

Artículo original

Validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa para la cuantificación de hidroclorotiazida y clorhidrato de propranolol en formas farmacéuticas sólidas.

Validation of an analytical method by reverse phase high performance liquid chromatography for quantification of hydrochlorothiazide and propranolol hydrochloride in solid dosage forms.

Guillén-Guillén Ana M^{1*}, Brunetto Rosario², León-Leal Andrés¹, Galignani Máximo², Lobatón-Álvarez Robert¹, Colón-Useche Sarín¹, Calderón-González Laura¹.

¹ Laboratorio de Análisis de Medicamentos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ² Laboratorio de Espectroscopia Molecular, Facultad de Ciencias; Universidad de Los Andes (ULA). Mérida C.P. 5101, República Bolivariana de Venezuela.

Recibido mayo 2015 - Aceptado diciembre 2015

RESUMEN

Se validó un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa para cuantificar simultáneamente hidroclorotiazida y clorhidrato de propranolol en formulaciones farmacéuticas sólidas, además con verificación de la presencia de clorotiazida como impureza de síntesis. La separación se realizó en una columna X-Bridge™ C₁₈ 250 mm x 4,6 mm x 5 µm a 35 °C. A la fase móvil, constituida por una solución amortiguadora de KH₂PO₄ 0,1 M y 1-heptano sulfonato de sodio 0,05 M a un pH 3,0 y acetonitrilo como solvente orgánico, se aplicó un programa de gradiente de elución. La respuesta, obtenida con un detector de fotodiodos en serie a 270 nm, fue lineal en intervalo de concentración de 0,1 - 3,5 µg mL⁻¹ para clorotiazida, de 1,4 - 34,0 µg mL⁻¹ para hidroclorotiazida y de 2,2 - 53,0 µg mL⁻¹ para clorhidrato de propranolol. La exactitud del procedimiento se estimó con el método de referencia farmacopeico y el de adición de estándar, arrojando valores de recuperación entre 98 - 102 %, en ambos casos. La precisión intra-día e inter-día expresada por el coeficiente de variación, fue menor a un 2 % con un n = 5 y n = 6 en cada caso. Además, se comprobó la selectividad y la estabilidad del fármaco en las condiciones de análisis. La ventaja

del método es su aplicabilidad en todo el ciclo de vida del producto farmacéutico.

PALABRAS CLAVE

Validación, cromatografía líquida de alta resolución, hidroclorotiazida, clorhidrato de propranolol, clorotiazida.

ABSTRACT

An analytical method was validated by reverse phase high performance liquid chromatography to simultaneously quantify propranolol hydrochloride and hydrochlorothiazide in solid dosage formulations, in addition to verifying the presence of chlorothiazide as impurity of the synthesis. The separation was performed on a C18 column X-Bridge™ 250 mm x 4.6 mm x 5 µm to 35 °C. The mobile phase, consisting of a buffer solution of KH₂PO₄ 0.1 M, 1-heptane sulphonate 0.05 M at pH 3.0 and acetonitrile as organic solvent, a gradient elution program was applied. The response obtained with a diode array system at 270 nm was linear over the concentration range of 0.1 to 3.5 µg mL⁻¹ for chlorothiazide, from 1.4 to 34.0 µg mL⁻¹ for hydrochlorothiazide and from

2.2 to 53.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for propranolol hydrochloride. The accuracy of the method is estimated using the method of reference the Pharmacopoeia and the addition standard, obtaining recovery values between 98-102% in both cases. The intra-day and inter-day expressed by the coefficient of variation was less precision to 2 % with $n = 5$ and $n = 6$ in each case. In addition, selectivity and stability of the drug in the analysis conditions are checked. The advantage of the method is its applicability in all the life-cycle of the pharmaceutical.

KEY WORDS

Validation, high performance liquid chromatography, hydrochlorothiazide, propranolol hydrochloride, chlorothiazide.

INTRODUCCIÓN

La hidroclorotizida (HCTZ) y el clorhidrato de propranolol (CHP) (Fig. 1), son fármacos antihipertensivos de primera línea utilizados para el tratamiento de la hipertensión arterial y se encuentran en el Listado de Medicamentos Esenciales emitido por la Organización Mundial de la Salud (OMS). De acuerdo al mecanismo de acción HCTZ actúa como un diurético y CHP como un bloqueador β -adrenérgico [1].

HCTZ es un fármaco del grupo de los ácidos débiles con características hidrofílicas, con un Log P de -0,07 y valores de pKa de 7,0 y 9,2 [2]. Presenta una impureza de síntesis conocida como clorotiazida (CTZ), con características muy similares a ella, su única diferencia estructural es debido a su vínculo oleofínico (Figura 1). Se ha determinado que posee de diez a veinte veces menos actividad que la HCTZ y es más tóxica [3].

CHP es un fármaco débilmente básico, que como base, es lipofílico con un Log P de 3,1 y un pKa de 9,4 [2].

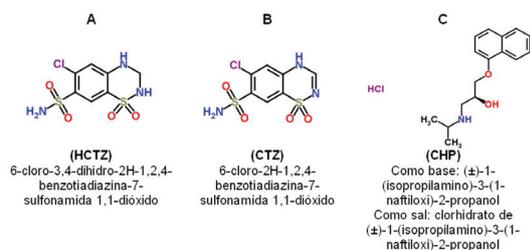


Fig. 1. Estructuras químicas de hidroclorotiazida (A), clorotiazida (B) y clorhidrato de propranolol (C) [2].

HCTZ y CHP se encuentran como ingredientes activos en formas farmacéuticas sólidas, tanto para monoterapia como en combinaciones fijas entre ellos o con otros fármacos antihipertensivos que ayudan a mejorar el cumplimiento terapéutico y facilitan la consecución de los objetivos a largo plazo [4-8].

En publicación previa [9], se presentó una metodología analítica para el control de estos fármacos en sus formulaciones farmacéuticas, quedando comprobada la robustez y la optimización de los parámetros cromatográficos por diseño factorial. Sin embargo, para garantizar un alto grado de seguridad en la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y atributos de calidad pautados en el desarrollo metodológico, se requiere el establecimiento de la evidencia documental de que el procedimiento analítico conduce a su uso previsto dentro de los intervalos definidos, por lo que se debe hacer uso de la validación [10], de acuerdo a directrices de la Conferencia Internacional sobre Armonización de Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano (ICH) [11], la Agencia de Drogas y Alimentos (FDA) [12] y las farmacopeas, en particular la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) [13]. Comparaciones de estas guías han sido reportadas por varios autores, entre ellos Chandran & Singh en el 2007 [14].

El presente trabajo tiene como objetivo validar un método por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (CLAR-FR), alternativo a los métodos reportados por la USP 37, aplicable en el análisis rutinario de tabletas de HCTZ en combinación con CHP y detectando CTZ como impureza de síntesis. Las cualidades que dicho método debe presentar son: precisión, exactitud, sensibilidad, selectividad y robustez, además de capacidad de automatización y la versatilidad de su aplicabilidad en las valoraciones a lo largo del ciclo de vida del producto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Instrumentos. Se empleó un cromatógrafo marca Waters®, provisto de: bomba cuaternaria modelo 600E, desgasificador AF en línea, inyector automático modelo 717 Plus y detector UV-Vis de arreglo de diodos modelo 2996, todos controlados con el software Empower 2. Se utilizó una columna X-Bridge™ C₁₈ 250 mm x 4,6 mm x 5 μm , y una pre-columna C₁₈ 20 mm x 4,6 mm x 5 μm todos

de la marca Waters®, Milford, MA, EE.UU.; a una temperatura de 35 °C.

La fase móvil consistió en una solución amortiguadora denominada solución A constituida por fosfato de potasio monobásico anhidro (KH₂PO₄) 0,10 M y 1-heptano sulfonato de sodio (1-HSS) 0,05 M, ajustada con ácido fosfórico (H₃PO₄) a pH 3,0; y acetonitrilo como solvente B. La elución de los analitos se controló con un programa de gradiente de elución (Tabla 1) a un flujo de 1 mL min⁻¹ y para un volumen de inyección de 50 µL. La detección se realizó a una longitud de onda de 270 nm.

TABLA 1
Sistema de gradiente.

Tiempo (min)	% Solución A	% Solvente B	Elución	Cambio de la composición del solvente
0	80	20	Equilibrio	-
5	80	20	Isocrático	-
6	30	70	Gradiente lineal	50 % B min ⁻¹
8	30	70	Isocrático	-
9	80	20	Gradiente lineal	50 % B min ⁻¹
17	80	20	Re-equilibrio	-

Reactivos. Todos los disolventes utilizados se adquirieron de grado CLAR (Merck®, EgaA, Alemania) y el agua ultrapura obtenida de un sistema Milli-Q (Millipore®, Bedford, MA, EE.UU.). Los reactivos empleados fueron de grado analítico. Los estándares de referencia de HCTZ (99 %), CHP (99 %), bisoprolol hemifumarato sal (> 98 %) y atenolol (99 %) se obtuvieron de Sigma-Aldrich®, (Shanghai, China), la CTZ del Committee on National Formulary of the American Pharmaceutical Association y las materias primas provienen de los Laboratorios Ipca Limited. Los productos comerciales evaluados fueron Di-Eudrin® tabletas de 25 mg de HCTZ e Inderal® tabletas de 40 mg de CHP.

Soluciones de trabajo. La solución madre de CTZ (0,20 mg mL⁻¹) patrón de referencia, se preparó en metanol. Las soluciones madre de HCTZ (0,28 mg mL⁻¹) y de CHP (0,44 mg mL⁻¹) patrón de referencia se prepararon individualmente utilizando HCl 0,01 M.

Las soluciones de trabajo de concentraciones 0,003 mg mL⁻¹ de CTZ, 0,028 mg mL⁻¹ de HCTZ, y 0,044 mg mL⁻¹ de CHP, se diluyeron con HCl 0,01 M y se prepararon diariamente. Todas las

soluciones fueron filtradas con membranas GHP (Acrodisc®, Waters® Milford MA EE.UU.) de 0,45 µm de tamaño de poro.

Validación del método analítico.

(i) Sistema instrumental. Los requisitos previstos son: precisión, linealidad e idoneidad del sistema [10]. Para la precisión, se monitorearon 15 soluciones de trabajo de cada uno de los analitos en estudio, en diferentes puntos de control durante un día de análisis (inicio, medio y final), y evaluando el porcentaje de coeficiente de variación (% CV). La linealidad se analizó en el intervalo de 0,1 a 3,0 µg mL⁻¹, 2,8 a 56,2 µg mL⁻¹ y 4,4 a 87,6 µg mL⁻¹ para CTZ, HCTZ y CHP respectivamente, constituido cada intervalo por 11 puntos de concentración, elaborados por triplicado y evaluando los supuestos de aplicación estadísticos del modelo de regresión lineal. Para la idoneidad se requirió de cinco réplicas de cada una de las soluciones de trabajo de CTZ, HCTZ y CHP y la verificación experimental del número de platos teóricos (N), factores de resolución (R), simetría o cola (T) y de capacidad (k'), además del tiempo de retención (t_R) y el porcentaje de CV del sistema.

(ii) Selectividad. La selectividad del método analítico fue evaluada por la separación de los picos de productos de degradación y los picos de los analitos principales. Adicionalmente por la evaluación de la selectividad del método en presencia de otros β-bloqueantes (atenolol a 39,2 µg mL⁻¹ y bisoprolol 21,0 µg mL⁻¹) [10, 15-16].

Para la obtención de los productos de degradación se aplicaron tratamientos de estrés artificiales sustentados por la bibliografía [10, 16-17]. Se trataron 5 mL de solución madre de HCTZ y de CHP por separado para cada uno de los siguientes tratamientos: 20 mL de HCl 0,25 M para una hidrólisis ácida y 20 mL de NaOH 0,25 M para una hidrólisis alcalina, ambos tratamientos por 1 hora (h) a 60 °C. La estabilidad en medio alcohólico se realizó con 20 mL de metanol y la degradación oxidativa con 20 mL de H₂O₂ al 10 %, ambos por 4 h a 60 °C. Se aplicó la termólisis a la materia prima a 70 °C por 15 días antes de preparar las soluciones de trabajo de forma convencional.

(iii) Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC). Para determinar el LD y el LC se utilizó la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de la ordenada de origen aplicando las fórmulas: LD = 3,3xSa/b y LC = 10xSa/b [10, 18-19]. Se elaboraron tres réplicas

de curvas de calibración para cada uno de los analitos, con ocho puntos por pesada individual con concentraciones en el rango de 0,1 a 3,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para CTZ, de 1,4 a 33,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para HCTZ y de 2,2 a 52,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para CHP.

(iv) Linealidad del método. La linealidad fue evaluada preparando, por pesada individual, ocho soluciones madre de cada analito en estudio, destinando cada solución para un punto de la curva de calibración, realizándolas por triplicado. Por dilución se dispusieron soluciones mezclas de los tres analitos a 0,1; 0,3; 0,6; 1,2; 1,7; 2,3; 2,9 y 3,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para CTZ; 1,4; 2,8; 5,6; 11,2; 16,8; 22,4; 28,0 y 33,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para HCTZ; y 2,2; 4,4; 8,8; 17,6; 26,4; 35,2; 44,0 y 52,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para CHP. El conjunto de 24 soluciones se analizó para trazar una curva de calibración que concedió los parámetros de regresión [10]. Para el análisis estadístico se asumió el 95 % de confianza.

(v) Estabilidad de las soluciones. Las tres curvas de calibración elaboradas para cada analito la linealidad del método (Punto iv), fueron leídas en el tiempo 0, 48 y 96 h a temperatura ambiente, para evaluar el valor de la pendiente de la recta, y corroborar que permanecían estables en el tiempo.

(vi) Exactitud del método. Se evaluó aplicando el método de referencia USP y el método de adición estándar [10, 14, 19]. En la comparación con el método de referencia (métodos analíticos USP de HCTZ y CHP para materia prima) [13], se efectuó estadísticamente la homogeneidad de varianzas y se realizó la comparación de dos medias con grupos independientes [10]. Para el método de adición de estándar, se prepararon curvas de calibración de HCTZ y CHP, fueron enriquecidas con soluciones de trabajo de Di-Eudrin® e Inderal® de 0,25 mg mL^{-1} de HCTZ y 0,40 mg mL^{-1} de CHP; calculando el porcentaje de recuperación. Por lo que fue necesario preparar curvas de calibración con soluciones estándar de referencia para HCTZ y CHP para generar las ecuaciones de la recta y se calcularon las respuestas experimentales netas en la proporción del 40, 60, 80, 100, 120 % del valor declarado de HCTZ (0,028 mg mL^{-1}) y de CHP (0,04 mg mL^{-1}).

(vii) Precisión del método. Para determinar la precisión se evaluaron las respuestas experimentales netas de soluciones de materia prima a 0,028 mg mL^{-1} de HCTZ y 0,044 mg mL^{-1} de CHP. Se prepararon curvas de calibración por pesada

individual en cada punto, a la concentración descrita en la linealidad del método. La precisión intra-día se evaluó comparando las respuestas de las muestras para el análisis de materia prima, al ser procesadas con cada una de las ecuaciones de la recta ($n = 3$), obtenidas en un día de trabajo [10, 14, 18]. La precisión intermedia (inter-día) se evaluó por la repetición de los análisis en diferentes días y preparaciones de soluciones, diluentes y fase móvil [10, 14, 18].

(viii) Robustez. La robustez fue evaluada y discutida en el proceso de desarrollo y optimización del método [9], por recomendación de la ICH de incluir la robustez en una fase apropiada del desarrollo del método y no en la validación propiamente dicha, para evitar validar un método poco robusto y realizar el ajuste necesario en caso de identificar el factor crítico [10, 11]. Para ello se aplicó un diseño factorial completo de ocho experimentos para evaluar el nivel de influencia del pH, concentración molar del KH_2PO_4 y 1-HSS de la solución amortiguadora en la respuesta termodinámica del sistema. Se empleó un diseño factorial fraccionado de ocho experimentos para estudiar la respuesta cinética del sistema con respecto a factores como: solvente (% B), temperatura, flujo y pH.

RESULTADOS

Sistema instrumental. La precisión expresada como el porcentaje de CV, se muestra en la Tabla 2.

TABLA 2
Valores de precisión del sistema cromatográfico.

Analitos	Concentración (mg mL^{-1})	Promedio de áreas ($n = 15$)	s	% CV
HCTZ	0,0277	5125406	9546	0,19
CHP	0,0438	1476046	7847	0,53

s = desviación; % CV = porcentaje de coeficiente de variación.

Para la linealidad se observó que las curvas de calibración son lineales en el intervalo de concentración estudiado para todos los casos, con un coeficiente de determinación $> 0,99$. Los estadísticos de prueba se resumen en la Tabla 3.

Los resultados de la idoneidad del sistema cromatográfico se encuentran resumidos en la Tabla 4, junto con el criterio de aceptación establecido por la USP [13]. La Fig. 2 muestra el cromatograma con la separación de los picos de los analitos.

TABLA 3
Parámetros de linealidad del sistema cromatográfico.

Analito	Intervalo dinámico ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Ecuación de la recta $Y = a + bX$	r^2	s_b	s_a	IC _b	IC _a	% CV
CTZ	0,1 - 3,0	$Y = -6,70.10^3 + 1,67.10^8 X$	0,9964	$1,80.10^6$	$2,42.10^3$	$\pm 3,67.10^6$	$\pm 4,94.10^3$	8,52
HCTZ	2,8 - 56,2	$Y = -6,16.10^4 + 1,86.10^8 X$	0,9999	$2,34.10^6$	$6,20.10^3$	$\pm 4,77.10^5$	$\pm 1,27.10^4$	2,58
CHP	4,4 - 87,6	$Y = -7,58.10^3 + 3,20.10^7 X$	0,9999	$6,28.10^4$	$2,59.10^3$	$\pm 1,28.10^5$	$\pm 5,29.10^3$	2,12

n = número de determinaciones (n = 33); número de soluciones ensayadas por replica = 11 x 3; ecuación de la recta = Y: área de pico, a: intercepto, b: pendiente; r^2 = coeficiente de determinación (> 0,98); s_b = desviación estándar de la pendiente; s_a = desviación estándar del intercepto; IC_b = intervalo de confianza al 95 % de b; IC_a = intervalo de confianza al 95 % de a; % CV = porcentaje de coeficiente de variación de los factores de respuesta (% CV < 5 para principio activos, % CV < 10 para compuestos relacionados) [20-22].

TABLA 4
Ensayo de idoneidad del sistema.

Analito	Área	% CV	N	t_R	k'	T	R
CTZ	281322	0,20	14006	4,68	0,38	1,24	-
HCTZ	4917352	0,10	16547	5,05	0,50	1,26	2,28
CHP	1426956	0,20	327173	14,21	3,18	1,13	69,22
Aceptación	-	$\leq 2\%$	$N > 2000$	-	$K' > 2^*$	$T \leq 2$	$R \geq 2$

Número de replicas = 5; % CV = porcentaje de coeficiente de variación de las áreas; N = platos teóricos; t_R = tiempo de retención; k' = factor de capacidad; T = factor cola; R = resolución; *factor de capacidad: $0,5 > k' < 20$ [20].

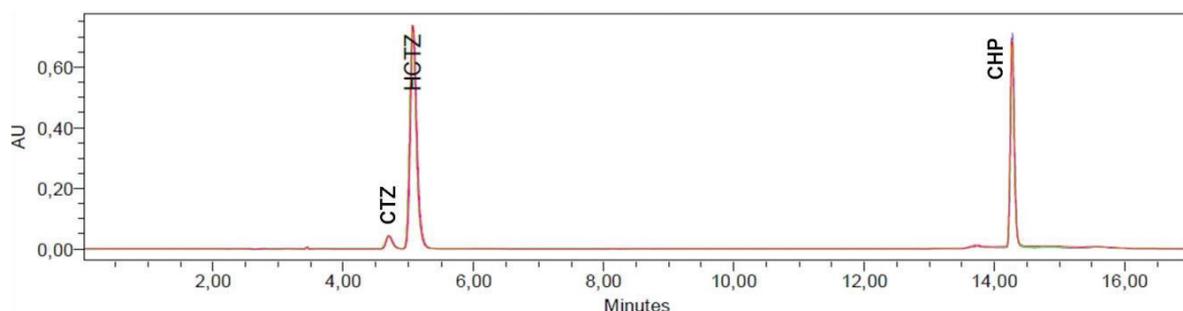


Fig. 2. Cromatograma de la separación de CTZ, HCTZ y CHP.

Selectividad. La selectividad del método desarrollado aplicando tratamientos de estrés artificiales, pudo ser demostrada por los parámetros cromatográficos de t_R y R (Tabla 5). Como se evidencia los picos de interés (HCTZ y CHP) son resueltos en la línea base y están libres de interferencias (Fig. 3). Se complementó con la pureza de picos cromatográficos de HCTZ y CHP evaluado por el detector de arreglo de diodos (Tabla 5).

Se observó que la HCTZ da un producto de degradación después de ser sometido a cada uno

de los procesos de estrés, con un porcentaje de discrepancia en el valor del área de pico de HCTZ (materia prima) en condiciones normales de 8,95 % (n = 5) con respecto al pico después de ser sometido a hidrólisis ácida; 2,75 % en la hidrólisis alcalina (n = 3) y de 3,74 % en oxidación, sin cambios significativos para el tratamiento en alcohol. En el caso de Di-Eudrin[®] (producto) de 25 mg se presentó un valor de 3,14 % (n = 3) entre el área de la muestra sin tratamiento y la que fue tratada por hidrólisis ácida. En las muestras de CHP y de Inderal[®] de 40 mg no se presentaron cambios en los cromatogramas.

En la evaluación de los analitos con compuestos de gran similitud estructural al CHP como lo son ATN y BP, se logró la separación de los picos, obteniendo los resultados que se resumen en la Tabla 6 y se ilustran en la Fig. 4. El t_R de BP y de CHP son muy cercanos, con una $R < 1,5$; pero si puede ser detectada la presencia de este primer

compuesto en un mismo cromatograma (Fig. 4). La pureza de pico del BP por su cercanía al CHP, genera un error en el software al momento de implementar el cálculo, pero es comprobado que el pico de CHP es puro debido a que el ángulo de pureza es menor su ángulo de umbral.

TABLA 5
Resultados del estudio de tratamientos de estrés para HCTZ y CHP.

Analito (n = 3)	Estudio de estrés	t_R	R	Promedio de área (n = 3)	% CV (totales)	*Pureza de pico
HCTZ	Sin estrés	5,07	-	5180145	4,97	Puro
	H. ácida	5,05	-	4550016		Puro
	H. alcalina	5,04	-	5041312		Puro
	Oxidación	5,04	-	4993564		Puro
	Alcohólica	5,05	-	5204745		Puro
CHP	Sin estrés	14,30	-	1463425	5,65	Puro
	H. ácida	14,25	-	1504035		Puro
	H. alcalina	14,25	-	1424722		Puro
	Oxidación	14,25	-	1366681		Puro
	Alcohólica	14,25	-	1587292		Puro
Producto de degradación	Sin estrés	N/I	-	N/I	-	-
	H. ácida	4,49	3,13	480541		Puro
	H. alcalina	4,48	3,19	41426		Puro
	Oxidación	4,48	3,19	18743		Puro
	Alcohólica	N/I	-	N/I		-

*Pureza de pico = el ángulo de pureza es menor al ángulo de umbral; R = entre producto degradación y la HCTZ; N/I = no indica producto de degradación.

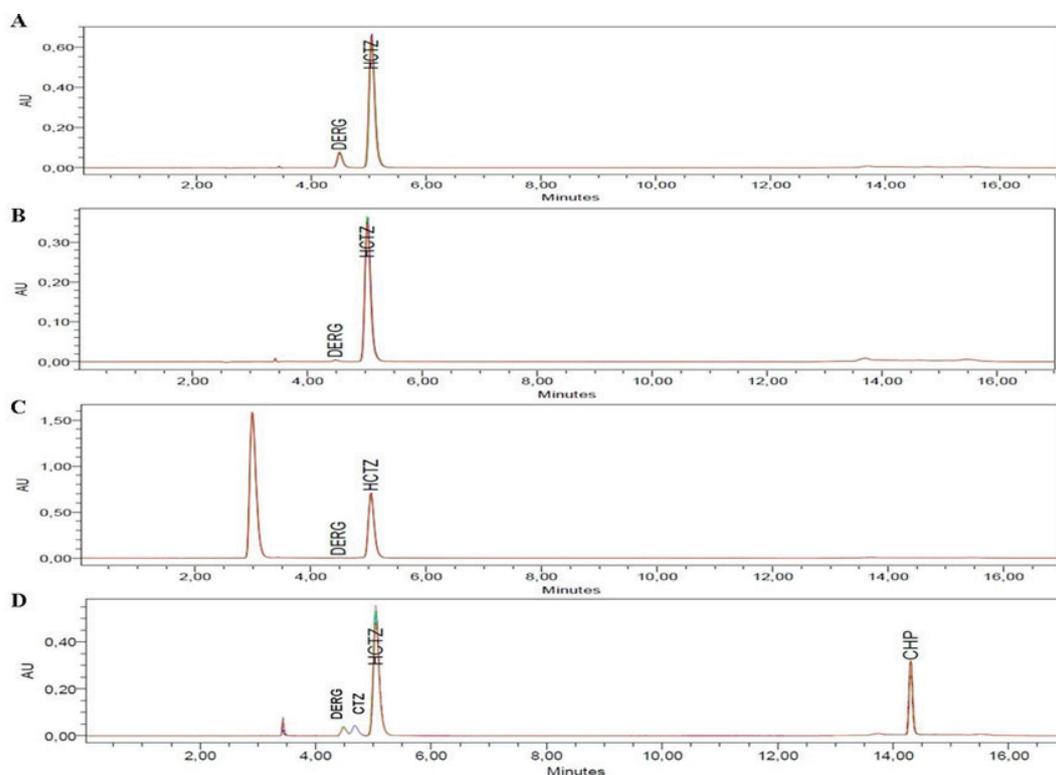


Fig. 3. Cromatograma de la separación de los productos de degradación (DEGR) de HCTZ por: A) hidrólisis ácida (DEGR $t_R = 4,49$; HCTZ $t_R = 5,05$); B) hidrólisis básica (producto de degradación $t_R = 4,48$; HCTZ $t_R = 5,04$); C) proceso de oxidación (producto de degradación $t_R = 4,49$; HCTZ $t_R = 5,05$); y D) mezcla de componentes (producto de degradación $t_R = 4,49$; CTZ $t_R = 4,70$; HCTZ $t_R = 5,05$ y CHP $t_R = 14,25$).

TABLA 6

Resultados del estudio de tratamientos de estrés para HCTZ y CHP.

Análito (n = 3)	R		Área	t_R	T	Pureza de pico
ATN	HCTZ-ATN = 6,13 % CV = 1,61	ATN-CHP = 39,77 % CV = 0,79	234176	6,51	1,20	Puro
BP	HCTZ-BP = 59,36 % CV = 0,86	BP-CHP = 1,19 % CV = 1,50	162192	14,17	1,10	Error en pureza

HCTZ t_R : 5,06; CHP t_R : 14,31; HCTZ = 0,014 mg mL⁻¹, CHP = 0,022 mg mL⁻¹, ATN = 0,040 mg mL⁻¹, CHP = 0,020 mg mL⁻¹.

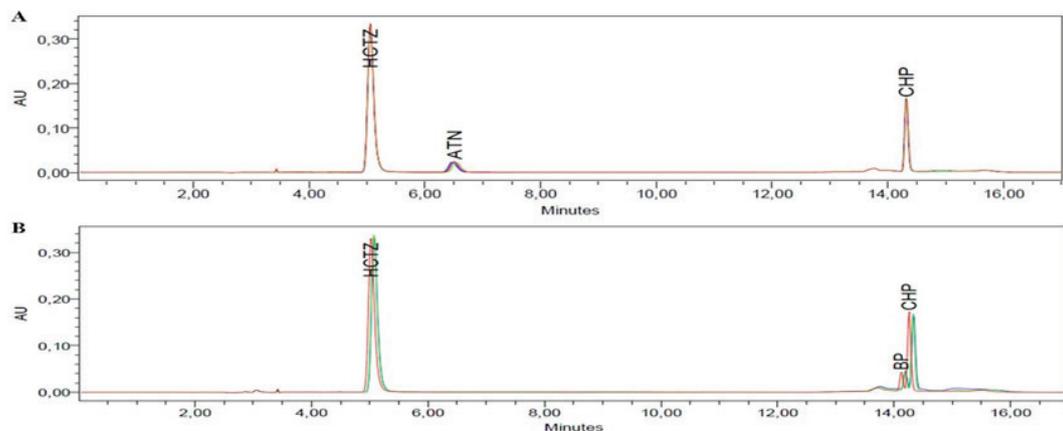


Fig. 4. Cromatogramas de selectividad del método analítico con otros β -bloqueantes: A) HCTZ, ATN y CHP; y B) HCTZ, BP y CHP.

Límite de detección y límite de cuantificación.

En la Tabla 7 se presentan los resultados donde se establece la concentración mínima a la cual los analitos pueden detectarse y cuantificarse en forma confiable.

TABLA 7

Resultados del límite de detección y el límite de cuantificación.

Analitos	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
CTZ	0,09	0,29
HCTZ	0,58	1,19
CHP	0,47	1,43

Datos obtenidos en relación con una curva de calibración: K = 8 (número de series); N = 3 (número de replicas); n = 24 (número de determinaciones).

Linealidad del método. Se observó que las curvas de calibración son lineales en el intervalo de concentración estudiado para los tres analitos. Los estadísticos de prueba para la evaluación de la linealidad se resumen en las Tablas 8 y 9.

Estabilidad de las soluciones. Las curvas de calibración mostraron CV menores al 3 % en la comparación de las pendientes de la recta para HCTZ y CHP en los días de estudio (Tabla 10), avalados por la relación estadística con un 95 % de confianza (Tabla 11).

Exactitud del método.

(i) Comparación con el método de referencia. Al comparar los porcentajes promedios de dos métodos analíticos (método propuesto y el método USP 37) a una concentración única de analito, se obtuvieron los resultados que se describen en la Tabla 12, con el tratamiento estadístico de comparación de dos medias de series no apareadas [10].

(ii) Método de adición de estándar. Curva Di-Eudrin[®] + Inderal[®] + CTZ: Los cromatogramas obtenidos demostraron que la mezcla de las

muestras, enriquecidas con solución de CTZ no presentan interferencia en el área de pico de HCTZ y CHP. El valor de porcentaje de discrepancia entre el valor del área de pico de Di-Eudrin[®] y de Di-Eudrin[®] + CTZ y el valor del área de pico de Inderal[®] y de pico de Inderal[®] + CTZ, se muestran en la Tabla 13. El blanco (sin enriquecer) no presentó área de pico para CTZ en el t_R correspondiente. El valor estadístico de homogeneidad de varianzas F de Snedecor (P > 0,05) se muestra en la Tabla 14.

Curva Di-Eudrin[®] + Inderal[®] + HCTZ: La curva de calibración generada con soluciones estándar de referencia (1,4 - 34,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para HCTZ presenta una ecuación $Y = 1,749.10^7X - 2,004.10^4$ ($r^2 = 0,9993$; test de linealidad y proporcionalidad satisfactorios). Para determinar la exactitud del método se calcularon las respuestas experimentales netas para la proporción ensayada del valor declarado de HCTZ (0,028 mg mL^{-1}) y se compararon con los resultados obtenidos por interpolación en la curva de calibración para las mismas concentraciones de analito, obteniendo los datos de la Tabla 15.

Curva Di-Eudrin[®] + Inderal[®] + CHP: La curva de calibración generada con soluciones estándar de referencia (2,2 - 54,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para CHP presenta una ecuación $Y = 3,184.10^7X - 4,121.10^2$ ($r^2 = 0,9997$; test de linealidad y proporcionalidad satisfactorios). Para determinar la exactitud del método se calcularon las respuestas experimentales netas para la proporción ensayada del valor declarado de CHP (0,044 mg mL^{-1}) y se compararon con los resultados obtenidos por interpolación en la curva de calibración para las mismas concentraciones de analito obteniendo los datos de la Tabla 16.

TABLA 8

Parámetros de linealidad del método analítico.

Analito	Intervalo dinámico ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Ecuación de la recta $Y = a + bX$	r^2	s_b	s_a	IC_b	IC_a	% CV
CTZ	0,1 - 3,5	$Y = 8,42.10^1 + 7,80.10^7X$	0,9878	$1,85.10^6$	$3,59.10^3$	$\pm 3,83.10^6$	$\pm 7,45.10^3$	6,33
HCTZ	1,4 - 33,6	$Y = -3,11.10^3 + 1,78.10^8X$	0,9986	$1,44.10^6$	$2,76.10^4$	$\pm 2,99.10^6$	$\pm 5,73.10^4$	4,03
CHP	2,2 - 52,8	$Y = -2,37.10^3 + 3,19.10^7X$	0,9997	$1,11.10^5$	$3,32.10^3$	$\pm 2,29.10^5$	$\pm 6,89.10^3$	4,43

n = número de determinaciones (n = 24); número de soluciones ensayadas por replica = 8 x 3; ecuación de la recta = Y: área de pico, a: intercepto, b: pendiente; r^2 = coeficiente de determinación (> 0,98); s_b = desviación estándar de la pendiente; s_a = desviación estándar del intercepto; IC_b = intervalo de confianza al 95 % de b; IC_a = intervalo de confianza al 95 % de a; % CV = porcentaje de coeficiente de variación de los factores de respuesta (% CV < 5 para principio activos, % CV < 10 para compuestos relacionados) [20-22].

TABLA 9

Estadístico experimental para la pendiente e intercepto de las curvas de CTZ, HCTZ y CHP.

Analito	t_{exp} pendiente	t_{exp} intercepto	t_{tab} (n-2)	G_{exp}	G_{tab} ($\alpha=0,05$; $k=8$; $N=3$)	$F_{1 exp}$	$F_{2 exp}$
CTZ	42,26	-0,023	2,074	0,3267	0,4377	1786	0,90
HCTZ	123,58	-0,113	2,074	0,2372	0,4377	15273	1,62
CHP	288,56	-0,794	2,074	0,3515	0,4377	83268	2,61

$n = 24$; grados de libertad (gl) = $n-2$; significancia (α) = $0,05$; t_{exp} y t_{tab} = valor t de Student experimental y tabulado; F_{tab} = valor de F de Snedecor tabulado, F_{tab} ($\alpha=0,05$; $k=8$; $N=3$) = 8,845.

TABLA 10

Estadístico experimental para la pendiente e intercepto de las curvas de CTZ, HCTZ y CHP.

Analito	Pendientes (n = 3)	0 horas	48 horas	96 horas	Promedio total de las pendientes (n = 9)
HCTZ	Promedio	178349358	177436333	176684420	177490037
	% CV	1,48	1,74	1,72	1,49
CHP	Promedio	31920497	32802155	32096576	32273076
	% CV	0,29	4,06	0,24	2,42

TABLA 11

Relación estadística de la pendiente de la curva de calibración del tiempo 0 y 96 horas.

Valor estadístico con un 95 % de confianza	HCTZ	CHP	Estadístico tabulado
$F_{exp(n-1)}$	0,006	0,428	0,490
$t_{exp(n-1+n-2+4)}$	0,013	0,076	2,015

TABLA 12

Relación estadística de la pendiente de la curva de calibración del tiempo 0 y 96 horas.

Muestras	HCTZ		CHP	
	Método propuesto (%)	Método USP (%)	Método propuesto (%)	Método USP (%)
Promedio ($\pm s$)	100,21 (0,66)	100,66 (0,86)	100,18 (1,10)	100,55 (1,49)
% CV	0,43	0,75	1,20	2,23
n	6	5	6	4
	$F_{exp} = 0,575$; $F_{tab} = 6,256$ ($gl_a = 5$; $gl_b = 4$; $\alpha = 0,05$)		$F_{exp} = 0,541$; $F_{tab} = 9,013$ ($gl_a = 5$; $gl_b = 3$; $\alpha = 0,05$)	

s = desviación; n = número de muestras; gl = grados de libertad; α = significancia

TABLA 13

Valores obtenidos para comprobar el grado de discrepancia entre las determinaciones en presencia o ausencia de CTZ en la matriz.

Áreas de pico	Valor de discrepancia
Di-Eudrin® vs Di-Eudrin® + CTZ	1,61 % (n = 5)
Inderal® vs Inderal® + CTZ	0,14 % (n = 6)

TABLA 14

Valores de la prueba de homogeneidad de varianzas F de Snedecor.

F de Snedecor	
F experimental	F tabla
HCTZ $F_{exp 3,3 n-1; \alpha=0,05} = 3,502$	HCTZ $F_{tab 3,3 n-1; \alpha=0,05} = 9,276$
CHP $F_{exp 4,4 n-1; \alpha=0,05} = 5,777$	CHP $F_{tab 4,4 n-1; \alpha=0,05} = 6,388$

TABLA 15

Resultados obtenidos para la determinación de la exactitud por el método de adición de estándar para la curva de HCTZ.

Di-Eudrin® + Inderal® + HCTZ (n = 5)	Mx + 40 %	Mx + 60 %	Mx + 80 %	Mx + 100 %	Mx + 120 %
Recuperación (%)	100,15	101,66	99,69	102,88	98,95

Obteniendo un valor promedio de 100,67 % de recuperación, con s = 1,58 y CV = 1,57 %, confirmado por $t_{exp} = 0,947$; $t_{tab} = 2,776$ ($gl = 4$; $\alpha = 0,05$).

TABLA 16

Resultados obtenidos para la determinación de la exactitud por el método de adición de estándar para la curva de CHP.

Di-Eudrin® + Inderal® + CHP (n = 5)	Mx + 40 %	Mx + 60 %	Mx + 80 %	Mx + 100 %	Mx + 120 %
Recuperación (%)	98,24	99,71	97,97	102,05	99,27

Obteniendo un valor promedio de 99,45 % de recuperación, con s = 1,62 y CV = 1,63 %, confirmado por $t_{exp} = 0,758$; $t_{tab} = 2,776$ ($gl = 4$; $\alpha = 0,05$).

Precisión del método. Las curvas de calibración elaboradas durante el día (precisión intra-día) y en los tres días de análisis (precisión inter-día), resultaron lineales en el intervalo de concentración estudiado para ambos analitos, con $r^2 > 0,99$ y cumpliendo con los criterios establecidos de linealidad y proporcionalidad con un nivel de confianza del 95 % (Tablas 17 y 18).

Las respuestas experimentales netas de las materias primas en los ensayos de precisión inter e intra-día para los tres analitos se describen en las Tablas 19 y 20.

Robustez del método. El diseño factorial completo (2^3) analizado en publicación anterior [9], demostró por la medida del k' , la gran robustez del método analítico y permitió confirmar el comportamiento similar de CTZ y HCTZ ante la respuesta termodinámica del sistema. Al observar los otros parámetros del sistema cromatográfico como los son t_R , T, R, área de picos y N, se observó que las respuestas cumplen los criterios de aceptación de la USP con CV menor al 6 %, para los tres analitos de interés (Tabla 21).

TABLA 17
Parámetros de las curvas de calibración intra-día.

Analito	Intervalo dinámico ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Ecuación de la recta $Y = a + bX$		r^2	S_b	S_a	$t_{\text{exp pendiente}}$	$t_{\text{exp intercepto}}$
HCTZ	1,4 - 34,0 % CV* = 4,02; $G_{\text{exp}}^* = 0,237$	1	$Y = 2,004 \cdot 10^4 + 1,766 \cdot 10^8 X$	0,9993	$1,870 \cdot 10^6$	$2,730 \cdot 10^4$	94,436	0,734
		2	$Y = -2,194 \cdot 10^4 + 1,812 \cdot 10^8 X$	0,9995	$1,681 \cdot 10^6$	$2,449 \cdot 10^4$	107,841	0,896
		3	$Y = -8,070 \cdot 10^4 + 1,771 \cdot 10^8 X$	0,9975	$3,565 \cdot 10^6$	$5,233 \cdot 10^4$	49,680	0,154
CHP	2,2 - 53,0; % CV* = 4,43; $G_{\text{exp}}^* = 0,352$	1	$Y = -4,121 \cdot 10^2 + 3,200 \cdot 10^7 X$	0,9997	$2,355 \cdot 10^5$	$5,414 \cdot 10^3$	135,881	0,076
		2	$Y = -3,595 \cdot 10^3 + 3,219 \cdot 10^7 X$	0,9999	$1,203 \cdot 10^5$	$2,739 \cdot 10^3$	267,527	1,313
		3	$Y = -3,906 \cdot 10^3 + 3,174 \cdot 10^7 X$	0,9996	$2,423 \cdot 10^5$	$5,556 \cdot 10^3$	130,983	0,703

n = número de determinaciones por pesada individual (n = 8); ecuación de la recta= Y: área de pico, a: intercepto, b: pendiente; r^2 = coeficiente de determinación (> 0,98); S_b = desviación estándar de la pendiente; S_a = desviación estándar del intercepto; $G_{\text{tab}}^* (\alpha=0,05; K=8; N=3) = 0,4377$; *% CV= porcentaje de coeficiente de variación de los factores de respuestas de las tres rectas (< 5 %); valor de $t_{\text{tab}} (\alpha=0,05; n-1) = 2,365$; para la pendiente debe $t_{\text{exp}} > t_{\text{tab}}$ y para el intercepto debe $t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$.

TABLA 18
Parámetros de las curvas de calibración inter-día.

Analito	Intervalo dinámico ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Ecuación de la recta $Y = a + bX$		r^2	S_b	S_a	$t_{\text{exp pendiente}}$	$t_{\text{exp intercepto}}$
CTZ	0,1 - 3,5 % CV* = 4,03; $G_{\text{exp}}^* = 0,385$	1	$Y = -3,725 \cdot 10^2 + 9,142 \cdot 10^7 X$	0,9994	$8,913 \cdot 10^5$	$1,361 \cdot 10^3$	102,580	2,737
		2	$Y = -1,634 \cdot 10^3 + 9,194 \cdot 10^7 X$	0,9978	$1,759 \cdot 10^6$	$2,804 \cdot 10^3$	52,258	0,583
		3	$Y = 1,380 \cdot 10^2 + 9,006 \cdot 10^7 X$	0,9990	$1,159 \cdot 10^6$	$1,866 \cdot 10^3$	77,688	0,074
HCTZ	1,4 - 34,0 % CV* = 4,96; $G_{\text{exp}}^* = 0,159$	1	$Y = 7,598 \cdot 10^3 + 1,786 \cdot 10^8 X$	0,9995	$2,28 \cdot 10^6$	$3,36 \cdot 10^4$	78,372	0,226
		2	$Y = -4,223 \cdot 10^4 + 1,776 \cdot 10^8 X$	0,9954	$4,94 \cdot 10^6$	$7,31 \cdot 10^4$	35,924	0,578
		3	$Y = 2,133 \cdot 10^4 + 1,804 \cdot 10^8 X$	0,9968	$4,14 \cdot 10^6$	$6,15 \cdot 10^4$	43,546	0,347
CHP	2,2 - 53,0 % CV* = 4,21; $G_{\text{exp}}^* = 0,400$	1	$Y = 2,487 \cdot 10^3 + 3,166 \cdot 10^7 X$	0,9992	$3,712 \cdot 10^5$	$8,492 \cdot 10^3$	85,293	0,226
		2	$Y = 3,584 \cdot 10^4 + 3,167 \cdot 10^7 X$	0,9966	$7,559 \cdot 10^5$	$1,735 \cdot 10^4$	41,896	0,578
		3	$Y = 2,969 \cdot 10^4 + 3,173 \cdot 10^7 X$	0,9980	$8,133 \cdot 10^5$	$1,872 \cdot 10^4$	39,018	0,347

n = número de determinaciones por pesada individual (n = 8); ecuación de la recta= Y: área de pico, a: intercepto, b: pendiente; r^2 = coeficiente de determinación (> 0,98); S_b = desviación estándar de la pendiente; S_a = desviación estándar del intercepto; $G_{\text{tab}}^* (\alpha=0,05; K=8; N=3) = 0,4377$; *% CV= porcentaje de coeficiente de variación de los factores de respuestas de las tres rectas (< 5 %); valor de $t_{\text{tab}} (\alpha=0,05; n-1) = 2,365$; para la pendiente debe $t_{\text{exp}} > t_{\text{tab}}$ y para el intercepto debe $t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$.

TABLA 19

Resultados de la valoración de las materias primas de HCTZ y CHP obtenidos por interpolación con cada una de las curvas de calibración elaboradas en un día de análisis para determinar la precisión intra-día.

Muestras (n=5)	Porcentaje de pureza (%)					
	HCTZ			CHP		
	1	2	3	1	2	3
Promedio	101,09	99,28	101,33	99,59	99,25	100,67
% CV	0,71	0,71	0,71	0,93	0,93	0,93
Promedio total (s)	100,57 (1,12)			99,84 (1,00)		
% CV	1,11			1,00		
IC (±)	± 3,10	97,47	103,66	± 2,78	97,06	102,61

s = desviación; IC = intervalo de confianza; $t_{\text{tab}} (p = 0,05; n = 5) = 2,776$.

TABLA 20

Resultados de la valoración de las materias primas de HCTZ y CHP obtenidos por interpolación con cada una de las curvas de calibración elaboradas en un día de análisis para determinar la precisión inter-día.

Muestras (n=6)	Porcentaje de pureza (%)								
	CTZ			HCTZ			CHP		
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3
Promedio	95,00	100,03	99,04	100,21	100,94	99,85	100,18	100,55	100,94
% CV	3,08	1,03	1,42	0,65	1,48	1,94	1,10	2,25	1,08
Promedio total (s)	98,02 (2,90)			100,33 (1,45)			100,56 (1,52)		
% CV	2,96			1,44			1,51		
IC (±)	± 7,46	90,56	105,49	± 3,73	96,61	104,06	± 3,91	96,64	104,47

s = desviación; IC = intervalo de confianza; $t_{\text{tab}} (p = 0,05; n = 6) = 2,571$.

TABLA 20

Respuesta de los parámetros cromatográficos de CTZ, HCTZ y CHP ante las interacciones del diseño factorial completo (2^3) de ocho experimentos.

Analito	n=8	Área	N	t_R	k'	T	R
CTZ	Promedio	286622	13029	4,71	0,39	1,28	-
	s	2434	385	0,05	0,02	0,02	-
	% CV	0,85	2,96	1,15	4,00	1,53	-
HCTZ	Promedio	4996143	15650	5,08	0,50	1,31	2,19
	s	42239	830	0,07	0,02	0,02	0,09
	% CV	0,85	5,31	1,35	3,92	1,31	4,30
CHP	Promedio	1452952	314354	14,32	3,21	1,19	68,27
	s	18969	138766	0,05	0,01	0,03	1,23
	% CV	1,31	44,14	0,37	0,46	2,16	1,80

DISCUSIÓN

Se comprobó experimentalmente que el sistema cromatográfico funciona apropiadamente en cuanto a precisión, linealidad e idoneidad del sistema, con buena eficiencia de la columna ofrecida por

el alto número de N, con un buen valor de k' , dada la naturaleza de los analitos, con buena T de picos y donde se resalta que a pesar de la mayor similitud estructural existe una buena R entre los picos de CTZ y HCTZ. Se garantizó que el sistema responde al momento del análisis y se pudo

establecer las condiciones idóneas para determinar simultáneamente a CTZ, HCTZ y CHP.

El método analítico demostró capacidad de discriminación para todos los compuestos que son producto de los ensayos de estrés, en especial la HCTZ que apunta a una degradación en soluciones ácidas a las condiciones ensayadas, pudiéndose detectar la presencia del producto nuevo, sin interferencia en la cuantificación de los otros analitos. La caracterización espectral apoyada por el detector de fotodiodos en serie, brindó sustento para determinar que el pico producto de la degradación no se trataba de CTZ (impureza de síntesis de HCTZ). Los espectros de absorción para cada uno de los picos eluidos, permitió la aproximación de identidad por la coincidencia con los espectros reportados en la literatura.

El análisis de selectividad se complementó con el estudio de la pureza u homogeneidad de los picos de los analitos y confirmó que además del pico nuevo ($t_R = 4,48$), no existe algún producto de degradación que proporcione un pico superpuesto y no alcance a evidenciarse, de igual forma que coincide con la simetría de los picos.

La selectividad del método para otros β -bloqueantes que pueden estar en diferentes formas farmacéuticas junto con HCTZ, se comprobó con la adecuada R entre HCTZ y ATN y de igual forma para BP, por lo que el método pudiese emplearse en la cuantificación de estos dos compuestos en mezclas. Los t_R de BP y CHP son muy cercanos, con una R menor a 1,5; pero si puede ser detectada la presencia de ambos en un mismo cromatograma. El ATN en particular, puede ser utilizado como un estándar interno, de ser requerido, ya que cumple con los requisitos [13].

El valor de LD y LC para cada uno de los analitos fueron obtenidos con las lecturas de tres curvas de calibración. Se tomaron estos valores ya que fueron elaboradas en un intervalo de concentración bajo, por lo que se admite utilizar el término independiente, como lo es el intercepto para estimar estos límites. Por los resultados arrojados se podría indicar que el método por CLAR planteado, tiene la capacidad de cuantificar simultáneamente con una buena precisión y exactitud a HCTZ y CHP.

Los valores obtenidos en el procedimiento de linealidad para la validación del método analítico por CLAR, revelan que fue lineal en el intervalo de concentración estudiado, con un nivel alto ($> 0,998$) del coeficiente de determinación, superior al

criterio de aceptación para pruebas de disolución, para $n-2$ grados de libertad, cada una de ellas con una pendiente estadísticamente distinta de cero comprobada por la prueba t de Student ($t_{exp} \gg t_{tab}$ en los tres analitos) para un grado de significación igual a 0,05; con intervalos de confianza que no incluyen el cero (Tabla 9) y con CV de los factores de respuesta, como una expresión de linealidad, dentro del criterio de aceptación (Tabla 8). En la misma forma, se encontró que el intercepto fue diferente de cero, con un 95 % de confianza (t_{exp} menor a t_{tab} para los tres analitos), garantizando la correlación lineal entre la concentración y la respuesta dada por el área de pico (Tabla 9). El intervalo de confianza cumplió la condición de proporcionalidad, es decir, incluye al cero.

Sumado a esto, la prueba G de Cochran aplicada a los resultados obtenidos no evidenció influencia del factor de concentración sobre la variabilidad de los resultados ya que el G_{exp} es menor a G_{tab} para cada uno de los analitos (Tabla 9), al igual que se comprobó la normalidad de los residuales. Para la variancia residual constante, la distribución de los puntos fue aleatoria y no reflejó ninguna tendencia, demostrando la validez del modelo.

Los F de Snedecor F_1 mayor a F_{tab} indicaron que existe una relación lineal entre el área y la concentración, y con un F_2 menor a F_{tab} se muestra un ajuste de los valores al modelo de regresión lineal. Se puede afirmar que el modelo cumple con los supuestos de aplicación y por lo tanto la linealidad del método es adecuado para la cuantificación de HCTZ y CHP en las formas farmacéuticas solas y en mezclas.

Se comprobó la estabilidad de las soluciones madre de HCTZ y CHP a temperatura ambiente. Los resultados soportan que no existe diferencia significativa entre las pendientes de la curva de calibración (Tabla 10), ya que la relación de la pendiente de la curva de calibración del tiempo 0 y de 96 horas (Tabla 11), no presentó una diferencia estadísticamente significativa entre las variancias estimadas de los residuos de ambas líneas con un 95 % de nivel de confianza y para $n-1$ grados de libertad, calculado con la prueba F de Snedecor, donde resultó F_{exp} menor a F_{tab} . Al soportar dicho valor con la prueba t de Student a un nivel del confianza del 95 %, se asume que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las pendientes de ambos calibrados, es decir, que las soluciones siguen siendo estables hasta las 96 horas.

Durante los estudios de validación se confirmó la estabilidad de los reactivos, la fase móvil, los estándares y las soluciones muestra, para cada una de las pruebas de rutina. Aunque se establece que se preparan y analizan cada día, fue esencial demostrar que las soluciones son lo suficientemente estables como para soportar los retrasos instrumentales que pueden darse por averías o análisis muy largos.

Para la determinación de la exactitud del método propuesto por la comparación con el método de referencia USP 37 para HCTZ y CHP materias primas, se obtuvo que en la prueba F de Snedecor, el F_{exp} es menor a F_{tab} , para ambos analitos. Esto indica que no hay diferencias significativas y ambos métodos tienen variancias estimadas iguales y por lo tanto precisiones semejantes. Al aplicar la prueba t de Student, como consecuencia de que las variancias son homogéneas, siendo S^2 la variancia conjunta con un valor para HCTZ de 0,570 y una S^2 para CHP de 1,587; el valor de t_{exp} es menor que el t_{tab} , lo que significa que no hay diferencia entre las dos medias para ambos analitos. Esto indica que los métodos no son estadísticamente diferentes y que el método analítico propuesto tiene la exactitud requerida.

Para la determinación de la exactitud del método propuesto por el método de adición estándar en la curva Di-Eudrin[®] + Inderal[®] + CTZ se demostró que las muestras no presentaron interferencia en el área de pico de HCTZ y CHP al ser enriquecidas con solución de CTZ, es decir, que el método tiene capacidad de discriminación suficiente con CV menor al 2 %, entre las determinaciones en presencia o ausencia de CTZ en la matriz. El valor crítico de F_{exp} para un contraste de una cola ($\alpha = 0,05$) es menor que el F_{tab} para HCTZ, de igual forma para el caso de CHP (Tabla 16), por tanto, con un 95 % de confianza no hay diferencia significativa entre variancias de las áreas de los picos para la curva alimentada con CTZ.

La curva Di-Eudrin[®] + Inderal[®] + HCTZ demostró que la recuperación es satisfactoria (100,67 %), y de acuerdo al estadístico t de Student, (t_{exp} menor a t_{tab}) no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100, por lo que la exactitud para HCTZ es correcta. Por último, la curva Di-Eudrin[®] + Inderal[®] + CHP reflejó que la recuperación es satisfactoria (99,45 %) para CHP y con la aplicación de la prueba t de Student se evidenció que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100, confirmando la buena exactitud del método para CHP.

Basados en todos los valores del estudio

estadístico y en que la recuperación de los analitos HCTZ y CHP en cada uno de los puntos ensayados en el estudio, se encuentran dentro del rango de aceptación (96 - 104 %); y que de igual forma, la media de recuperación para los dos analitos de interés, se ubica dentro del criterio de aceptación (98 - 102 %) [20], se puede considerar que el método propuesto es exacto para la determinación simultánea de HCTZ y CHP, con CTZ como impureza de síntesis, por la metodología de adición de estándar. Para la precisión del método analítico, las curvas elaboradas en los tiempos estipulados de trabajo para la precisión inter e intra-día demostraron ser lineales en el intervalo de concentración estudiado con $r^2 > 0,99$; cumpliendo con los supuestos de aplicación estadística con un 95 % de confianza (Tablas 17 y 19). El CV para las tres curvas, en ambos casos, fue menor al 5 % por lo que son consideradas las respuestas lineales. El conjunto de tres curvas de cada analito ofrecen G_{exp} menor a G_{tab} ($\alpha = 0,05$; $K = 8$; $N = 3$), lo que significa que las variancias de concentración son homogéneas, es decir, que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

La metodología empleada incluyó la verificación de la repetibilidad del método, ya que depende generalmente del proceso de preparación de muestras; se evaluó la precisión intermedia del método analítico, que estudió la variabilidad que existe entre los diferentes resultados.

Los resultados de la precisión intra-día revelaron un CV menor a 1,11 % para todas las muestras de HCTZ y un valor de CV menor a 1 % para el CHP. Esto indica que el método tiene buena precisión para ambos analitos con un IC de $\pm 3,10$ % para HCTZ y $\pm 2,78$ % para CHP.

Las respuestas de las muestras de HCTZ y CHP inter-día, muestran un CV menor a 2 % y para CTZ como impureza de síntesis un valor de CV menor a 3 %. El CV se encuentra dentro de los límites indicados por Horwitz (2 %) [10, 19, 22-23] para el rango de concentración de 100 % de las materias primas, esto indica que el método tiene buena precisión para el valor de concentración seleccionado (0,028 mg mL⁻¹ HCTZ y 0,044 mg mL⁻¹ CHP).

Con estas metodologías se pudo comprobar que el método analítico desarrollado cumple las especificaciones establecidas para la precisión del método.

El estudio de robustez propuesto, permitió conocer la estabilidad del método analítico ante

pequeñas modificaciones de las condiciones descritas y su independencia frente a éstas; también permitió confirmar las interacciones de importancia en el análisis simultáneo de CTZ, HCTZ y CHP, como lo fue la [1-HSS] y la [KH₂PO₄], para un trabajo óptimo. Bajo los criterios técnicos, las interacciones de la composición de la solución amortiguadora, tienen poco fundamento de ser verosímiles.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio de validación confirman la idoneidad del método analítico por CLAR-FR para la cuantificación de HCTZ y CHP, en presencia de CTZ como impureza de síntesis, en análisis de materia prima o de producto terminado.

Se comprobó el cumplimiento de la linealidad por los parámetros estadísticos planteados. Su exactitud fue demostrada por dos metodologías. La precisión intra-día e inter-día, ofreció % CV dentro de los valores requeridos. Los diseños estadísticos elaborados para demostrar la robustez del método analítico mostraron resultados válidos sobre el margen razonable de fluctuación para cada factor y su interacción, que permitieron garantizar la robustez del método desarrollado con un 95 % de confianza.

El método analítico desarrollado [9], garantiza la monitorización de la estabilidad de los principios activos, en especial de HCTZ por su selectividad; es aplicable en todas las etapas del ciclo de vida del producto y el tiempo de análisis es relativamente corto. La buena resolución que existe entre los picos de HCTZ y CHP permitirá la aplicación de este método en muestras más complejas, como los medios biorrelevantes y matrices biológicas.

Es por esto que se garantiza que la validación se realizó siguiendo un exhaustivo protocolo del procedimiento analítico en el análisis farmacéutico, donde la combinación de grupos de contribuidores de variabilidad, ligados a un diseño, demostraron los niveles de precisión y exactitud experimental de la metodología propuesta en los rangos de concentración planteados (0,1 - 3,5 µg mL⁻¹ para CTZ, de 1,4 - 33,6 µg mL⁻¹ para HCTZ y de 2,2 - 52,8 µg mL⁻¹ para CHP).

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) por el soporte financiero brindado a

través del proyecto N° G-2005000641.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

[1] World Health Organization. Formulario Modelo de la OMS 2004 [en línea] Actualización octubre de 2015 [fecha de acceso 14 de octubre de 2010]; Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js5422s/>

[2] ChemSpider [base de datos en Internet]. Royal Society of Chemistry. Building community for chemists; 2008 [actualización enero de 2015; acceso 14 de octubre de 2015]. Disponible en: <http://www.chemspider.com>

[3] Szász G, Budvári-Bárány Z. Pharmaceutical Chemistry of Antihypertensive Agents. Volumen 1. Florida: CRC Press; 1991. pp. 61-63.

[4] Escobar C, Barrios V. Combinaciones en el tratamiento de la hipertensión arterial. Actualización [en línea] 2010 [fecha de acceso 12 de octubre de 2015]; noviembre: 61-67. Disponible en: http://www.jano.es/ficheros/sumarios/1/0/1765/61/00610067_LR.pdf

[5] Llisterra J, Barrios V. Papel de las nuevas combinaciones a dosis fijas en el tratamiento de la hipertensión arterial. Med Clin (Barc). 2008; 130(9): 342-344.

[6] Mancia G, Laurent S, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Burnier M, Caulfield MJ, et al. Reappraisal of European guidelines on hypertension management: a European Society of hypertension task force document. J Hypertens. 2009; 27: 2121-2158.

[7] Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty A, Kjeldsen S, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilope L, Rynkiewicz A, Schmieder R, Boudier H, Zanchetti A. Guías de práctica clínica para el tratamiento de la hipertensión arterial 2007. Rev Esp Cardiol. 2007; 60(9): 968-994.

[8] Oparil S. Antihypertensive and lipid-lowering treatment to prevent heart attack trial: practical implications. Hipertensión. 2003; 41: 1006-1009.

[9] Guillén A, Calderón L, Brunetto R, León A, Galignani M, Páez M. Desarrollo analítico por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa para la determinación simultánea de clorhidrato de propranolol, hidroclorotiazida y clorotiazida. Aplicación de diseño factorial para la robustez del método. Rev Fac Farm. 2011; 53(1): 2 -12.

[10] Pérez J, Pujol M. Validación de métodos analíticos. España: Asociación Española de

Farmacéuticos de la Industria; 2001. pp. 95-105.

[11] International Conference on Harmonisation. Validation of analytical procedures: text and methodology. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Switzerland: ICH; 2005. Series Q2 (R1).

[12] Food and Drug Administration. Guidance for industry: bioanalytical method validation. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Rockville, USA: FDA; 2013.

[13] Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 37 NF 32. Formulario Nacional compendios de normas oficiales. Edición en español. Estados Unidos de América; 2014.

[14] Chandran S, Singh R. Comparison of various international guidelines for analytical method validation. *Pharmazie*. 2007; 62(1): 4-14.

[15] Quattrocchi O, Andrizzi S, Laba R. Introducción a la HPLC: aplicación y práctica. 1er ed. Argentina: Merck; 1992. pp. 241-327.

[16] Joshi S, Karbhari P, Bhoir S, Bindu K, Das C. RP-HPLC method for simultaneous estimation of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in tablet formulation. *J Pharm Biomed Anal*. 2010; 52(3): 362-371.

[17] International Conference on Harmonisation. Stability testing of new drug substances and products. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Switzerland: ICH; 2003. Series Q1A (R2).

[18] Castro M, Gascón S, Pujol M, Sans J, Vicente L. Validación de métodos analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Monografía AEFI. Sección Catalana. Comisión de Normas de Buena Fabricación y Control de la Calidad. España: Hewlett Packard; 1989.

[19] Alcántara A, Cárdenas J. Guía de validación de métodos analíticos. Comisión especial de validación de métodos analíticos. México: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C.; 2000.

[20] Ahuja S, Scypinski S. Handbook of modern pharmaceutical analysis. Volumen 3. Separation Science and Technology. United States of America: Academic Press; 2001. pp 430-442.

[21] Ruiz Á, Carda B, Torres L, García Á. Review: Retention mechanisms in micellar liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2009; 1216:1798-1814.

[22] Ermer J, Nethercote P. Method Validation in Pharmaceutical Analysis. 2da ed. Alemania: Wiley-VCH; 2015. pp. 59-182.

[23] Instituto de Salud Pública de Chile. Sandoval S, editores. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: aspectos generales sobre la validación de métodos. Chile: Departamento de Salud Ambiental, Sección Metrología Ambiental y de Alimentos; 2010.