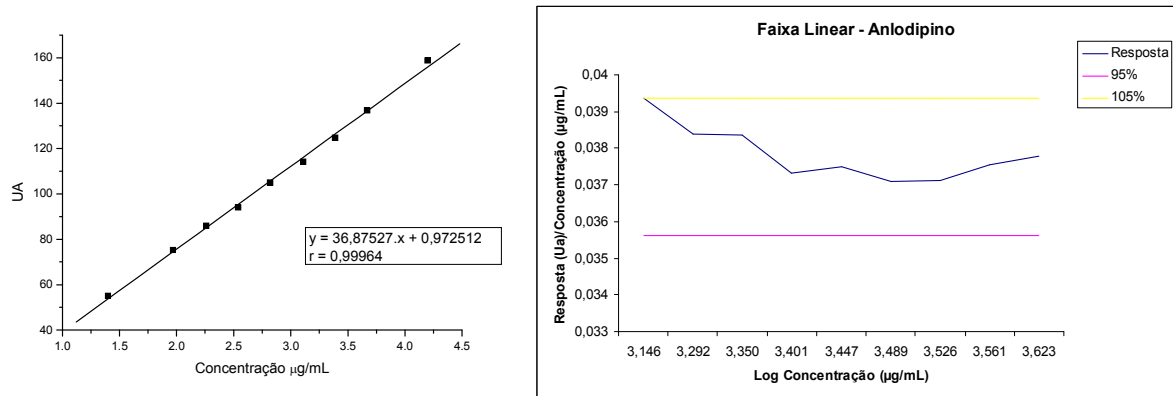


FIGURA 30 - GRÁFICO DA LINEARIDADE E FAIXA LINEAR DO ANLODIPINO

A faixa de concentração do losartano variou de 20 a 60 µg/mL, esses dados foram plotados para obter a equação da reta: $y = 48,78163 - 9,08904$ com coeficiente de correlação (r) 0,99994, conforme Figura 31. O valor de coeficiente de correlação do losartano apresentou-se acima do exigido pela legislação nacional e internacional para determinação da linearidade. Concomitantemente, também fez o gráfico proposto por Green (1996), mostrando que o método para losartano apresentou-se linear dentro da faixa de concentração estudada.

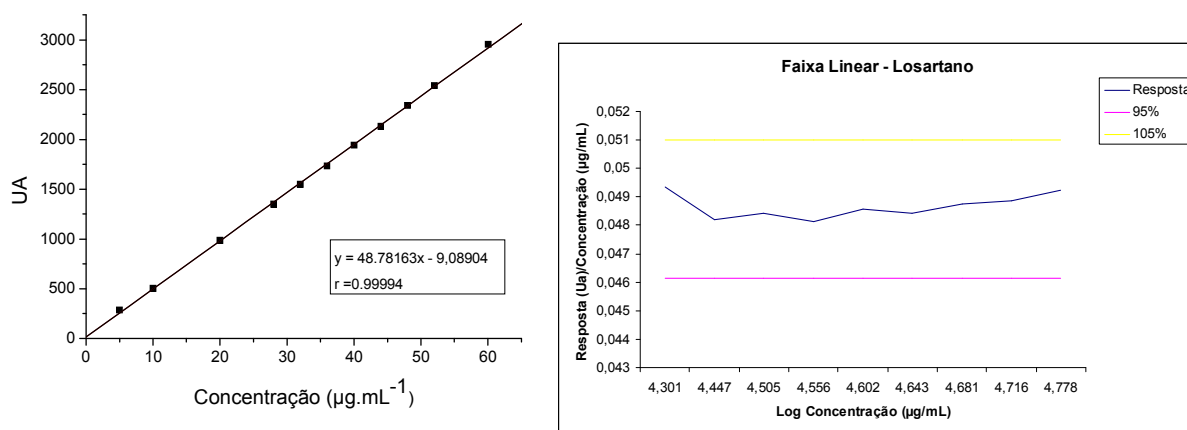


FIGURA 31 - GRÁFICO DA LINEARIDADE E FAIXA LINEAR DO LOSARTANO

5.3.4 Limite de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

Os resultados de LQ e LD, em quintuplicata, encontrados para o Anlodipino foram 0,175 e 0,0875 µg/mL, com DPR de 2,8% e 3,5%, respectivamente.

5.3.5 Precisão

5.3.5.1 Repetibilidade

O estudo de repetibilidade ou precisão intra-dia foi realizado em cinco níveis de concentração variando de 70 a 130% da concentração de trabalho. Os desvios padrões relativos encontrados para o losartano e anlodipino foram abaixo do especificado pela ICH e ANVISA de 5%.

Os valores DPR encontrados para o losartano podem ser observados na Tabela 4, mostrando que todos foram iguais ou inferiores a 1%.

TABELA 5 - DADOS DE REPETIBILIDADE E RECUPERAÇÃO DO LOSARTANO

Porcent.	C (µg/mL)	Média UA	DP	DPR	Média Recuperação (%)	DP	DPR
70	28,01	1340,4	8,82	0,66	98,8	0,65	0,65
80	32,01	1549,3	13,78	0,89	99,8	0,89	0,89
100	40,01	1942,1	10,65	0,55	100,0	0,56	0,56
120	48,02	2341,3	24,12	1,03	100,3	1,04	1,04
130	52,02	2539,1	13,58	0,54	100,4	0,53	0,53

Por outro lado, os desvios padrões relativos para o anlodipino foram maiores que os encontrados para o losartano (tabela 5). Esse fato se deve à baixa concentração do anlodipino (na faixa de trabalho) que favoreceu uma dispersão maior dos resultados. A necessidade de trabalhar numa faixa de concentração baixa para o anlodipino foi devido a grande diferença de concentração dos fármacos na forma farmacêutica. Em concentrações mais elevadas do medicamento o losartano ultrapassou o limite superior de quantificação do detector. Para que os dois fármacos pudessem ser quantificados simultaneamente foi necessário esse ajuste da concentração.

TABELA 6 - DADOS DE REPETIBILIDADE E RECUPERAÇÃO DO ANLODIPINO

Porcent.	C (µg/mL)	Média UA	DP	DPR	Média Recuperação (%)	DP	DPR
70	1,98	74,5	2,14	2,87	100,6	3,86	3,84
80	2,27	85,5	3,62	4,23	101,2	4,11	4,04
100	2,83	101,6	1,53	1,51	96,4	1,94	2,01
120	3,40	122,7	1,64	1,34	97,1	1,56	1,61
130	3,68	133,2	4,19	3,15	97,4	3,44	3,53

5.3.5.2 Precisão intermediária

O estudo da precisão intermediária ou inter-dia foi realizado em cinco níveis de concentração variando de 70 a 130% da concentração de trabalho, em dias diferentes e com analista diferente. Os desvios padrões relativos encontrados para o losartano e anlodipino foram abaixo do especificado pela ICH e ANVISA (5%).

Os valores DPR encontrados para o losartano podem ser observados na Tabela 7 mostrando que foram iguais ou inferiores a 1,5%.

TABELA 7 - DADOS DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA E RECUPERAÇÃO DO LOSARTANO

Porcent.	C (mg/mL)	Média UA	DP	DPR	Média Recuperação (%)	DP	DPR
70	28,01	1331,5	19,84	1,49	98,1	1,45	1,48
80	32,01	1541,5	10,87	0,71	99,3	0,70	0,70
0	40,02	1936,2	5,40	0,28	99,7	0,28	0,28
120	48,02	2329,1	15,45	0,66	99,8	0,66	0,66
130	52,02	2534,5	15,68	0,62	100,2	0,62	0,62

Os desvios padrões relativos encontrados em diferentes concentrações para o anlodipino (Tabela 8), foram maiores que os encontrados para o losartano, essa dispersão maior dos resultados ocorre pelo mesmo fato citado no item anterior.

TABELA 8 - DADOS DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA E RECUPERAÇÃO DO ANLODIPINO

Porcent.	C (mg/mL)	Média UA	DP	DPR	Média Recuperação (%)	DP	DPR
70	1,97	74,4	2,27	3,05	101,0	3,84	3,81
80	2,25	89,0	3,98	4,48	105,9	4,04	3,82
100	2,82	104,7	5,16	4,93	100,4	4,33	4,31
120	3,38	126,1	6,22	4,94	100,3	4,26	4,25
130	3,66	134,2	4,14	3,09	98,6	2,75	2,79

5.3.6 Exatidão

Os parâmetros de exatidão foram avaliados pelo método de recuperação dos fármacos, dado em porcentagem. O teste foi realizado juntamente com a precisão, variando de 70 a 130% da concentração de trabalho. Os valores de recuperação do losartano variaram de 98,8 a 100,4%, conforme descrito na Tabela 5. Já os valores de recuperação para o anlodipino variaram de 96,4 a 101,2% (Tabela 6). Os valores de recuperação, em porcentagem encontrada para os dois fármacos apresentaram-se dentro da faixa de 95 a 105% do valor nominal.

5.4 COMPARAÇÃO DE MÉTODOS

A comparação de diferentes métodos se faz necessária para verificar se a variabilidade difere de forma significativa entre eles, verificando se existe correspondência ou equivalência dos mesmos em um determinado intervalo específico (USP, 2008a).

Por não haver até o presente momento um método que quantifique simultaneamente o losartano e anlodipino a comparação dos métodos só pôde ser realizada com outros métodos por CLAE que quantificam cada fármaco individualmente. Os resultados de teor em porcentagem e DPR obtidos para os comprimidos de losartano e anlodipino associados ou não, nos diferentes métodos, estão descritos na Tabela 9. Os resultados foram comparados analiticamente e estatisticamente. O teste F é recomendado para determinação de diferenças de precisão entre dois métodos analíticos, já o teste t é utilizado para comparação de exatidão (CIENFUEGOS, 2005, INMETRO, 2003, LANÇAS, 2004).

TABELA 9 – TEOR DAS ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS EM DIFERENTES MÉTODOS

	Metodologia proposta				Hertzog e colaboradores (2002)		Mohammadi e colaboradores (2007)	
	Anlodipino		Losartano		Losartano		Anlodipino	
	Teor (%)	DPR	Teor (%)	DPR	Teor (%)	DPR	Teor (%)	DPR
Lotar®	100,5	0,68	99,0	0,38	98,8	0,22	99,8	0,58
Coozar®	----- -	-----	101,9	1,03	99,2	0,25	-----	-----
Norvasc®	104,2	0,75	-----	-----	-----	-----	103,8	0,67

Foram analisados os diferentes resultados, em porcentagem de teor, obtidos para cada especialidade farmacêutica, nos três métodos. Pode-se notar que os teores para a mesma especialidade, nos diferentes métodos, não diferiram analiticamente.

O teor de anlodipino no Lotar® apresentou valores para o método proposto no trabalho e pelo proposto por Mohammadi e colaboradores (2007), que diferem

apenas 0,7%, sendo esse valor muito próximo do próprio DPR dos métodos analisados (Tabela 9). Foram analisados estatisticamente os resultados obtidos nos dois métodos citados acima. Para o anlodipino presente no Lotar®, o valor de F encontrado ($F = 1,368$) foi abaixo do F tabelado ($F = 6,388$), indicando que os métodos possuem variâncias iguais para essa amostra e que não existe diferença significativa na precisão dos métodos comparados. O resultado para o teste t ($t = 1,75$; $p > 0,05$) dessa mesma amostra e métodos mostraram que não há diferenças significativas entre os intervalos de confiança das médias, indicando semelhanças entre os métodos.

O mesmo procedimento foi realizado para o losartano presente no Lotar®, porém, os métodos comparados foram o proposto no trabalho e a do Hertzog e colaboradores (2002). A diferença de teores encontrados em porcentagem foi de 0,2%, valor abaixo do DPR dos métodos analisados (Tabela 9). Os resultados obtidos nos dois métodos para quantificação do losartano foram analisados estatisticamente, o valor de F encontrado ($F = 2,972$) foi abaixo do F tabelado ($F = 6,388$), indicando que os métodos possuem variâncias iguais para essa amostra e que não existe diferença significativa na precisão dos métodos comparados. O resultado para o teste t ($t = 0,727$; $p > 0,05$) dessa mesma amostra e métodos mostraram que não há diferenças significativas entre os intervalos de confiança das médias, indicando semelhanças entre os métodos. Portanto os diferentes métodos testados para o Lotar® não apresentaram diferenças significativas em seus resultados de quantificação.

O teor de losartano no Coozar® apresentou valores para método proposto no trabalho e do Hertzog e colaboradores (2002) que diferem em porcentagem de 2,7%. Esse valor encontrado foi acima do DPR dos métodos analisados (Tabela 9). Os resultados obtidos nos dois métodos para quantificação do losartano foram analisados estatisticamente, o valor de F encontrado ($F = 17,910$) foi acima do F tabelado ($F = 6,388$), indicando que os métodos possuem variâncias diferentes para essa amostra e que segundo o teste F existe diferença significativa na precisão dos métodos comparados. Quando foram comparados os resultados dessa mesma amostra utilizando o teste t foi observado que também há diferenças significativa ($t = 5,567$; $p < 0,05$) dessa mesma amostra e métodos mostraram que também há diferenças significativas entre os intervalos de confiança das médias, indicando que

estatisticamente os métodos são diferentes. Esse resultado pode ser facilmente explicado devido à baixa dispersão encontrada para o Coozar® no método proposto por Hertzog e colaboradores (2002). Porém, podemos afirmar que os resultados encontrados pelos dois métodos não diferem analiticamente, pois essa diferença de médias é inferior a 5%.

Os valores de teor de anlodipino no Norvasc® apresentou para o método proposto no trabalho e pelo descrito por Mohammadi e colaboradores (2007), que diferem em 0,4%. Esse valor encontrado é abaixo do DPR dos métodos comparados (Tabela 9). Os resultados obtidos nos dois métodos para quantificação do anlodipino foram analisados estatisticamente, o valor de F encontrado ($F = 1,261$) foi abaixo do F tabelado ($F = 6,388$), indicando que os métodos possuem variâncias iguais para essa amostra e que não existe diferença significativa na precisão dos métodos comparados. O resultado de comparação desses métodos pelo teste t dessa mesma amostra mostraram que não há diferenças significativas entre os intervalos de confiança das médias ($t = 0,820$; $p > 0,05$), indicando semelhanças entre os métodos. Portanto os diferentes métodos testados para o Norvasc® não apresentaram diferenças significativas em seus resultados.

As comparações dos métodos através dos resultados obtidos das três diferentes especialidades farmacêuticas permite concluir que o método validado não difere dos métodos existentes para quantificação dos fármacos isolados (losartano e anlodipino). Porém, com a vantagem de quantificar simultaneamente o losartano e anlodipino.

6 CONCLUSÃO

A quantificação simultânea por CLAE do losartano e anlodipino representa um grande desafio analítico, pois os analitos apresentam características químicas diferentes (polaridade, cromóforo etc) e principalmente concentrações muito diferentes na forma farmacêutica. Por isso, procurou-se trabalhar dentro de uma faixa de concentração que fosse linear para os dois fármacos.

Durante o desenvolvimento do método foram analisados os efeitos de cada variável cromatográfica: coluna, fase móvel, gradiente de polaridade, temperatura, fluxo etc., obtendo-se os melhores resultados dentro da realidade do laboratório.

O método desenvolvido e validado para quantificação simultânea de losartano e anlodipino em formas farmacêuticas sólidas mostrou-se dentro dos critérios estabelecidos pela legislação brasileira e internacional vigente.

A seletividade do método pôde ser avaliada e comprovada com duas técnicas diferentes de detecção: o DAD e a espectrometria de massas.

O método mostrou-se robusto em relação as variáveis cromatográficas e colunas de modelos e fabricantes diferentes.

A linearidade do método foi realizada na faixa de concentração do anlodipino de 1,4 a 4,2 $\mu\text{g/mL}$ (50 a 150% da concentração de trabalho), com coeficiente de correlação 0,99964 e na faixa de 20 a 60 $\mu\text{g/mL}$ (50 a 150% da concentração de trabalho) para o losartano com coeficiente de correlação 0,99994.

A precisão e exatidão foram avaliadas dentro da faixa de 1,98 a 3,68 $\mu\text{g/mL}$ (70 a 130% da concentração de trabalho definida) para o anlodipino e 28 a 52 $\mu\text{g/mL}$ (70 a 130% da concentração de trabalho definida) de para losartano.

O método proposto mostrou-se ser estatisticamente e analiticamente semelhante com outros métodos existentes na literatura, mesmos estes sendo utilizados para quantificação de apenas um dos fármacos.

7 REFERENCIAS

AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEM PHARMACISTS. **AHFS Drug Information**. Bethesda: ASHP, 2006.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução n 899 de 29 maio de 2003 que determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 fev. de 2003

BAHRAMI, G.;MIRZAEI, S. Simple and rapid HPLC method for determination of amlodipine in human serum with fluorescence detection and its use in pharmacokinetic studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.36, n.1, p.163-8, 2004.

BASAVAIH, K.; CHANDRASHEKAR, U.;PRAMEELA, H. C. Sensitive spectrophotometric determination of amlodipine and felodipine using iron(III) and ferricyanide. **Farmaco**, v.58, n.2, p.141-8, 2003.

BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION. **British Pharmacopoeia**. 5. ed. London: The Stationery Office, 2007.

CARLUCCI, G. *et al.* Simultaneous determination of losartan and hydrochlorothiazide in tablets by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.23, n.1, p.185-9, 2000.

CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH (CDER). Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods. nov. 1994.

CIENFUEGOS, F. **Estatística Aplicada ao Laboratório**. 1ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência Ltda, 2005.

COMISSÃO DA FARMACOPÉIA PORTUGUESA. **Farmacopéia Portuguesa**. 7. ed. Lisboa: Infarmed, 2002.

CONLIN, P. R. Efficacy and safety of angiotensin receptor blockers: A review of losartan in essential hypertension (vol 62, pg 86, 2001). **Current Therapeutic Research-Clinical and Experimental**, v.62, n.9, p.673-673, 2001.

DÜSING R.; LOTTERMOSER K.;MENGDEN T., V. H. Compliance with antihypertensive therapy. Comparison of losartan, amlodipine and metoprolol in an open prospective trial. **American Journal of Hypertension**, v.14, n.4, p.A98, 2001.

EL WALILY, A. F. *et al.* Simultaneous determination of enalapril maleate and hydrochlorothiazide by first-derivative ultraviolet spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.13, n.7, p.851-6, 1995.

ERK, N. Analysis of binary mixtures of losartan potassium and hydrochlorothiazide by using high performance liquid chromatography, ratio derivative spectrophotometric and compensation technique. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.24, n.4, p.603-11, 2001.

FARTHING, D. *et al.* Simple high-performance liquid chromatographic method for determination of losartan and E-3174 metabolite in human plasma, urine and dialysate. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.704, n.1-2, p.374-8, 1997.

UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES,. Guidance for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation. ago. 2000.

GONZALEZ, L. *et al.* Fast screening method for the determination of angiotensin II receptor antagonists in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. **Journal of Chromatography A**, v.949, n.1-2, p.49-60, 2002.

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry**, v.68, n.9, p.A305-a309, 1996.

HERTZOG, D. L. *et al.* Development and validation of a stability-indicating HPLC method for the simultaneous determination of losartan potassium, hydrochlorothiazide, and their degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.30, n.3, p.747-60, 2002.

HILLAERT, S.;VAN DEN BOSSCHE, W. The quantitative determination of several inhibitors of the angiotensin-converting enzyme by CE. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.25, n.5-6, p.775-83, 2001.

HUBER, L. Validation of Analytical Methods:Review and Strategy. **LC/GC International**, v.11, n.96, 1998.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). nov. de 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). Orientações sobre Validação de Métodos e Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008. mar. de 2003.

IWASA, T. *et al.* Method for the simultaneous determination of losartan and its major metabolite, EXP-3174, in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography-Biomedical Applications**, v.734, n.2, p.325-30, 1999.

KAWABE, Y. *et al.* Photochemical stabilities of some dihydropyridine calcium-channel blockers in powdered pharmaceutical tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.47, n.3, p.618-624, 2008.

KLINKENBERG, R.; STREEL, B.;CECCATO, A. Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of amlodipine residues on manufacturing equipment surfaces. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.32, n.2, p.345-52, 2003.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. 1. ed. São Carlos: RiMa Editora, 2004.

LAW, M. R. *et al.* Value of low dose combination treatment with blood pressure lowering drugs: analysis of 354 randomised trials. **British Medical Journal**, v.326, n.7404, p.1427, 2003.

LUSINA, M. *et al.* Stability study of losartan/hydrochlorothiazide tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, v.291, n.1-2, p.127-37, 2005.

MA, Y. *et al.* Determination and pharmacokinetic study of amlodipine in human plasma by ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.43, n.4, p.1540-5, 2007.

MERCK & COMPANY INCORPORATED. **The Merck Index**. 13. ed. New Jersey: Merck & Company Incorporated, 2001.

MOHAMMADI, A. *et al.* A stability-indicating high performance liquid chromatographic (HPLC) assay for the simultaneous determination of atorvastatin and amlodipine in commercial tablets. **Journal of Chromatography-Biomedical Applications**, v.846, n.1-2, p.215-21, 2007.

NAIDU, K. R.; KALE, U. N.;SHINGARE, M. S. Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of amlodipine and benazepril hydrochloride from their combination drug product. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.39, n.1-2, p.147-55, 2005.

NIE, J. *et al.* Biocompatible in-tube solid-phase microextraction coupled to HPLC for the determination of angiotensin II receptor antagonists in human plasma and urine. **Journal of Chromatography-Biomedical Applications**, v.828, n.1-2, p.62-9, 2005.

OATES, J. A.;BROWN, N. J. Anti-hipertensivos e Terapia Farmacológica da Hipertensão. In. **Goodman & Gilman, As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003

OPARIL, S. *et al.* Efficacy, tolerability, and effects on quality of life of losartan, alone or with hydrochlorothiazide, versus amlodipine, alone or with hydrochlorothiazide, in patients with essential hypertension. **Clinical Therapeutics**, v.18, n.4, p.608-625, 1996.

KOHLMANN, O. JR. *et al.*. Estudo "LOTHAR": Avaliação de Eficácia e Tolerabilidade da Combinação Fixa de Anlodipino e Losartana no Tratamento da Hipertensão Arterial Primária. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.86, n.1, p.39-51, 2006.

PATEL, Y. P. *et al.* Isocratic, simultaneous reversed-phase high-performance liquid chromatographic estimation of six drugs for combined hypertension therapy. **Journal of Chromatography A**, v.828, n.1-2, p.283-6, 1998.

PHILLIPS, R. A. *et al.* The effects of amlodipine compared to losartan in patients with mild to moderately severe hypertension. **Journal of Clinical Hypertension (Greenwich)**, v.5, n.1, p.17-23, 2003.

POLINKO, M. *et al.* Simultaneous determination of losartan and EXP3174 in human plasma and urine utilizing liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.33, n.1, p.73-84, 2003.

QUAGLIA, M. G. *et al.* Determination of losartan and hydrochlorothiazide in tablets by CE and CEC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.29, n.6, p.981-987, 2002.

RAGNO, G.; GAROFALO, A.; VETUSCHI, C. Photodegradation monitoring of amlodipine by derivative spectrophotometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.27, n.1-2, p.19-24, 2002.

RAHMAN, N.; NASRUL HODA, M. Validated spectrophotometric methods for the determination of amlodipine besylate in drug formulations using 2,3-dichloro 5,6-dicyano 1,4-benzoquinone and ascorbic acid. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.31, n.2, p.381-92, 2003.

RAHMAN, N.; SINGH, M.; HODA, M. N. Application of oxidants to the spectrophotometric determination of amlodipine besylate in pharmaceutical formulations. **Farmaco**, v.59, n.11, p.913-9, 2004.

RIBANI, M. *et al.* Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Quimica Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RITTER, M. A.; FURTEK, C. I.; LO, M. W. An improved method for the simultaneous determination of losartan and its major metabolite, EXP3174, in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.15, n.7, p.1021-9, 1997.

SCHOENBERGER, J. A. Losartan with Hydrochlorothiazide in the Treatment of Hypertension. **Journal of Hypertension**, v.13, p.S43-S47, 1995.

SEBURG, R. A. *et al.* Photosensitized degradation of losartan potassium in an extemporaneous suspension formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.42, n.4, p.411-22, 2006.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US

Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v.987, n.1-2, p.57-66, 2003.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2. ed. Danvers: John Wiley & Sons, INC, 1997.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. **VII Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial**. São Paulo, 2006.

SOLDNER, A.; SPAHN-LANGGUTH, H.; MUTSCHLER, E. HPLC assays to simultaneously determine the angiotensin-AT1 antagonist losartan as well as its main and active metabolite EXP 3174 in biological material of humans and rats. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.16, n.5, p.863-73, 1998.

STREEL, B. *et al.* Enantiomeric determination of amlodipine in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.54, n.1-3, p.357-68, 2002.

TATAR, S.; ATMACA, S. Determination of amlodipine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography-Biomedical Applications**, v.758, n.2, p.305-10, 2001.

USP. **The United States Pharmacopeia**. 31. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008a. 232-243 p.

USP. **The United States Pharmacopeia**. 31. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008b. 2354-2355 p.

VESSMAN, J. Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.14, n.8-10, p.867-869, 1996.

VOLPE, M. *et al.* Comparison of the blood pressure-lowering effects and tolerability of losartan- and amlodipine-based regimens in patients with isolated systolic hypertension. **Clinical Therapeutics**, v.25, n.5, p.1469-1489, 2003.

WEBSTER, J. *et al.* Once daily amlodipine in the treatment of mild to moderate hypertension. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.24, n.6, p.713-9, 1987.

WILLIAMS, R. C. *et al.* Comparison of liquid chromatography, capillary electrophoresis and super-critical fluid chromatography in the determination of Losartan Potassium drug substance in Cozaar(R) tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.14, n.11, p.1539-1546, 1996.

WOLF-MAIER, K. *et al.* Hypertension treatment and control in five European countries, Canada, and the United States. **Hypertension**, v.43, n.1, p.10-7, 2004.

YEUNG, P. K. *et al.* Determination of plasma concentrations of losartan in patients by HPLC using solid phase extraction and UV detection. **International Journal of Pharmaceutics**, v.204, n.1-2, p.17-22, 2000.

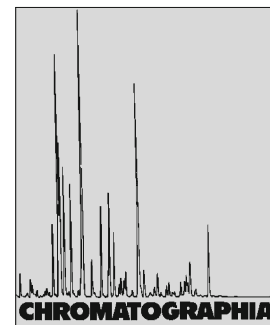
YOSHII M., T. M., TAKIUCHI S., KAMIDE K., HORIO T., YOSHIHARA F., NAKAMURA S., NAKAHAMA H., INENAGA T., KAWANO Y. Effects of amlodipine and losartan on ambulatory blood pressure parameters in patients with essential hypertension: HOSP substudy. **American Journal of Hypertension**, v.16, n.5, p.A134, 2003.

ZARGHI, A. *et al.* Validated HPLC method for determination of amlodipine in human plasma and its application to pharmacokinetic studies. **Farmaco**, v.60, n.9, p.789-92, 2005.

ZHAO, Z. *et al.* Identification of losartan degradates in stressed tablets by LC-MS and LC-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.20, n.1-2, p.129-36, 1999.

8 ANEXO

A Validated RP-LC Method for Simultaneous Determination of Losartan Potassium and Amlodipine Besilate in Pharmaceutical Preparations



2009, 69, S201-S206

Carlos F. Pedroso[✉], Julcemara G. de Oliveira, Francinete R. Campos, Alan G. Gonçalves, Angela C. L. B. Trindade, Roberto Pontarolo

Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil; E-Mail: cpedroso@ufpr.br; pontarolo@ufpr.br

Received: 30 September 2008 / Revised: 1 December 2008 / Accepted: 7 January 2009
Online publication: 5 February 2009

Abstract

A simple RP-LC method for simultaneous quantification of losartan and amlodipine and separation of their degradation products has been developed. For this purpose we tested appropriated mobile phase pH range, flow rate, temperature and different columns. The method was validated with an ODS column. A gradient of acetonitrile and phosphate pH 3.0 buffer was utilized as mobile phase. The linearity was determined at 50–150% level. Individual recoveries at 70–130% level ranged from 98.8 to 100.5% for losartan and 96.4–101.2% for amlodipine. The robustness was also evaluated. Although losartan has much higher quantities than amlodipine in commercial tablets, this method allowed simultaneous quantification for both drugs.

Keywords

Column liquid chromatography
Losartan potassium
Amlodipine besilate
Method validation

Introduction

Amlodipine besilate, 3-ethyl 5-methyl (4*RS*)-2-[(2-aminoethoxy)methyl]-4-(2-chlorophenyl)-6-methyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate benzenesulphonate [1] is a potent calcium channel antago-

nist used for the treatment of hypertension [2]. LC-UV have been performed for raw material [1] and for combination with a second drug in commercial tablets [3–5]. Pharmacokinetic studies employing liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry [6, 7], UV

detection [8] or fluorescence detection [9] has also been described.

Losartan, monopotassium salt of 2-butyl-4-chloro-1-[*p*-(*o*-1*H*-tetrazol-5-yl-phenyl)benzyl]imidazole-5-methanol is a non-peptide AT₁ receptor antagonist utilized for the treatment of hypertension [10]. A number of analytical methods have been related in literature for losartan determination. For raw material [11] and commercial tablets [12, 13] LC-UV has been commonly used. In the simultaneous determination of losartan and its degradation products techniques such as LC-MS-MS [14], RP-TLC [15] have been reported. Williams and coworkers [16] demonstrated comparative analyses using LC, CE and SFC. LC quantification of the combined losartan and hydrochlorothiazide have also been related [12, 17, 18]. Determination of losartan in plasma has been conducted by use of LC-UV [19, 20] and with fluorescence detection [21–23].

Monotherapy for control of blood pressure has been shown to be inefficient; in this way, combination drug therapy has become a clinical routine practice [24, 25]. Furthermore, the development of drug combinations at the same pharmaceutical preparation is widespread in pharmaceutical industry [26].

Separation Analysis Applied to Pharmaceutical Sciences in Brazil.

Combination of losartan and amlodipine at the same pharmaceutical preparation (100/5.0 and 50/2.5 mg, respectively) have been used for better therapy compliance. However, there is no available LC method in the literature for simultaneous quantification of these two drugs in the same chromatographic separation. This kind of separation is not readily performed because of the distinct losartan and amlodipine acid-base behavior and the high difference in the amount between them in the available commercial tablets.

Here we described the development and validation of RP-LC with DAD detection for the simultaneous quantification of losartan and amlodipine, and separation of their major degradation products in commercial preparations.

Experimental

Chemicals and Reagents

Losartan potassium salt and amlodipine besilate were purchased from United States Pharmacopoeia Reference Standards. Pharmaceutical preparation containing 50/2.5 and 100/5.0 mg of losartan and amlodipine were manufactured by Biosintética Farmacêutica. Placebos were prepared in the laboratory using United States Pharmacopoeia grade excipients. Acetonitrile and methanol (LC grade), sodium dihydrogen phosphate monobasic monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), phosphoric acid 85%, DMSO- d_6 were purchased from Merck (Darmstadt, Germany); ammonium acetate crystal, ammonium formate 97%, formic acid 88% and acetic acid glacial from J.T. Baker (Mexico); TMS from Aldrich (Germany). For sample dilution a mixture of acetonitrile and 10 mM phosphate buffer solution at pH 3.0 (50:50 *v/v*) was prepared.

Working Standard Solution, Sample Preparation

The content of 20 capsules were crushed and mixed to homogeneous powder and the mass equivalent of one capsule was

weighed and transferred to a 50 or 100 mL volumetric flask, dissolved in diluent and sonicated for 10 min. The resulting solution was filtered through a Millipore Millex PVDF 0.45 μm filter and diluted with diluent to the final concentration of 40 and 2.84 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for losartan and amlodipine, respectively.

Chromatography

Chromatographic separations were performed on an Agilent 1100 LC system, consisting of G1311A quaternary pump, a G1379A degasser, G1329A automatic injector, G1315B DAD (Germany), and Chemstation Rev. A. 10.02[1757] software. The following columns were adapted to the equipment for this study: XBridge C18 (150 \times 4.6 mm I.D., 5 μm particle size), Spherisorb ODS2 C18 (150 \times 4.6 mm, 5 μm), Symmetry C18 (150 \times 3.9 mm, 5 μm) purchased from Waters Corporation (Ireland). Zorbax Eclipse C18 XDB column (150 \times 4.6 mm, 5 μm) was purchased from Agilent Technologies (USA) and Microsorb-MV C18 110-5 (150 \times 4.6 mm, 5 μm) from Varian (USA). The SPE OASIS HLB 1 cc used was purchased from Waters (USA).

For method development, mixtures of phosphate, formate and acetate buffers in different concentrations (5–30 mM) and pH ranges (3.0–7.0) were tested. Gradients were performed with acetonitrile or methanol with different gradient ramps. Varying of column temperatures (20–50 $^\circ\text{C}$), and types and manufactures of ODS packing were also evaluated. Chromatograms were then analyzed and compared for a better selection of chromatographic and time efficiency.

The selected conditions for method validation were as follows: mobile phase with phosphate buffer solution 10 mM pH 3.0 (channel A) and acetonitrile (channel B) in a linear gradient from A to B (65:35, *v/v*) in 10 min A–B (35:65, *v/v*) to A–B in 15 min (65:35, *v/v*) and 5 min for column re-equilibration. The flow rate was 1 mL min^{-1} with 20 μL being injected. The UV detection was performed at 237 nm on an XBridge column.

Analytes and Degradation Products Identification

The solution containing losartan, amlodipine and their degradation products was injected repeated times and each analyte was collected and purified by SPE for subsequent characterisation by tandem mass spectrometry and NMR analysis.

Low-resolution ESI-MS and ESI-MS-MS data were acquired, using an API 3200 of Applied Biosystems instrument, equipped with electrospray ionization (ESI) and atmospheric pressure ionization (APCI) sources. A Turbo-IonSpray (ESI) probe in the positive-ion mode was utilized for these experiments. Full scan and product ions mass spectra were obtained by direct infusion into the mass spectrometer with acetonitrile/water (50:50, *v/v*) containing 5 mM ammonium formate as diluents. The typical ion source parameters were: declustering potential (DP): 50 V (losartan, amlodipine and Impurity D), 58 V (Compound E and Compound F), and 5,500 V (IS); collision energy (CE): 20 eV (losartan), 50 eV (amlodipine), 30 eV (Impurity D), 40 eV (Compound E and Compound F); entrance potential (EP) 10 V; collision cell exit potential (CXP) 3.8 V; spray voltage, 5,500 V and ion temperature, 300 $^\circ\text{C}$. Nebulizer gas (NEB), curtain gas (CUR) and collision gas (CAD) were set to 40, 10, 5 psi, respectively. Nitrogen gas was used for CUR, CAD, NEB.

All NMR data were recorded at 293 K in DMSO- d_6 as the solvent and TMS as the internal standard on a Bruker AVANCE DRX 400 spectrometer operating at 9.4 T, observing ^1H at 400.13 and ^{13}C at 100.61 MHz.

Method Validation

The validation approach was executed under ICH guideline for validation of analytical procedures [27].

Selectivity

Individual injections of diluent solution, placebo, losartan and amlodipine

stressed solution were performed. The chromatograms were compared with the response of the working solutions the contribution for losartan and amlodipine quantification was then evaluated.

Linearity

The linearity of the detector response was determined at level ranges of 50–150% for losartan (20–60 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and amlodipine (1.4–4.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Evaluations were conducted by analysis of three working standard solutions of losartan and amlodipine in nine concentration levels. Peak areas and analyte concentrations were plotted and subjected to regression analysis to calculate correlation coefficient, y -intercept and slope of the regression line.

Limits of Detection and Quantification

The limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) were established by decreasing analyte amounts to S/N of 3:1 and 10:1, respectively. Injection of six different solutions with the supposed LOD and LOQ concentrations for amlodipine were then performed.

Precision

The precision of the method was evaluated in terms of repeatability (intra-day) and Intermediate precision (inter-day). Determinations were executed with three independent replicates in five concentration levels (70, 80, 100, 120, 130%).

Accuracy

The study of accuracy was conducted analyzing the recovery of known amounts of the analytes in spiked blank matrices through three independent replicates in five concentration levels (70, 80, 100, 120, 130%).

Robustness

The evaluation of robustness was made by analyses of the influence of variations in pH (2.8–3.2), buffer concentration (5–20 mM) and acetonitrile ($\pm 1\%$) in the mobile phase. Column temperature

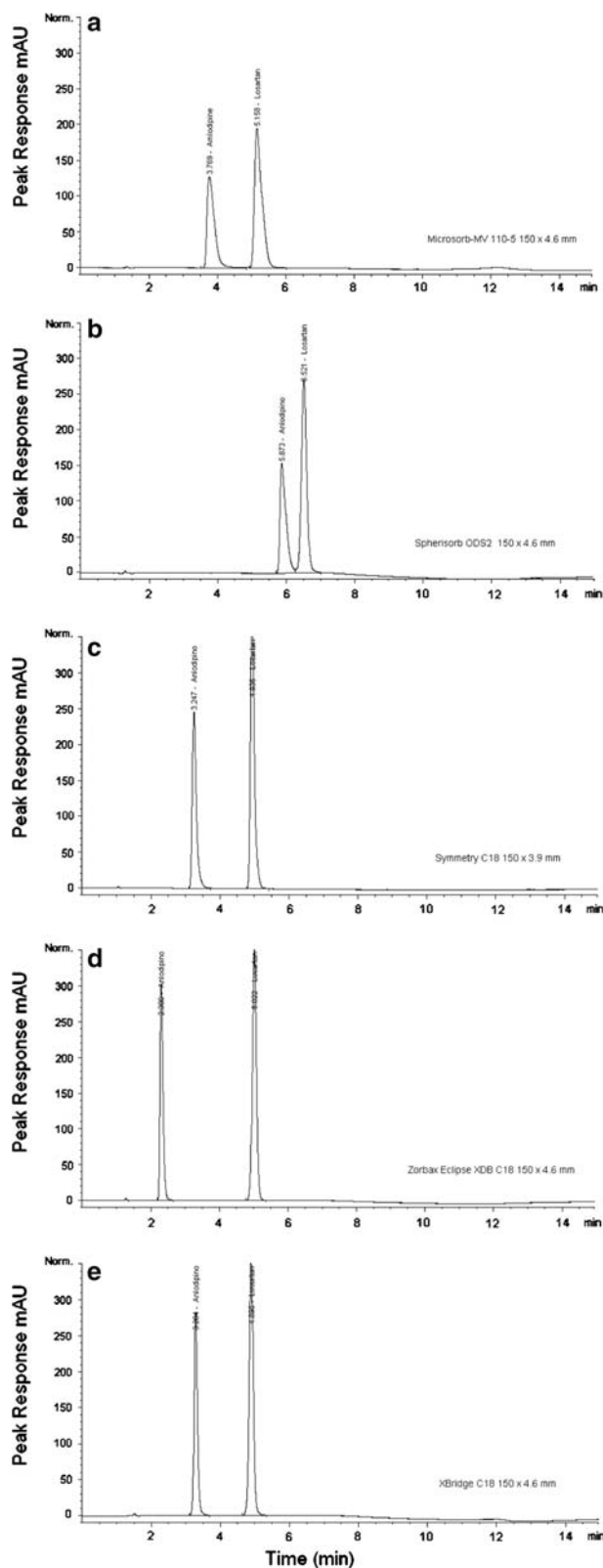
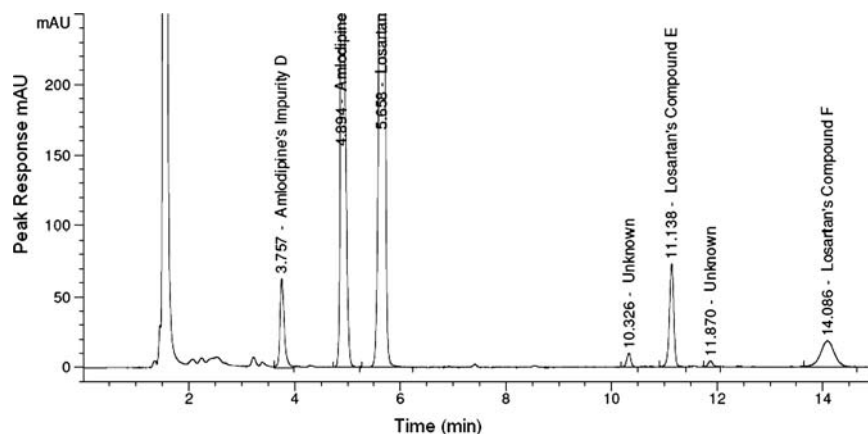


Fig. 1. LC chromatogram of losartan and amlodipine with different ODS columns (a Microsorb, b Spherisorb, c Symmetry, d Zorbax, e XBridge). Separation conditions: gradient of 10 mM phosphate pH 3.0 buffer and acetonitrile, 1.0 mL min^{-1} flow rate, room temperature, 20 μL injection volume and UV detection at 237 nm

Table 1. System suitability test

	Amlodipine's Impurity	Amlodipine	Losartan	Losartan's Compound E	Losartan's Compound F
k'	1.89	2.76	3.35	7.57	9.83
T	1.35	1.62	0.94	0.92	0.97
N	11,881	16,739	24,383	91,800	14,038
R_s	–	7.86	5.16	5.66	7.1
RSD	0.54%	0.10%	0.20%	0.87%	0.22%

**Fig. 2.** LC chromatogram of losartan and amlodipine with their major degradation products

(20–30 °C) and mobile phase flow rate (0.9–1.1 mL min⁻¹) were also evaluated.

System Suitability

System suitability testing is an integral part of many analytical procedures. These tests are used to verify if the resolution and repeatability of the system are adequate for the analysis to be executed [11, 27, 28]. The tests were performed injecting six times the solution for the study of losartan and amlodipine degradation products. The method of generation of amlodipine degradation products is described in the British Pharmacopoeia [1]. For losartan, the specific methodology is described by Hertzog et al. [12].

Results and Discussion

Degradation Products Identification

Amlodipine and Impurity D have characteristic UV spectra, but losartan, Compounds E and F have similar UV

spectra that prevent their differentiation by use of DAD detection in the chromatographic experiments. For unambiguous determination of the mentioned compounds we introduced NMR and ESI-MS analysis of the collected fractions from repeated stressed solution injections. Full scan ESI-MS analysis of the compounds presented protonated species $[M + H]^+$ at m/z 409, 407, 423, 827, and 827 for amlodipine, Impurity D, losartan, Compounds E and F, respectively. Tandem mass spectrometry analysis of Compounds F and E also gave similar spectra [14]. Both impurities were then submitted to 1 and 2D NMR analysis. Differently from the two isolated methylene of losartan, the ¹H NMR spectrum of Compound E revealed the presence of four methylene signals at δ 4.30, 5.21, 4.94, and 4.74 which correspond to the carbons at δ 51.5, 46.5, 46.7 and 39.5, respectively as evidenced on the one-bond ¹H-¹³C heteronuclear correlation (HSQC) experiment. On the other hand, for Compound F, four new other ¹H NMR signals were observed at δ 4.35, 5.22, 5.24, and 5.78 that correspond to

carbons at δ 51.5, 47.1, 46.9, and 45.2, respectively. Therefore, both degradation products of losartan could be identified by means of NMR experiments as the combination of two losartan monomers that result in two position dimmer isomers. This data allowed us to correlate each impurity structure to the corresponding chromatographic retention time.

Method Development

The methodology described here was developed in order to separate and quantify losartan and amlodipine in commercial preparation. We also provided the separation of their major degradation products for stability studies. For this purpose, we selected ODS columns and mobile phase gradient involving polar solvents and aqueous buffers. For the first pH and gradient condition studies, we utilized a Spherisorb ODS2 column with the gradient composed by methanol or acetonitrile with phosphate, acetate or formate buffer.

Better conditions were achieved using a gradient of acetonitrile and phosphate buffer (0 min 35 and 65%; 10 min 35 and 65%, 15 min 35 and 65%, respectively) with 5 min in the initial condition for column re-equilibration. Column temperature and mobile phase flow rate were also tested. Tests with different column temperatures (20–50 °C) did not lead to significant changes in the chromatogram, hence room temperature was preferred to provide longer column lifetime. The mobile phase flow rate was tested from 0.5 to 1.5 mL min⁻¹, with the best relationship between time and pressure at 1.0 mL min⁻¹.

The pH buffer tests were performed with values ranging from 3.0 to 7.0. All evaluated pH conditions were able to separate the main analytes, however, at pH 7.0 losartan was not retained and amlodipine had an excessive slowing in the elution time. At pH 3.0, 4.0, 4.5 and 5.0 the main analytes were well resolved ($R_s > 2.0$), however, at pH 4.0 and 4.5 the losartan major degradation products were co-eluted. Even though in pH 5.0 condition the analytes and their major degradation products presented a good

Table 2. Accuracy by recovery and precision study ($n = 3$)

Approximate level	Losartan				Amlodipine			
	Conc. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Accuracy	Precision		Conc. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Accuracy	Precision	
		Recovery mean (%)	Intra-day RSD (%)	Inter-day RSD (%)		Recovery mean (%)	Intra-day RSD (%)	Inter-day RSD (%)
70	28.01	98.8	0.66	1.49	1.98	100.6	2.87	3.05
80	32.01	99.8	0.89	0.75	2.27	101.2	4.23	4.48
100	40.01	100.0	0.55	0.28	2.83	96.4	1.51	4.93
120	48.02	100.3	1.03	0.66	3.40	97.1	1.34	4.94
130	52.02	100.4	0.54	0.62	3.68	97.4	3.15	3.09

resolution, the method appeared less robust for losartan retention times in different chromatographic runs and types of column. This was probably caused by the closeness of losartan pK_a value (4.9) to the buffer pH value in this condition. Analyses performed at pH 3.0 gave the best results: all main analytes and the degradation products were well resolved with the appropriate robustness and, additionally, the more retained analyte (losartan, in this pH) appeared with the lower retention time in comparison to the other conditions.

We also evaluated different types of columns and manufacturers (Fig. 1). All the columns tested (L1 packing by USP, with the same dimensions) quantified losartan and amlodipine with different chromatographic efficiencies. All N values were higher than 1,000, the tailing factor for amlodipine lower than 2.0 and resolution higher than 2.0. This data indicated that all columns presented acceptable chromatographic parameters to provide the proposed analysis. In this study XBridge column provided the best results.

Separation of related degradation products was also evaluated. In this case, Spherisorb, Symmetry and XBridge columns were able to separate the analytes in the proposed run time (15 min). The best overall results were obtained by use of the XBridge column, thus, it was employed for the method validation.

Validation

System Suitability

The test was performed by six repeated injections of losartan and amlodipine

stressed solutions. The values of resolution (R_s), USP tailing (T), plate number (N), retention factor (k') and RSD are presented in Table 1 and a typical chromatogram is showed in Fig. 2.

Selectivity

Selectivity assay demonstrated that the placebo and diluents had negligible contribution in the chromatogram, and the major degradation products had a good resolution from the analytes, indicating that amlodipine and losartan can be appropriately labeled (Fig. 2).

Linearity

The linear relationship between detector response and analyte concentration was performed from 50 to 150% levels. For losartan, the concentration range was 20–60 $\mu\text{g mL}^{-1}$, the ration line with $y = 48.78163x - 9.08904$ and correlation coefficient of 0.99994. For amlodipine the values were 1.4–4.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$; $y = 36.87527x + 0.972512$; 0.99964 as indicating for losartan.

Limits of Detection and Quantification

The LOD and LOQ were determined only for amlodipine because it is normally present in a lower amount in commercial tablets and capsules than losartan. The LOD and LOQ values were 0.0875 and 0.175 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively.

Precision

Losartan and amlodipine intra-day RSD were from 0.54 to 1.03% and from 1.34

to 4.23%, respectively. The RSD inter-day ranged from 0.28 to 1.49% (losartan) and 3.05–4.94% (amlodipine), as shown in Table 2.

Accuracy

The accuracy was evaluated by determination of analytes recovery percentage. For losartan the value ranged from 98.8 to 100.4% and for amlodipine from 96.4 to 101.2%.The results are listed in Table 2.

Robustness

For robustness evaluation, small changes in flow rate ($\pm 10\%$), pH buffer (2.8 and 3.2) buffer concentration (5 and 20 mM), Acetonitrile content ($\pm 1\%$) and column temperature ($\pm 5^\circ\text{C}$) did not give significant changes in resolution and recovery.

Conclusion

As far as we know, there was no available method for the simultaneous quantification of losartan and amlodipine in pharmaceutical preparations. Here we described a new and simple method that has been established for this purpose. Although commercial tablets present much higher quantities of losartan (20 times) in comparison to amlodipine, the method here described allowed a reliable simultaneous quantification of this kind of product. In addition, ESI–MS and NMR tools were employed to determine the related degradation products unambiguously.

References

1. British Pharmacopoeia Commission (2007) British Pharmacopoeia, vol 1, 5th edn. The Stationery Office, London
2. Meredith PA, Elliott HL (1992) Clin Pharmacokinet 22:22–31
3. Mohammadi A, Rezanour N, Ansari Dogaheh M, Ghorbani Bidkorbeh F, Hashem M, Walker RB (2007) J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 846:215–221. doi:10.1016/j.jchromb.2006.09.007
4. Naidu KR, Kale UN, Shingare MS (2005) J Pharm Biomed Anal 39:147–155. doi:10.1016/j.jpba.2005.04.001
5. Patel YP, Patil S, Bhoir IC, Sundaresan M (1998) J Chromatogr A 828:283–286. doi:10.1016/S0021-9673(98)00652-9
6. Ma Y, Qin F, Sun X, Lu X, Li F (2007) J Pharm Biomed Anal 43:1540–1545. doi:10.1016/j.jpba.2006.11.015
7. Strel B, Laine C, Zimmer C, Sibenaler R, Ceccato A (2002) J Biochem Biophys Methods 54:357–368. doi:10.1016/S0165-022X(02)00133-1
8. Zarghi A, Foroutan SM, Shafaati A, Khoddam A (2005) Farmaco 60:789–792. doi:10.1016/j.farmac.2005.06.012
9. Tatar S, Atmaca S (2001) J Chromatogr B Biomed Sci Appl 758:305–310. doi:10.1016/S0378-4347(01)00197-9
10. Conlin PR (2001) Curr Ther Res Clin Exp 62:673–673. doi:10.1016/S0011-393X(01)80019-9
11. Seburg RA, Ballard JM, Hwang TL, Sullivan CM (2006) J Pharm Biomed Anal 42:411–422. doi:10.1016/j.jpba.2006.04.030
12. Hertzog DL, McCafferty JF, Fang X, Tyrrell RJ, Reed RA (2002) J Pharm Biomed Anal 30:747–760. doi:10.1016/S0731-7085(02)00385-0
13. Lusina M, Cindric T, Tomaic J, Peko M, Pozaic L, Musulin N (2005) Int J Pharm 291:127–137. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.07.050
14. Zhao Z, Wang Q, Tsai EW, Qin XZ, Ip D (1999) J Pharm Biomed Anal 20:129–136. doi:10.1016/S0731-7085(99)00004-7
15. McCarthy KE, Wang Q, Tsai EW, Gilbert RE, Ip DP, Brooks MA (1998) J Pharm Biomed Anal 17:671–677. doi:10.1016/S0731-7085(97)00251-3
16. Williams RC, Alasandro MS, Fasone VL, Boucher RJ, Edwards JF (1996) J Pharm Biomed Anal 14:1539–1546. doi:10.1016/0731-7085(96)01740-2
17. Carlucci G, Palumbo G, Mazzeo P, Quaglia MG (2000) J Pharm Biomed Anal 23:185–189. doi:10.1016/S0731-7085(00)00268-5
18. Erk N (2001) J Pharm Biomed Anal 24:603–611. doi:10.1016/S0731-7085(00)00434-9
19. Soldner A, Spahn-Langguth H, Mutschler E (1998) J Pharm Biomed Anal 16:863–873. doi:10.1016/S0731-7085(97)00128-3
20. Yeung PK, Jamieson A, Smith GJ, Fice D, Pollak PT (2000) Int J Pharm 204:17–22. doi:10.1016/S0378-5173(00)00453-1
21. Farthing D, Sica D, Fakhry I, Pedro A, Gehr TW (1997) J Chromatogr B Biomed Sci Appl 704:374–378. doi:10.1016/S0378-4347(97)00489-1
22. Gonzalez L, Lopez JA, Alonso RM, Jimenez RM (2002) J Chromatogr A 949:49–60. doi:10.1016/S0021-9673(01)01496-0
23. Ritter MA, Furtak CI, Lo MW (1997) J Pharm Biomed Anal 15:1021–1029. doi:10.1016/S0731-7085(96)01948-6
24. Society British Hypertension (2004) J Fam Pract 53:528–550
25. Wolf-Maier K, Cooper RS, Kramer H, Banegas JR, Giampaoli S, Joffres MR, Poulter N, Primates P, Stegmayr B, Thamm M (2004) Hypertension 43:10–17. doi:10.1161/01.HYP.0000103630.72812.10
26. Qin XZ, Demarco J, Ip DP (1995) J Chromatogr A 707:245–254. doi:10.1016/0021-9673(95)00349-R
27. ICH Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1) (2005). International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use
28. Shabir GA (2003) J Chromatogr A 987:57–66. doi:10.1016/S0021-9673(02)01536-4