

# 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.

Analytical development for reverse-phase high resolution liquid chromatography for the simultaneous determination of propranolol hydrochloride, hydrochlorothiazide and chlorothiazide. Application of factorial design to the robustness of the method.

Guillén-Guillén Ana M<sup>1</sup>\*, Calderón-González Laura M<sup>1</sup>, Brunetto María del Rosario<sup>2</sup>, León-Leal Andrés<sup>1</sup>, Gallignani Máximo<sup>2</sup>, Páez-Márquez María A<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Análisis de Medicamentos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. <sup>2</sup>Laboratorio de Espectroscopia Molecular, Facultad de Ciencias; Universidad de Los Andes (ULA). Mérida 5101A, República Bolivariana de Venezuela.

Recibido junio 2011 - Aceptado octubre 2011

## RESUMEN

Un método por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa ha sido desarrollado para la determinación simultánea del clorhidrato de propranolol y la hidroclorotiazida, con detección de clorotiazida como impureza de síntesis. La separación se realizó en una columna X-Bridge™ C<sub>18</sub> 250 mm x 4,6 mm x 5 μm a 35 °C. La fase móvil, con caudal de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, quedó constituida por la solución A: solución amortiguadora de 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0,05 M de 1-heptano sulfonato de sodio, a un pH 3,0 y un solvente B: acetonitrilo, aplicando un sistema de gradiente. La detección se realizó en un sistema de arreglo de diodos a 270 nm. La respuesta lineal se logró en un rango de concentración de 2,2 - 53,0 μg mL<sup>-1</sup> para el clorhidrato de propranolol, de 1,4 - 34,0 μg mL<sup>-1</sup> para la hidroclorotiazida y de 0,1 - 3,5 μg mL<sup>-1</sup> para la clorotiazida. Un diseño factorial completo de 8 experimentos se aplicó para evaluar el nivel de influencia del pH, la [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] y la [1-HSS] de la disolución amortiguadora, en la respuesta termodinámica del sistema para cada uno de los analitos en estudio. Un diseño factorial fraccionado de 8 experimentos fue empleado para estudiar la respuesta cinética del sistema con respecto a factores como: el solvente (% B), la temperatura, el flujo y el pH. Ambos diseños estadísticos 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.

## PALABRAS CLAVE

Hidroclorotiazida, Clorhidrato de Propranolol, Clorotiazida, Antihipertensivos, Cromatografía Líquida de Alta Resolución, Diseño Factorial, Robustez.

## ABSTRACT

A reverse-phase high performance liquid chromatographic method has been developed for the simultaneous determination of propranolol hydrochloride and hydrochlorothiazide, chlorothiazide sensing as an impurity of synthesis. The separation was performed on a C<sub>18</sub> column X-Bridge™ 250 mm x 4.6 mm x 5 μm to 35 °C. The mobile phase with flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>, was composed of solution A: 0.1 M buffer KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 0.05 M of 1-heptane sulfonate, pH 3.0 and solvent B: acetonitrile, using a gradient system. The detection was performed on a diode array system at 270 nm. The linear response was achieved in a concentration range of 2.2 to 53.0 μg mL<sup>-1</sup> for propranolol hydrochloride, from 1.4 to 34.0 μg mL<sup>-1</sup> for hydrochlorothiazide and 0.1 to 3.5

$\mu\text{g mL}^{-1}$  for chlorothiazide. A full factorial design of 8 experiments was applied to assess the level of influence of pH,  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  and  $[\text{1-HSS}]$  of the buffer solution, thermodynamics in the response of the system to each of the analytes under study. Fractional factorial design of 8 experiments was used to study the kinetic response of the system with respect to factors such as the solvent (% B), temperature, flow and pH. Both designs showed statistical valid results on reasonable margin of fluctuation for each factor and their interaction, which allowed guarantee the robustness of the method developed with 95 % confidence.

## KEY WORDS

Hydrochlorothiazide Propranolol Hydrochloride, Chlorothiazide, Antihypertensives, High Resolution Liquid Chromatography, Factorial Design and Robustness

## INTRODUCCIÓN

El clorhidrato de propranolol (CHP) y la hidroclorotiazida (HCTZ) son fármacos que poseen mecanismos de acción diferentes, pero comparten una de sus actividades terapéuticas, el ser agentes antihipertensivos. El CHP es un bloqueador  $\beta$ -adrenérgico no selectivo y la HCTZ es un diurético del grupo de las tiazidas [1-2]. Ellos forman parte del listado de medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la Salud (OMS); además, la HCTZ en la actualidad se encuentra en el mercado en combinación con un gran número de otros agentes antihipertensivos [1-3]. Estos dos moléculas poseen características fisicoquímicas diferentes: el CHP es una base débil y la HCTZ un ácido débil (Figura 1-A y 1-B, respectivamente) [4].

La HCTZ se puede sintetizar por ciclación de la 4,6-sulfonamida-3-cloroanilina utilizando paraformaldehído, o por la reducción del doble enlace de la clorotiazida (CTZ) [5]. Estos dos compuestos, la 4,6-sulfonamida-3-cloroanilina y la CTZ, pueden encontrarse como impurezas de síntesis en la HCTZ y por ser la CTZ (Figura 1-C) un compuesto con gran similitud estructural a la HCTZ, representa un inconveniente al momento de la cuantificación. Se ha determinado que la CTZ, en comparación con la HCTZ, posee de diez a veinte veces menos actividad y es más tóxica [6], por lo que la Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP, por sus siglas en inglés) en su edición 31 del año 2008, establece identificar la presencia de CTZ como impureza de síntesis en materias primas y en el producto terminado de este fármaco [7].

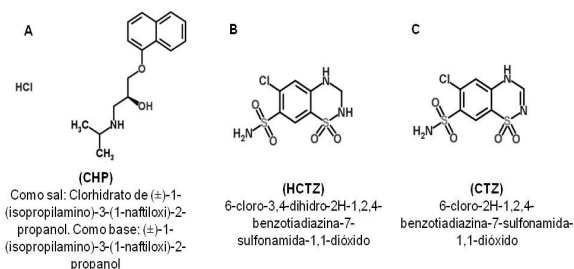


Fig. 1. Estructuras químicas de clorhidrato de propranolol (A), hidroclorotiazida (B) y clorotiazida (C) [4].

La USP 31, reporta aplicaciones por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (CLAR-FR), para el análisis del CHP o la HCTZ como materia prima. Así mismo, se reportan métodos por CLAR-FR para las formulaciones farmacéuticas sólidas de liberación inmediata (FFSO-LI).

Para la materia prima de HCTZ se utiliza una columna  $\text{C}_{18}$  de 5 cm de longitud (l.), 4,6 mm de diámetro interno (d.i.) y 3,5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula (t.p.), y se aplica un gradiente de elución para el analito y sus dos impurezas de síntesis, empleando una mezcla de acetonitrilo y metanol, con agua acidificada con ácido fórmico como fase móvil. En la valoración de contenido y la uniformidad de la unidad de dosificación de la HCTZ tabletas, se emplea una columna  $\text{C}_{18}$  de 25 cm (l.) x 4,6 mm (d.i.) x 5  $\mu\text{m}$  (t.p.) y una fase móvil que consiste en un buffer fosfato 0,1 M a pH 3,0 y acetonitrilo [7]. Ambos métodos buscan controlar la ionización del analito utilizando un pH ácido para lograr una mayor retención [8]. En las pruebas de disolución de la HCTZ, la USP 31 recomienda el uso de espectroscopia UV para la cuantificación de la cantidad disuelta.

Para la valoración del CHP como materia prima, así como en la valoración de contenido y uniformidad de la unidad de dosificación de las tabletas, se usa cromatografía de apareamiento iónico, aplicando una mezcla de dodecilsulfato de sodio (DSS) a un pH ácido (pH = 2,0), con acetonitrilo y metanol como fase móvil y una columna  $\text{C}_8$  de 25 cm (l.) x 4,0 mm (d.i.) x 5  $\mu\text{m}$  (t.p.). En las pruebas de disolución del CHP, la USP 31 recomienda el uso de espectroscopia UV para la cuantificación de cantidad disuelta.

La USP 31 ofrece para la determinación simultánea de CHP e HCTZ en FFSO-LI, diferentes metodologías analíticas, según sea la prueba. En ellas se incluyen métodos de separación por extracción líquido-líquido, para la determinación de la cantidad disuelta del CHP e HCTZ en la prueba de disolución y para el ensayo de uniformidad de la unidad de dosificación. Esta misma reporta la valoración simultánea del contenido de los principios activos en las FFSO-LI, utilizando la

CLAR-FR y no registra la separación de la CTZ.

La extracción convencional líquido-líquido es una operación lenta y tediosa, muy dependiente de la habilidad del operador y está expuesta a numerosos problemas como: formación de emulsiones, manipulación de grandes cantidades de solventes orgánicos, con el riesgo de ser tóxicos, inflamables, además de los inconvenientes en el proceso de evaporaciones finales, entre otros [8]. Una vez separados los fármacos, son cuantificados de forma individual por espectroscopia UV, considerando que esto se debe aplicar a un gran número de muestras, lo que hace de éste, un método largo y costoso.

En el método de valoración de contenido del producto combinado, se utiliza un buffer fosfato con adición del hidróxido de tetrabutylamonio (para evitar la interacción de los grupos silanol con el CHP) [8], a un pH de 2,5 con metanol en la fase móvil, y se estima que el tiempo de retención para el CHP sea de 15 a 25 minutos y no se reporta la presencia de CTZ [7].

La literatura reporta diversos métodos analíticos por CLAR para la estimación de CHP o HCTZ en fluidos biológicos y en formulaciones farmacéuticas. Hitscherich y col. [9], y luego Chetty [10], reportan la determinación simultánea de ambos fármacos, pero en ninguno de estos métodos se reporta la presencia de CTZ como impureza de síntesis, cuando se analiza el CHP simultáneamente con la HCTZ. En un gran número de publicaciones se presenta la valoración de uno de estos dos fármacos con otros agentes terapéuticos [11-35]. Estos métodos en su mayoría utilizan una columna C<sub>18</sub> con adecuado control del pH de la fase móvil, en función de los solutos y su pKa [10, 12, 31, 35].

Se ha reportado la determinación de la HCTZ y sus productos de degradación empleando columnas ciano [36]. Esta columna posee una alta selectividad hacia los dobles y triples enlaces y los compuestos polares e hidrofílicos, que no pueden eluir normalmente en una columna C<sub>8</sub> o una C<sub>18</sub>, además puede separar compuestos con gran similitud estructural, con menor retención de los compuestos hidrofóbicos. Sin embargo, son menos utilizadas en la industria farmacéutica por su costo, poca versatilidad y por ser lábiles a las condiciones de trabajo.

La aplicación de un par iónico, como lo es el 1-heptano sulfonato de sodio (1-HSS), que actúa como un anión "pesado" susceptible de aparearse con el grupo nitrogenado con carga positiva del CHP, tiene efectos favorables para la separación de HCTZ y CTZ bajo la forma no ionizada de ambas moléculas (compuestos neutros). Esto se traduce en una mayor eficiencia y supresión de las colas en los picos [37].

Una vez definido el método cromatográfico, se deben evaluar los efectos de pequeñas variaciones deliberadas de las condiciones cromatográficas (sal, pH, porcentaje de solventes, temperatura, entre otros), sobre parámetros que repercuten en el factor de capacidad (k'), la resolución, la eficiencia y el factor de asimetría. Esto se verifica con un estudio de diseño factorial, que ofrece una metodología eficaz para determinar la robustez del método analítico. La robustez se aplica en una fase apropiada del desarrollo del método, como lo recomienda la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, y no en la validación propiamente dicha. Con esto se logra identificar los parámetros críticos que pueden afectar a la robustez del método, comprenderlos y realizar mejoras si es necesario [38].

El presente trabajo tiene como objetivo principal desarrollar un método por CLAR-FR, alternativo a los métodos reportados por la USP 31 [7], que sea aplicable a la valoración de las materias primas como también en el análisis rutinario (valoración de contenido, uniformidad de la unidad de dosificación y en especial en la prueba disolución) de tabletas de CHP en combinación con la HCTZ, detectando la CTZ como impureza de síntesis. Además, entre otras cualidades, dicho método debe mostrar precisión, sensibilidad, selectividad y robustez, también tener la capacidad de automatización o reducción de procesamiento de datos, así como para los estudios de solubilidad y perfiles de disolución en la obtención de bioequivalencia por la vía de la bioexención de ensayos *in vivo*, para lo que se necesitan métodos analíticos indicativos de la estabilidad de los principios activos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *a. Instrumentos*

En el análisis cromatográfico de los tres analitos planteados se utilizó para la separación en fase líquida un cromatógrafo marca Waters®, provisto de: una bomba cuaternaria modelo 600E, un desgasificador AF en línea, un inyector automático modelo 717 Plus y un detector UV-Vis de arreglo de diodos modelo 2996. Todos los componentes del sistema cromatográfico, así como el registro, el almacenamiento y el procesamiento de los datos se controlaron en un computador dotado con el software Empower 2. Para procesar los resultados del diseño factorial se utilizó el software estadístico Minitab® 14.

### *b. Materiales y reactivos*

Todos los disolventes utilizados se adquirieron de grado CLAR (Merck® KGaA de Alemania) y el agua fue purificada en un sistema Milli-Q (Millipore®),

Bedford, MA, EE.UU.). Los reactivos empleados fueron de grado analítico, el 1-heptano sulfonato de sodio y los patrones de referencia de HCTZ (99 %) y CHP (99 %) se obtuvieron de la marca Sigma-Aldrich®, la CTZ del Committee on National Formulary of the American Pharmaceutical Association y las materias primas se usaron de los Laboratorios Ipca Limited.

#### c. Preparación de soluciones

Las soluciones madre de HCTZ (0,28 mg mL<sup>-1</sup>) y de CHP (0,44 mg mL<sup>-1</sup>) patrón de referencia, se prepararon individualmente, utilizando HCl 0,01 M como diluyente, sometiénolas al ultrasonido.

La solución madre de CTZ (0,20 mg mL<sup>-1</sup>) patrón de referencia, se preparó utilizando metanol como diluyente, sometiénola al ultrasonido.

Todas las soluciones se almacenaron en frascos ámbar bajo refrigeración a 4 °C y se utilizaron en un tiempo no mayor a 8 días.

Las soluciones de trabajo de concentraciones 0,003 mg mL<sup>-1</sup> de CTZ, 0,028 mg mL<sup>-1</sup> de HCTZ, y 0,044 mg mL<sup>-1</sup> de CHP se prepararon interdiariamente, diluyendo con HCl 0,01 M a volumen.

Todas las soluciones fueron filtradas con membranas GHP (Waters® Corporation) de 47 mm de diámetro y 0,45 µm de tamaño de poro.

#### d. Separación cromatográfica

La separación cromatográfica de CHP, HCTZ y CTZ se realizó por cromatografía de par iónico en fase reversa utilizando 1-HSS como contraión. La optimización de la separación se realizó con el fin de obtener la mejor selectividad y sensibilidad para los analitos, fundamentada por la separación entre la HCTZ y la CTZ como impureza de síntesis. Para ello, se inyectaron tanto las soluciones individuales y de la mezcla de los tres compuestos y se ensayaron fases móviles de diferente naturaleza y composición.

#### e. Idoneidad del sistema

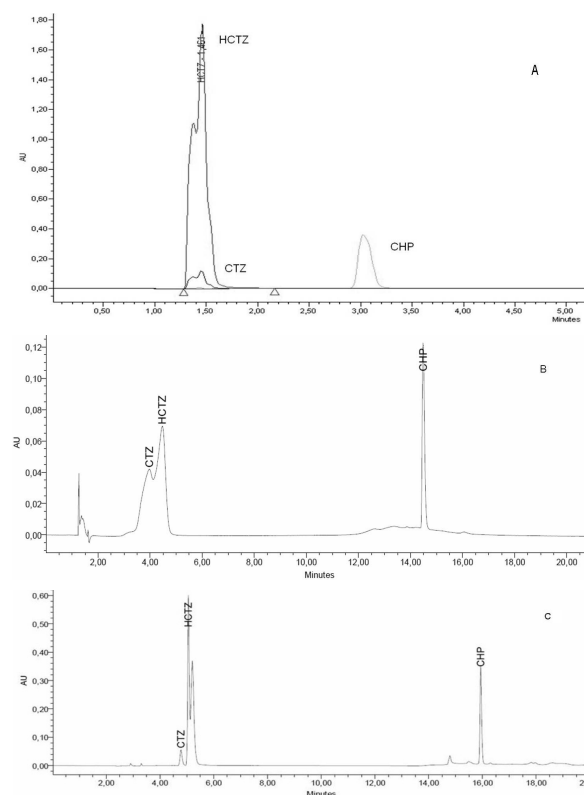
Para verificar el buen funcionamiento del sistema, se inyectó por quintuplicado en el sistema cromatográfico la solución de trabajo de la mezcla. Se observó la respuesta de los analitos, el número de platos teóricos, factores de resolución, simetría y capacidad, tiempo de retención relativo y coeficiente de variación del sistema.

## RESULTADOS

La separación inicial de los analitos, se realizó con las condiciones experimentales del método de cuantificación del CHP materia prima reportado en USP 31. Se utilizó una columna X-Bridge™ C<sub>8</sub> (Waters®) de 150 mm x 4,6 mm x 3,5 µm, a una temperatura de 35 °C, y como fase móvil una solución

de DSS 0,025 M y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,039 M /Acetonitrilo/Metanol, en la proporción (28:36:36; v:v:v), a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. Bajo estas condiciones se inyectó inicialmente un volumen de 20 µL de soluciones individuales y de la solución mezcla de concentración de 0,032, 0,320 y 0,200 mg mL<sup>-1</sup> de CTZ, HCTZ y CHP respectivamente, representando la concentración para el ensayo de cada una de las materias primas [7]. En la Figura 2-A se muestra el cromatograma obtenido donde se observan picos desdoblados y superpuestos para HCTZ y CTZ y un pico sin interferencias para el CHP.

A partir de estos resultados se comenzó la optimización de la separación modificando cada una de las variables involucradas en mejorar la forma de los picos de los analitos y la resolución entre los mismos. Se varió la proporción de los modificadores orgánicos, la naturaleza y molaridad del amortiguador de pH, y la columna. Sin embargo, si bien se logró separar la CTZ y la HCTZ, a las concentraciones que se estiman encontrar en el tiempo de muestreo en la prueba de disolución (0,003, 0,028 y 0,044 mg mL<sup>-1</sup> de CTZ, HCTZ y CHP, respectivamente), se observó el desdoblamiento del pico de la HCTZ (Figura 2-B).



**Fig. 2.** Cromatogramas: A) Método USP para CHP materia prima. B) Método de separación de CTZ, HCTZ y CHP a una concentración de 0,003, 0,028 y 0,044 mg mL<sup>-1</sup> respectivamente, usando una columna X-Bridge™ C<sub>18</sub> 150 mm x 3 mm x 3,5 µm y una fase móvil de buffer fosfato de sodio 0,025 M a pH 3,0 con acetonitrilo en modo de gradiente. C) Método de separación de CTZ, HCTZ y CHP usando las condiciones de la Tabla 1 con la concentración del buffer fosfato a 0,05 M a pH 3,0.

Al incorporar a la fase móvil el 1-HSS a una concentración de 0,05 M en la solución amortiguadora de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,10 M, a un pH 3,0 en presencia de acetonitrilo y bajo un sistema de gradiente, se observó la desaparición del sangrado de la HCTZ y la interferencia de la línea base, pero se reflejó, por la presencia de un pico definido diferente, la posible degradación de la solución de la HCTZ en metanol en el tiempo de corrida. Los compuestos se prepararon utilizando como solvente acetonitrilo, mostrando la desaparición de dicho pico. Una disminución de la concentración de la sal de fosfato en la solución amortiguadora a 0,05 M, provocó una división del pico de la HCTZ y desplazó al CHP (Figura 2-C). El efecto ha sido atribuido a la modificación que produce en la cantidad adsorbida de agente surfactante aniónico, esto debido a un cambio en la repulsión electrostática y del fortalecimiento de interacción hidrofóbica para el CHP [37].

Los resultados de la optimización condujeron a un método por CLAR-FR para la separación y cuantificación simultánea del CHP, HCTZ y CTZ bajo las condiciones de la Tabla 1, donde la elución por gradiente se consideró necesaria para la separación de los tres analitos (Tabla 2).

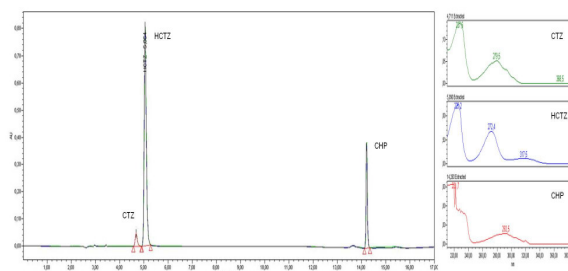
**TABLA 1**  
Condiciones cromatográficas

Equipo	CLAR
Columna	X-Bridge™ C <sub>18</sub> 250 mm x 4,6 mm x 5 μm
Guarda columna	X-Bridge™ C <sub>18</sub> 20 mm x 4,6 mm x 5 μm
Fase Móvil	Solución A: solución amortiguadora de 0,10 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ y 0,05 M de 1-HSS a pH 3,0 (ajustado con $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) Solvente B: Acetonitrilo
Longitud de onda de detección	270 nm
Temperatura	35 °C
Flujo	1 mL min <sup>-1</sup>
Volumen de inyección	50 μL
Tiempo de corrida	17 minutos
Método de cálculo	Patrón externo
Concentración de los analitos	0,003 mg mL <sup>-1</sup> de CTZ, 0,028 mg mL <sup>-1</sup> de HCTZ y 0,044 mg mL <sup>-1</sup> para el CHP

**TABLA 2**  
Sistema de Gradiente

Tiempo	% Solución A	% Solvente B	Elución	Velocidad de gradiente
0	80	20	Equilibrio	-
5	80	20	Isocrático	-
6	30	70	Gradiente Lineal	50%B min <sup>-1</sup>
8	30	70	Isocrático	-
9	80	20	Retorno	-
17	80	20	Re-equilibrio	-

En la Figura 3, se muestra el cromatograma obtenido y los espectros UV que identifican a cada analito; se puede observar que los tres analitos se separan con una buena resolución y tiempos de retención de 4,68, 5,05 y 14,21 minutos para la CTZ, HCTZ y CHP respectivamente.



**Fig. 3.** Cromatograma de la idoneidad del sistema: clorotiazida (CTZ)  $t_R$ : 4,68 min; hidroclorotiazida (HCTZ)  $t_R$ : 5,05 min; clorhidrato de propranolol (CHP)  $t_R$ : 14,21 min

En el presente trabajo se verificó experimentalmente la idoneidad del sistema cromatográfico, para ello se inyectaron cinco réplicas de la solución de trabajo de CTZ, HCTZ y CHP. En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos, que cumplen con los requerimientos establecidos por la USP, donde la resolución entre la CTZ y la HCTZ es de 2,27, aunque su factor de capacidad es menor a uno. Sin embargo, el factor de capacidad obtenido es considerado aceptable cuando se tienen mezclas de compuestos y mayor aun, cuando uno de ellos es producto de degradación [8, 39]. Por esta razón se pudo establecer que el método era idóneo para determinar CTZ, HCTZ y CHP.

**TABLA 3**  
Ensayo de idoneidad del sistema

Analito	Área	%CV	Platos teóricos (N)	$t_R$	K'	Factor cola (T)	R
Clorotiazida (CTZ)	281321,55	0,20	14005,66	4,68	0,38	1,24	-
Hidroclorotiazida (HCTZ)	4917352,22	0,10	16547,01	5,05	0,50	1,26	2,28
Clorhidrato de Propranolol (CHP)	1426956,22	0,20	327173,23	14,21	3,18	1,13	69,22
Límites recomendados	-	≤ 2%	N > 2000	-	K' > 2*	T ≤ 2	≥ 2

\*Factor de capacidad:  $0,5 > K' < 20$ .

Para la evaluación de la linealidad del método se prepararon, por pesada individual, 8 soluciones madre de cada analito en estudio, tal como se presenta en el punto c (*preparación de soluciones*), representando cada solución un punto de la curva de calibración. Por dilución se dispusieron soluciones en el rango de concentración establecido para el estudio (Tabla 4) y se

prepararon tres juegos de soluciones de cada analito y de cada punto. El conjunto de 24 se analizó para trazar una curva de calibración que concedió los parámetros de regresión que se encuentran en la Tabla 4.

Se observó que las curvas de calibración son lineales en el intervalo de concentración estudiado para todos los casos, con un coeficiente de correlación  $> 0,99$ , el cual fue considerado aceptable con un 95 % de confianza, para  $n-2$  grados de libertad ( $t_{exp} = 288,56$  para el CHP,  $t_{exp} = 123,58$  para la HCTZ y  $t_{exp} = 42,26$  para la CTZ  $\gg t_{tab} = 2,074$ ) y con coeficientes de variación de los factores de respuesta, como una expresión de linealidad, dentro del criterio de aceptación (Tabla 4).

En la misma forma, se encontró que el intercepto fue diferente de cero, con un 95% de confianza ( $t_{exp} = -0,794$  para el CHP,  $t_{exp} = -0,113$  para la HCTZ y  $t_{exp} = 0,023$  para la CTZ  $< t_{tab} = 2,074$ ). 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  $<$  al  $G_{tab}$  para cada uno de los analitos, al igual que se comprobó la normalidad de los residuales. Todos estos valores se consideraron estadísticamente aceptables.

**TABLA 4**  
Parámetros de linealidad

Analito	Intervalo dinámico ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Ecuación de la recta $Y = a + bX$	r	$S_b$	$S_a$	$IC_b$	$IC_a$	% CV
CHP	2,2 - 53,0	$Y = 2,84 \cdot 10^3 + 3,19 \cdot 10^4 X$	0,9999	$1,11 \cdot 10^6$	$3,32 \cdot 10^3$	$\pm 2,28 \cdot 10^6$	$\pm 6,89 \cdot 10^3$	4,43
HCTZ	1,4 - 34,0	$Y = 3,11 \cdot 10^3 + 1,78 \cdot 10^4 X$	0,9993	$1,44 \cdot 10^6$	$2,76 \cdot 10^4$	$\pm 2,98 \cdot 10^6$	$\pm 5,73 \cdot 10^4$	4,03
CTZ	0,1 - 3,5	$Y = 84,236 + 7,810 \cdot X$	0,9939	$1,85 \cdot 10^6$	$3,59 \cdot 10^3$	$\pm 3,83 \cdot 10^6$	$\pm 7,45 \cdot 10^3$	6,33

$n$  = número de determinaciones ( $n = 24$ )

Número de soluciones ensayadas por replica =  $8 \times 3$

Ecuación de la recta =  $Y$ : área de pico,  $a$ : intercepto,  $b$ : pendiente

$r$  = coeficiente de correlación ( $> 0,98$ )

$S_b$  = 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 = Coeficiente de variación de los factores de respuesta (% CV  $< 5\%$  para principio activos, % CV  $< 10\%$  para compuestos relacionados) [37, 39].

En la evaluación de la robustez del método analítico se aplicaron diseños estadísticos completamente al azar, con arreglos de tratamientos factoriales de ocho experimentos. Se utilizó un diseño factorial completo ( $2^3$ ) para la composición de la solución amortiguadora de la fase móvil y un diseño fraccionado ( $2^{4-1}$ ) para la interacción de factores que pudieran influir en el análisis simultáneo de los tres compuestos, siendo la variable dependiente el factor de capacidad ( $k'$ ), para ambos diseños.

El diseño factorial completo ( $2^3$ ) evaluó como variables independientes la influencia del pH (pH = 3,0) con una desviación de  $\pm 0,2$ , y la concentración molar  $[M]$  de los aditivos  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,1 M) y 1-HSS (0,05 M) en la solución amortiguadora de la fase móvil, con una variación de  $\pm 10\%$ .

El diseño factorial fraccionado ( $2^{4-1}$ ) involucró como variable independiente cuatro factores: el porcentaje de solvente B (20 $\rightarrow$ 70) en  $\pm 2\%$ , la temperatura (35 °C) en  $\pm 3\text{ }^\circ\text{C}$ , el flujo (1 mL  $\text{min}^{-1}$ ) en  $\pm 10\%$  y el pH (pH = 3,0) en  $\pm 0,2$ .

El análisis de varianza (Tabla 5) del diseño factorial completo de 8 experimentos ( $2^3$ ) reflejó que cerca del 98 % de la variabilidad del factor de capacidad de la CTZ y la HCTZ se explicó por el pH, la  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  y la [1-HSS] y por las interacciones; el restante 2 % fue debido al error. Para el CHP la variabilidad obtenida fue cerca del 97 %. El  $r^2$  para cada modelo (HCTZ, CTZ y CHP), fue de 98,42 %, 97,91 % y 96,54 %, respectivamente, lo cual indicó que estos modelos se ajustaron al diseño planteado. Para los tres modelos se cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas lo que demostró su adecuación.

Las hipótesis acerca de los efectos principales en la CTZ, HCTZ y CHP, se rechazaron ( $H_0: \sigma^2_{-x} = 0$ ; no existió efecto de interacción significativo por cada factor individual), puesto que P-value  $< 0,05$ , excepto para la HCTZ por la  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$ . Los cuatro efectos de interacción considerados explicaron la variabilidad observada para la CTZ y la HCTZ con un nivel de confianza del 95 %, pero tres no poseen interacción de mayor orden de significancia (P-value  $> 0,05$ ), sólo la interacción de  $[\text{KH}_2\text{PO}_4] * [1\text{-HSS}]$  fue notoriamente significativa. De los cuatro efectos de interacción evaluados para el CHP, los de interacción  $\text{pH} * [1\text{-HSS}]$  y  $\text{pH} * [\text{KH}_2\text{PO}_4]$ , no mostraron ser significativos; los restantes efectos, demostraron ser dependientes entre sí.

**TABLA 5**  
Análisis de Varianza

CTZ							
Fuente	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P	
pH	1	0,0003511	0,0003511	0,0003511	64,62	0,000	
$\text{KH}_2\text{PO}_4(\text{M})$	1	0,0000375	0,0000375	0,0000375	6,90	0,018	
1-HSS(M)	1	0,0052925	0,0052925	0,0052925	973,94	0,000	
$\text{pH} * \text{KH}_2\text{PO}_4(\text{M})$	1	0,0000001	0,0000001	0,0000001	0,02	0,877	
$\text{pH} * 1\text{-HSS}(\text{M})$	1	0,0000220	0,0000220	0,0000220	4,06	0,061	
$\text{KH}_2\text{PO}_4(\text{M}) * 1\text{-HSS}(\text{M})$	1	0,0001685	0,0001685	0,0001685	31,01	0,000	
$\text{pH} * \text{KH}_2\text{PO}_4(\text{M}) * 1\text{-HSS}(\text{M})$	1	0,0000157	0,0000157	0,0000157	2,89	0,109	
Error	16	0,0000869	0,0000869	0,0000054			
Total	23	0,0059745					

HCTZ						
Fuente	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
pH	1	0,0004076	0,0004076	0,0004076	61,83	0,000
$\text{KH}_2\text{PO}_4(\text{M})$	1	0,0000057	0,0000057	0,0000057	0,87	0,366
1-HSS(M)	1	0,0088205	0,0088205	0,0088205	1338,21	0,000
$\text{pH} \times \text{KH}_2\text{PO}_4(\text{M})$	1	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,00	0,956
$\text{pH} \times 1\text{-HSS}(\text{M})$	1	0,0000267	0,0000267	0,0000267	4,05	0,061
$\text{KH}_2\text{PO}_4(\text{M}) \times 1\text{-HSS}(\text{M})$	1	0,0001810	0,0001810	0,0001810	27,45	0,000
$\text{pH} \times \text{KH}_2\text{PO}_4(\text{M}) \times 1\text{-HSS}(\text{M})$	1	0,0000222	0,0000222	0,0000222	3,37	0,085
Error	16	0,0001055	0,0001055	0,0000066		
Total	23	0,0095691				

CHP						
Fuente	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
pH	1	0,0001659	0,0001659	0,0001659	48,34	0,000
$\text{KH}_2\text{PO}_4(\text{M})$	1	0,0002490	0,0002490	0,0002490	72,55	0,000
1-HSS(M)	1	0,0016352	0,0016352	0,0016352	476,49	0,000
$\text{pH} \times \text{KH}_2\text{PO}_4(\text{M})$	1	0,0000000	0,0000000	0,0000000	0,01	0,922
$\text{pH} \times 1\text{-HSS}(\text{M})$	1	0,0000069	0,0000069	0,0000069	2,02	0,174
$\text{KH}_2\text{PO}_4(\text{M}) \times 1\text{-HSS}(\text{M})$	1	0,0000704	0,0000704	0,0000704	20,51	0,000
$\text{pH} \times \text{KH}_2\text{PO}_4(\text{M}) \times 1\text{-HSS}(\text{M})$	1	0,0000964	0,0000964	0,0000964	28,09	0,000
Error	16	0,0000549	0,0000549	0,0000034		
Total	23	0,0022787				

Los resultados del ANOVA fueron sustentados por los gráficos de interacción (Figura 4), donde se observó que el factor  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  presentó interacción con el factor [1-HSS], para la CTZ, HCTZ y el CHP, por el cruce de las líneas, indicando un grado de interacción en el estudio. Las interacciones donde interviene el pH no fueron significativas, es decir, son independientes entre sí, con un 95 % de confianza.

Los gráficos de la superficie de respuesta ilustraron que en el menor valor del rango de pH, aumenta el  $k'$  de los analitos. Se observó la tendencia de un aumento leve en el  $k'$  en los niveles bajos de la  $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$ . El  $k'$  del CHP fue directamente proporcional a la [1-HSS] (Figura 4).

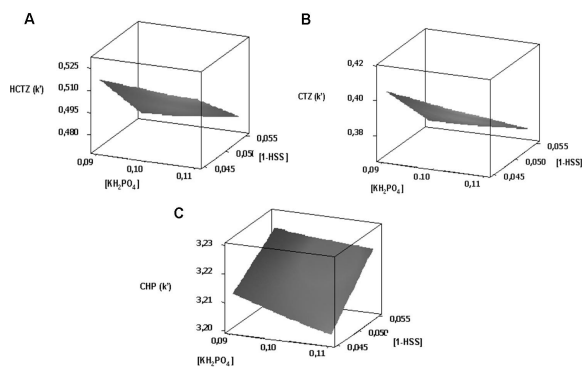


Fig. 4. Superficie de respuesta para mostrar la tendencia del factor de capacidad ( $k'$ ) de: A) HCTZ Vs [1-HSS]\* $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$ ; B) CTZ Vs [1-HSS]\* $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$  y C) CHP Vs [1-HSS]\* $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$

Del análisis de varianza para el diseño factorial fraccionado, resultó que el 99,99 % de la variabilidad en la CTZ, la HCTZ y el CHP se explica por el solvente, la temperatura, el flujo, el pH y los efectos de interacción, lo que demuestra un buen modelo estadístico para cada uno de los analitos.

Los efectos de interacción de segundo orden, donde interviene el solvente, influyen sobre los tres compuestos. Salvo la interacción Solvente\*Flujo para la CTZ, las demás combinaciones son eliminadas porque su aporte es tan pequeño que es despreciable. El estudio de los efectos principales (Figura 5), en los niveles más altos, muestra que el solvente, la temperatura y el flujo, representan una disminución del  $k'$  de la CTZ y la HCTZ. El solvente, en su proporción más alta, presenta una ligera disminución del  $k'$  para el CHP; el flujo disminuye considerablemente en su nivel alto; la temperatura y el pH tienden a mantenerse en todos sus niveles.

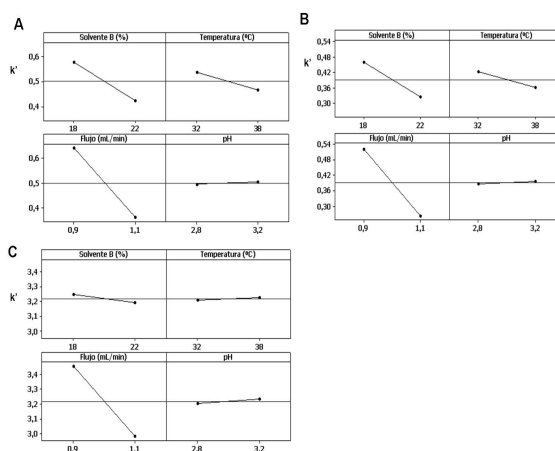


Fig. 5. Gráfico de efectos principales en el  $k'$  para el diseño factorial fraccionado ( $2^{4-1}$ ): A) HCTZ, B) CTZ y C) CHP

## DISCUSIÓN

La separación simultánea de estos analitos no es una tarea fácil ya que tienen características fisicoquímicas muy diferentes. La HCTZ es un fármaco del grupo de los ácidos débiles con características hidrofílicas, con un coeficiente de partición (octanol/agua) de -0,10 y valores de pKa de 7,0 y 9,2 [4]. A un pH alrededor de 3,0, se asegura la forma no ionizada y de esta manera se potenciaría la retención de la molécula por un aumento de las interacciones hidrofóbicas con una fase estacionaria del tipo  $\text{C}_{18}$ . La CTZ presenta características muy similares a la HCTZ, posee un pKa de 6,7 y de 9,5, con un coeficiente de partición (octanol/agua) de -0,18, debido a su vínculo oleofínico entre el

C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>, única diferencia estructural entre ellas [6].

En el caso del CHP, tiene características básicas, es un fármaco lipofílico con un coeficiente de partición (octanol/pH 7,4) de 1,20 y un pka de 9,4 [4]. Estas propiedades le confieren una fuerte retención en una fase estacionaria del tipo C<sub>18</sub>. No obstante, a diferencia de CTZ y HCTZ, a pH igual a 3,0 el CHP se encuentra protonado a nivel del nitrógeno secundario de este compuesto (Figura 1-C).

Este comportamiento de las moléculas de los analitos condujo a pensar que el agregado de un contraión como el 1-HSS garantizaría la retención del CHP por apareamiento iónico cuando el pH de la fase móvil es de 3,0.

El 1-HSS es un agente surfactante aniónico muy hidrofílico que se adsorbe a las cadenas alquílicas de la fase estacionaria, actuando como un intercambiador iónico, y bloqueando la actividad de los grupos silanoles presentes en la fase estacionaria lo que se traduce en una mayor eficiencia y supresión de la cola de los picos [37].

Por otra parte, la presencia de 1-HSS en la fase móvil, facilita la interacción de la CTZ y la HCTZ con la fase estacionaria, por medio de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, logrando conseguir la separación adecuada entre ellas con una buena resolución. Se ha reportado que la mayor retención de los ácidos débiles en presencia de un agente surfactante ocurre en solución ácida, donde predomina el compuesto bajo la forma neutra, por la interacción no polar, dipolo-dipolo y por el carácter donador-aceptor de protones del compuesto, con el agente surfactante y con la fase estacionaria [37].

En ese sentido, la presencia del 1-HSS a la fase móvil permitió una separación selectiva de HCTZ, CTZ y CHP utilizando el gradiente de elución (Tabla 2), que fue verificado por la idoneidad del sistema comparado con los límites especificados en la USP 31.

El método analítico desarrollado demuestra linealidad en un rango dinámico amplio, esto permite el análisis de los tres analitos a concentraciones muy bajas para cumplir con los requisitos exigidos para el desarrollo de un método analítico en las pruebas de disolución de FFSO-LI, así como sus perfiles de disolución. A concentraciones más altas permite el análisis de valoración de contenido, uniformidad de la unidad de dosificación y la monitorización de las pruebas de estabilidad.

Los experimentos del diseño factorial completo (2<sup>3</sup>) han permitido confirmar que el comportamiento de la CTZ y de la HCTZ son similares ante los cambios en la composición de la solución amortiguadora que lleva la fase móvil. Estos dos fármacos analizados al rango

de pH y de la [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] no presentan variabilidad en el k' y se confirma que en ese rango de pH se garantiza que las dos moléculas se localicen bajo la forma no ionizada. Esos datos indican que existe una interacción entre la [1-HSS] y la [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] que puede afectar el k' de los dos analitos, pero no se mostró significativa, sin embargo debe tomarse en cuenta que la presencia de 1-HSS en la fase móvil influyó en la retención de estos dos compuestos bajo la forma neutra.

El CHP mostró una conducta característica de los compuestos básicos con apareamiento iónico, donde el pH y el contraión (1-HSS) juegan un papel importante en el k' del analito. Es así como un aumento del pH disminuye el k' del CHP, y un aumento de la [1-HSS], significa un aumento del k'; las interacciones observadas no presentaron una influencia significativa en los resultados, demostrando un gran robustez para el CHP.

El diseño factorial fraccionado de 8 experimentos reflejó el comportamiento de los cuatro factores (solvente, temperatura, flujo y pH) y demostró pequeñas variaciones esperadas del k' de los tres compuestos al modificar la proporción del solvente B, por aumento de la fuerza de elución de la fase móvil, que lleva a su vez a la desorción del surfactante de la fase estacionaria, pero sin afectar la resolución entre los picos de CTZ e HCTZ. Se confirma por los resultados obtenidos, que el acetonitrilo es un buen modificador orgánico en las fases móviles donde hay presencia de agentes surfactantes y para las características de los analitos estudiados [37].

El impacto de estos diseños estadísticos sobre los otros parámetros cromatográficos (t<sub>R</sub>, R, factor cola) demostró el buen funcionamiento del sistema cromatográfico, ya que se mantuvieron con un % CV menor al 5 % por la influencia de la composición de la solución amortiguadora de la fase móvil. Para las variaciones cinéticas como son las plateadas en el diseño factorial fraccionado, se obtienen % CV más altos (% CV < al 12 %) para los t<sub>R</sub> en particular para la CTZ e HCTZ. El % CV de la R, factor cola, y el t<sub>R</sub> del CHP alcanzan valores menores al 7 %. Era de esperarse estos valores ya que se está modificando la velocidad del equilibrio del analito entre la fase móvil y la fase estacionaria, sin embargo se considera aceptable para este conjunto de variaciones simultáneas.

En cuanto a las áreas de los picos cromatográficos de los tres analitos, aportaron un %CV < al 1,5% en la respuesta termodinámica del sistema (variaciones en la solución amortiguadora) y en el estudio de la respuesta cinética del sistema, el área de los picos de los analitos poseen un %CV > al 11%. Demostrando que el sistema responde en el momento del análisis a pesar de los requisitos fijados en el estudio de robustez.



## CONCLUSIONES

1. El método es lo suficientemente selectivo para la detección cuantitativa del CHP y la HCTZ, monitoreando la CTZ como impureza de síntesis, en preparaciones farmacéuticas sólidas.

2. El estudio de la robustez basado en los diseños factoriales confirman un método robusto, donde pequeñas variaciones en la fase móvil y en las condiciones del sistema cromatográfico (porcentaje del solvente de mayor poder de elución, pH, flujo y temperatura), no afectan el factor de capacidad de los tres analitos en estudio, así como en la resolución entre ellos, especialmente entre la CTZ y la HCTZ. Lo que permitió conocer que las condiciones de trabajo resultaron óptimas en el procedimiento analítico.

3. El método propuesto se puede utilizar para análisis de rutina, control de calidad y para el estudio de la estabilidad de las tabletas que contienen estos fármacos, así como también en la realización de perfiles de solubilidad de los analitos y en los perfiles de disolución de sus FFSO-LI, de esta forma contribuir a la caracterización biofarmacéutica.

4. Se ha determinado la robustez del método analítico y así dotado de una adecuada flexibilidad, por lo que ahora se le debe adjuntar la calidad de los datos de medición por un proceso de validación, para corroborar su aplicación y fiabilidad, con ventajas para la precisión, sensibilidad, selectividad, y capacidad de automatización.

## 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.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] World Health Organization. Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Fortieth Report. WHO Series 937. Geneva 2006: 347-438.

[2] World Health Organization. Formulario Modelo de la OMS 2004 [en línea] Actualización 2009 [acceso 26 de mayo de 2010]; Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js5422s/>.

[3] World Health Organization. WHO Model list of essential medicines [en línea] 16a ed. 2009 [acceso 26 de mayo de 2010]; Disponible en: <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/index.html>.

[4] ChemSpider [base de datos en Internet].

Royal Society of Chemistry. Building community for chemists; 2008 [actualización 15 de diciembre de 2009; acceso 26 de Mayo de 2010]. Disponible en: <http://www.chemspider.com>.

[5] Vardanyan R, Hruby V. Synthesis of Essential Drugs. Amsterdam: Elsevier; 2006. p. 297.

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

[7] Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 31 NF 26. Formulario Nacional compendios de normas oficiales. Volumen 3. Edición en español. Estados Unidos de América; 2008.

[8] Quattrocchi O, Andrizzi S, Laba R. Introducción a la HPLC: Aplicación y práctica. 1er ed. Argentina: Merck; 1992.

[9] Hitscherich M, Rydberg E, Tsilifonis D, Daly R. Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and propranolol hydrochloride in tablets by high performance liquid chromatography. *J Liq Chrom.* 1987; 10 (5): 1011-1021.

[10] Chetty P. Development and assessment of propranolol sustained release dosage forms separately and in combination with hydrochlorothiazide [tesis de maestría]. Grahamstown: Rhodes University; 2006.

[11] Obando M, Estela J, Cerdà V. Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and losartan potassium in tablets by high-performance low-pressure chromatography using a multi-syringe burette coupled to a monolithic column. *Anal Bioanal Chem.* 2008; 391: 2349-2356.

[12] Jones A, LoBrutto R, Kazakevich Y. Effect of the counter-anion type and concentration on the liquid chromatography retention of  $\beta$ -blockers. *J Chromatogr A.* 2002; 964 (1-2): 179-187.

[13] Souri E, Farsam H, Amini L. Stereospecific determination of propranolol by high performance liquid chromatography using UV detection. *DARU J Pharm Sci.* 1999; 7 (2): 18-21.

[14] El-Saharty Y. Simultaneous high-performance liquid chromatographic assay of furosemide and propranolol HCL and its application in a pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal.* 2003; 33: 699-709.

[15] Modamio P, Lastra C, Montejo O, Marifio E. Development and validation of liquid chromatography methods for the quantitation of propranolol, metoprolol, atenolol and bisoprolol: Application in solution stability studies. *Int J Pharm.* 1996; 130 (1): 137-140.

[16] Venkatesh G, Ramanathan S, Mansor S, Nair N, Sattar M, Croft S, Navaratnam V. Development and validation of RP-HPLC-UV method for simultaneous

determination of buparvaquone, atenolol, propranolol, quinidine and verapamil: A tool for the standardization of rat *in situ* intestinal permeability studies. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 43 (4): 1546-1551.

[17] Varma M, Sarkar M, Kapoor N, Panchagnula R. pH-dependent functional activity of P-glycoprotein in limiting intestinal absorption of protic drugs 1. Simultaneous determination of quinidine and permeability markers in rat *in situ* perfusion samples. *J Chromatogr B.* 2005; 816: 243-249.

[18] Zakeri-Milani P, Valizadeh H, Azarmi Y, Barzegar-Jalali M, Tajerzadeh H. Simultaneous determination of metoprolol, propranolol and phenol red in samples from rat *in situ* intestinal perfusion studies. *DARU J Pharm Sci.* 2006; 14 (2): 102-108.

[19] Joshi S, Karbhari P, Bhoir S, Bindu K, Das C. Simultaneous estimation of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in tablet dosage form by RP-HPLC method. *J Pharma Biomed Anal.* 2010; 52 (3): 362-371.

[20] Delamoye M, Duverneuil C, Paraire F, Mazancourt P, Alvarez J. Simultaneous determination of thirteen  $\beta$ -blockers and one metabolite by gradient high-performance liquid chromatography with photodiode-array UV detection. *Forensic Sci Int.* 2004; 141 (1): 23-31.

[21] Singh A, Kedor-Hackmann E, Santoro M. Enantiomeric separation and quantitative determination of propranolol enantiomers in pharmaceutical preparations by chiral liquid chromatography. *Braz J Pharm Sci.* 2004; 40 (3): 301-308.

[22] Gupta Y, Shrivastava A, Duggal D, Patel A, Agrawal S. A new RP-HPLC method for simultaneous estimation of nebivolol hydrochloride and hydrochlorothiazide in dosage forms. *J Young Pharmacists.* 2009; 1 (3): 264-269.

[23] 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.

[24] Patel L, Suhagia B, Shah P, Shah R. Simultaneous estimation of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in tablet dosage form by RP-HPLC method. *Indian J Pharm Sci.* 2006; 68 (5): 635-638.

[25] Tarte P, Wate S, Bondre A, Paunekar G. Simultaneous determination of nebivolol and hydrochlorothiazide in tablet dosage form by RP-HPLC. *International Journal of PharmTech Research.* 2009; 1 (3): 720-724.

[26] Durga D., Satyanarayana N, Sait S, Ramakoti Y, Mukkanti K. Simultaneous determination of losartan potassium, atenolol and hydrochlorothiazide

in pharmaceutical preparations by stability-indicating UPLC. *J Chromatogr.* 2009; 70: 647-651.

[27] Safeer K, Anbarasi B, Senthil N. Analytical method development and validation of amlodipine and hydrochlorothiazide in combined dosage form by RP-HPLC. *Int J Chem Tech Res.* 2010; 2 (1): 21-25.

[28] Al-Momani I. Determination of hydrochlorothiazide and enalapril Maleate in tablet formulations by reversed-phase HPLC. *Turk J Chem.* 2001; 25: 49-54.

[29] Jancic B, Knezevic N, Malenovic A, Popovic I, Ivanovic D, Medenica M. Chromatographic analysis of lisinopril, hydrochlorothiazide and their impurities in tablets [en línea]. [acceso 06 de junio de 2010]; 12 (1). Disponible en: [www.magum.hacettepe.edu.tr/mcrd/pdf/P75.pdf](http://www.magum.hacettepe.edu.tr/mcrd/pdf/P75.pdf).

[30] Fliieger J. The effect of chaotropic mobile phase additives on the separation of selected alkaloids in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2006; 1113 (1-2): 37-44.

[31] LoBrutto R, Jones A, Kazakevic Y. Effect of counter-anion concentration on retention in high-performance liquid chromatography of protonated basic analytes. *J Chromatogr A.* 2001; 913 (1-2): 189-196.

[32] Gritti F, Guiochon G. Role of the buffer in retention and adsorption mechanism of ionic species in reversed-phase liquid chromatography: I. Analytical and overloaded band profiles on Kromasil-C18. *J Chromatogr A.* 2004; 1038 (1-2): 53-66.

[33] Gritti F, Guiochon G. Effect of the pH, the concentration and the nature of the buffer on the adsorption mechanism of an ionic compound in reversed-phase liquid chromatography: II. Analytical and overloaded band profiles on Symmetry-C18 and Xterra-C18. *J Chromatogr A.* 2004; 1041 (1-2): 63-75.

[34] Pan L, LoBrutto R, Kazakevich Y, Thompson R. Influence of inorganic mobile phase additives on the retention, efficiency and peak symmetry of protonated basic compounds in reverse phase liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2004; 1049: 63-73.

[35] Hashem H, Jira T. Effect of chaotropic mobile phase additives on retention behaviour of  $\beta$ -blockers on various reversed-phase high-performance liquid chromatography columns. *J Chromatogr A.* 2006; 1133 (1-2): 69-75.

[36] Abdel M, El-Gendy A, Shokry E. Comparative study of isocratic and gradient elution chromatography in stability indicating assay of an antihypertensive drug combination. *J American Sci.* 2010; 6(12): 1227-1236.

[37] Ruiz Á, Carda B, Torres L, García Á. Review: Retention mechanisms in micellar liquid chromatography.

J Chromatogr A. 2009; 1216: 1798-1814.

[38] Pérez J, Pujol M. Validación de métodos analíticos. España: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria; 2001. p 95-105.

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