



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO**  
**EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**Determinación simultánea de los antihipertensivos Captopril-  
Hidroclorotiazida y Metoprolol-Hidroclorotiazida en tabletas mediante  
cromatografía de gases (CG-FID)**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

HUGO AYALA ESQUIVEL

TUTOR: DRA. ARACELI PEÑA ÁLVAREZ  
FACULTAD DE QUÍMICA  
MÉXICO, D.F. MARZO 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

**Biblioteca Central**

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**

**Tesis Digitales**

**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**

**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por una vez más darme la oportunidad de superarme y formar parte del grupo de mexicanos con una educación superior de excelencia.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento a la Dra. Araceli Peña Álvarez por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de esta tesis, así mismo agradezco a la profesora Rocio Juárez por su disponibilidad y participación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada con el No. de becario 409676 para el desarrollo de este proyecto de investigación.

A las sinodales por sus comentarios y aportes para mejorar este proyecto de investigación. Mi más sincero agradecimiento a cada una de ellas.

Le doy gracias a mis padres por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida. A mis hermanos por ser parte importante de mi vida y representar la unidad familiar.

Gracias a esas personas importantes en mi vida, que siempre estuvieron listas para brindarme toda su ayuda. Con todo mi cariño está tesis se las dedico a ustedes: todos mis amigos y maestras de Quick Learning.

A las maestras Lolita y María Luisa que durante mucho tiempo me han ayudado a formarme como profesional y persona. Gracias por cada una de los consejos que me dieron.

Finalmente, gracias a Dios por ser esa fuerza que me impulsa todos los días a seguir adelante.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 101 del Departamento de Química Analítica de la División de Estudios de Posgrado, Edificio "B" de la Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

# Índice

## Resumen

<b>1.</b>	<b>Introducción</b>	<b>8</b>
<b>2.</b>	<b>Marco teórico</b>	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b>Hipertensión arterial</b>	<b>10</b>
2.1.1	Fisiopatología	10
2.1.2	Tratamientos para la hipertensión arterial	11
2.1.3	Clasificación de fármacos antihipertensivos	12
2.1.4	Terapia farmacológica combinada	14
<b>2.2</b>	<b>Generalidades de los principios activos</b>	<b>15</b>
2.2.1	Captopril	15
2.2.2	Metoprolol	17
2.2.3	Hidroclorotiazida	19
<b>2.3</b>	<b>Cromatografía</b>	<b>21</b>
2.3.1	Generalidades	21
2.3.2	Clasificación de métodos cromatográficos	22
2.3.3	Derivatización en cromatografía de gases	24
2.3.4	Derivatización asistida por microondas (MAD)	25
<b>2.4</b>	<b>Desarrollo analítico</b>	<b>29</b>
2.4.1	Criterios para seleccionar un método analítico	29
2.4.2	Clasificación de métodos analíticos	30
2.4.3	Métodos analíticos reportados para la determinación de antihipertensivos	31
<b>2.5</b>	<b>Validación</b>	<b>34</b>
2.5.1	Validación de métodos analíticos	34
2.5.2	Definición de parámetros	35
<b>3.</b>	<b>Objetivos</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo general</b>	<b>39</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivo particulares</b>	<b>39</b>
<b>4.</b>	<b>Desarrollo experimental</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Materiales y equipo</b>	<b>40</b>
<b>4.2</b>	<b>Sustancias de referencia y reactivos</b>	<b>40</b>
<b>4.3</b>	<b>Soluciones estándares</b>	<b>40</b>
<b>4.4</b>	<b>Derivatización</b>	<b>41</b>
<b>4.5</b>	<b>Identificación</b>	<b>41</b>
<b>4.6</b>	<b>Análisis cromatográfico</b>	<b>42</b>
<b>4.7</b>	<b>Validación de los métodos</b>	<b>42</b>
4.7.1	Precisión del sistema	42

4.7.2	Linealidad del sistema	43
4.7.3	Exactitud del método	43
4.7.4	Especificidad	44
4.7.5	Precisión del método	44
4.7.6	Intervalo de linealidad (linealidad del método)	44
<b>4.8</b>	<b>Muestras</b>	<b>45</b>
<b>5.</b>	<b>Resultados y discusión de resultados</b>	<b>47</b>
<b>5.1</b>	Derivatización e identificación de los analitos	47
<b>5.2</b>	Derivatización utilizando MTBSTFA	48
<b>5.3</b>	Derivatización utilizando yoduro de metilo	52
<b>5.4</b>	Validación del método	57
5.4.1	Linealidad	58
5.4.2	Precisión	60
5.4.3	Especificidad	60
5.4.4	Precisión del método	67
5.4.5	Exactitud	67
5.4.6	Intervalo de linealidad	67
<b>5.5</b>	<b>Análisis de las muestras comerciales</b>	<b>70</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>74</b>
<b>7.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>75</b>
<b>8.</b>	<b>Anexo I. Datos de la Validación de los métodos analíticos para la valoración de CAP-HCT y MET-HCT</b>	<b>80</b>

## Resumen

Para asegurar los niveles de calidad de los productos farmacéuticos se requiere de técnicas analíticas capaces de determinar el contenido de cada uno de los principios activos que constituyen a dicho medicamento.

Debido a la necesidad de un control de medicamentos más riguroso en nuestro país, la validación de los métodos analíticos es un requisito que establece la Ley General de Salud en el Diario Oficial desde 1994, donde marca los parámetros mínimos para ser validados, cuya finalidad es tener un medicamento seguro en todo aquello que pueda afectarlo en su fabricación además de ser eficaz en cuanto a su acción terapéutica.

En este trabajo se desarrolló un método por cromatografía de gases con detección de ionización en llama (CG-FID), para la determinación simultánea de antihipertensivos en diferentes medicamentos: Captopril (CAP) y Metoprolol (MET) en sus correspondientes combinaciones con Hidroclorotiazida (HCT). La confirmación se efectuó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

Los parámetros para validar los métodos desarrollados de CAP/HCT y MET/HCT fueron: linealidad del sistema, precisión, exactitud, especificidad, precisión del método e intervalo de linealidad. Los métodos desarrollados resultan ser linealmente aceptables, exactos y precisos.

La metodología desarrollada y validada se aplicó a 2 medicamentos: tabletas (Co-Altiver) Captopril / Hidroclorotiazida 25 mg/12.5 mg, las cuales combinan un agente antihipertensivo-diurético y tabletas de liberación prolongada (Selopres Zok) Succinato de Metoprolol / Hidroclorotiazida 95 mg/12.5 mg las cuales combinan un bloqueador selectivo del receptor  $\beta_1$  y un diurético.

Al tratarse de formas farmacéuticas, documentos oficiales como lo son las farmacopeas, presentan métodos de análisis para este tipo de productos. En el caso de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), no existen métodos de valoración de simultánea dentro de las monografías de los fármacos estudiados, no siendo este el caso de la Farmacopea de Estados Unidos (USP), donde se describen métodos para la valoración de CAP-HCT y MET-HCT, los

cuales a diferencia de este trabajo, conllevan etapas de extracción líquido-líquido para separar a los analitos uno de otro. Para ambos casos, en base a la solubilidad de los analitos, se elige el medio de disolución para la preparación de las soluciones de trabajo y posteriormente se agregan etapas de filtración y/o centrifugación al procedimiento.

Los métodos desarrollados en este estudio mediante CG-FID, ofrecen varias ventajas, entre las que destacan: análisis simultáneo de las combinaciones CAP-HCT y MET-HCT en lugar de destinar un análisis cuantitativo para cada uno de los fármacos incluidos en la presentación comercial, la reducción en los residuos y el consumo de disolventes es un factor a considerar debido a la tendencia en química verde de hoy en día puesto que en cada monografía de las farmacopeas se especifican volúmenes mayores a los utilizados en este trabajo para alcanzar la concentración de trabajo y finalmente el tiempo de análisis se ve reducido al ser una determinación simultánea. Los métodos desarrollados cumplen con estos propósitos.

En todas las muestras analizadas se identificaron los analitos en estudio y el contenido de los principios activos fue determinado, obteniéndose que Captopril e Hidroclorotiazida cumplen con la especificación; 101.70% y 92.98% respectivamente con CV < 8.43 %. Para Metoprolol e Hidroclorotiazida 101.22% y 98.29% respectivamente con CV < 7.72%. Así pues, ambas muestras comerciales cumplen con la especificación descrita en FEUM 10° y USP 33.



# 1.Introducción

La hipertensión (HTA) es una enfermedad de etiología múltiple que produce daño vascular sistémico. En la actualidad tiene una prevalencia elevada en México, por lo que se considera un problema de salud pública.

Aunque fármacos vasodilatadores puros (como Hidralazina y Minoxidilo) y simpaticolíticos de acción central y periférica pueden utilizarse en el tratamiento de la HTA, en general, existen siete grupos terapéuticos propuestos. Estos grupos son: diuréticos,  $\beta$ -bloqueadores,  $\alpha$ -bloqueadores, bloqueantes  $\alpha + \beta$ , inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), antagonistas o bloqueantes de los canales de calcio (AC) y antagonistas de los receptores de la angiotensina II.

Un medicamento  $\beta$ -bloqueante/diurético es Metoprolol/Hidroclorotiazida (MET-HCT) cuya combinación es utilizada para tratar la presión arterial alta y la retención de líquidos ocasionada por diversas afecciones. Por otra parte Captopril/Hidroclorotiazida (CAP-HCT) es un medicamento inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina / diurético. La combinación de estos principios activos controla los síntomas de la hipertensión, pero no la cura. Las dos sustancias activas actúan conjuntamente para lograr una disminución de la presión arterial, superior a la obtenida con cada una de ellas por separado.

Se han desarrollado diversas metodologías para la cuantificación de estos analitos en matrices biológicas, así como métodos oficiales para formas farmacéuticas. Dichos métodos abarcan espectrofotometría, cromatografía de líquidos y gases así como su acoplamiento con espectrometría de masas.

Existe una tendencia definida a elegir procedimientos para el análisis de muchos fármacos donde los factores de selectividad, especificidad y sensibilidad juegan un papel determinante en la elección de un método. A pesar de que los métodos espectrofotométricos y CLAR cumplen con los factores mencionados, en las monografías incluidas en las farmacopeas FEUM y USP, los métodos CLAR incluidos en ellas tienen algunas desventajas tales como el uso de disolventes de toxicidad alta, impedimento en el análisis simultáneo debido a las propiedades fisicoquímicas de los fármacos en combinación, tamaño de muestra grande y

tiempos de análisis largos. La cromatografía de gases constituye un método que puede asociarse a la resolución de problemas concretos, tal es el caso de la cuantificación de los fármacos estudiados en este trabajo.

Por lo anterior, en este trabajo se desarrolló un método analítico por cromatografía de gases (CG-FID) para la cuantificación simultánea de Captopril-Hidroclorotiazida en tabletas y otro para la determinación simultánea de Metoprolol-Hidroclorotiazida en tabletas de liberación prolongada. Se encontraron las condiciones idóneas de ambos métodos analíticos en donde no se analizaron por separado los compuestos de interés, por lo que el problema se tradujo en desarrollar y validar un método para cada combinación de trabajo, capaz de llevar a cabo el análisis simultáneo.

## 2.Marco teórico

### 2.1 Hipertensión arterial

#### 2.1.1 Fisiopatología

La hipertensión arterial sistémica (HAS) es una enfermedad crónica, controlable de etiología multifactorial, que se caracteriza por un aumento sostenido en las cifras de la presión arterial sistólica (PS) por arriba de 140 mm Hg, y/o de la presión arterial diastólica (PD) igual o mayor a 90 mm Hg, en la tabla 1 se muestra una clasificación de la enfermedad con respecto a las cifras de PS y PD.

**Tabla 1.** Clasificación de la presión arterial

<b>Clasificación de presión arterial</b>	<b>Presión arterial sistólica (mm Hg)</b>	<b>Presión arterial diastólica (mm Hg)</b>
Normal	< 120	y < 80
Pre-hipertensión	120 – 139	ó 80 - 89
Hipertensión etapa 1	140 – 159	ó 90 - 99
Hipertensión etapa 2	≥ 160	ó ≥ 100

En general la descripción de la fisiopatología de la hipertensión arterial (HTA) no es sencilla, debido a que la elevación de la presión arterial no representa una enfermedad por sí misma sino que es una manifestación sintomática aislada de diversos trastornos que afectan mecanismos homeostáticos cardiovasculares. Sin embargo, es útil caracterizar a la hipertensión como un trastorno generalizado que puede ser inducido por una causa solitaria identificable o por varias alteraciones primarias. Estos dos tipos de hipertensión no se excluyen mutuamente, dado que, en la mayor parte de los llamados estados hipertensivos secundarios, es posible identificar una causa definida de hipertensión (Alvear, 2005).

Se han implicado múltiples factores fisiopatológicos en el origen de la hipertensión: incremento del tono simpático, quizás relacionado con una respuesta al estrés psicosocial; sobreproducción de hormonas retenedoras de sodio y vasoconstrictoras; ingesta excesiva y prolongada de sodio, así como un aporte

inadecuado de calcio y potasio en la dieta; secreción de renina incrementada o inapropiada, con la resultante sobreproducción de angiotensina II y aldosterona; producción deficitaria de sustancias vasodilatadoras tales como prostaciclina y óxido nítrico (ON) y de péptido natriuréticos; alteraciones en la expresión del sistema de las calicreínas-cininas que afectan el tono vascular y la regulación renal del sodio; anormalidades en la resistencia vascular, incluyendo lesiones selectivas en la microvasculatura renal del sodio; anormalidades en la resistencia vascular; diabetes mellitus (DM); resistencia a la insulina; obesidad; actividad incrementada de factores de crecimiento vascular; alteraciones en los receptores adrenérgicos que afectan el cronotropismo, anotropismo y el tono vascular y alteraciones en el transporte iónico celular (Hernández, 2011).

### **2.1.2 Tratamientos para la hipertensión arterial**

La HTA es una de las enfermedades crónicas de mayor prevalencia en México. En nuestro país existen más de trece millones de personas con este padecimiento, de las cuales un poco más de ocho millones no han sido diagnosticadas, de ahí que posteriormente la terapia farmacológica sea un factor clave en el control de esta enfermedad (Secretaría de Salud, 2013).

Los costos económicos asociados al tratamiento de esta enfermedad y sus complicaciones representan una carga para los pacientes y los servicios de salud. Para contender con este importante problema, es necesario contar con acciones preventivas junto con el tratamiento y control de esta enfermedad.

La meta de la terapia antihipertensiva es la reducción de la morbilidad por eventos cardiovasculares, cerebrovasculares y la prevención del daño renal. Se recomienda lograr cifras inferiores a 140/90 mm Hg. El tratamiento implica recomendar cambio del estilo de vida a todos los pacientes, asociado o no con terapia farmacológica (Gradman, 2010).

Principalmente el tratamiento farmacológico adopta la modificación del estilo de vida. Inicialmente se recomienda empezar con diuréticos tiazídicos y si no hay control adecuado, adicionar IECA, antagonistas de los receptores de angiotensina II,  $\beta$ -bloqueadores o calcioantagonistas.

El antihipertensivo ideal debe: tener un buen perfil hemodinámico, evitar el daño de órgano blanco, tener pocos efectos adversos, ser eficaz en monoterapia, permitir buena adherencia al tratamiento y ser económico. En la figura 1 se muestra el algoritmo para designar tratamiento médico.

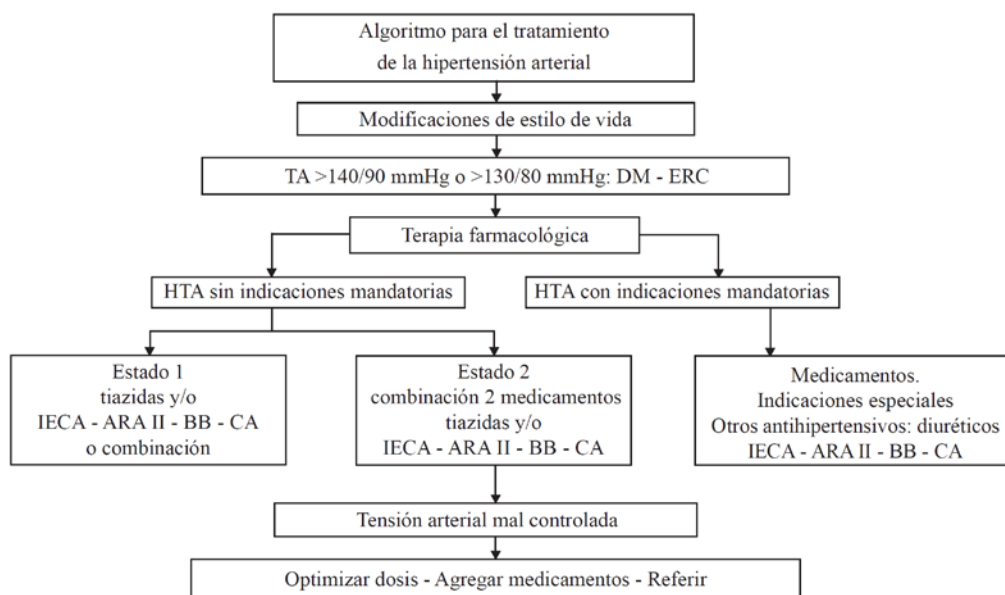


Fig. 1. Algoritmo para el tratamiento de la hipertensión arterial

### 2.1.3 Clasificación de fármacos antihipertensivos

En la actualidad se utilizan siete familias de fármacos para el control de la hipertensión (Hernández, 2011):

- 1) **Diuréticos.** Diuréticos en ausencia de otra enfermedad concomitante, y junto con los  $\beta$ -bloqueadores son los agentes de primera elección. Pueden causar una amplia gama de efectos adversos metabólicos y alteraciones electrolíticas, principalmente depleción de potasio, arritmias e hiperuricemia.
- 2)  **$\alpha$ -bloqueadores.** Bloquean de forma selectiva y competitiva los receptores  $\alpha$ -1-adrenérgicos postsinápticos vasoconstrictores, produciendo como

consecuencia vasodilatación arteriovenosa y reducción de las resistencias vasculares periféricas y de la presión arterial sin modificar la frecuencia cardíaca, el flujo sanguíneo renal, la tasa de filtración glomerular, la tolerancia a la glucosa y los niveles plasmáticos de potasio y ácido úrico.

- 3)  **$\beta$ -bloqueadores.** Producen un bloqueo competitivo y reversible de las acciones de las catecolaminas mediadas a través de la estimulación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, disminuyendo el consumo de oxígeno del miocardio y el gasto cardíaco.
- 4) **Bloqueadores de canales de calcio o calcioantagonistas.** Inhiben el flujo de entrada de calcio a través de los canales de calcio tipo-L de las membranas celulares, disminuyendo como consecuencia la concentración de calcio vascular y produciendo vasodilatación arteriovenosa reduciendo así la presión.
- 5) **IECA (inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina).** Produce un bloqueo competitivo de la enzima que transforma la angiotensina I en angiotensina II, reduciendo los niveles plasmáticos y tisulares de angiotensina II, potente vasoconstrictor arteriovenoso que aumenta el tono simpático y libera vasopresina y aldosterona con la consecuente retención de hidrosalina.
- 6) **Antagonistas del receptor AT1 de la angiotensina (ARA II).** Bloquean de forma competitiva y selectiva los receptores AT1, inhibiendo la acción de angiotensina II, presentando una acción antihipertensiva gradual que se acompaña de una regresión de la hipertrofia cardíaca y del remodelado vascular.
- 7) **Bloqueadores directos de renina.** Los antihipertensivos de acción central y los vasodilatadores directos son cada vez menos utilizados al presentar

un perfil de efectos adversos más desfavorable que el resto de los antihipertensivos, no recomendándose actualmente como medicamentos de primera elección, sino en situaciones concretas.

### 2.1.4 Terapia farmacológica combinada

El tratamiento farmacológico debe ser individualizado, de acuerdo con el cuadro clínico, tomando en cuenta el modo de acción, las indicaciones y las contraindicaciones, los efectos adversos, las interacciones farmacológicas, las enfermedades concomitantes y el costo económico (Gonzalez y cols., 2010).

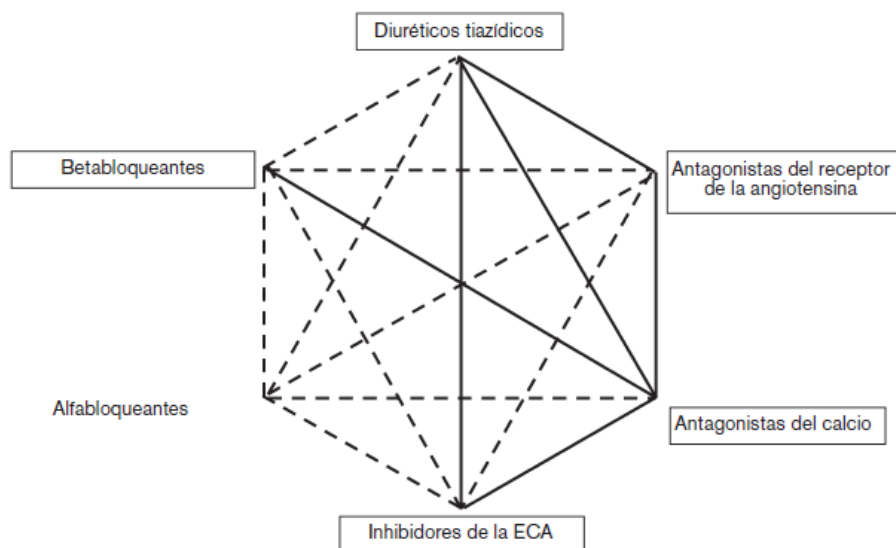
Se recomienda la combinación de dos fármacos de diferentes clases a dosis bajas cuando no se logra controlar la enfermedad con un solo fármaco, ya que pueden lograr mayor eficacia que un solo fármaco, reduciendo así el riesgo de efectos adversos. En tabla 2 se encuentran las combinaciones de principios activos que sugiere la NOM 030.

**Tabla 2.** Combinación de principios activos en medicamentos destinados al control de la presión arterial según NOM-030

Medicamento	Principios activos	Dosis (mg)
Bloqueadores $\beta$ -adrenérgicos / Diuréticos	Atenolol / Clortalidona	50 - 100 / 25 - 12.5
	Metoprolol / Hidroclorotiazida	100 / 12.5
	Nadolol / Bendroflumetida	40 - 80 / 5
Inhibidores de la ECA / Diuréticos	Captopril / Hidroclorotiazida	50 - 25 / 25 - 12.5
	Maleato de enalapril / Hidroclorotiazida	20 - 10 / 12.5 - 25
	Lisinopril / Hidroclorotiazida	20 / 12.5
Antagonistas receptores de angiotensina II / Diuréticos	Losartán potásico / Hidroclorotiazida	50 / 12.5
	Triamtereno / Hidroclorotiazida	50.5 / 25
Otras combinaciones	Clorhidrato de amilorida / Hidroclorotiazida	5 / 50

La combinación de principios activos es necesaria en los casos en que el paciente necesita llevar un control estricto. En promedio 2 de cada 3 pacientes requieren combinación de fármacos. La más efectiva es aquella que combina medicamentos a dosis terapéuticas con diferente mecanismo de acción (Gradman, A.H., 2010). Esto permite tener sinergia en su efecto antihipertensivo, reducir los mecanismos homeostáticos capaces de bloquear el efecto de fármacos

individuales y minimizar los efectos indeseables (Hernández y cols., 2009). En la Fig. 2 se muestra las combinaciones posibles de acuerdo a las familias de fármacos antihipertensivos.

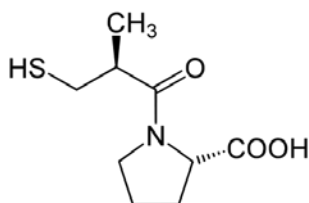


**Fig. 2.** Posibles combinaciones entre algunos grupos de antihipertensivos. Las combinaciones de elección en la población hipertensa general se representan con líneas gruesas. Los recuadros indican los grupos de fármacos que se ha comprobado que resultan beneficiosos en ensayos de intervención controlados.

## 2.2 Generalidades de los principios activos

### 2.2.1 Captopril

**Nombre químico:** El Captopril es designado químicamente como 1-(2S)-3-mercaptopropionil-L-prolina. La estructura se muestra en la figura 3.



**Fig. 3.** Estructura química de Captopril (CAP)

**Peso molecular:** 217.18 g/mol



**Formula molecular:**  $C_9H_{15}NO_3S$

**Solubilidad:** fácilmente soluble en agua, etanol, metanol, diclorometano y cloroformo

**pka:** 4.02

**log P:** 0.73

### **Presentación comercial de la asociación con Hidroclorotiazida**

Tabletas. Cada tableta contiene 50 mg CAP y 25 mg HCT ó 25 mg y 12.5 mg respectivamente. Excipiente cbp 1 tableta.

### **Farmacocinética y farmacodinamia**

El mecanismo de acción de CAP aún no ha sido completamente dilucidado. Sus efectos benéficos en la hipertensión e insuficiencia cardíaca parecen ser sobre todo el resultado de la supresión del sistema renina-angiotensina-aldosterona. Sin embargo, no existe una correlación consistente entre los niveles de renina y la respuesta del fármaco. La renina, una enzima sintetizada por los riñones, es liberada a la circulación, donde interactúa con un sustrato de globulina plasmática para producir angiotensina I, un decapeptido relativamente inactivo. La angiotensina I es convertida por la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) en angiotensina II, una potente sustancia vasoconstrictora endógena. La angiotensina II también estimula la secreción de aldosterona por la corteza suprarrenal, contribuyendo con esto a la retención de sodio y líquidos. El CAP previene dicha conversión por la inhibición de la ECA, una peptidildipeptidasa carboxihidrolasa.

Luego de la administración de una dosis terapéutica oral, la absorción de CAP es rápida y el pico sanguíneo se obtiene al cabo de 1 hora. La presencia de alimentos en el tubo gastrointestinal reduce la absorción en 30% a 40%, por lo que debe administrarse una hora antes de las comidas. La absorción mínima promedio del Captopril es de 75%. En un período de 24 horas, alrededor del 95% de la dosis

absorbida es eliminada por la orina, 40% a 50% como fármaco libre; la mayor parte del fármaco restante se elimina como dímero disulfuro de Captopril y como disulfuro de cisteína-Captopril. Alrededor del 25% a 30% del fármaco circulante se encuentra unido a las proteínas plasmáticas. La vida media aparente de eliminación es probable que sea menor de 2 horas.

La duración del efecto está relacionada con la dosis y se prolonga en presencia de un diurético tiazídico, así los efectos del CAP y diuréticos tiazídicos son aditivos. En contraste, el CAP y los  $\beta$ -bloqueadores tienen un efecto menos aditivo. La presión arterial disminuye en el mismo grado (Vademécum IPE, 2013).

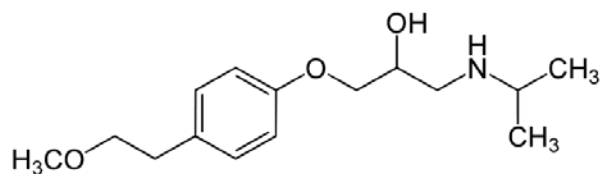
## Dosificación

En hipertensión arterial se sugiere comenzar el tratamiento con 25 mg 3 veces por día; dosis que puede ser aumentada a 50 mg 3 veces por día. De ser necesaria mayor disminución de la presión arterial, la dosis puede ser aumentada hasta 100 mg 3 veces al día y luego, si fuera necesario, hasta 150 mg 3 veces por día. No se debe sobrepasar la dosis máxima de 450 mg diarios (Vademécum IPE, 2013).

### 2.2.2 Metoprolol

**Nombre químico:** (RS)-1-(isopropilamino)-3-[4-(2-metoxietil)fenoxi] propan-2-ol.

La estructura se muestra en la figura 4.



**Fig 4.** Estructura química de Metoprolol (MET)

**Peso molecular:** 267.36 g/mol

**Formula molecular:**  $C_{15}H_{25}NO_3$

**Solubilidad:** muy soluble en agua; fácilmente soluble en cloroformo, en cloruro de metilo y en etanol; ligeramente soluble en acetona; casi insoluble en benceno y éter dietílico

**pKa:** 9.68

**log P:** 1.88

### **Presentación comercial de la asociación con Hidroclorotiazida**

Tabletas. Liberación prolongada: cada tableta contiene Succinato de Metoprolol 95 mg, Hidroclorotiazida 12.5 mg, excipiente cbp una tableta. 95 mg de succinato de Metoprolol son equivalentes a 100 mg de tartrato de Metoprolol (DrugBank, 2013).

### **Farmacocinética y farmacodinamia**

El Metoprolol se absorbe completamente por vía oral. Debido a un efecto de primer orden, la biodisponibilidad sistémica de MET a partir de una dosis oral única es aproximadamente del 50%. En comparación con las tabletas convencionales, la biodisponibilidad se reduce en 20% a 30% aproximadamente para las preparaciones de liberación controlada, pero no se ha demostrado ningún efecto sobre la eficacia clínica, ya que el área bajo la curva (ABC) del efecto para frecuencia cardíaca es la misma que para las tabletas convencionales. La afinidad de MET por las proteínas plasmáticas es baja, entre 5-10%.

El MET es sometido a metabolismo oxidativo en el hígado principalmente por la isoenzima CYP2D6. Se han identificado tres metabolitos principalmente, pero ninguno de ellos tiene efectos importantes de  $\beta$ -bloqueador. Más del 95% de la dosis oral puede recuperarse por orina. Aproximadamente el 5% de la dosis administrada se excreta sin cambios por orina. La vida media de eliminación de MET es en promedio de 3.5 horas. La tasa de depuración total es 1 L/min.

Debido a su baja afinidad por las proteínas plasmáticas, la farmacocinética de MET es poco afectada durante la disminución de la función hepática.

No se ha encontrado ninguna interacción farmacocinética entre MET e HCT, ni cuando se administra en combinación, ya sea en la forma convencional o de liberación controlada. Después de ser ingerida, la tableta se desintegra rápidamente permitiendo que las esferas se dispersen en el tubo digestivo y liberen MET de manera continua por un periodo de aproximadamente 20 horas. La velocidad de liberación es independiente de los factores fisiológicos tales como pH, alimentación y perístasis. Después de la desintegración de la tableta, HCT se absorbe rápidamente (DrugBank, 2013).

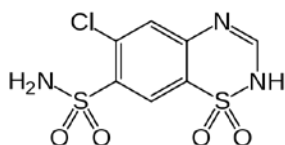
## Dosificación

Se recomienda adaptarla a cada paciente, en hipertensión 1 comprimido de liberación lenta por día; puede prescribirse, además, otro antihipertensivo. En formas leves de hipertensión  $\frac{1}{2}$  comprimido de liberación lenta. Angor pectoris: 100 a 200 mg por día. Infarto de miocardio: puede reducirse la dosificación recomendada según el estado hemodinámico del paciente. Dosis de mantenimiento: 200 mg/día vía oral, distribución en dos tomas, el tratamiento debe prolongarse durante 3 meses (DrugBank, 2013).

### 2.2.3 Hidroclorotiazida

**Nombre químico:** 6-cloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida-1,1-dióxido. La estructura se muestra en la figura 5.

#### Estructura química



**Fig 5.** Estructura química de Hidroclorotiazida (HCT)

**Peso molecular:** 297.74 g/mol

**Formula molecular:**  $C_7H_8N_3ClO_4S_2$

**Solubilidad:** fácilmente soluble en solución de NaOH, n-butilamina y en dimetilformamida; soluble en acetona; poco soluble en metanol; ligeramente soluble en agua; casi insoluble en éter dietílico, cloroformo y ácidos minerales. Muy poco soluble en agua.

**pka:** 9.09

**log P:** 1.94 (en HCl 0.1 N); 0.866 (en buffer glicina 0.1 M pH 3.0)

### **Farmacocinética y farmacodinamia**

La Hidroclorotiazida es un diurético de la familia de las tiazidas y está indicado en hipertensión arterial como monoterapia o combinado para aumentar el efecto de otros antihipertensivos cuando se trata de formas más severas de hipertensión.

La HCT afecta el mecanismo tubular de reabsorción de electrólitos. A dosis terapéuticas máximas todas las tiazidas incrementan la excreción de sodio y de cloro en cantidades equivalentes. Actúa sobre el mecanismo tubular renal de la absorción de electrólitos, aumenta la excreción urinaria de sodio y agua por inhibición de la reabsorción de sodio al principio de los túbulos distales y aumenta la excreción urinaria de potasio incrementando la secreción de potasio en el túbulo contorneado distal y en tubos colectores. La HCT se absorbe oralmente en 65-75% de la dosis administrada y su vida media plasmática es de 2.5 horas. La acción diurética de la HCT comienza a las horas posteriores a su administración oral y el efecto pico a las 4 horas; la acción persiste de 6 a 12 horas. Las tiazidas son eliminadas rápidamente por el riñón (DrugBank, 2013).

### **Dosificación**

En adultos como diurético se recomiendan de 25 mg a 100 mg una o dos veces al día, una vez en días alternados o una vez al día durante un periodo de 3 a 5 días a la semana; como antihipertensivo, 25 mg a 100 mg por día como dosis única o en 2 ingestas diarias. Niños: 1 mg a 2mg/kg al día como dosis única o en 2 tomas diarias (DrugBank, 2013).

## **2.3. Cromatografía**

### **2.3.1 Generalidades**

La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de métodos, que permite a los científicos separar los componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en ocasiones resulta imposible por otros medios (Atkins, P.W. y cols. 2007). En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza por una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible, y que se fija a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre ambas fases. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta migración, los componentes de la muestra se separan en “zonas” que pueden analizarse cualitativamente y/o cuantitativamente (Blumberg y Klee, 2001).

El empleo de la técnica cromatográfica como una herramienta analítica de uso diario en el laboratorio ha obligado a reconocer la importancia de las variables que pueden afectar la calidad y consistencia de la información que de ella se obtiene (Cramers y Leclercq, 1999). Resulta evidente que la cantidad de factores que pueden definir el éxito de un análisis cromatográfico es tal, que puede ser difícil enumerarlos en su totalidad, entre ellos podemos considerar:

- preparación de la muestra
- calidad de los disolventes
- volumen de inyección
- selección de la columna
- desempeño del instrumento

En el caso del análisis de medicamentos se tienen las mismas consideraciones, si los materiales son volátiles y estables en la fase gaseosa, la cromatografía de gases puede ser la técnica de elección dado que es simple de realizar, rápida y capaz de alta resolución (Barwick, 1999). Si es preciso aislar compuestos eluidos en cantidad, entonces una elección más ventajosa puede ser la cromatografía de reparto líquida o la cromatografía en capa delgada. Las columnas de cromatografía gaseosa no pueden manejar grandes cantidades de material y resulta difícil recuperar los gases calientes que eluyen.

Las técnicas de separación, en particular los métodos de cromatografía, son necesarias y valiosas para analizar las sustancias farmacéuticas. Los métodos cromatográficos en columnas se emplean del mismo modo en la separación de un fármaco de una matriz en forma de dosificación o de un medio biológico natural (Alfonso, 2003).

La cromatografía es un poderoso método de separación que tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia. En cromatografía de gases (CG), la muestra se volatiliza y la elución se produce por el flujo de una fase móvil constituida por un gas inerte (Skoog y cols., 2001).

### **2.3.2 Clasificación de los métodos cromatográficos**

Los métodos cromatográficos se pueden clasificar de dos modos distintos: cromatografía en plano y cromatografía en columna. En la cromatografía en columna, un tubo estrecho contiene la fase estacionaria a través de la cual se hace pasar la fase móvil por presión. En la cromatografía en plano, la fase estacionaria se fija sobre una placa plana o a los intersticios de un papel; en este caso la fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria por capilaridad o gravedad (Atkins y cols., 2007).

Es importante señalar que los equilibrios en los que se basan los dos tipos de cromatografía son idénticos y que la teoría desarrollada para la cromatografía en columna se adapta también fácilmente a la cromatografía en plano.

Una clasificación más fundamental de los métodos cromatográficos se basa en el tipo de fase móvil y estacionaria, y en la clase de equilibrios implicados en la transferencia de los solutos entre las fases. En la tabla 3 se da la relación de las tres clases generales de cromatografía.

**Tabla 3.** Clasificación de los métodos cromatográficos en columna (Skoog y cols., 2001).

<b>Clasificación general</b>	<b>Método específico</b>	<b>Fase estacionaria</b>	<b>Tipo de equilibrio</b>
Cromatografía de líquidos (CL) (fase móvil: líquida)	Líquido-líquido Reparto	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre líquidos inmiscibles
	Líquido-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
	Líquido-sólido, o adsorción	Sólido	Adsorción
	Intercambio iónico	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	Exclusión por tamaño	Líquido de los intersticios de un sólido/ sólido polimérico	Distribución / Exclusión
Cromatografía de gases (CG) (fase móvil: gas)	Gas-líquido	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre un gas y un líquido
	Gas-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
	Gas-sólido	Sólido	Adsorción
Cromatografía de fluidos supercríticos (CFS) (fase móvil: fluido supercrítico)		Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el fluido supercrítico y la superficie enlazada

Ateniendo al fundamento de la separación de las técnicas mencionadas en la tabla 3, la naturaleza de las fases interviene en el proceso de separación, así fases estacionarias sólidas retienen a los solutos por un doble efecto de adsorción física y química debido a fuerzas de Van der Waals (adsorción), atracciones electrostáticas (intercambio iónico) o en función del tamaño (permeabilidad en geles). Por otro lado, fases estacionarias líquidas o enlazada intervienen en la separación mediante equilibrios de distribución controlados por la diferente solubilidad de los solutos en las distintas fases, las cuales pueden ser líquidos inmovilizados sobre un soporte inerte (reparto) o un polímero de tipo inmovilizado sobre un sólido inerte por enlaces covalentes (afinidad).



Generalmente la cromatografía de reparto es del tipo más usado, la fase estacionaria debe tener polaridad semejante a la de los analitos y la fase móvil es de diferente polaridad y se suele hablar de dos tipos: fase normal (fase estacionaria polar) y fase reversa (fase estacionaria no polar). En fase normal los disolventes polares eluyen más rápidamente mientras que en fase reversa ocurren al contrario. Puede emplearse elución isocrática o en gradiente.

En cromatografía de adsorción como la fase estacionaria es polar suelen usarse fases móviles apolares. Para seleccionar la fase móvil suele considerarse no sólo su polaridad sino también su fuerza eluyente, el cual es un parámetro relacionado con la energía de adsorción por unidad de superficie.

En cromatografía iónica se emplean intercambiadores de iones como fases estacionarias, éstos son redes tridimensionales de macromoléculas con ciertas cargas electrostáticas fijas por unidad estructural. Pueden tomar iones de una disolución electrolítica y ceder otros de la misma carga en cantidad equivalente. La fase móvil suele ser una disolución acuosa que contiene especies iónicas. Los iones de la fase móvil compiten con los analitos por los sitios activos de la fase estacionaria. Se trata de un equilibrio heterogéneo.

### **2.3.3 Derivatización en cromatografía de gases**

La etapa de derivatización de un compuesto se emplea en muchos métodos analíticos en los que se emplea cromatografía de gases. La derivatización aumenta la volatilidad del analito, mejora las características cromatográficas del mismo al disminuir su polaridad y/o aumentar la sensibilidad de detección. Sin la disponibilidad de una amplia gama de reactivos derivatizantes, la aplicación de la cromatografía de gases en la química analítica se vería seriamente limitada (Wells, 1999).

El tipo de reacciones que comúnmente se llevan a cabo durante la derivatización se encuentran en la tabla 4. La mayoría de los reactivos derivatizantes remplazan átomos de hidrógeno lábiles de los heteroátomos con grupos menos polares (Barceló-Barrachina, 2005).

La cromatografía de gases se ha utilizado ampliamente para el análisis de aminas debido a sus ventajas inherentes, es decir, simplicidad, alto poder de resolución, alta sensibilidad, tiempo de análisis y bajo costo. En general, las aminas se pueden separar en fases estacionarias fuertemente básicas como sus formas libres, sin embargo se sabe que las aminas presentan generalmente absorción y descomposición, por lo que la derivatización de este grupo funcional es empleada para reducir su polaridad y mejorar sus propiedades cromatográficas. Con frecuencia las reacciones de derivatización son selectivas para el tipo de amina (primaria, secundaria, terciaria) y también se han utilizado para mejorar la detección y separación de estas aminas. En la tabla 5 se indican algunos reactivos de derivatización para análisis de aminas por cromatografía de gases que se utilizan en las reacciones de acilación, sililación, dinitrofenilización, formación de diferentes productos de condensación (bases de Schiff), permetilación y la formación de carbamatos, sulfonamidas y fosfamidas entre otras (Kataoka, 1996).

#### **2.3.4 Derivatización asistida por microondas (MAD)**

En la última década, la etapa de derivatización ha hecho uso de las microondas como fuente de energía en laboratorios de química analítica, química orgánica, medicina, síntesis de polímeros, ciencias de materiales y nanotecnología ya que se considera un eficaz y no contaminante método de activación.

El espectro electromagnético está conformado por diferentes regiones y el área de la radiación de microondas se encuentra entre la radiación de infrarrojo y ondas de radio. Los hornos de microondas tienen longitudes de onda en el rango de 1 mm a 1 m, que corresponden a las frecuencias de entre 30 y 3 GHz, por lo tanto las frecuencias de microondas para fines industriales y científicos son impuestos por las convenciones internacionales; las que se utilizan habitualmente son de 2.45 GHz (longitud de onda 12.2 cm).

**Tabla 4.** Tipos de reacciones de derivatización (Wells, R.J., 1999).

Tipo de reacción	Tipos de reactivos	Condiciones de reacción típicas	Grupos funcionales derivatizados
Alquilación / Esterificación	Diazoalcanos	Disolv. no polares	OH ácidos y NH
	Haluros de alquilo <sup>a,b</sup>	$\text{CH}_3\text{SOCH}_2^{(-)}$ en DMSO <sup>a</sup> $\text{K}_2\text{CO}_3$ – acetona <sup>b</sup>	Alcoholes, amidas Tioles, fenoles, ácidos, NH, NH ác.
	Haluros de alquilo <sup>c</sup>	$\text{K}_2\text{CO}_3$ -18-corona-6 disolv. no protónico	Tioles, fenoles, ácidos, NH, NH ác.
	Cloroformiatos de alquilo	Reacción en piridina con/sin 2° reactivo	Fenoles, ácidos
	Haluros de alquilo <sup>d</sup>	Transferencia de fase	Tioles, fenoles, ácidos, NH, NH ác.
	Sales de sulfonio o $\text{NH}_4^+$	Derivatización on-column	Tioles, fenoles, ácidos, NH, NH ác.
	Acetales amida de dialquilo	Dimetilformamida	OH ácidos
	Metanodiimina	Alcohol y disolv. aprótico	Ácidos
	Haluros de alquilo metálicos (R.G.)	Reacción directa, en dietiléter	Organometálicos
	Alcoholes/ $\text{BX}_3$ , HCl ó $\text{H}_2\text{SO}_4$	Reacción a $T^\circ\text{C}_{\text{amb}}$	Ácidos carboxílicos
	Transesterificación	Reacción con ROH/HCl, NaOR ó $\text{Me}_3\text{S}^+ \text{OH}$	Ésteres, glicéridos
Acilación	Acil-anhídridos	Anhídridos ó con base orgánica (piridina)	Alcoholes, fenoles
	Perfluoroacil-anhídrido	Reacción en piridina o medio org. base	Aminas, tioles
	Cloruros de acilo	Reacción directa (no medio ácido)	Alcoholes, fenoles, aminas, tioles
	Perfluoroacil-imidazol	Reacción directa (no medio ácido)	Alcoholes, fenoles, aminas, tioles
	N-metiltrifluorometil-trifluoracetamida	Reacción directa (no medio ácido)	Alcoholes, fenoles, aminas, tioles
	Perfluoroacil anhídrido - alcohol	Acilación/esterificación Combinada	Aminas ácidas
Condensación	Cloroformiatos de alquilo	Cloroformiato-piridina	Aminas, alcoholes, fenoles
	O-Alquiloxima	Reacción en alcohol/HCl	Cetonas
	Ácidos alquilborónicos	Mezcla de analito con ác. borónico	Dioles, amino-alcoholes, hidroxiácidos
	Aldehídos aromáticos	Calentamiento controlado	Aminas
	Formaldehído	Paraldehído / Ácido	Dioles, amino-alcoholes (más perfluoroacil derivados)

a – base fuerte

b – base débil

c – ionóforo base débil

d – sales cuaternarias de amonio

R.G., reactivos de Grignard

Los trabajos publicados con respecto a reacciones asistidas por microondas han aumentado en la última década, aproximadamente con más de 2000 publicaciones. Las principales razones de este aumento incluyen la disponibilidad de equipos comerciales destinados a laboratorios y el desarrollo de técnicas enfocadas al medio ambiente. Si bien es cierto que los aspectos de seguridad han mejorado, el interés principal es el realizar reacciones en el menor tiempo posible.

Debido a los beneficios de la no contaminación y la economía del proceso, los métodos que utilizan microondas son de gran interés para el desarrollo convencional, ya que los procedimientos se vuelven más limpios, seguros y fáciles de llevarse a cabo (Ruiz-Matute y cols., 2011)

El uso de MAD involucra el calentamiento efectivo de los materiales debido al calor generado por mecanismos dieléctricos y con la ventaja del aumento de temperatura por encima del punto de ebullición de la mezcla de reacción, esto en comparación con las condiciones convencionales de presión atmosférica (Damm y cols., 2009) . Esencialmente, ese tipo de calentamiento depende de la habilidad del material, ya sea un reactivo o un buen disolvente, para absorber energía de microondas y calentar el material que en consecuencia aumenta la reactividad de los compuestos.

Generalmente el resultado obtenido después de una reacción asistida por microondas, depende esencialmente del medio de reacción así como del mecanismo de reacción y su cinética. Sí la estabilización electrostática de los dipolo-dipolo y las interacciones del estado de transición son más efectivas que las del estado fundamental, la reactividad aumentará y por lo general reacciones químicas que no se producen por calentamiento convencional o que conducen a rendimientos bajos se pueden realizar utilizando radiación de microondas (Loupy y cols., 2005).

En la literatura está ampliamente reportado el uso de MAD en reacciones de derivatización, por ejemplo Deng y cols. (2005) desarrollaron un método por CG-EM para el análisis de aminoácidos en muestras biológicas; Silva y Ferraz

(2004) reportaron la derivatización de azúcares y ácidos orgánicos usando un horno de microondas casero, por otro lado Zuo y cols. (2007) analizaron.

**Tabla 5.** Reactivos y reacciones de derivatización para determinación de aminas por cromatografía de gases (Kataoka, H. 1996).

Reacción / reactivo	Tipo de amina	Detección <sup>a</sup>
<b>Acilación</b>		
Anídrido trifluoroacético	primaria, secundaria, amonio	DIL, DCE, EM-MIS
Anídrido pentafluoropropionico	primaria, secundaria	DFN, DCE, EM-MIS
Anídrido hexafluorobutírico	primaria, secundaria	DFN, DCE, EM-MIS
Anídrido cloro ó dicloroacético	primaria	DCE, EM-MIS
Cloruro de tricloroacetilo	primaria, secundaria	DCE
Cloruro de pentafluorobencilo	primaria, secundaria	DFN, DCE
Heptafluorobutimidazol	primaria, secundaria	DCE
N-Metilbis (trifluoroacetamida)	primaria, secundaria	DIL, EM-MIS
<b>Sililación</b>		
N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida	primaria, secundaria	EM-MIS
N-metil-N-( <i>t</i> -butildimetilsilil)-acetamida	primaria, secundaria	EM-MIS
Reactivos Pentafluorofenildimetilsilil	primaria, secundaria	DIL, DCE
<b>Dinitrofenilización</b>		
2,4-Dinitrofluorobenceno	primaria, secundaria	DIL, DCE, EM-MIS
Ácido 2,4-Dinitrobenzenosulfónico	primaria, secundaria, amonio	DIL
<b>Permetilación</b>		
Formamida-bohidrato de sodio	primaria, secundaria	DFN
<b>Formación de bases de Shiff</b>		
Benzaldehído	primaria	DIL
Furfural	primaria	DIL
2-Tiófenaldehído	primaria	DFF
Pentafluorobenzaldehído	primaria	DCE, EM-MIS
Dimetilformamida dimetil acetal	primaria	DFF
<b>Formación de carbamatos</b>		
Dietilpirocarbonato	Primaria, amonio	DIL
Etilcloroformato	primaria, secundaria, terciaria	DIL, DFN, EM-MIS
<i>i</i> -butilcloroformato	primaria, secundaria	DIL, DFN, EM-MIS
Amilcloroformato	primaria, secundaria	DIL
2,2,2-Trifluoroetilcloroformato	primaria, secundaria	DFN, EM-MIS
Pentafluorobenzilcloroformato	primaria, secundaria, terciaria	DCE
<b>Formación de sulfonamidas</b>		
Cloruro de bencensulfonilo	primaria, secundaria, amonio	DFF, DCE, EM-MIS
Cloruro de p-toluensulfonilo	secundaria	DIL, EM-MIS
<b>Formación de fosfamidias</b>		
Cloruro de dimetiltiofosfina	primaria	DFN
Cloruro de dimetiltiofosforilo	primaria, secundaria	DIL, DFF
Cloruro de dietiltiofosforilo	primaria, secundaria, nitrosamina	DFF

<sup>a</sup> DIL: detector de ionización de flama; DCE: detector de captura de electrones; EM-MIS: espectrometría de masas en modo de monitoreo de iones selectivo; DFN: detector de fósforo y nitrógeno; DFF: detector fotométrico de flama

derivados de estrógeno mediante CG-EM, en donde se utilizó como derivatizante BSTFA + 1% TMC y recientemente Liebeke y cols. (2010) publicaron un método para determinar derivados microbianos en muestras biológicas, en donde se hacía uso de MAD, obteniendo tiempos de reacción muy bajos, en específico de 120 a 60 min. En el presente estudio se aplicó la derivatización asistida por microondas para los antihipertensivos CAP, MET e HCT, utilizando MTBSTFA y yoduro de metilo como agentes derivatizantes y con un posterior análisis por CG-FID.

## **2.4 Desarrollo analítico**

### **2.4.1 Criterios para seleccionar un método analítico**

Para poder seleccionar correctamente un método analítico, es esencial definir con claridad la naturaleza del problema analítico, y esta definición requiere contestar las siguientes preguntas:

1. ¿Qué exactitud se requiere?
2. ¿De cuánta muestra se dispone?
3. ¿En qué intervalo de concentraciones está el analito?
4. ¿Qué componentes de la muestra interfieren?
5. ¿Cuáles son las propiedades físicas y químicas de la matriz de la muestra?
6. ¿Cuántas muestras habría que analizar?

Es de vital importancia la respuesta a la primera pregunta, ya que determina el tiempo y esfuerzo que requerirá el análisis. Las respuestas a la segunda y tercera pregunta determinan lo sensible que debe ser el método y el intervalo de concentraciones al que debe adaptarse. La respuesta a la cuarta pregunta determina qué selectividad se requiere. Es importante la respuesta a la quinta pregunta porque algunos de los métodos analíticos son utilizados para pruebas tales como valoración, disolución, uniformidad etc., es decir otros métodos son más adecuados para el análisis directo de sólidos. Una consideración importante desde el punto de vista económico es el número de muestras a analizar.

Existen otras características importantes que se deben tener en cuenta: velocidad, facilidad y costos.

#### **2.4.2. Clasificación de métodos analíticos**

Según la guía para la validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C. (CNQFB, 1997), los métodos analíticos pueden clasificarse bajo los siguientes criterios:

##### **1) En función de su estado regulatorio en:**

- a) Métodos farmacopeicos: Todos aquellos métodos que aparecen en cualquier farmacopea (FEUM, USP, BP, Europea, etc.).
- b) Métodos no farmacopeicos: Aquellos métodos no compendiados en una farmacopea.

##### **2) En función de su aplicación (NOM 059 SSA1 y NOM 073 SSA1) en:**

- a) Métodos para producto a granel.
- b) Métodos para producto terminado.
- c) Métodos para materia prima.
- d) Métodos indicadores de estabilidad.

##### **3) En función de la naturaleza de la respuesta analítica en:**

- a) Métodos físico-químicos. Cuando la respuesta es de carácter físico (absorción de luz, emisión de luz, voltaje, etc.) o químico (consumo de iones  $\text{-OH}$ , consumo de un acomplexante, etc.).
- b) Métodos biológicos. Cuando la respuesta es de carácter biológico (crecimiento de un microorganismo, protección, muerte, etc.).

##### **4) En función de su propósito analítico en:**

- a) Métodos para cuantificar el analito (contenido o potencia).

- b) Métodos para establecer la presencia del analito a un límite.
- c) Métodos para identificar el analito.

**5) En función de la naturaleza del sistema de medición se clasifican en:**

- a) Métodos en los cuales el instrumento de medición de la respuesta analítica, permite medir una señal de ruido (cromatógrafo de líquidos, cromatógrafo de gases, espectrofotómetros, etc.).
- b) Métodos en los cuales el instrumento de medición no permite medir una señal de ruido (buretas, medidor de halos, potenciómetros, etc.).

**2.4.3 Métodos analíticos reportados para la determinación de antihipertensivos**

En la literatura están reportados diversos estudios de cuantificación simultánea de fármacos, en particular existe uno donde la determinación simultánea de las combinaciones Hidroclorotiazida, Valsartán, Amilorida y Captopril se lleva a cabo en tabletas por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y la preparación del estándar de trabajo está dada por la disolución de los analitos en la fase móvil (buffer de fosfatos 0.02M:Metanol (55:45 v/v) pH 3.0) y la muestra es preparada de la misma forma con filtración previa a la obtención de la concentración para la valoración, sin embargo, el tiempo de análisis aumenta al estar presente más de un activo en la mezcla (Ahmed y cols., 2011). En el caso de Irbersartán, la determinación en tabletas es de tipo electroquímica donde el analito es disuelto en buffer Britton-Rubinson en el que ocurre una reducción voltamétrica gracias al efecto del surfactante catiónico; a pesar de ser un método sencillo, no todos los antihipertensivos son viables para su análisis por esta técnica (Gupta y cols., 2011).

En general el conjunto de técnicas para las determinaciones de fármacos es muy amplio y comprende desde aquellas basadas en métodos clásicos como CLAR a técnicas más recientes desarrolladas a lo largo de estos años (Vidal, 2009), por ejemplo la extracción en fase sólida-cromatografía de líquidos acoplada



a espectrometría de masas tándem ionización por electrospray (EFS-CL-IES-EM/EM) está descrita en la literatura para el análisis de fármacos en aguas residuales, en este método durante su desarrollo se hizo uso de cartuchos de diferente polaridad: Oasis HLB, SampliQ Polymer SCX y Si-SCX SPE, además de utilizar diferentes eluyentes como formiato de amonio, buffer de acetato de amonio a pH 3 y 5. (Varga y cols., 2011).

En el caso de matrices biológicas, se encuentran reportados una amplia gama de métodos analíticos. Existe un estudio donde se determinan simultáneamente Metoprolol e Hidroclorotiazida en plasma humano por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas/masas (CL-EM/EM) (Gao y cols., 2010), en este método los analitos se disuelven en metanol-agua (50:50, v/v) , posteriormente una extracción líquido-líquido con éter etílico-diclorometano, seguido de centrifugación para que la fase orgánica sea llevada a sequedad y reconstituida con fase móvil (metanol:acetato de amonio:ácido fórmico pH3.4) , por otro lado, Metoprolol en plasma puede ser determinado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), en dicho método el medio de disolución es Acetonitrilo y se lleva a cabo una extracción líquido-líquido y se hace uso del derivatizante MSTFA para reconstituir (Yilmaz y cols., 2009).

Algunos  $\beta$ -bloqueadores en sangre total son determinados por EFS-CL-EM (Kristoffersen y cols., 2007), en este caso se precipitaron los componentes de la sangre con una mezcla de Acetonitrilo:Metanol, centrifugación y EFS donde se utilizó un cartucho de fase reversa y finalmente el eluato se reconstituyo en fase móvil pH 3.1, esta misma clase de analitos junto con sus metabolitos son también determinados en orina humana por medio de CG-EM, Metanol es el medio de disolución de los estándares y en la muestra se lleva a cabo una hidrólisis enzimática por 18 h a 37°C; ya hidrolizada la muestra es disuelta en buffer de fosfatos a pH 2.4, seguido de EFS y derivatización con MSTFA ó BSTFA 1% TMCS (Magiera y cols., 2011).

En el caso de la determinación de Captopril en plasma humano existen diferentes métodos reportados, son de destacar EFS-CL-EM aplicado a un estudio

de bioequivalencia, donde el Metanol es el medio de disolución de los estándares, en el caso de la muestra, los fármacos se extraen de la matriz usando EFS con el cartucho OASIS® HLB (Rezende y cols., 2007) y CG-EM aplicado a un estudio de farmacocinética, en este método buffer de fosfatos 0.2 M pH 7.0 se uso como medio de disolución y a la muestra se le adicionó N-etilmaleimida 0.05% seguido de una extracción líquido-líquido con Diclorometano, posteriormente derivatización con pentafluorobencilbromuro para finalmente reconstituir con cloroformo (Franklin y cols., 1998).

Distintos tipos de cromatografía han sido reportadas para la determinación de Metoprolol incluyendo CG-EM (Yilmaz, 2009) y CL-FL (Yilmaz, 2010) en plasma humano y otros fluidos biológicos como orina.

Para la determinación, de HCT y MET hay varios métodos reportados basados en CLAR con detección UV y de fluorescencia, CG-EM y CL-EM/EM. En términos de la combinación, el problema principal es que HCT es un fármaco ácido y se ioniza de manera eficiente sólo en el modo de iones negativos mientras que MET es un fármaco básico cuya ionización efectiva es en el modo de iones positivos. Esto exige un método que implica la conmutación del modo de ionización durante la corrida analítica (Gao y cols., 2010).

Las propiedades fisicoquímicas relevantes (estabilidad, pKa, carácter ácido-base, etc.) de los analitos son diferentes y es por eso que su análisis simultáneo resulta muchas veces incompatible, el mismo caso se presenta en los factores físicos como lo son las condiciones ambientales (luz, temperatura, humedad) a los cuales son susceptibles. Una estrategia para elegir el método analítico correcto, es aprovechar las propiedades en común de los analitos (Connors, 1981). Existen diversos métodos para la determinación simultánea de mezcla de fármacos, tales como CLAR, espectrofotometría UV/VIS, calorimetría, espectrofluorometría (Ding, 2008).

## **2.5 Validación**

### **2.5.1 Validación de métodos analíticos**

Según la NOM 059 la validación analítica se entiende como el trabajo experimental encaminado a obtener pruebas documentadas de que un método proporciona fehacientemente la información requerida al uso para el que se destina. La validación de un proceso analítico según la USP, es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas (US Pharmacopeial Convention, 2009).

De acuerdo con las buenas prácticas tanto de fabricación como de laboratorio, es necesario que todos los métodos analíticos que se emplean estén validados.

Como es bien sabido, todo producto farmacéutico debe reunir atributos de identidad, pureza, concentración, potencia, inocuidad y disponibilidad para cumplir con los aspectos normativos oficiales e internos y no menos importantes, los éticos, por lo que si un método analítico, que finalmente es el medidor de las características críticas de calidad del producto, no es confiable, se corre el grave riesgo de afectar al usuario final que es un paciente (CNQFB, 1997).

El uso de un método analítico se justifica sólo después de haber demostrado que es válido. Tanto la Agencia de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration (FDA)) como la Farmacopea de los Estados Unidos (United States Pharmacopea (USP)) tienen un interés vital en la validación de los métodos de ensayo formal para asegurarse de que dichos métodos son lo que pretenden ser (Alfonso, 2003).

Los criterios de validación deben relacionarse con la prueba asociada a la especificación. Así, por ejemplo, si como especificación se establece la riqueza en un principio activo de una materia prima, ésta debe hallarse entre el 99 y el 101% de su masa para cumplir con la especificación. La International Conference on Harmonisation (ICH) establece los procedimientos necesarios para llevar a cabo la validación de los métodos analíticos (Hernández y cols., 2011). En ellos se indican

las características del método que deben ser consideradas para la validación, que son: exactitud, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y robustez. En la tabla 6 se detallan las características exigibles para cada una de las pruebas de objeto de validación.

**Tabla 6.** Características analíticas<sup>a</sup> requeridas en la validación de un método de acuerdo con su utilización

Parámetros	Identificación	Impurezas		Ensayos (contenido/potencia /disolución)
		Cuantitativa	Límite	
Exactitud	(-)	(+)	(-)	(+)
Precisión				
Repetibilidad	(-)	(+)	(-)	(+)
Precisión intermedia	(-)	(+)	(-)	(+)
Especificidad	(+)	(+)	(+)	(+)
LOD <sup>b</sup>	(-)	(-)	(+)	(-)
LOQ <sup>c</sup>	(-)	(+)	(-)	(-)
Linealidad	(-)	(+)	(-)	(+)
Intervalo de linealidad	(-)	(+)	(-)	(+)

a – Adaptada de la guía directiva ICH-Q2A; b – Límite de detección; c – Límite de cuantificación; (+) parámetro imprescindible; (-) parámetro prescindible.

### 2.5.2 Definición de parámetros

De acuerdo con la guía para validación de métodos analíticos de la ICH se definen los siguientes parámetros (International Conference on Harmonisation, 1996):

- **Especificidad.** Habilidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se puede esperar que estén presentes.  
**Criterios de aceptación:** La respuesta del método únicamente debe ser debida al analito.

- **Exactitud.** Expresa la cercanía entre el valor que es aceptado, sea como un valor convencional verdadero (material de referencia interno), sea como un valor de referencia aceptado (material de referencia certificado o estándar) y el valor encontrado (valor promedio) obtenido al aplicar el procedimiento de análisis un cierto número de veces.

**Criterios de aceptación:** el IC( $\mu$ ) debe incluir el 100 % o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo 98-102%.

- **Estabilidad analítica de la muestra.** Propiedad de una muestra, preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

**Criterios de aceptación:**  $|d_i| \leq 2\%$  para métodos cromatográficos y volumétricos; no mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra.

- **Intervalo.** Concentraciones incluidas entre la concentración superior e inferior (incluyendo éstas), para las cuales se ha demostrado que el método analítico es preciso, exacto y lineal.

**Criterios de aceptación:**  $r^2 \geq 0.98$ , IC( $\beta_1$ ) debe incluir la unidad, IC( $\beta_0$ ) debe incluir el cero, el  $CV_{y/x}$  del porcentaje de recobro no debe ser mayor de 2% si el método es cromatográfico, el IC( $\mu$ ) debe incluir el 100 % o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo 98-102%.

- **Límite de cuantificación.** Concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas.

**Criterios de aceptación:**  $r^2 \geq 0.98$ , IC( $\beta_1$ ) no debe incluir el cero, además el LOQ debe ser menor a la especificación del contenido / valoración de la prueba de impurezas (LOQ con base a la curva de calibración basado en la desviación estándar de regresión).

- **Límite de detección.** Concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

**Criterios de aceptación:**  $r^2 \geq 0.98$ , IC( $\beta_1$ ) no debe incluir el cero, además el LOD debe ser menor a la especificación de la prueba de impurezas (LOD con base a la curva de calibración basado en la desviación estándar de regresión)

- **Linealidad.** Habilidad (dentro de un intervalo determinado) del procedimiento analítico de obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra.

**Criterios de aceptación:**  $r^2 \geq 0.98$ , IC( $\beta_1$ ) no debe incluir el cero

- **Precisión.** Grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia.

**Criterios de aceptación:**  $CV \leq 1.5\%$  para métodos físico-químicos.

- **Precisión intermedia.** Precisión obtenida dentro del laboratorio por diferentes analistas, diferentes equipos, días distintos con la misma muestra homogénea.

**Criterios de aceptación:**  $CV \leq 2\%$  para métodos cromatográficos y volumétricos; no mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra.

- **Repetibilidad.** Precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo (mismo día), por un mismo analista, en la misma muestra homogénea y en el mismo equipo.

- **Reproducibilidad.** La reproducibilidad se define como la desviación estándar obtenida al analizar varias veces la muestra en días distintos, pudiendo variar condiciones tales como el equipo, reactivos o analistas.
- **Robustez.** Medida de la capacidad de un procedimiento analítico de permanecer inafectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y provee una indicación de su fiabilidad en condiciones de uso normales.

**Criterios de aceptación:**  $|d_i| \leq 2\%$  para métodos cromatográficos y volumétricos; no mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra.

- **Tolerancia.** Reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación como pueden ser: equipos, columnas.

**Criterios de aceptación:**  $|d_i| \leq 2\%$  para métodos cromatográficos y volumétricos; no mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra.

## 3 Objetivos

### 3.1 Objetivo General

- Desarrollar, optimizar y validar un método analítico por cromatografía de gases con un detector de ionización de llama (CG-FID) para la cuantificación simultánea de los principios activos de dos medicamentos de elección en el tratamiento de la hipertensión arterial, Captopril y Metoprolol, ambos en combinación con Hidroclorotiazida.

### 3.2 Objetivos Particulares

- Optimizar la reacción de derivatización simultánea de Captopril – Hidroclorotiazida y Metoprolol – Hidroclorotiazida mediante microondas.
- Desarrollar y validar el método analítico para el análisis de Captopril – Hidroclorotiazida (CAP – HCT) en tabletas de liberación inmediata.
- Desarrollar y validar el método analítico para el análisis de Metoprolol – Hidroclorotiazida (MET – HCT) en tabletas de liberación prolongada.



## 4 Desarrollo experimental

### 4.1 Materiales y equipo

- Balanza analítica Sartorius modelo CP124S
- Estufa Varian aerograph serie 1400
- Horno de microondas Daewoo KOR-6LZB
- Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N
- Cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas HP 6890-5973
- Jeringas Hamilton de vidrio de 10  $\mu$ L, 50  $\mu$ L, 100  $\mu$ L y 250  $\mu$ L
- Matraces aforados Pyrex de 1 mL, 2mL, 5mL y 10 mL
- Viales de vidrio 4mL, viales de reacción con tapón

### 4.2 Sustancias de referencia y reactivos

Captopril Sigma-Aldrich USP testing specifications >99.0% (USA); Tartrato de Metoprolol, Fluka Analytical 99.2% (USA); Hidroclorotiazida, Fluka Analytical 99.7% (Italia); Iodometano Sigma-Aldrich >99.5% (USA); Carbonato de potasio, J. T. Baker (Alemania); Acetona, Química Alva Q.P. 99% (México) y Metanol, J. T. Baker >99.8% (Alemania).

### 4.3 Soluciones estándar

Las sustancias de referencia fueron preparadas en metanol de acuerdo a la proporción en la que los fármacos están presentes en los productos comerciales, es decir, CAP/HCT 2:1 y MET/HCT 7.6:1.

Para el primer caso se pesaron 10 mg de CAP y 5 mg HCT y se llevaron a un volumen de 5 mL con metanol (Sol. stock 1), de dicha solución se tomó una alícuota de 0.6 mL para llevarse a un volumen final de 2 mL, obteniéndose las concentraciones de 600  $\mu$ g/mL y 300  $\mu$ g/mL de CAP-HCT respectivamente. En el segundo caso se pasaron 38 mg de tartrato de MET (equivalentes a 36.1 mg de succinato de MET) y 5 mg de HCT y se llevaron a un volumen de 5 mL (Sol. stock 2) y una alícuota de 0.3 mL fue llevada a un volumen final de 2 mL para así obtener las concentraciones 1083  $\mu$ g/mL y 150  $\mu$ g/mL para MET-HCT

respectivamente. Dichas cantidades representan el 100% de concentración de trabajo para cada uno de los analitos. Se almacenaron a 4 °C, en viales con tapón y protegidos de la luz.

#### 4.4 Derivatización

La reacción de derivatización se llevó a cabo con 50 µL de las soluciones de trabajo que se prepararon, este volumen se llevó a sequedad bajo corriente suave de nitrógeno, posteriormente se adicionó una mezcla de 500 µL de yoduro de metilo y acetona 1:10 v/v, utilizando como catalizador 55 mg de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. La reacción fue sometida a microondas con potencia de 700 W durante 10 min. Finalmente, dicha mezcla fue llevada a sequedad bajo corriente suave de nitrógeno y reconstituida con 50 µL y 100 µL de acetona.

En esta etapa también se probó el derivatizante MTBSTFA (50 µL) para llevar a cabo una reacción típica de sililación:

(analito + C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>NOSi → *t*-SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>-analito + XH<sup>+</sup> + C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>F<sub>3</sub>NO), así como una fuente de calentamiento convencional, es decir la reacción se efectuó en estufa a 70°C. El tiempo de reacción de derivatización se estudió a 2 y 3 h.

#### 4.5 Identificación

Se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N acoplado a un detector selectivo de masas Agilent 5973 network para confirmar la reacción de derivatización y para realizar la prueba de especificidad. Se utilizó la columna capilar Quadrex-5 de sílice fundida (5%-fenil-95%polidimetilsiloxano) 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, el gas acarreador fue Helio a un flujo constante de 1 mL/min, la temperatura del inyector fue 250°C en modo splitless (1 min). La temperatura de la línea de transferencia fue de 280°C, la temperatura de la fuente de ionización fue 230°C y la temperatura del analizador cuadrupolo de 150°C. Los análisis se realizaron por ionización electrónica empleando una energía de 70 eV. Se utilizó el modo de barrido total (SCAN) de 50 a 550 m/z, y las condiciones descritas para el análisis por CG-FID en el apartado 4.6.

#### **4.6 Análisis cromatográfico**

Se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N con columna capilar de sílice fundida ZB-5 (5%-fenil-95%-dimetilpolisiloxano) de 30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m (Zebron Phenomenex, USA) y detector de ionización de llama (FID). El gas acarreador fue Hidrógeno con un flujo constante de 0.8 mL/min. Se inyectó 1  $\mu$ L de la muestra en el cromatógrafo de gases, modo splitless (1 min); las temperaturas del inyector y detector fueron 250° y 320°C respectivamente. Programa de temperatura: temperatura inicial 140°C durante 1 min; después un incremento de 20°C/min hasta llegar a una temperatura de 220°C durante 1 min para el caso de MET/HCT y 230°C durante 1 min para CAP/HCT; finalmente un incremento de 20°C/min hasta llegar a la temperatura final de 320°C durante 5 min.

#### **4.7 Validación de los métodos**

Para validar los métodos desarrollados, se evaluaron los siguientes parámetros: precisión y linealidad del sistema; exactitud, especificidad, precisión e intervalo de linealidad del método. Los parámetros fueron evaluados con respecto a lo establecido por la United States Pharmacopeia 33 y al mismo tiempo en concordancia con The Guideline for industry: Text on Validation of Analytical Procedures indicada por ICH.

##### **4.7.1 Precisión del sistema**

Se preparó un sextuplicado de soluciones al 100% de la concentración de referencia, es decir 600  $\mu$ g/mL y 300  $\mu$ g/mL para el caso de CAP/HCT y 1140  $\mu$ g/mL de Tartrato de Metoprolol equivalente a 1083  $\mu$ g/mL de Succinato de Metoprolol y 150  $\mu$ g/mL para el caso de MET/HCT. Las soluciones fueron preparadas por diluciones independientes. El análisis cromatográfico se realizó bajo las mismas condiciones indicadas en el apartado 4.6.

#### 4.7.2 Linealidad del sistema

Se prepararon por triplicado 5 niveles de concentración con respecto a las concentraciones indicadas en el apartado 4.3, por diluciones independientes a partir de las soluciones stock de CAP-HCT y MET-HCT. En la tabla 7 se indican las concentraciones de cada nivel. La concentración central fue igual a la que se prepara la solución de referencia en el método, es decir, la concentración que representa el 100%. El intervalo incluyó la especificación para el caso de determinación de contenido, por lo general expresado en  $\pm 20\%$  de la concentración de la solución de referencia.

**Tabla 7.** Niveles de concentración para la realización de la prueba de linealidad

%	Combinación CAP-HCT		Combinación MET-HCT	
	CAP $\mu\text{g/mL}$	HCT $\mu\text{g/mL}$	MET $\mu\text{g/mL}$	HCT $\mu\text{g/mL}$
80	480	240	866.4	120
90	540	270	974.7	135
100	600	300	1083	150
110	660	330	1191.3	165
120	720	360	1299.6	180

#### 4.7.3 Exactitud del método

Las formulaciones de las muestras se desconocen, por lo tanto se utilizaron las tabletas de cada una de las combinaciones para determinar este parámetro. Se prepararon 6 muestras adicionadas con estándar, es decir, de las soluciones stock preparadas con las tabletas de CAP-HCT y MET-HCT (apartado 4.8) se tomaron las alícuotas de 0.3 mL y 0.15 mL obteniéndose la mitad de la cantidad de analito necesaria para completar el 100%: 300-150  $\mu\text{g/mL}$  y 570-75  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, posteriormente para la otra mitad de la concentración de trabajo se tomó con las alícuotas de 0.3 mL y 0.15 mL de las soluciones stock preparadas con los estándares de CAP-HCT y MET-HCT respectivamente (apartado 4.3) y se llevó a un volumen final de 2 mL con metanol. El % de recobro se obtuvo

analizando los estándares de 600 y 300  $\mu\text{g/mL}$  de CAP-HCT y 1140-150  $\mu\text{g/mL}$  de MET-HCT (equivalente a 1083  $\mu\text{g/mL}$  de succinato de Metoprolol) con el análisis cromatográfico indicado en el apartado 4.6 y se determinó la cantidad de analito recuperada.

#### **4.7.4 Especificidad del método**

Se estudiaron las posibles interferencias que podrían provenir de los excipientes que comúnmente están presentes en las tabletas convencionales. Por ejemplo lactosa, almidón, celulosa microcristalina y estearato de magnesio. En el caso de formulaciones de liberación prolongada, los excipientes no fueron elucidados. Los 4 excipientes anteriormente mencionados fueron adicionados al 4% para evaluar su respuesta al método, bajo las condiciones del análisis cromatográfico indicadas en el apartado 4.6. También se evaluaron las muestras comerciales CAP-HCT y MET-HCT al 100% de las concentraciones de trabajo (apartado 4.8). Una vez derivatizadas las muestras, estas fueron llevadas a un volumen de 2 mL con acetona para poder ser inyectadas en el sistema acoplado.

#### **4.7.5 Precisión del método**

Se analizaron por triplicado las muestras comerciales de CAP-HCT y MET-HCT en dos días diferentes. Las soluciones de trabajo fueron preparadas como se indica en el apartado 4.8, en un nivel cercano al 100% de la concentración estándar de trabajo, es decir 600 y 300  $\mu\text{g/mL}$  para el caso de CAP/HCT y 1140 –150  $\mu\text{g/mL}$  para el caso de MET/HCT.

#### **4.7.6 Intervalo de linealidad (linealidad del método)**

Se prepararon 3 muestras adicionadas de la misma manera que se describió para el parámetro de exactitud. El intervalo estuvo integrado por dos niveles, superior e inferior a partir del punto central, es decir  $100\% \pm 10\%$  (90%, 100%, 110%), en la tabla 8 se indican las concentraciones del nivel correspondiente. Cada nivel se

preparó por triplicado. Las muestras adicionadas fueron analizadas después de su derivatización y bajo las condiciones del análisis cromatográfico, utilizando como referencia los estándares al 90%, 100% y 110%.

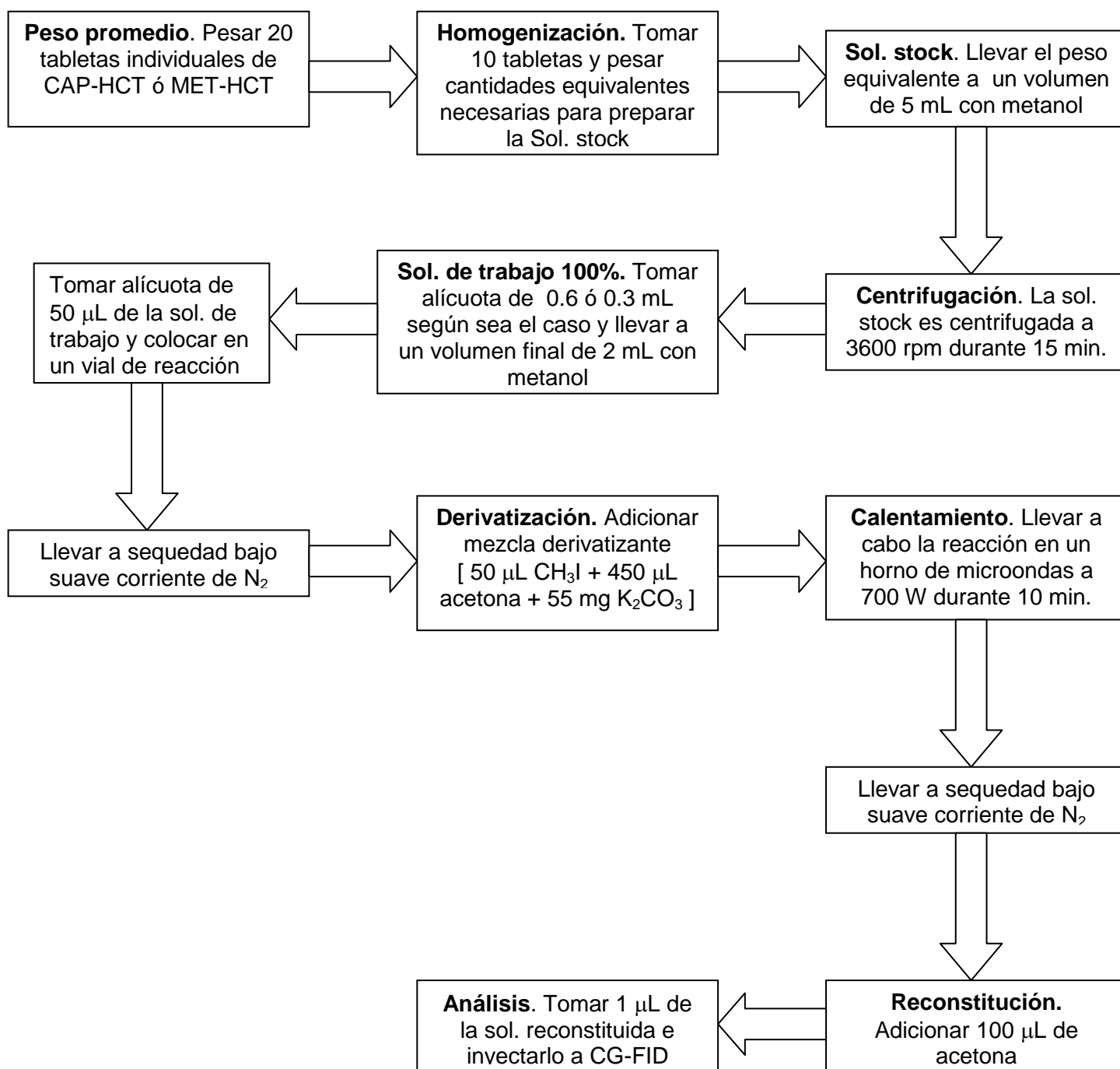
**Tabla 8.** Niveles de concentración para la realización de la prueba de linealidad

%	Combinación CAP-HCT		Combinación MET-HCT	
	CAP $\mu\text{g/mL}$	HCT $\mu\text{g/mL}$	MET $\mu\text{g/mL}$	HCT $\mu\text{g/mL}$
90	540	270	974.7	135
100	600	300	1083	150
110	660	330	1191.3	165

#### 4.8 Muestras

Se analizaron tabletas comerciales de Captopril-Hidroclorotiazida 25mg/12.5 mg y Succinato de Metoprolol-Hidroclorotiazida 95 mg/12.5 mg ambas para administración oral.

Para realizar el análisis se obtuvo el peso promedio de 20 tabletas (Apéndice I, Tabla 16). Se homogenizaron 10 de las mismas para después pesar 100.5 mg de la tableta CAP-HCT equivalente a 10 y 5 mg respectivamente y 148.8 mg de la tableta MET-HCT equivalente a 38 y 5  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente y se disolvieron en metanol, posteriormente se aforaron a 5 mL. Se centrifugaron a 3600 rpm durante 15 min, del sobrenadante se realizaron las mismas diluciones descritas en el apartado 4.3 para preparar las soluciones de trabajo de la muestra. La reacción de derivatización se llevó a cabo con 50  $\mu\text{L}$  de las soluciones de trabajo, este volumen se llevó a sequedad bajo corriente suave de nitrógeno, se adicionó una mezcla de 500  $\mu\text{L}$  de yoduro de metilo y acetona 1:10 v/v, utilizando como catalizador 55 mg de  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . La reacción fue sometida a microondas con potencia de 700 W durante 10 min. Finalmente, dicha mezcla fue llevada a sequedad bajo corriente suave de nitrógeno y reconstituida con 100  $\mu\text{L}$  de acetona. En el cromatógrafo de gases se inyectó 1  $\mu\text{L}$ . En la figura 6 se muestra el diagrama de la determinación de los principios activos en las tabletas.



**Fig. 6.** Diagrama experimental para la determinación de CAP-HCT y MET-HCT en las muestras.

## 5 Resultados y discusión de resultados

### 5.1 Derivatización e identificación de los analitos

El análisis de medicamentos constituye un área de conocimiento de importancia fundamental, tanto en el desarrollo de nuevos fármacos, como en el control de los ya existentes. En el trabajo desarrollado, se eligieron los antihipertensivos: Captopril, Metoprolol e Hidroclorotiazida. Estos fármacos se encuentran en el mercado de manera unitaria y en combinación, es decir, Captopril-Hidroclorotiazida (CAP-HCT) y Metoprolol-Hidroclorotiazida (MET-HCT).

La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) es el documento regulatorio que contiene los métodos de análisis para principios activos en formas farmacéuticas, y una de las maneras para evaluar la calidad de los productos es la valoración del principio activo. La valoración es la prueba que se utiliza para determinar la cantidad de principio activo por contenido neto promedio o preparado farmacéutico y puede llevarse a cabo por diferentes metodologías analíticas como la espectroscopía y cromatografía, entre otras. En la edición vigente (10<sup>a</sup> ed.) no se encuentran métodos para la determinación simultánea de los fármacos de estudio, por ello se decidió desarrollar un método con esa característica que pudiera proponerse como método rutinario para el control de calidad de estos productos.

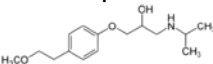
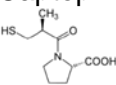
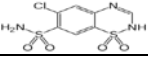
Para realizar los ensayos cuantitativos planeados, las diferentes monografías de las farmacopeas establecen una amplia variedad de técnicas analíticas que van desde las volumetrías convencionales más simples hasta técnicas instrumentales. En este particular caso se hizo uso de cromatografía de gases con detección de ionización en llama.

El Captopril (inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina), Metoprolol ( $\beta$ -bloqueador) e Hidroclorotiazida (diurético) son estructuras químicas con grupos funcionales de polaridad alta, haciéndolos inadecuados para el análisis directo por cromatografía de gases (CG). Sin embargo, recientemente el uso de agentes derivatizantes para la determinación de éstos por CG ha aumentado considerablemente. En la tabla 9 se muestran algunos reactivos derivatizantes



reportados en la literatura para la determinación de los analitos de interés. Se decidió ensayar la N-Metil-N-ter-butildimetilsililtrifluoroacetamida (MTBSTFA) para mejorar la volatilidad de los analitos debido a que está entre los reactivos de derivatización preferidos para la sililación, el cual ya ha sido probado en diferentes grupos polares para obtener señales analíticas en términos de sensibilidad y especificidad.

**Tabla 9.** Reactivos utilizados en la derivatización de los principios activos de interés.

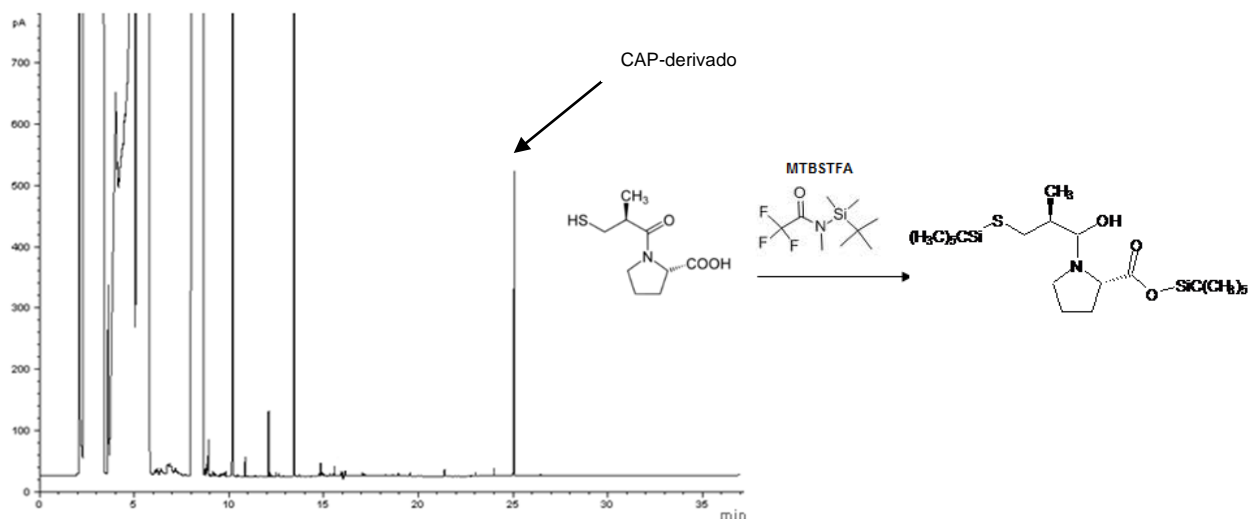
Principio activo	Reactivo derivatizante	Referencia
 Metoprolol	BSTFA+1% TMCS (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) MBTFA (N-Methyl-bis(trifluoroacetamide) MSTFA (N-methy-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide)	Caban, M. y cols. 2011 Franklin, M.E. y cols. 1998
 Captopril	PFPA (pentafluoropropionic anhydride) PFBBR (pentafluorobenzylbromide)	Rezende, K.R. y cols. 2007 Franklin, M.E. y cols. 1998
 Hidroclorotiazida	Acetona:yoduro de metilo (10:1)	Morra,V. et al. 2006 Amendola, L. y cols. 2003

## 5.2 Derivatización utilizando MTBSTFA

La utilización de agentes sililantes como derivatizantes de compuestos con grupos  $-OH$ ,  $-NH_2$  y  $-SH$  es muy habitual, ya que el silicio tiene una gran afinidad por estos heteroátomos (Blau y cols., 1993). Los antihipertensivos CAP, MET e HCT fueron derivatizados con MTBSTFA, el cual es un reactivo donador del grupo *t*-butildimetilsilil  $SiC(CH_3)_5$ , a  $70^\circ C$  durante 3 horas. En la literatura se describe que 2 y 3 h es el tiempo requerido para la derivatización de diuréticos de tipo sulfona, como es el caso de HCT. En adición, CAP y MET fueron sometidos a las condiciones óptimas para HCT puesto que éstos se encuentran en combinación con el diurético en las formas farmacéuticas respectivas.

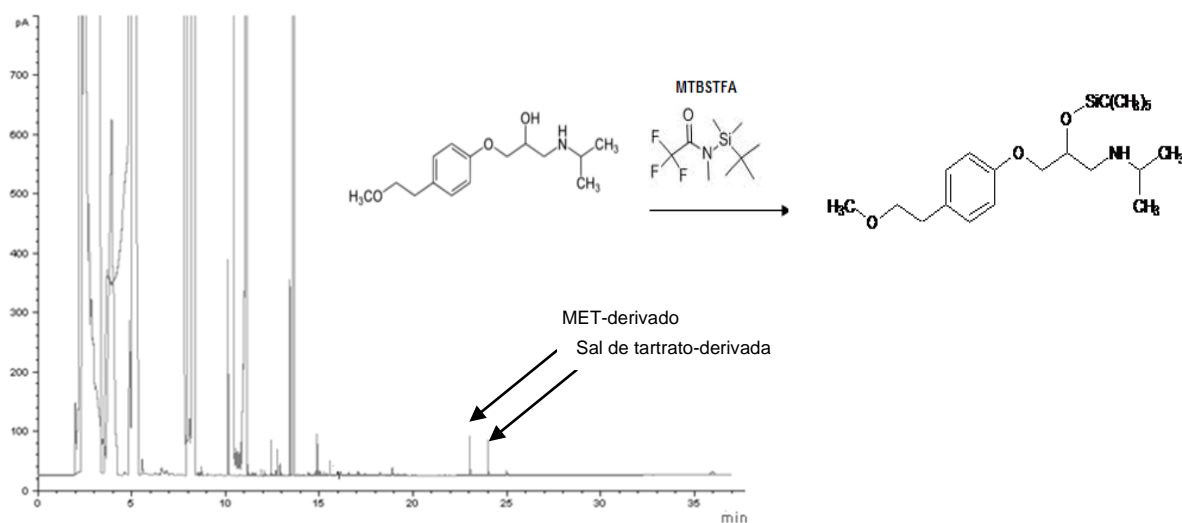
El uso de MTBSTFA representa una gran ventaja frente a otros agentes sililantes, debido al grupo *t*-butil, con un gran impedimento estérico, evita la hidrólisis de los enlaces oxígeno-silicio, lo que hace que los derivados obtenidos sean relativamente estables frente a diferentes condiciones como humedad y luz

(Heberer y cols., 1997); por otra parte presenta bajo tiempo de reacción y en algunos casos la reacción se realiza a temperatura ambiente (Spaulding y cols., 2002). En la figura 6 se muestra el cromatograma del derivado *t*-butildimetilsililado de CAP, donde se observa un pico resuelto y definido sin embargo, el uso de MTBSTFA como derivatizante conlleva a la presencia de múltiples señales, las cuales se observan al inicio del cromatograma.



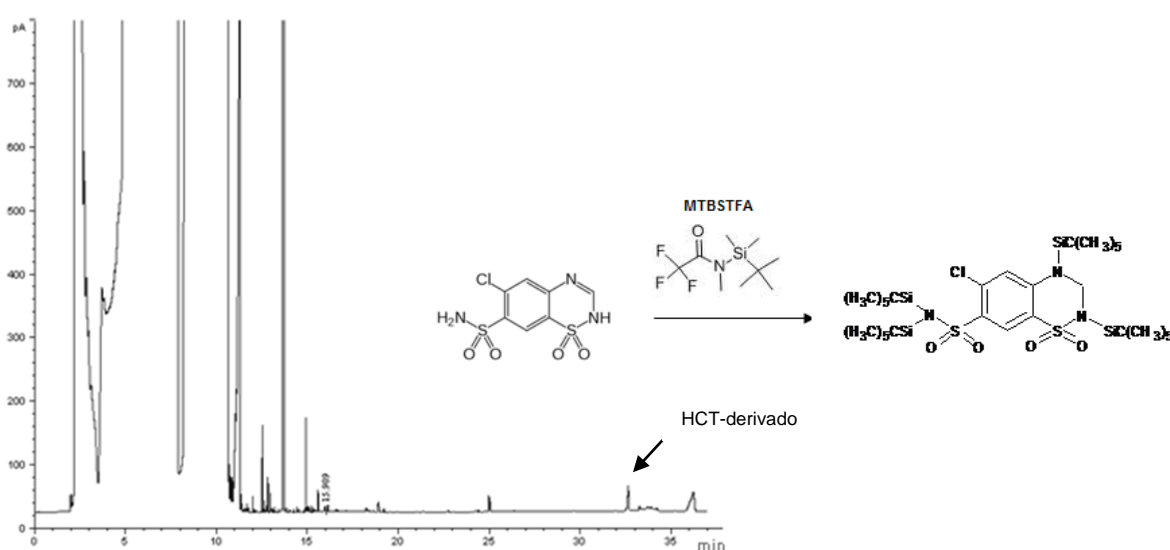
**Fig 6.** Cromatograma del derivado *t*-butildimetilsililado de Captopril.

En la figura 7, se observa el cromatograma que corresponde al derivado *t*-butildimetilsililado de MET, y además se observa la presencia de otro pico, que corresponde a la sal de tartrato presente en la sustancia de referencia.



**Fig 7.** Cromatograma del derivado *t*-butildimetilsililado de Metoprolol.

En el caso de HCT, se obtuvo una señal pequeña la cual se observa en la figura 8, en adición a esto también se observan interferencias cercanas al pico de interés, a pesar del tiempo de reacción transcurrido, podría tratarse de subproductos de reacción debido al efecto estérico que causa la voluminosidad de los grupos donados por el MTBSTFA, es decir no se lleva a cabo completamente la sustitución de las 4 posiciones susceptibles a la reacción o bien se llevó a cabo una reacción de derivatización incompleta, esto se observa en las señales posteriores a la del pico principal que se muestra en el cromatograma.

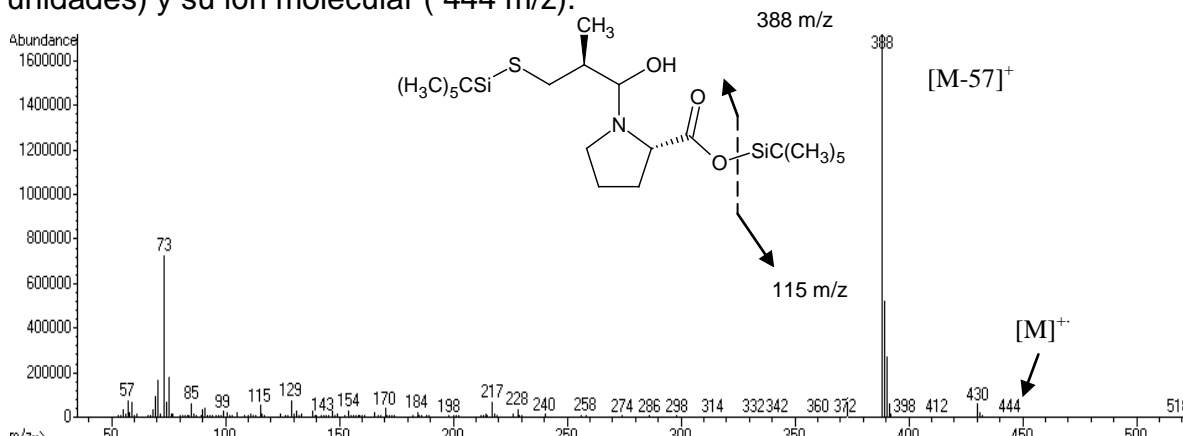


**Fig 8.** Cromatograma del derivado *t*-butildimetilsililado de Hidroclorotiazida.

En todos los cromatogramas de los derivados de MTBSTFA se encontraron señales que corresponden a especies *t*-butildimetilsililadas, además de un grupo de señales al inicio de la corrida cromatográfica, las cuales fueron similares en todos los cromatogramas de los analitos, quienes son consideradas como los remanentes provenientes del agente derivatizante, esto se verificó ensayando un blanco del reactivo derivatizante y contrastándolo a su vez con el cromatograma del analito derivatizado.

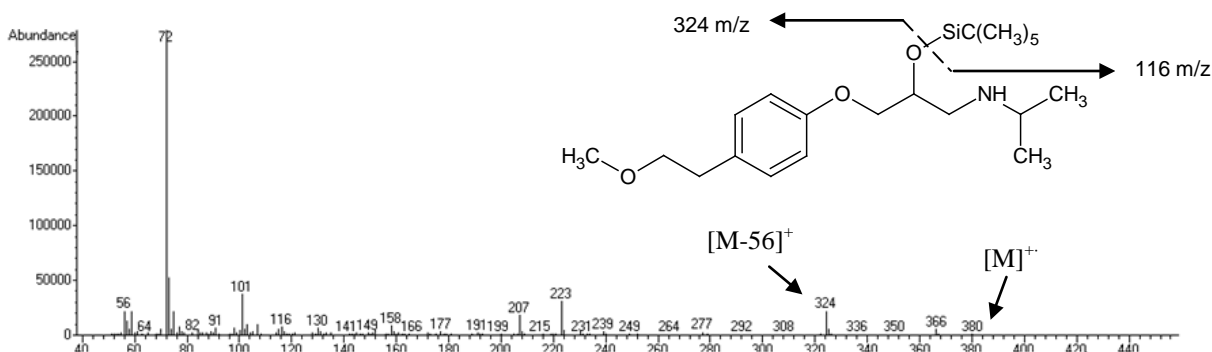
La identificación de los picos cromatográficos correspondientes a los analitos estudiados se realizó considerando sus espectros de masas. En el caso de CAP y MET los espectros presentaron poca fragmentación, correspondiente a la sustitución de los protones de  $-OH$  y  $-SH$ .

El espectro de masas del derivado *t*-butildimetilsililado de CAP se presenta en la figura 9, en él se muestran los iones fragmento característicos del grupo  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_5$  (73 m/z y 115 m/z), el cual es donado por el derivatizante MTBSTFA, así como el pico base (388 m/z) el cual indica la pérdida del grupo *t*-butilo (57 unidades) y su ión molecular (444 m/z).



**Fig 9.** Espectro de masas correspondiente a Captopril derivatizado con MTBSTFA.

En la figura 10 se muestra el espectro de masas del derivado *t*-butildimetilsililado de MET, en el cual se observa el ión molecular (380 m/z), los iones del grupo trimetildimetilsilil (72 m/z y 116 m/z) y la pérdida de *t*-butilo (324 m/z).



**Fig 10.** Espectro de masas correspondiente al derivado trimetildimetilsilil de Metoprolol.

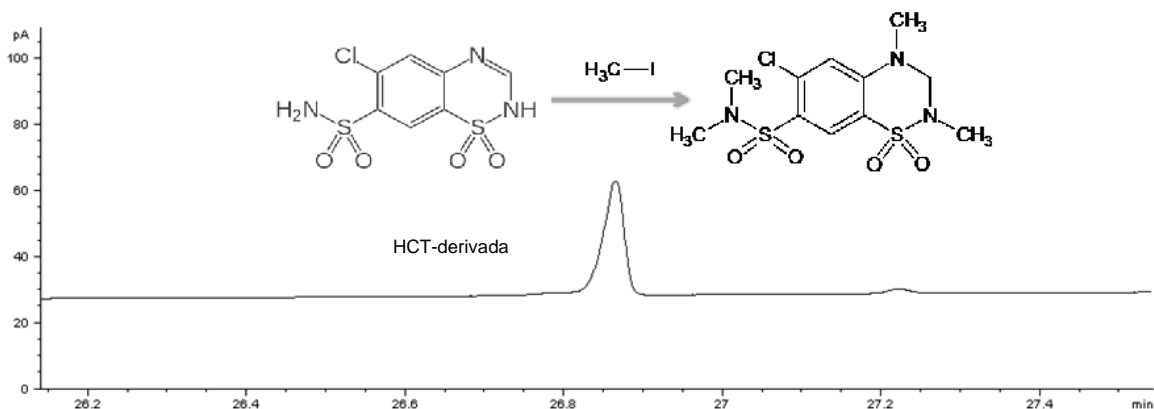
Por otro lado, no se pudo obtener el espectro de masas del derivado *t*-butildimetilsililado de HCT al no ser detectado, posiblemente debido a la inestabilidad del derivado.

### 5.3 Derivatización utilizando yoduro de metilo

Debido a que HCT es el fármaco limitante al estar presente en las combinaciones de estudio, además de que presenta menor respuesta cromatográfica y su solubilidad en disolventes es diferente a la de los compuestos ácidos como es el caso de CAP y MET, todo esto debido a su carácter alcalino, se decidió utilizar un agente derivarizante para diuréticos, para tal fin el yoduro de metilo ha sido descrito en la literatura para el análisis de HCT por CG (L.Amendola, y cols.2003).

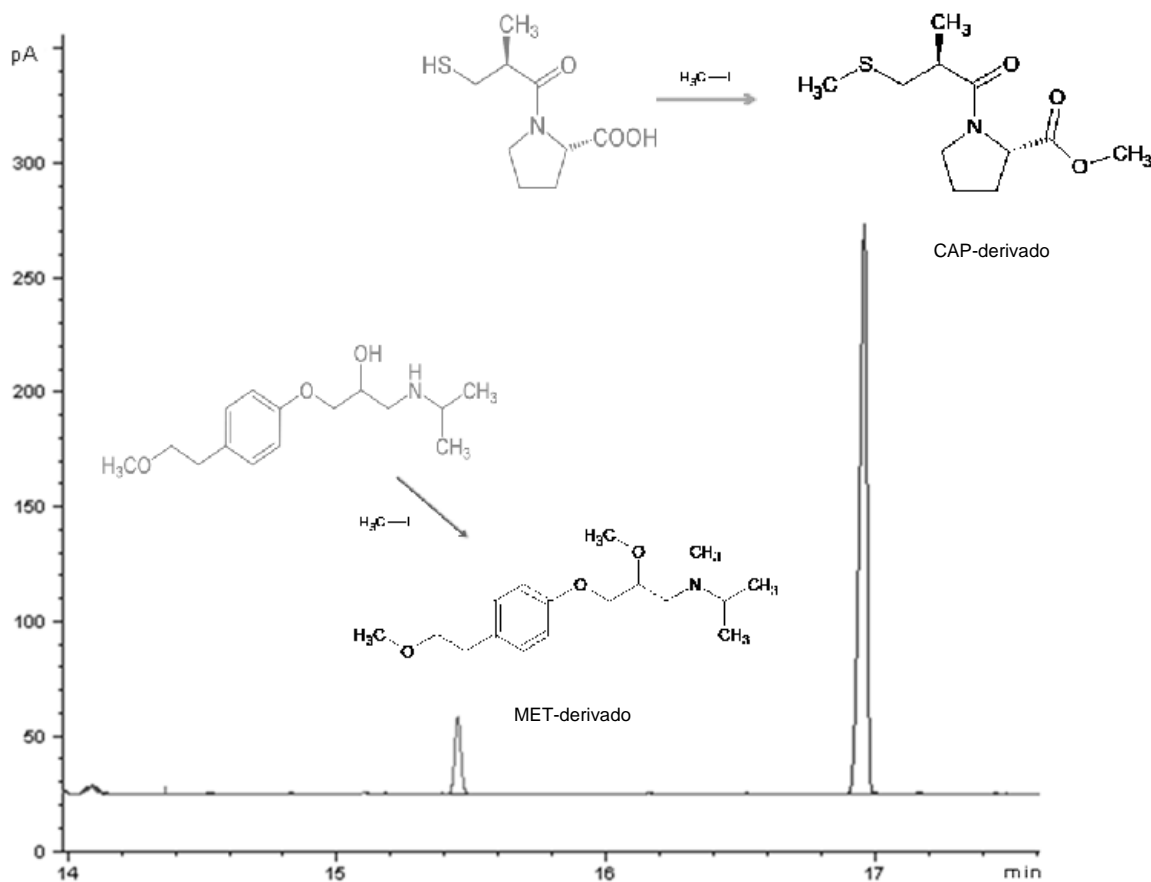
El yoduro de metilo es un excelente sustrato para la reacción, puesto que se trata de una sustitución  $S_N2$ , debido a la disponibilidad estérica que posee para ser atacado por un nucleófilo, además de que el grupo yoduro es un buen grupo saliente. En esta reacción se utiliza también carbonato de potasio ( $K_2CO_3$ ), debido a su carácter alcalino,  $K_2CO_3$  extrae los protones ácidos para formar nucleófilos. Como el yoduro es un anión suave, el resultado es una metilación que ocurre de manera lenta y en un ambiente altamente nucleofílico sin embargo, la presencia del  $K_2CO_3$  modifica la velocidad de reacción sin consumirse en el proceso.

En la figura 11 se muestra el cromatograma del derivado metilado de HCT. La HCT posee 4 posibles sitios de sustitución donde uno de los hidrógenos unido al nitrógeno será reemplazado por el grupo alquilo. El número de grupos metilo absorbidos por el nitrógeno depende del tipo de amina: una primaria se combinará con dos de ellos; una secundaria con uno, entonces el proceso llevado a cabo con HCT se considera como metilación exhaustiva.



**Fig. 11.** Cromatograma del derivado metilado de Hidroclorotiazida.

La reacción de derivatización con yoduro de metilo también fue eficiente para MET y CAP, el cromatograma se muestra en la figura 12. De esta forma es viable el análisis de los fármacos de interés por CG-FID. A pesar de utilizar  $K_2CO_3$  como catalizador, la reacción de derivatización tenía el inconveniente de seguir tardando, ya que 3 h fue el tiempo necesario para que el yoduro de metilo reaccionara con los analitos, es decir, la cinética de esta metilación aún es lenta.



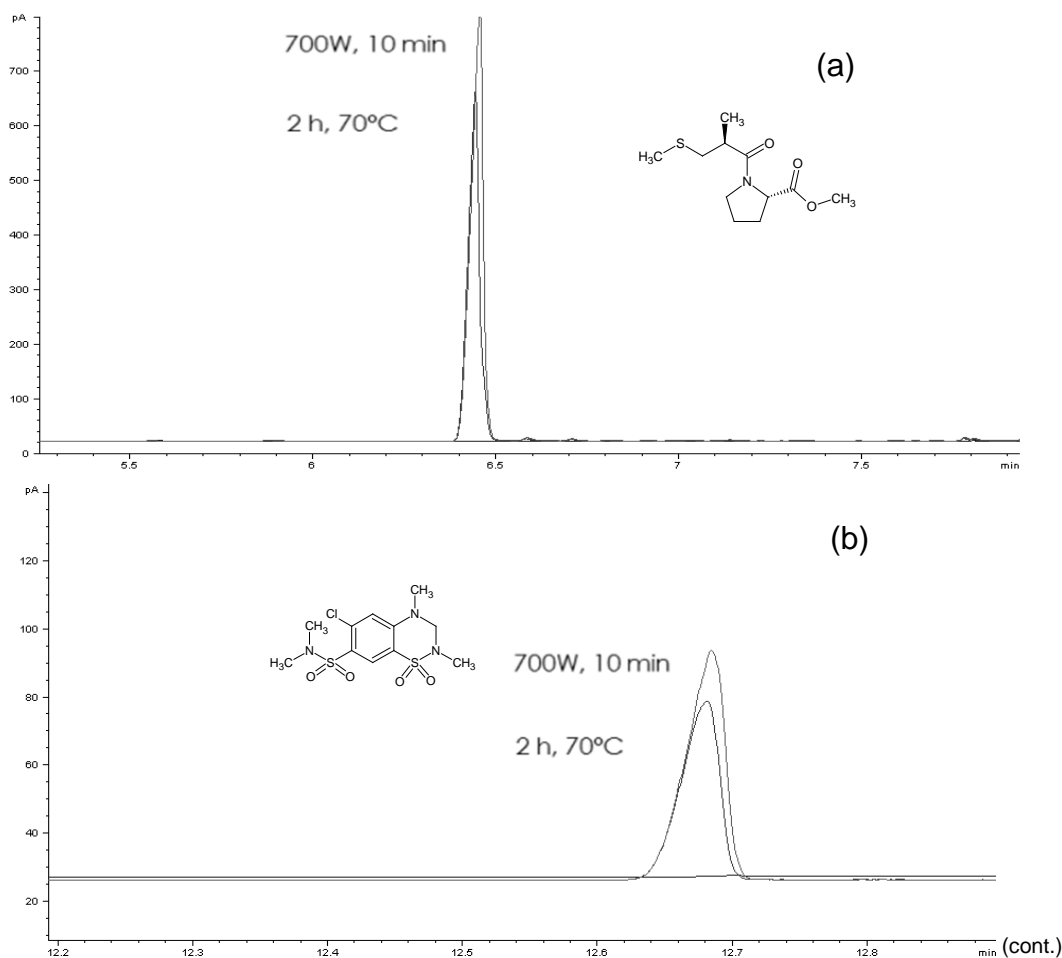
**Fig. 12.** Cromatograma de los derivados metilados de Metoprolol y Captopril.

En la literatura se reportan tiempos de reacción de 1, 2 y 3 h, en el primer caso la reacción fue incompleta y al aumentar el tiempo de reacción la formación del derivado fue siendo cada vez más completa. Sin embargo, a 2 y 3 h de reacción ambos a 70 °C se observó que en 3 h la estabilidad del derivado se veía afectada puesto que en 2 h la cantidad de derivado metilado era mayor. La reacción de derivatización se siguió realizando a 70°C durante 2 h pero el tiempo

de reacción seguía siendo muy largo, por lo que se probó energía de microondas (Morra y cols., 2006) como fuente de calentamiento ya que está reportado su uso en la literatura como alternativa en la formación de reacciones orgánicas

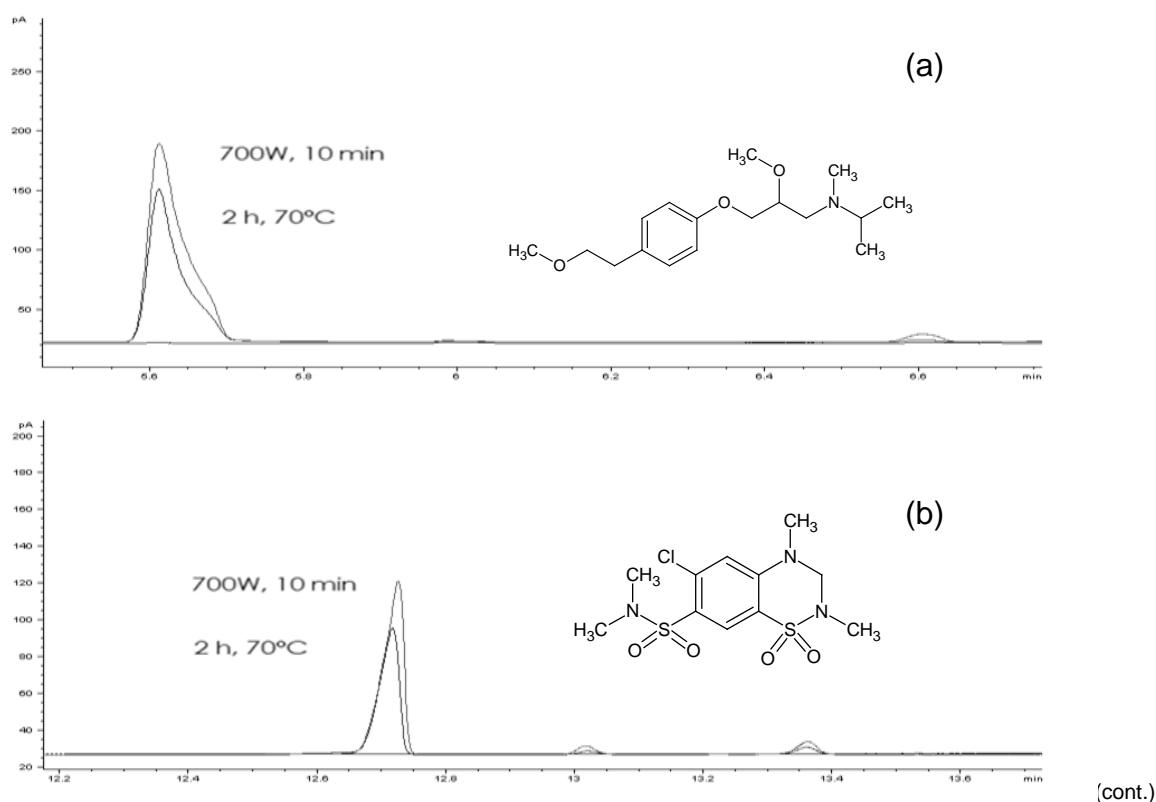
La radiación emitida por parte del horno de microondas es absorbida y convertida en calor por las moléculas con grupos polares, como es el caso de los antihipertensivos en estudio, de esta forma la energía de activación necesaria disminuye y más moléculas poseen la energía suficiente para poder reaccionar, contribuyendo a que la reacción sea más rápida.

Por lo tanto se compararon la reacción de derivatización con calentamiento convencional a 70°C durante 2 h y energía de microondas a una potencia de 700 W durante 10 min. La figura 13 muestra los resultados para CAP-HCT, observándose que al realizar la reacción con microondas, dentro del mismo cromatograma se obtuvo un aumento en la señal de ambos analitos.



**Fig. 13.** Cromatograma de (a) CAP metilado y (b) HCT metilado.

En la figura 14 se muestra el cromatograma para la combinación MET-HCT, en él también se observa un incremento en la respuesta cromatográfica, así pues la eficiencia de reacción de derivatización se ve reflejada en un aumento del 17.2 % con el uso de microondas. Otra ventaja del uso de microondas, es la disminución del tiempo de reacción, el cual se disminuyó de 2 h a 10 min. Debido a estas ventajas se seleccionó como fuente de energía microondas para llevar a cabo la reacción de derivatización en los antihipertensivos en estudio.



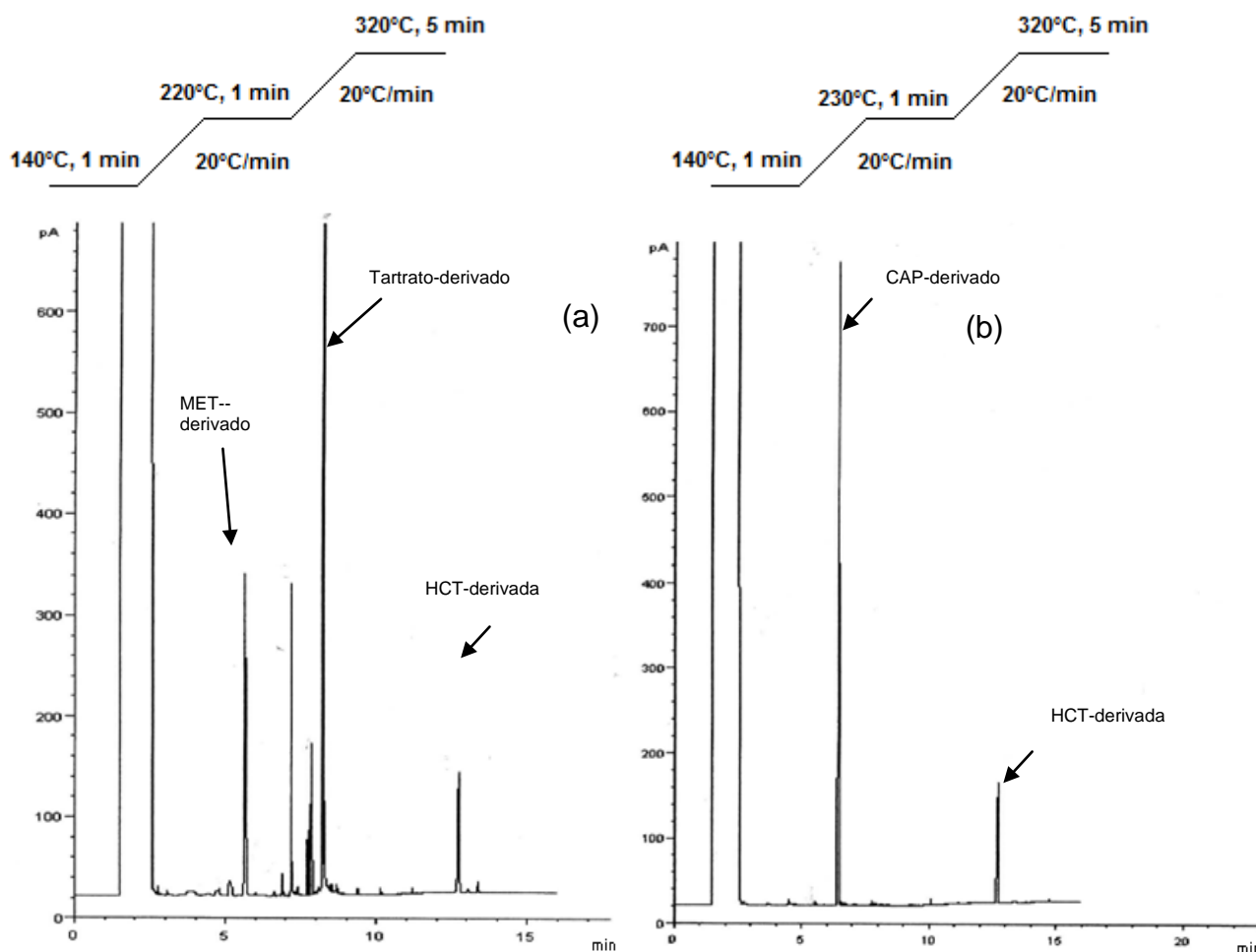
**Fig. 14.** Cromatograma donde son comparadas 2 fuentes de calentamiento: convencional y microondas; (a) derivado metilado de MET y (b) derivado metilado de HCT.

Posteriormente, con el fin de aumentar la respuesta cromatográfica de HCT, se varió el volumen de inyección (1 y 2  $\mu$ L), observándose que duplicar el volumen de inyección no presentó un cambio significativo en el incremento de la señal del derivado metilado de HCT en comparación con los derivados de CAP y MET. Sin embargo el área de los picos cromatográficos de MET y CAP se incrementó



considerablemente al inyectar 2  $\mu\text{L}$  y esto podría deformar los picos y dar error en la cuantificación, por lo que se eligió continuar inyectando 1  $\mu\text{L}$ .

Por otro lado, se optimizó el programa de temperatura para reducir el tiempo de análisis y la figura 15 muestra los cromatogramas obtenidos con el respectivo programa de temperatura, para CAP-HCT y MET-HCT.



**Fig. 15.** Cromatogramas de los estándares utilizando microondas como fuente de energía para la reacción de derivatización; (a) Estándar de MET-HCT y (b) Estándar de CAP-HCT.

Con el propósito de aumentar la respuesta cromatográfica del derivado metilado de HCT, se varió el volumen de reconstitución (50 y 100  $\mu\text{L}$ ). En el caso de la combinación CAP-HCT la respuesta no representó un cambio significativo y el perfil cromatográfico fue similar en ambas condiciones. Con respecto a MET-HCT, los analitos de interés poseen el mismo perfil cromatográfico, sin embargo, la presencia de las señales debidas al tartrato aumentaron su respuesta. La variación del volumen de reconstitución no significó un cambio en la señal de los derivados metilados de HCT, MET y CAP, por lo que se optó por seguir utilizando el volumen de 100  $\mu\text{L}$ . En la tabla 10 se resumen las condiciones con las que se efectuó la reacción de derivatización.

**Tabla 10.** Condiciones óptimas para llevar a cabo la reacción de derivatización de antihipertensivos

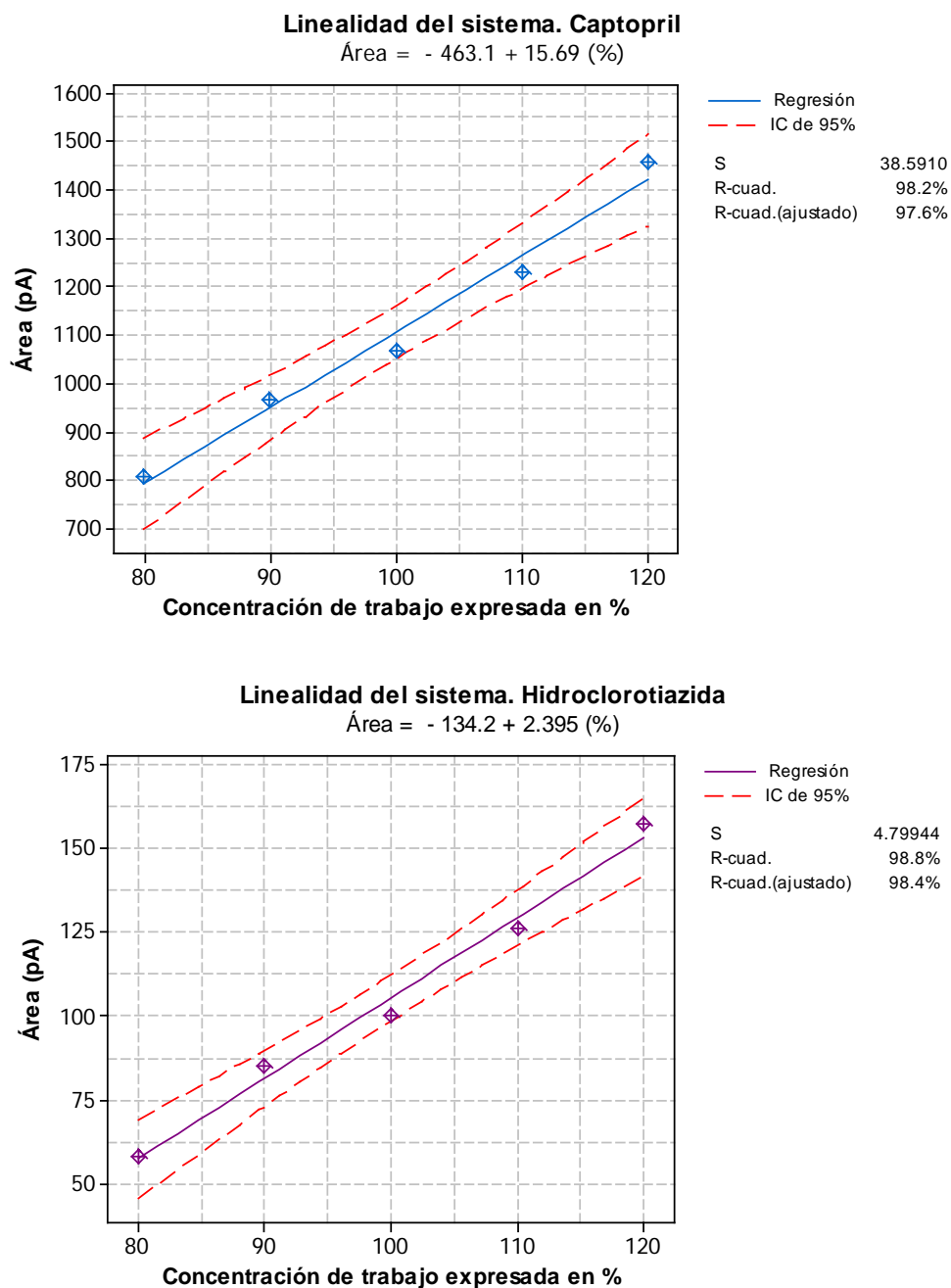
Condiciones óptimas	
Agente derivatizante	$\text{CH}_3\text{I}$ (50 $\mu\text{L}$ )
Mezcla de reacción	$\text{CH}_3\text{I}$ :acetona 1:10 v/v (500 $\mu\text{L}$ )
Catalizador	55 mg $\text{K}_2\text{CO}_3$
Fuente de calor	Microondas (700 W potencia)
Tiempo de reacción	10 min.
Disolvente para reconstituir	Acetona (100 $\mu\text{L}$ )

#### 5.4 Validación de los métodos desarrollados

Una vez optimizada la reacción de derivatización, se prosiguió a validar el método. El uso del método analítico se justifica sólo después de haber demostrado que es válido. Las concentraciones de trabajo se eligieron de acuerdo a la proporción en que se encuentran los principios activos en las formas farmacéuticas es decir, CAP-HCT (2:1) y MET-HCT (7.6:1), 600  $\mu\text{g/mL}$  / 300  $\mu\text{g/mL}$  y 1140  $\mu\text{g/mL}$  (equivalente a 1083  $\mu\text{g/mL}$  de succinato de Metoprolol) / 150  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente.

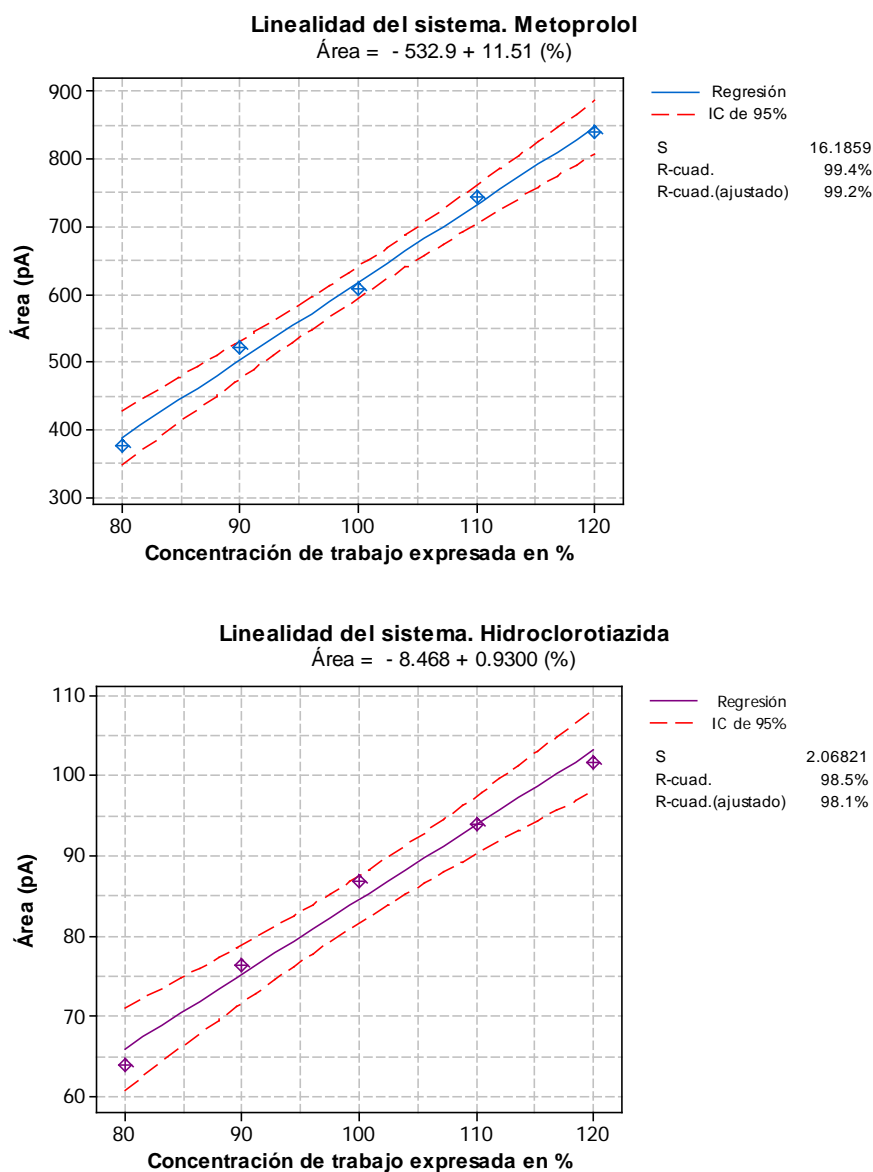
### 5.4.1 Linealidad

En la prueba de linealidad del sistema de CAP-HCT y MET-HCT, para CAP-HCT se obtuvieron coeficientes de correlación ( $r$ ) de 0.9910 y 0.9940 respectivamente a partir de las curvas de calibración, las cuales se muestran en la figura 16.



**Fig 16.** Curvas de calibración de CAP e HCT, donde el 100% de la conc. de trabajo representa 600  $\mu\text{g/mL}$  y 300  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente.

En el caso de la combinación MET-HCT se obtuvieron los coeficientes de correlación 0.9970 y 0.9926 respectivamente. Las curvas de calibración se muestran en la figura 17.



**Fig. 17.** Curvas de calibración de MET e HCT, donde el 100% de la conc. de trabajo representa 1140 µg/mL (equivalentes a 1083 µg/mL de succinato de MET) y 150 µg/mL respectivamente.

**Criterio de aceptación:**  $r^2 \geq 0.98$ ,  $IC(\beta_1)$  no debe incluir el cero. Al trazar las gráficas de concentración vs la respuesta analítica, tanto la línea de ajuste y el

coeficiente de determinación cumplen con los criterios, sin embargo el tratamiento estadístico que se presenta en el anexo I tablas 18-26 y 51-58 indica problemas con la regresión. A pesar de que los datos presentan aproximadamente una distribución normal de la respuesta analítica condicionada a la concentración de cada punto de la curva la variabilidad de la regresión se observa en la estimación del error estándar de los coeficientes, los cuales son altos y en los intervalos de confianza no válidos de la pendiente ( $\beta_1$ ) y ordenada ( $\beta_0$ ), probablemente los estimadores de mínimos cuadrados no son eficientes, es decir no son los estimadores de mínima varianza, por lo que este modelo lineal no es adecuado. La varianza es no homogénea e indica heteroscedastocidad de los datos afectando así la validez de las conclusiones del análisis de regresión lineal mediante inspección visual.

Se podrá usar algún procedimiento más complejo para estimar los parámetros o encontrar transformaciones apropiadas para las variables, el inconveniente es la posibilidad de incluir términos de interacción y que el análisis será solamente valido para los datos transformados.

#### 5.4.2 Precisión

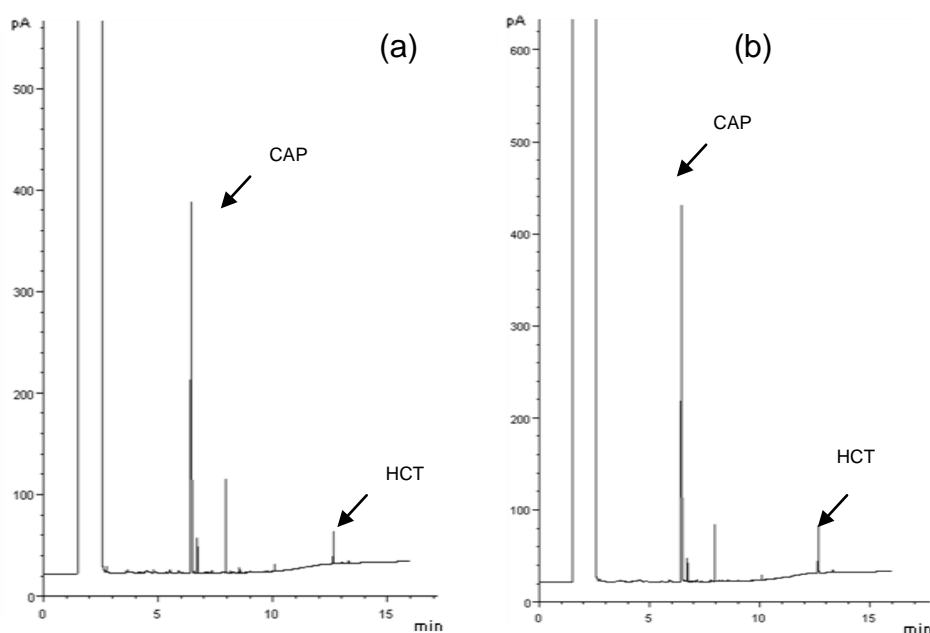
**Criterio de aceptación:**  $CV \leq 1.5\%$  para métodos físico-químicos. En el caso de la precisión del sistema ( $n=6$ ) existe un grado de concordancia entre mediciones analíticas obtenidas bajo las mismas condiciones de medición de 4.19% y 9.77% para CAP-HCT respectivamente, y a su vez 5.21% y 6.97% para MET-HCT (tablas 17 y 50). Estos valores se consideraron aceptables de acuerdo al procedimiento aplicado (determinación simultánea) y concentración de las soluciones de trabajo.

#### 5.4.3 Especificidad

**Criterios de aceptación:** La respuesta del método únicamente debe ser debida al analito. La especificidad para las sustancias de referencia y las muestras de CAP-

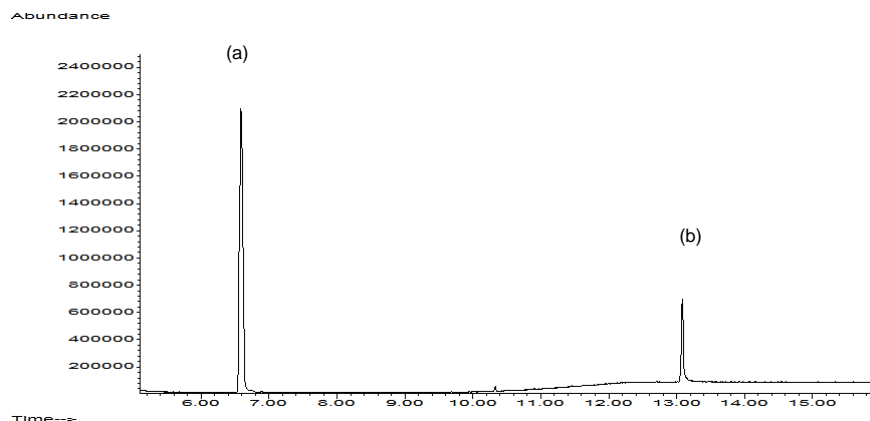
HCT y MET-HCT fue evaluada por medio de cromatografía de gases seguida de espectrometría de masas CG-EM.

Para CAP-HCT, se asumió que la formulación podría contener los excipientes: lactosa, estearato de magnesio, almidón y celulosa microcristalina y se adicionaron al 4% para observar si interferían en la determinación de los fármacos en estudio. En la figura 18 se presentan los cromatogramas del estándar con adición de excipientes y la tableta de CAP-HCT.

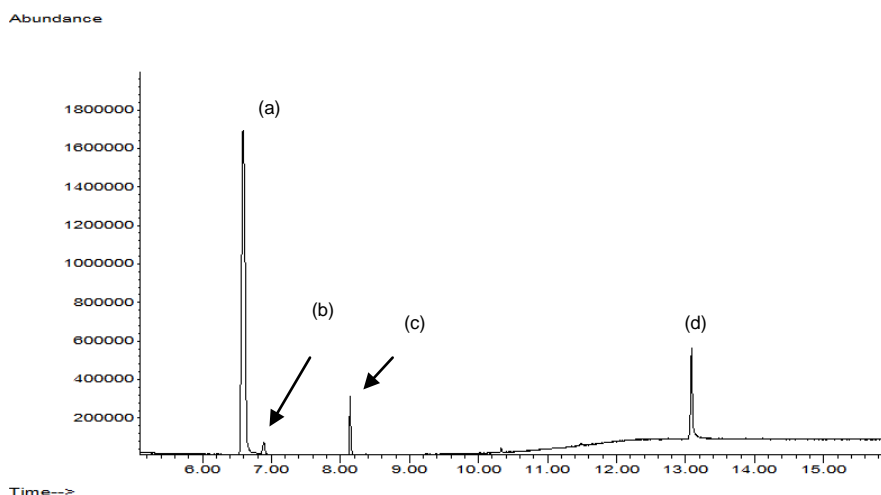


**Fig. 18.** (a) cromatograma correspondiente a los estándares CAP-HCT con excipientes adicionados al 4%, (b) cromatograma de la tableta de CAP-HCT.

En la figura 18, en ambos cromatogramas para CAP-HCT, se observaron señales adicionales a los picos de los fármacos en estudio, dichas señales posiblemente se deban a contaminación originada del proceso de análisis o a componentes de la muestra. Para confirmar esto, se obtuvo el espectro de masas de CAP-HCT<sub>ref</sub> y CAP-HCT<sub>tab</sub>, los cuales son presentados en las figuras 19 y 20 respectivamente.

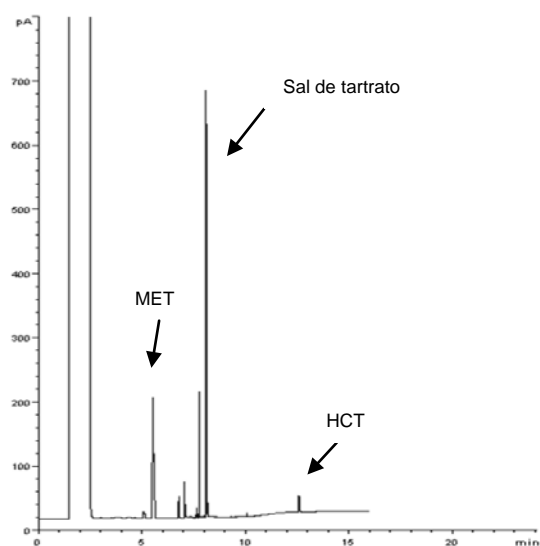


**Fig. 19.** Cromatograma iónico total (a) derivado metilado de CAP y (b) derivado metilado de HCT.

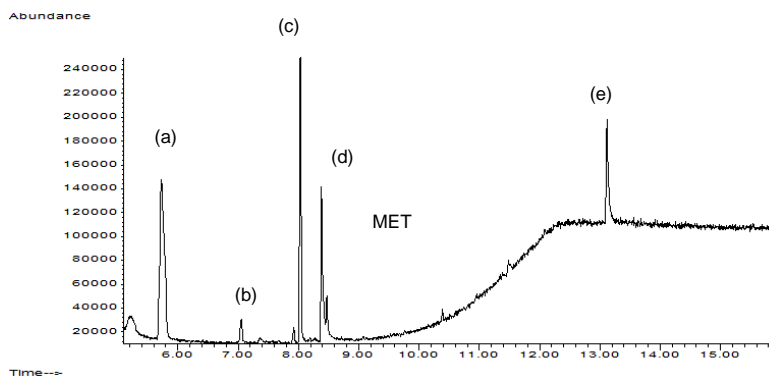


**Fig. 20.** Cromatograma iónico total (a) derivado metilado de CAP, (b,c) picos no identificados y (d) Hidroclorotiazida.

Por otra parte, para la combinación MET-HCT se obtuvo solamente el cromatograma de la tableta, puesto que esta vez no se tuvo la información de algún excipiente en la formulación para una tableta de liberación prolongada. Los cromatogramas de la figuras 21 y 22 son muy similares en el comportamiento que se obtiene de los estándares de MET-HCT, aparentemente no hubo interferencias originadas en la matriz de la muestra.



**Fig. 21.** Cromatograma de la tableta de MET -HCT.



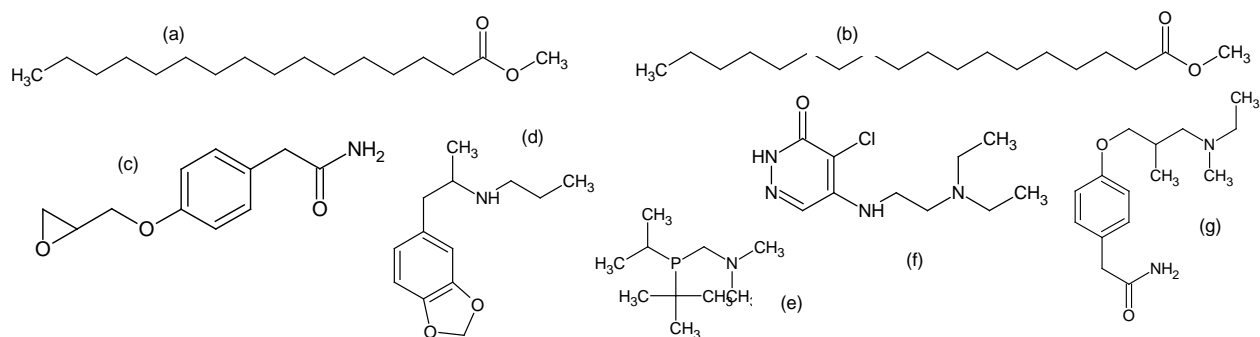
**Fig. 22.** Cromatograma iónico total de la tableta MET-HCT donde (a) derivado metilado de MET; (b-d) picos no identificados y (e) Hidroclorotiazida.

En general los componentes de las tabletas no interfirieron en la cuantificación de los principios activos, ya que no se observó en los cromatogramas del estándar adicionado con excipientes ninguna señal en el tiempo de retención de cada uno de los fármacos y por lo tanto no interfirieron en la cuantificación.

En las dos combinaciones de antihipertensivos en estudio se observaron distintas señales que no corresponden a los fármacos de interés, estas señales pueden provenir del proceso de fabricación o bien contaminación en el proceso de



análisis. En la figura 23 se muestran las estructuras de las posibles contaminaciones presentes en las muestras de los productos utilizados, por otro lado los excipientes más comunes como lo son lactosa, estearato de magnesio, celulosa microcristalina y almidón no interfieren en la determinación de los antihipertensivos de estudio debido a su insolubilidad en el metanol, el cual fue el disolvente utilizado en la preparación de los estándares y muestras.

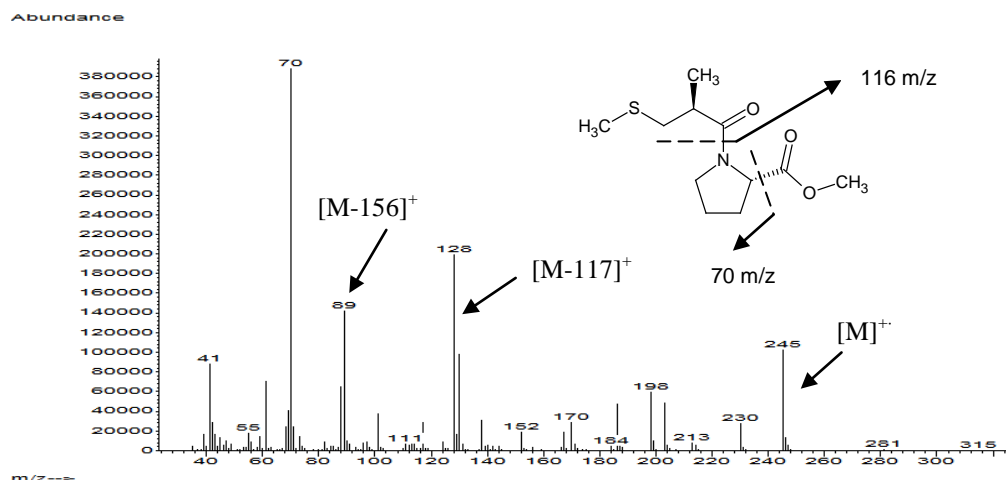


**Fig. 23.** Compuestos que pueden proporcionar señales intrínsecas a las muestras comerciales que se utilizaron para la determinación de antihipertensivos. Donde (a) ác. octadecanoico, (b) ác. hexadecanoico, (c) etil-3,5-dimetil-1-adamantanecarboxilato, (d) 3,4-metilendioxipropilamfetamina, (e) N-dimetilaminometil-*t*-fosfoisopropilo, (f) 4-cloro-5-[(2-dietilaminoetil)-aminopiridazina-3]-2H-ona, (g) 2-[4-(2-metil-3-isopropilmetilaminopropoxi)]-fenilacetamida.

Para verificar la derivatización de los analitos se realizó un análisis mediante CG-EM.

El espectro de masas del derivado metilado de Captopril se muestra en la figura 24. En este espectro se verificó que la sustitución resultante es en los grupos hidroxilo y sulfidrilo ( $-\text{OH}$ ,  $-\text{SH}$ ) debido a que en el espectro se observa el ión molecular ( $m/z$  245) y pico base ( $m/z$  70) que corresponde a la pérdida del anillo de pirrolidina.

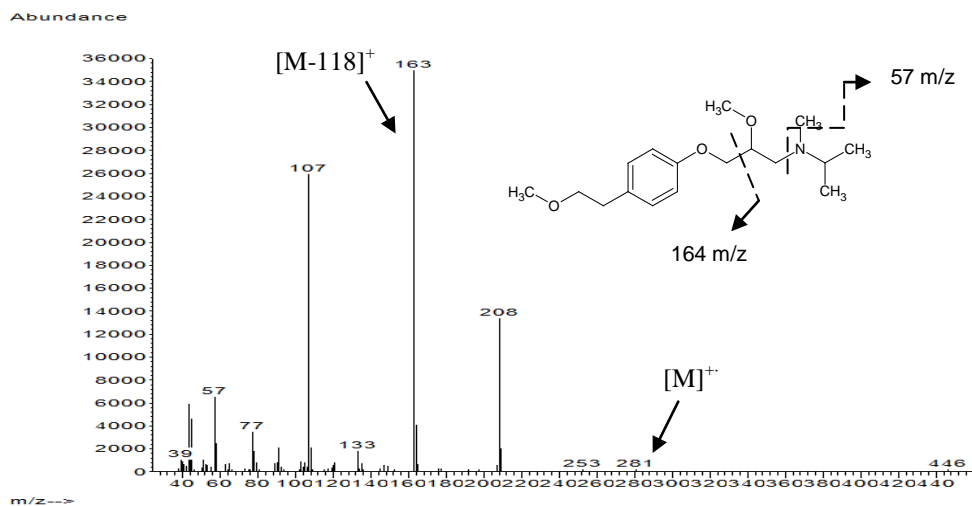
Las fragmentaciones resultantes se deben generalmente a las rupturas alquílicas, preferentemente en los enlaces C-C y C-C=O, por ejemplo ( $m/z$  89 y 128) y en especial en los puntos de ramificación dando lugar a iones fragmento de mayor estabilidad debido a que se generan iones carbono terciarios.



**Fig. 24.** Espectro de masas del derivado metilado de Captopril.

En el caso de Metoprolol, el espectro se muestra en la figura 25. Este compuesto cuenta con un anillo aromático, el cual induce la ruptura bencílica en posición  $\alpha$  ( $m/z$  107, 138), llevando así a la formación del ión bencílico, estabilizado por la deslocalización de la carga originando mayor estabilidad. En el caso de los grupos amino la ruptura de los enlaces en posición  $\alpha$  se ve favorecida ( $m/z$  57, 72), quedando la carga estabilizada por el heteroátomo. El ión molecular se logra observar ( $m/z$  281) y pico base ( $m/z$  163) con la pérdida de 118 unidades.

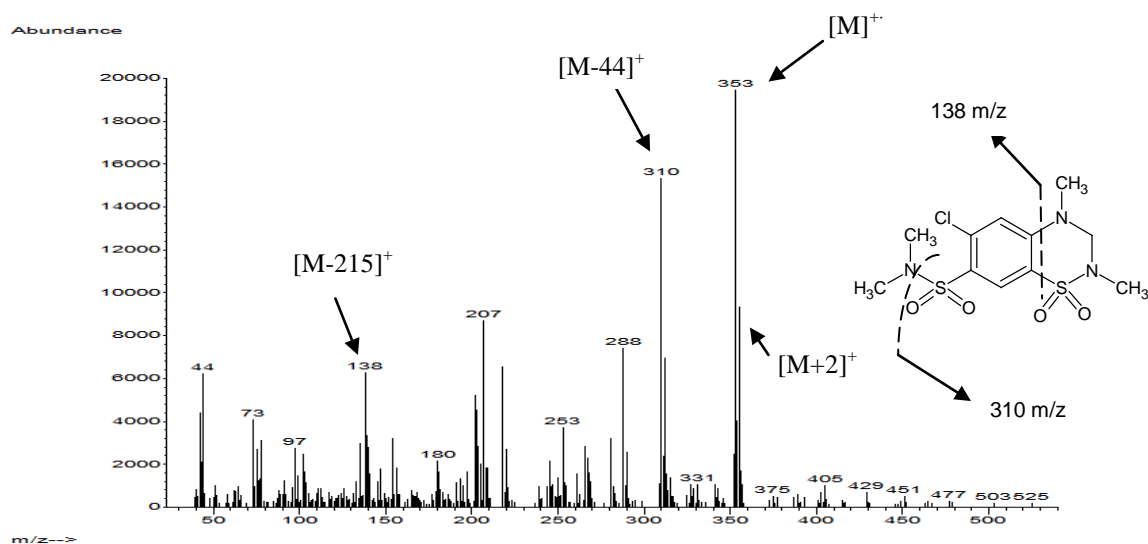
La reacción de derivatización para el MET es en consecuencia, el resultado de una competencia entre los grupos susceptibles a sustitución alquímica puesto que la molécula de MET también posee un grupo amino.



**Fig. 25.** Espectro de masas del derivado metilado de Metoprolol.

En la mayoría de las reacciones de derivatización una vez formado un producto particular, éste se mantiene estable después de haber sido efectuada tal reacción. Sin embargo, no siempre es éste el caso debido a que en algunas ocasiones las reacciones son reversibles ó bien existe un equilibrio entre los productos formados, si hubiera diversidad de productos; siendo así en el caso del derivado metilado de MET se obtuvo un producto que resulta favorecido por el equilibrio y que no necesariamente podría ser el que se forma más rápido. La preferencia por el derivado monosustituido de MET está determinada por la cinética, estereoquímica, dispersión de carga en la formación del derivado, factores polares del grupo  $-OH$  y el carácter nucleofílico conferido por la sal adicionada.

El espectro de Hidroclorotiazida se muestra en la figura 26, su fragmentación resultó más compleja comparada con los espectros de CAP y MET, presentando el ión molecular en 353 m/z, el cual también corresponde al pico base. También se obtienen iones fragmento a 310 m/z, procedente de la pérdida del isopropilamino (44 unidades de masa) y 138 m/z de la pérdida del anillo aromático con sus ramificaciones, además del comportamiento isotópico debido a la presencia del grupo halógeno, es decir se observan un pico separado por dos unidades en el ión molecular 353 m/z (M y M+2) y cuya intensidad relativa parece ser 3 a 1, por tanto se verifica que la molécula contiene Cl.



**Fig. 26.** Espectro de masas del derivado metilado de Hidroclorotiazida.

#### 5.4.4 Precisión del método

**Criterios de aceptación:**  $CV \leq 2\%$  para métodos cromatográficos y volumétricos; no mayor a una magnitud preestablecida, acorde a la especificación del analito en la muestra. En la precisión obtenida, la concordancia entre determinaciones independientes ( $n=3$ ) realizadas por un solo analista, empleando el mismo aparato y la misma técnica fue de 5.41 y 12.61% para CAP – HCT, por otro lado 9.65 y 6.18% para MET – HCT, además de que no hay diferencia significativa entre días. (Tablas 29-33 y 61-65).

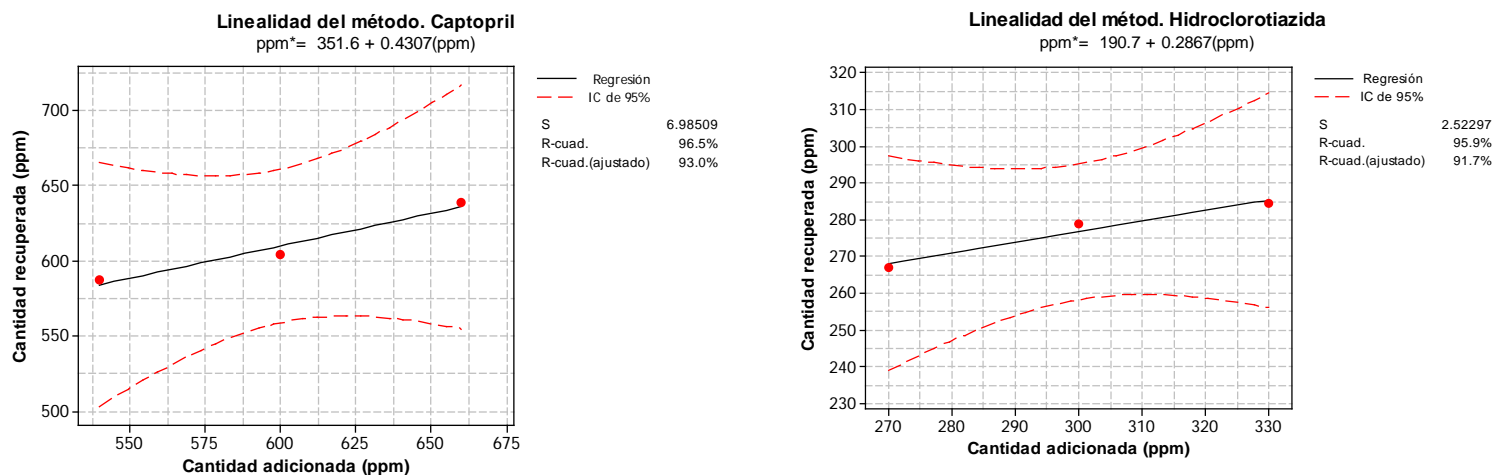
#### 5.4.5 Exactitud

**Criterios de aceptación:** el  $IC(\mu)$  debe incluir el 100 % o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo 98-102%. Los recobros de los métodos desarrollados fueron de 93.99 y 84.13% para CAP–HCT, 91.75 y 92.95% para MET–HCT respectivamente (Tablas 27-28 y 59-60).

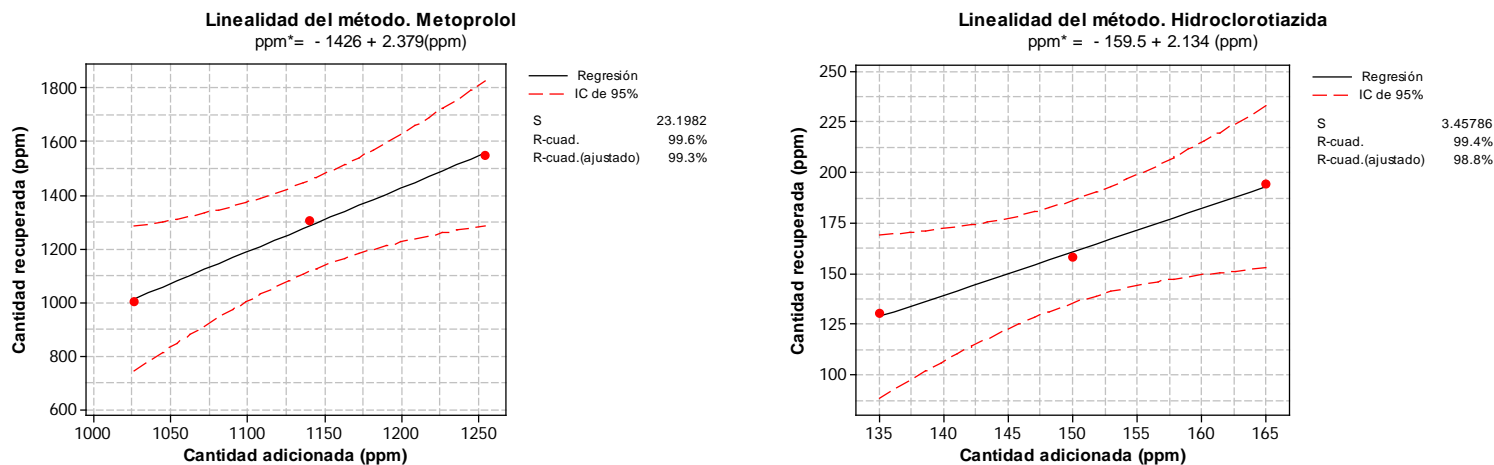
#### 5.4.6 Intervalo de linealidad

**Criterios de aceptación:**  $r^2 \geq 0.98$ ,  $IC(\beta_1)$  debe incluir la unidad,  $IC(\beta_0)$  debe incluir el cero, el  $CV_{y/x}$  del porcentaje de recobro no debe ser mayor de 2% si el método es cromatográfico, el  $IC(\mu)$  debe incluir el 100 % o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo 98-102%. Con base en los resultados del estudio de linealidad y exactitud se provee el rango en el que se puede obtener una respuesta lineal y con exactitud ( $100 \pm 10\%$ ). En la figura 27 se muestran las curvas de CAP-HCT y en la figura 28 las curvas de MET-HCT respectivamente.

En la prueba de hipótesis para el intercepto  $t_{cal} < t_{teo} (0.975, n-2)$ , donde la hipótesis nula  $H_0: B=0$ , no se rechaza por lo que el intercepto no es significativamente diferente de cero. Además la prueba de hipótesis para la pendiente  $t_{cal} < t_{teo} (0.975, n-2)$ , donde la hipótesis nula  $H_0: m=1$ , no se rechaza por lo que la pendiente no es significativamente diferente de uno (Tabla 34-49, 66-81).



**Fig. 27.** Gráficos de la linealidad del recobro de CAP e HCT en el método.



**Fig. 28.** Gráficos de la linealidad del recobro de MET e HCT en el método.

En el tratamiento estadístico ocurren los problemas en la regresión lineal mencionados en el apartado 5.4.1, es decir los supuestos de linealidad no se cumplen al estar apartados del modelo a consecuencia de la estimación demasiado sesgada de los parámetros.

En la tabla 11 se muestran en forma resumida los parámetros que se evaluaron para la validación de los métodos. Los datos correspondientes a la validación, así como las respectivas gráficas y la estadística necesaria de los mismos se presentan en el Anexo I.

**Tabla 11.** Parámetros de validación para la determinación simultánea de CAP-HCT y MET-HCT.

Parámetros	CAP 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$	HCT 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$	MET 1140 $\mu\text{g mL}^{-1}$	HCT 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$
<b>Linealidad del sistema</b>				
Intercepto	-463.06	-134.17	-532.89	-8.47
Pendiente	15.69	2.39	11.51	0.93
Coef. de correlación (r)	0.9910	0.9940	0.9970	0.9926
Coef. de determinación ( $r^2$ )	0.9822	0.9881	0.9941	0.9853
<b>Precisión del sistema</b>				
DE	40.8	15.7	35.09	6.63
CV (%)	4.19	9.77	5.21	6.97
<b>Exactitud del sistema</b>				
DE	2.04	7.81	5.53	5.16
CV (%)	2.17	9.28	6.03	5.55
Recobro (%)	93.99	84.13	91.75	92.95
<b>Especificidad</b>	Fig. 18	Fig. 18	Fig. 20	Fig. 20
<b>Linealidad del método</b>				
Intercepto	-70.04	-49.12	-947.77	-230.24
Pendiente	8.97	2.27	18.61	3.52
Coef. de correlación (r)	0.9978	0.9782	0.9960	0.9838
Coef. de determinación ( $r^2$ )	0.9956	0.9568	0.9919	0.9838
<b>Precisión del método</b>				
<b>Intradía</b>				
DE	52.86	7.51	28.32	4.95
CV (%)	4.96	7.04	3.40	5.92
<b>Interdía</b>				
DE	55.47	13.93	81.86	5.13
CV (%)	5.41	12.61	9.65	6.18

DE: Desviación estándar de las áreas; CV: Coeficiente de variación

En general, los parámetros de ensayo en este estudio de validación se encuentran por encima de los criterios de aceptación debido a la influencia directa de la etapa de derivatización, en la cual la energía suministrada para llevar a cabo la reacción no se considera constante por el tipo de equipo utilizado, sin embargo los procedimientos desarrollados sirven como método de análisis de rutina.

## 5.5 Análisis de las muestras comerciales

Una vez evaluados los parámetros de validación de los métodos desarrollados, se prosiguió a la valoración de los principios activos en muestras comerciales. En la tabla 12 se presentan los resultados del análisis de las tabletas CAP-HCT y de acuerdo a las especificaciones descritas en FEUM y USP, Captopril cumple con  $101.70 \pm 3.35\%$  e Hidroclorotiazida cumple con  $92.98 \pm 7.84\%$ .

**Tabla 12.** Análisis de tabletas de Captopril / Hidroclorotiazida 25 mg / 12.5 mg

	Captopril <sup>a</sup>			Hidroclorotiazida <sup>b</sup>		
	Referencia	Tableta	%	Referencia	Tableta	%
Tiempo de retención (min)	6.37	6.37		12.60	12.59	
Factor de asimetría	0.96	1.72		0.91	1.50	
Áreas						
1	965.50	953.90	97.77	206.50	207.50	100.14
2	816.30	854.60	103.60	205.60	194.30	94.18
3	736.60	772.10	103.72	222.50	188.90	84.61
Promedio			101.70			92.98
DER			3.40			7.84
CV (%)			3.35			8.43

<sup>a</sup> Contiene no menos del 90.0 % y no más del 110.0 % de la cantidad de  $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ , indicada en el marbete.

<sup>b</sup> Contiene no menos del 90.0 % y no más del 110.0 % de la cantidad de  $C_9H_{15}NO_3S$ , indicada en el marbete.

En la tabla 13 se presentan los resultados del análisis para la combinación MET-HCT y de acuerdo a las especificaciones descritas en FEUM y USP, Metoprolol cumple con  $96.96 \pm 5.08\%$  e Hidroclorotiazida cumple con  $98.29 \pm 7.58\%$ .

**Tabla 13.** Análisis de tabletas de Metoprolol / Hidroclorotiazida 95 mg / 12.5 mg

	Metoprolol <sup>a</sup>			Hidroclorotiazida <sup>b</sup>		
	Referencia	Tableta	%	Referencia	Tableta	%
Tiempo de retención (min)	5.51	5.51		12.56	12.55	
Factor de asimetría	0.60	0.70		1.00	1.68	
Áreas						
1	782.6	755.5	91.71	167.6	175.1	106.21
2	975.7	999.6	97.32	139.3	133.7	97.58
3	702.5	753.2	101.86	223	199.8	91.08
Promedio			96.96			98.29
DER			5.08			7.58
CV (%)			5.24			7.72

<sup>a</sup> Contiene no menos del 90.0 % y no más del 110.0 % de la cantidad de  $C_{15}H_{25}NO_3$ , indicada en el marbete.

<sup>b</sup> Contiene no menos del 90.0 % y no más del 110.0 % de la cantidad de  $C_9H_{15}NO_3S$ , indicada en el marbete.

Los resultados en estas series de muestras expresan datos cuya evaluación estadística, es decir, la desviación estándar está por encima de la precisión de esta clase de métodos (valoración) lo que implica un aumento en el margen de error para determinar un resultado acertado.

En la tabla 14 y 15 se hace una comparación de las ventajas obtenidas por parte de los métodos desarrollados con respecto a los descritos en FEUM 10ed. Los métodos expuestos en este trabajo presentan varias ventajas respecto a los métodos previamente ya mencionados en la documentación oficial, entre las cuales destacan las siguientes:

El tamaño de muestra requerido es menor, es decir, se utilizaron menos mg equivalentes de los fármacos para obtener la concentración de trabajo en comparación con los mg indicados en las monografías individuales. En adición, en la etapa de preparación, los métodos de estudio involucraron una etapa de derivatización la cual tiene un tiempo de reacción más corto que el necesario para realizar las etapas de extracción líquido-líquido de los procedimientos incluidos en las monografías. Por otro lado, se emplean volúmenes de disolvente mucho menor en la preparación de las soluciones debido al esquema de diluciones que se siguió. Finalmente los tiempos de las corridas analíticas para el análisis de la referencia y la muestra de CAP-HCT ó MET-HCT fueron de 1 h con 30 min., cuando generalmente la determinación unitaria de esos fármacos con lleva un tiempo de 2 horas.

Se concluye que los métodos descritos en este trabajo para cuantificar CAP-HCT y MET-HCT son capaces de cuantificar los analitos estudiados simultáneamente a pesar de estar por encima de los criterios de aceptación, a pesar de ello las características de las tablas 14 y 15 describen conjuntamente su aptitud para su uso en comparación con las características enunciadas de los métodos farmacopeicos.



**Tabla 14.** Comparación entre los métodos descritos en FEUM 10ª ed. y el método desarrollado para la determinación de los antihipertensivos CAP-HCT en tabletas.

Variables	Método farmacopeico para la determinación de CAP en tabletas	Método farmacopeico para la determinación de HCT en tabletas	Método desarrollado para la determinación simultánea de CAP-HCT
Valoración	CLAR	CLAR	CG
Fase móvil	Metanol:agua y ácido fosfórico	Sol. fosfato monobásico de sodio: acetonitrilo pH 3±0.1	Hidrógeno
Preparación de referencia	20 mg CAP y 5 mg de disulfuro de CAP para obtener 1 mg/mL y 0.05 mg/mL respectivamente	15 mg de HCT y clorotiazida para obtener 150 µg/mL de cada una de las S <sub>ref</sub>	10 mg y 5 mg de CAP y HCT respectivamente para obtener 600/300 µg/mL
Disolvente utilizado	30 mL	100 mL	7 mL
Preparación de la muestra	100 mg equivalentes de CAP	30 mg equivalentes de HCT	5 y 10 mg equivalentes de HCT y CAP
Disolvente utilizado	100 mL fase móvil	200 mL	7 mL
Etapa de preparación	Ultrasonido 15 min y centrifugación 5 min. El sobrenadante fue utilizado para la prueba.	Ultrasonido 5 min, agitación mecánica durante 10 min y filtrar, desechando los primeros 10 mL.	Centrifugación 15 min. El sobrenadante fue utilizado para la prueba. Tiempo de derivatización 10 min.
			Ionización en llama a 320 °C
Detector	Luz UV de 220 nm	Luz UV de 254 nm	
Volumen de inyección	20 µL	20 µL	1 µL
Tiempo del análisis cromatográfico	Aprox. 1 h	Aprox. 1 h	16 min
Tiempo de la corrida analítica	Aprox. 2 h	Aprox. 2 h	41 min. para la muestra y 36 min. para la referencia

**Tabla 15.** Comparación entre los métodos descritos en FEUM 10ª ed. y el método desarrollado para la determinación de los antihipertensivos MET-HCT en tabletas.

Variables	Método farmacopeico para la determinación de MET en tabletas	Método farmacopeico para la determinación de HCT en tabletas	Método desarrollado para la determinación simultánea de CAP-HCT
Valoración	CLAR	CLAR	CG
Fase móvil	Metanol:agua con sales: 1-pentanosulfónico y acetato de sodio anhidro	Sol. fosfato monobásico de sodio: acetonitrilo pH 3±0.1	Hidrógeno
Preparación de referencia	10 mg MET y aforar con patrón interno (oxprenolol 720 µg/mL) para obtener 500 µg/mL	15 mg de HCT y clorotiazida para obtener 150 µg/mL de cada una de las S <sub>ref</sub>	38 mg y 5 mg de MET y HCT respectivamente para obtener 1140/150 µg/mL
Disolvente utilizado	20 mL	100 mL	7 mL
Preparación de la muestra	50 mg equivalentes de MET	30 mg equivalentes de HCT	38 y 5 mg equivalentes de MET e HCT
Disolvente utilizado	60 mL	200 mL	7 mL
Etapa de preparación	Ultrasonido 10 min, centrifugación durante 5 min y filtración con membrana de 0.5 µm	Ultrasonido 5 min, agitación mecánica durante 10 min y filtrar, desechando los primeros 10 mL.	Centrifugación 15 min. El sobrenadante fue utilizado para la prueba. Tiempo de derivatización 10 min.
			Ionización en llama a 320 °C
Detector	Luz UV de 254 nm	Luz UV de 254 nm	
Volumen de inyección	10 µL	20 µL	1 µL
Tiempo del análisis cromatográfico	Aprox. 1 h	Aprox. 1 h	16 min
Tiempo de la corrida analítica	Aprox. 2 h	Aprox. 2 h	41 min. para la muestra y 36 min. para la referencia

Por lo tanto, para mejorar los métodos desarrollados se deben cambiar ciertos aspectos del procedimiento experimental, así como el uso de métodos estadísticos y cambio del tipo de procedimientos de inspección, por otra parte se

recomienda hacer un estudio más a fondo sobre las variables que afectan la de derivatización ya que dicha etapa condiciona la variabilidad de los resultados en la determinación cromatográfica.

Finalmente es importante indicar que las pruebas de las farmacopeas, y en general las descritas en los registros, se plantean de manera que se puedan emplear de manera óptima, siendo así, éstos métodos desarrollados son capaces de generar determinaciones de calidad aceptable de los productos estudiados.

## 6 Conclusiones

1. Se desarrolló y validó un método mediante Cromatografía de Gases-Detector de Ionización de Llama (CG-FID) para cuantificar simultáneamente Captopril-Hidroclorotiazida en tabletas.
2. Se desarrolló y validó un método mediante Cromatografía de Gases-Detector de Ionización de Llama (CG-FID) para cuantificar simultáneamente Metoprolol-Hidroclorotiazida en tabletas, sin contemplar una etapa de extracción líquido-líquido previo a la valoración.
3. Se estableció la reacción de derivatización para antihipertensivos utilizando  $\text{CH}_3\text{I}$  y acetona 1:10 v/v con adición de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  como catalizador y con el uso de microondas reduciendo el tiempo de reacción a 10 minutos.
4. El método desarrollado estudiado para CAP-HCT, es lineal en el intervalo de  $\pm 20\%$  del 100% de la conc. de trabajo, preciso con CVs de 4.19-9.77% y exacto con porcentajes de recobro de 93.99-84.13%, los cuales son similares con respecto al 99.10 y 98.65% reportados en la literatura (Hassan, 1991 y SN Meyyanathan y cols., 2008). Además se utilizó menor cantidad de estándar, cantidad de disolvente y se redujo el tiempo de análisis.
5. El método desarrollado estudiado para MET-HCT, es lineal en el intervalo de 20% del 100% de la conc. de trabajo, preciso con CVs de 5.21-6.97% y exacto con porcentajes de recobro de 91.75-92.95%, los cuales son similares con respecto al 99.85 y 98.65% reportados en la literatura (PS Jain y cols., 2012 y SN Meyyanathan y cols., 2008). También se utilizó menor cantidad de estándar, cantidad de disolvente y se redujo el tiempo de análisis.

## 7 Bibliografía

- Ahmed, S., Atia, N.N., Mohamed, N.A. 2011. *Dual separation mode for simultaneous determination of antihypertensive drug combinations by high-performance liquid chromatography*. Talanta 84, 666-672.
- Alfonso, G. 1990. *Farmacía de Remington*. 19 ed. Tomo I y II. Ed. Médica Panamericana, México. Pp. 557-558.
- Alvear, M.T. 2005. *Semiología Médica: Fisiopatología, Semiología y Propedéutica*. 3ra ed., Editorial Médica Panamericana, Argentina, Buenos Aires. Pp. 462.
- Atkins, P.W., Jones, L.L. 2007. *Principios de química: los caminos del descubrimiento*. 3° ed. Editorial Médica-Panamericana, Buenos Aires, Argentina. Pp. 327.
- Barceló-Barrachina, E., Santos, F.J., Puignou, L., Galceran, M.T. 2005. *Comparison of dimethylformamide dialkylacetal derivatization reagents for the analysis of heterocyclic amines in meat extracts by gas chromatography-mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta 545, 209-217.
- Barwick, V.J. 1999. *Sources of uncertainty in gas chromatography and high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A 849, 13-33.
- Blau, K., Halket, J. 1993. *Handbook of Derivatives for Chromatography*. 2nd Edition, J. Wiley & Son, Chichester.
- Blumberga, L.M., Klee, M.S. 2001. *Quantitative comparison of performance of isothermal and temperature-programmed gas chromatography*. Journal of Chromatography A 933, 13-26.
- CNQFB. 1997. *Requisitos mínimos para la validación de métodos analíticos*. México.
- Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. *Métodos Analíticos Validación*. México: Secretaría de Salud, 1991.
- Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 2010. FEUM 10a Tomos I y II. México.
- Connors, K.A. 1981. *Curso de Análisis Farmacéutico. Ensayo del medicamento*. 2da ed. Editorial Reverté, España.

- Cramers, C.A., Leclercq, P.A. 1999. *Strategies for speed optimisation in gas chromatography: an overview*. Journal of Chromatography A 842, 3-13.
- Damm, M., Rechberger, G., Kollroser, M., Kappe, C.O. 2009. *An evaluation of microwave-assisted derivatization procedures using hyphenated mass spectrometric techniques*. Journal of Chromatography A 1216, 5875-5881.
- Deng, C., Yin, X., Zhang, L., Zhang, X. 2005. *Development of microwave-assisted derivatization followed by gas chromatography/mass spectrometry for fast determination of amino acids in neonatal blood samples*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 19(16), 2227-2234.
- Diario Oficial de la Federacion.1999. *NORMA Oficial Mexicana NOM-030-SSA2-1999, Para la prevención, tratamiento y control de la hipertensión arterial*. México.
- Diario Oficial de la Federacion. 2006. *NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos*. México
- Ding, L., Wang, Xi., Yang, Z., Chen, Y. 2008. *The use of HPLC/MS, CG/MS, NMR, UV and IR to identify a degradation product of eperisone hydrochloride in the tablets*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 46, 282-287.
- DrugBank. *Ficha técnica de Hidroclorotiazida*.  
<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00999>  
Página consultada el 15 de Abril de 2013.
- DrugBanck. *Ficha técnica de Metoprolol*.  
<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00264>  
Página consultada el 15 de Abril de 2013.
- Food and Drug Administration. 1996. *Guidance for industry validation of analytical procedures: methodology*, USA Department of health and human services.
- Franklin, M.E., Addison, R.S., Baker, P.V., Hooper, W.D.1998. *Improved analytical procedure for the measurement of Captopril in human plasma by gas chromatography--mass spectrometry and its application to pharmacokinetic studies*. Journal of Chromatography B 705, 47-54.

- Gao, F., Zhang, M., Cui, X., Wang, Z., Sun, Y., Gu, J. 2010. *Simultaneous quantitation of hydrochlorothiazide and Metoprolol in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 52, 149-154.
- Gonzalez, O., Iriarte, G., Rico, E., Ferreirós, N., Maguregui, M.I., Alonso, R.M., Jiménez, R.M. 2010. *LC-MS/MS method for the determination of several drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma*. Journal of Chromatography B 878, 2685-2692.
- Gradman, A.H., Basile, J.N., Carter, B.L., Bakris, G.L. 2010. *Combination therapy in hypertension*. Journal of the American Society of Hypertension 4(1), 42-50.
- Gupta, V.K., Jain, R., Agarwal, S., Mishra, R., Dwivedi, A. 2011. *Electrochemical determination of antihypertensive drug irbesartan in pharmaceuticals*. Analytical Biochemistry 410, 266-271.
- Hassan F. Askal (1991). *New spectrophotometric methods for determination of captopril bulk drug and tablets*. Talanta 38, 1155-1158.
- Heberer, T., Stan, H.J. 1997. *Detection of more than 50 substituted phenols as their t-butyldimethylsilyl derivatives using gas chromatography-mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta 341, 21.
- Hernández, Á.M. y cols. (2009). *Guía de tratamiento farmacológico para el control de la hipertensión arterial*. Revista Mexicana de Cardiología 20 (2) 55-104.
- Hernández, G., Moreno, A., Zaragoza, F., Porras, A. 2011. *Tratado de Medicina Farmacéutica*. Ed. Médica Panamericana, Madrid, España. Pp. 106, 108-109, 146-147.
- Howard, C.A. 1985. *Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*. 4ed. Lea & Febiger Editors, USA.
- International Conference on Harmonisation. 1996. Guideline on the validation of analytical procedures; Methodology ICHQ2A y Q2B.
- Jover-Botella, A. 2004. *Manual auxiliar de farmacia*. Temario general. Ed. MAD S.L., España, pg. 152.
- Kataoka, H. 1996. *Derivatization reactions for the determination of amines by gas chromatography and their applications in environmental analysis*. Journal of Chromatography A 733, 19-34.

- Kristoffersen, L., Leere, E., Stokke, M., Krogh, M., Lundanes, E., Solberg, A. 2007. *Simultaneous determination of 6 beta-blockers, 3 calcium-channel antagonists, 4 angiotensin-II antagonists and 1 antiarrhythmic drug in post-mortem whole blood by automated solid phase extraction and LC-MS: Method development and robustness testing by experimental design.* Journal of Chromatography B 850, 147-160.
- Liebeke, M., Wunder, A., Lalk, M. 2010. *A protocol for the investigation of the intracellular Staphylococcus aureus metabolome.* Analytical Biochemistry. 401, 250-259.
- Loupy, K., Bougrin, M.S. 2005. *Microwave-assisted solvent-free heterocyclic synthesis.* Journal of Photochemistry and Photobiology C 6, 140-163.
- Magiera, S., Uhlschmied, C., Rainer, M., Huck, Ch.W., Baranowska, I., Bonn, G.K. 2011. *CG-EM method for the simultaneous determination of  $\beta$ -blockers, flavonoids, isoflavones and their metabolites in human urine.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 56, 93-102.
- PS Jain, MK Patel, SB Bari, SJ Surana (2012). *Development and validation of HPTLC method for simultaneous determination of amlodipine besylate and metoprolol succinate in bulk and tablets.* Indian Journal of Pharmaceutical Sciences 74,152-156.
- Rezende K.R., Mundim, I.M., Teixeira, L.S., Souza, W.C., Ramos D.R., Cardoso, C.R., Souza, I.C., Gratão, M.Z., Bellório, K.B. 2007. *Determination of Captopril in human plasma, using solid phase extraction and high-performance liquid chromatography, coupled to mass spectrometry: application to bioequivalence study.* Journal of chromatography B 850, 59-67.
- Ruiz-Matute, A.I., Hernández-Hernández, O., Rodríguez-Sánchez, S., Sanz, M.L., Martínez-Castro, I. 2011. *Derivatization of carbohydrates for CG and CG-MS analyses.* Journal of Chromatography B 879, 1226-1240.
- Secretaría de Salud. *Boletín informativo*  
<http://www.salud.gob.mx> . Página consultada el 15 de Abril de 2013
- Silva, F., Ferraz, V. 2004. *Microwave-Assisted derivatization of glucose and galactose for gas chromatographic determination in human plasma.* Food Chemistry. 88, 609-612.

- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. 2001. *Principios de análisis instrumental*. 5ta edición, McGraw-Hill, Madrid, España. Pp. 759-760.
- SN Meyyanathan, S Rajan, S Muralidharan, Arunadevi S Birajdar, B Suresh (2008). *A validated RP-HPLC method for simultaneous estimation of nebivolol and hydrochlorothiazide in tablets*. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences 70, 687-689.
- Spaulding, R.S.; Charles, M. J. 2002. *Comparison of methods for extraction, storage, and silylation of pentafluorobenzyl derivatives of carbonyl compounds and multi-functional carbonyl compounds*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 372, 808-816.
- US Pharmacopeial Convention. 2009. *United States Pharmacopeia* 33. USA.
- Vademécum IPE.  
<http://www.medicamentos.com.mx>  
Página consultada el 15 de Abril de 2013.
- Varga, R., Somogyvári, I., Eke, Zs., Torkos, K. 2011. *Determination of antihypertensive and anti-ulcer agents from surface water with solid-phase extraction–liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry*, Talanta 83, 1447-1454.
- Vidal-Martinez, Lorena (2009). *Desarrollo y evaluación de nuevas estrategias para la miniaturización de la preparación de la muestra*. Tesis doctoral, Universidad de Alicante, Pp. 355.
- Wells, R.J. 1999. *Recent advances in non-silylation derivatization techniques for gas chromatography*. Journal of Chromatography A 843, 1-18.
- Yilmaz, B., Arslan, S., Vedat, A. 2009. *Gas chromatography–mass spectrometry method for determination of Metoprolol in the patients with hypertension*. Talanta 80, 346-351.
- Yilmaz, B., Arslan, S., Asci, A . 2010. *Determination of Metoprolol in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*. Journal of Separation Science 33, 1904-1908.
- Zuo, Y., Zhang, K., Lin, Y. 2007. *Microwave-accelerated derivatization for the simultaneous gas chromatography-mass spectrometric analysis of natural and synthetic estrogenic steroid hormones*. Journal of Chromatography A 1148, 211-218.



# I. Anexo

## Datos de la Validación de los métodos analíticos para la valoración de CAP-HCT y MET-HCT

Fórmulas para el cálculo de los parámetros de validación

- Media aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

- Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

- Coeficiente de variación

$$CV = \left( \frac{S}{\bar{y}} \right) (100)$$

$n$  = número de mediciones

- Pendiente

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$n$  = número de mediciones (concentraciones-respuesta analítica)

- Ordenada al origen

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

- Coeficiente de determinación

$$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

- Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b1}$$

$$S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}} \quad S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$$

$t_{0.95, n-2}$  es el valor correspondiente a la  $t$  de Student para un nivel del 95% de confianza

- Intervalo de confianza para la ordenada al origen

$$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b0} \quad S_0 = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\sum \frac{x}{n})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

- Coeficiente de variación de regresión

$$CV_{y/x} = \left( \frac{S_{y/x}}{\bar{y}} \right) (100)$$

- Intervalo de confianza de la media poblacional

$$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

$t_{0.95, n-1}$  es el valor correspondiente a la  $t$  de Student para un nivel del 95% de confianza

**Tabla 16.** Peso promedio de las tabletas utilizadas en el desarrollo experimental. Tablet CAP-HCT y tabletas de liberación prolongada de MET-HCT.

# Tableta	Peso (mg)	# Tableta	Peso (mg)
1	251.1	1	367
2	250.3	2	367.6
3	250.4	3	372.6
4	249.3	4	372
5	252.4	5	374.8
6	249.7	6	365
7	251.3	7	368.2
8	252.9	8	363.5
9	249	9	368.9
10	252.3	10	377
11	252.5	11	370.1
12	250.1	12	376.6
13	253	13	377.2
14	250.5	14	376.1
15	255.9	15	377
16	248.7	16	380.4
17	251.7	17	371
18	253.6	18	368.9
19	252.9	19	373.8
20	250.9	20	375.2
Peso Promedio (mg)	251.42	Peso Promedio (mg)	372.145
mg Tableta equivalentes a 5 mg / 10 mg CAP/HCT	100.5	mg Tableta equivalentes a 38 mg / 5 mg MET/HCT	148.8

## Captopril – Hidroclorotiazida (CAP – HCT)

- Precisión del sistema CAP - HCT

**Tabla 17.** Precisión del sistema CAP – HCT

Propiedad medida (Área) de la solución de referencia	Captopril 600 µg/mL Área (pA)	Hidroclorotiazida 300 µg/mL Área (pA)
1	971	140.6
2	1043.8	176.5
3	925.9	152.0
4	974.8	149.8
5	944.1	167.2
6	989.8	179.3
Promedio	974.9	160.9
Desviación Estándar	40.8	15.7
Coeficiente de Variación	<b>4.19</b>	<b>9.77</b>

$n = 6$

- Linealidad del sistema CAP - HCT

**Tabla 18.** Linealidad del sistema CAP

Solución	Conc. % <sup>a</sup>	Área (pA)	Promedio
1	80	791.2	806.87
2	80	772.3	
3	80	857.1	
4	90	847.3	965.13
5	90	1102.9	
6	90	945.2	
7	100	941.4	1068.73
8	100	1211.5	
9	100	1053.3	
10	110	1076.7	1230.07
11	110	1306.6	
12	110	1306.9	
13	120	1152.2	1458.90
14	120	1623.6	
15	120	1600.9	
Pendiente		$b_1$	15.69
Ordenada		$b_0$	-463.06
Coef. determinación		$r^2$	0.9822
Coef. correlación		$r$	0.9910

<sup>a</sup> – Representa el % de concentración con respecto al 100% de la concentración de trabajo; Captopril 600 µg/mL.

**Tabla 19.** Estadísticas de la regresión para la linealidad de CAP.

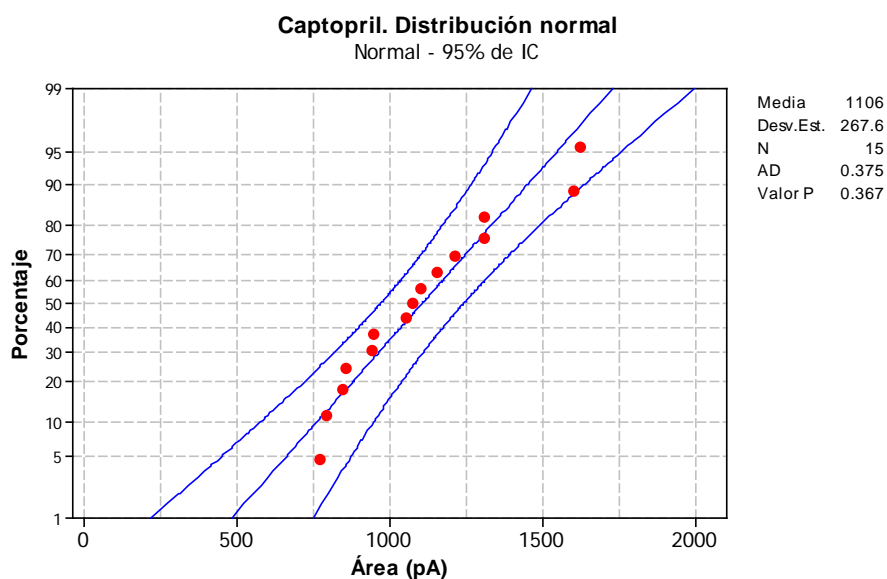
Coeficiente de correlación múltiple	0.99104723
Coeficiente de determinación $r^2$	0.98217462
$r^2$ ajustado	0.97623282
Error típico $S_{y/x}$	38.5911199
Observaciones	5

**Tabla 21.** Análisis de varianza para la regresión lineal.

Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	246176.1	246176.1	165.299342	0.00101551
Residuos	3	4467.8236	1489.27453		
Total	4	250643.924			

**Tabla 22.** Intervalos de confianza para la pendiente y ordenada en la linealidad del sistema CAP.

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-463.06	123.25	-3.76	0.03295604	-855.29	-70.82
pendiente	15.69	1.2203	12.87	0.00101551	11.80	19.57



**Fig. 29.** Gráfica de Probabilidad normal para la linealidad de CAP.

**Tabla 23.** Linealidad del sistema HCT

Solución	Conc. % <sup>b</sup>	Área (pA)	Promedio
1	80	67.5	58.10
2	80	50.7	
3	80	56.1	
4	90	84.2	85.10
5	90	82.7	
6	90	88.4	
7	100	89.9	99.97
8	100	89.6	
9	100	120.4	
10	110	119.1	126.20
11	110	128.9	
12	110	130.6	
13	120	178.2	157.30
14	120	149.4	
15	120	144.3	
		Pendiente	$b_1$ 2.39
		Ordenada	$b_0$ -134.17
		Coef. determinación	$r^2$ 0.9881
		Coef. correlación	$r$ 0.9940

<sup>b</sup> – Donde representa el % de concentración con respecto al 100% de la concentración de trabajo; Hidroclorotiazida 300 µg/mL.

**Tabla 24.** Estadísticas de la regresión para la linealidad de HCT.

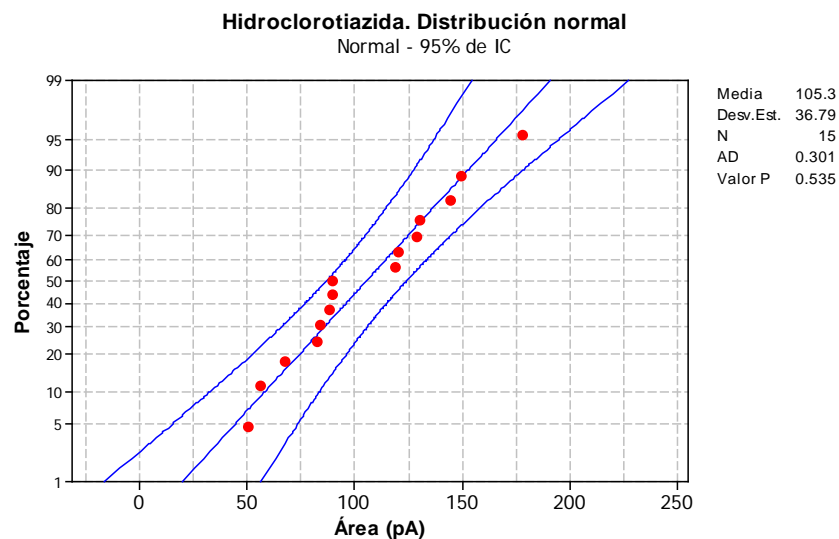
Coeficiente de correlación múltiple	0.99403327
Coeficiente de determinación $r^2$	0.98810215
$r^2$ ajustado	0.9841362
Error típico $S_{y/x}$	4.79819827
Observaciones	5

**Tabla 25.** Análisis de varianza para la regresión lineal.

Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	5736.025	5736.025	249.146422	0.00055278
Residuos	3	69.06812	23.0227067		
Total	4	5805.09312			

**Tabla 26.** Intervalos de confianza para la pendiente y ordenada en la linealidad del sistema HCT.

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-134.166	15.3242164	-8.75	0.00313797	-182.93	-85.39
pendiente	2.395	0.15173235	15.78	0.00055278	1.91	2.87



**Fig. 30.** Gráfica de Probabilidad normal para la linealidad de HCT.

- Exactitud CAP – HCT

**Tabla 27.** Exactitud y repetibilidad para el caso de CAP

Placebo analítico adicionado	Área pA	Cantidad adicionada μg	Cantidad recuperada μg	% Recobro (y)
1	999.7	600	578.33	96.39
2	938.8	600	543.10	90.52
3	989.7	600	572.54	95.42
4	974.7	600	563.86	93.98
5	979.7	600	566.76	94.46
6	966.4	600	559.06	93.18
Promedio	974.8			93.99
Desviación Estándar	21.13			2.04
Coefficiente de Variación	2.17			2.17

y - es el cociente porcentual de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada  
 $\text{Área}_{\text{referencia}} = 1036.7$

$$t_{0,975,5} = 2.571 \quad n = 6$$

$$IC(\mu) = 93.99 \pm \left( 2.571 \left( \frac{2.04}{\sqrt{6}} \right) \right) = 91.85, 96.13$$

**Tabla 28.** Exactitud y repetibilidad para el caso de HCT

Placebo analítico adicionado	Área pA	Cantidad adicionada μg	Cantidad recuperada μg	% Recobro (y)
1	181	300	277.96	92.65
2	165.5	300	254.16	84.72
3	144.1	300	221.30	73.77
4	179.0	300	274.89	91.63
5	148.6	300	228.21	76.07
6	167.9	300	257.85	85.95
Promedio	168.4			84.13
Desviación Estándar	12.96			7.81
Coeficiente de Variación	7.69			9.28

y - es el cociente porcentual de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada  
 $\text{Área}_{\text{referencia}} = 195.2$

$$t_{0.975,5} = 2.571 \quad n = 6$$

$$IC(\mu) = 84.13 \pm \left( 2.571 \left( \frac{7.81}{\sqrt{6}} \right) \right) = 75.93, 92.33$$

- Precisión del método (precisión intermedia) CAP - HCT

**Tabla 29.** Precisión método CAP - HCT

Día	Propiedad medida (Área) de la solución de referencia	Captopril 600 μg/mL	Hidroclorotiazida 300 μg/mL
1	1	1097.3	105.2
	2	1004	114.8
	3	1093.7	100
2	1	988.5	94.4
	2	974.1	133.7
	3	992.2	114.5
	Promedio	1024.97	110.43
	Desviación Estándar	55.47	13.93
	Coeficiente de Variación	5.41	12.61

$$n = 6$$

**Tabla 30.** Resumen del análisis de varianza para la precisión de CAP en el método.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Día 1	3	3195	1065	2793.99
Día 2	3	2954.8	984.933333	91.4433333

**Tabla 31.** Análisis de varianza para la precisión de CAP en el método.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre días	9616.00667	1	9616.00667	6.665208	0.06121707	7.70864742
Dentro de los días	5770.86667	4	1442.71667			
Total	15386.8733	5				

**Tabla 32.** Resumen del análisis de varianza para la precisión de HCT en el método.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Día 1	3	320	106.666667	56.3733333
Día 2	3	342.6	114.2	386.19

**Tabla 33.** Análisis de varianza para la precisión de HCT en el método.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre días	85.1266667	1	85.1266667	0.38469824	0.56868863	7.70864742
Dentro de los días	885.126667	4	221.281667			
Total	970.253333	5				



- Linealidad del método CAP – HCT

**Tabla 34.** Linealidad del método para CAP

Solución	Conc. %	Área (pA)	Promedio
1	90	756.0	741.00
2	90	686.6	
3	90	780.4	
4	100	785.5	820.40
5	100	861.9	
6	100	813.8	
7	110	857.3	920.47
8	110	980.7	
9	110	923.4	
		Pendiente	$b_1$ 8.97
		Ordenada	$b_0$ -70.04
		Coef. determinación	$r^2$ 0.9956
		Coef. correlación	$r$ 0.9978

$$t_{0.975,7} = 2.365 \quad n = 9$$

**Tabla 35.** Estadísticas de la regresión para la linealidad de CAP.

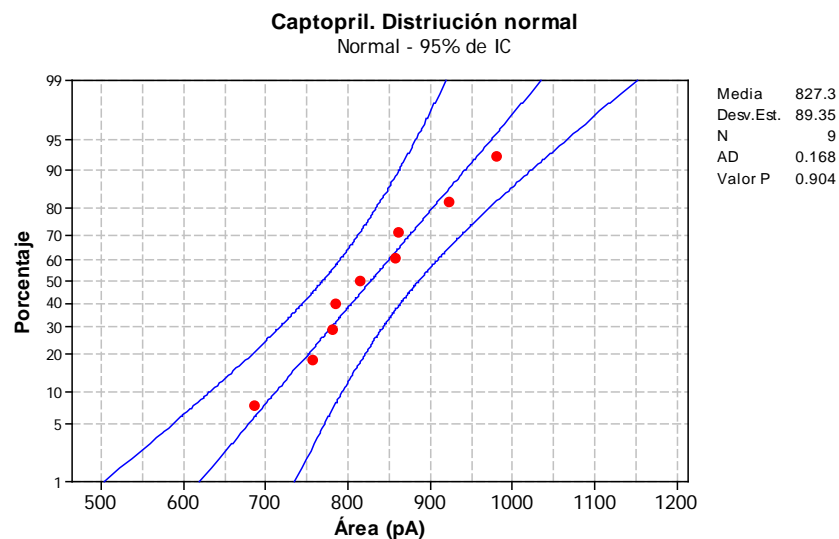
Coeficiente de correlación múltiple	0.99779652
Coeficiente de determinación $r^2$	0.9955979
$r^2$ ajustado	0.9911958
Error típico $S_{y/x}$	8.43849216
Observaciones	3

**Tabla 36.** Análisis de varianza para la regresión lineal para CAP del método.

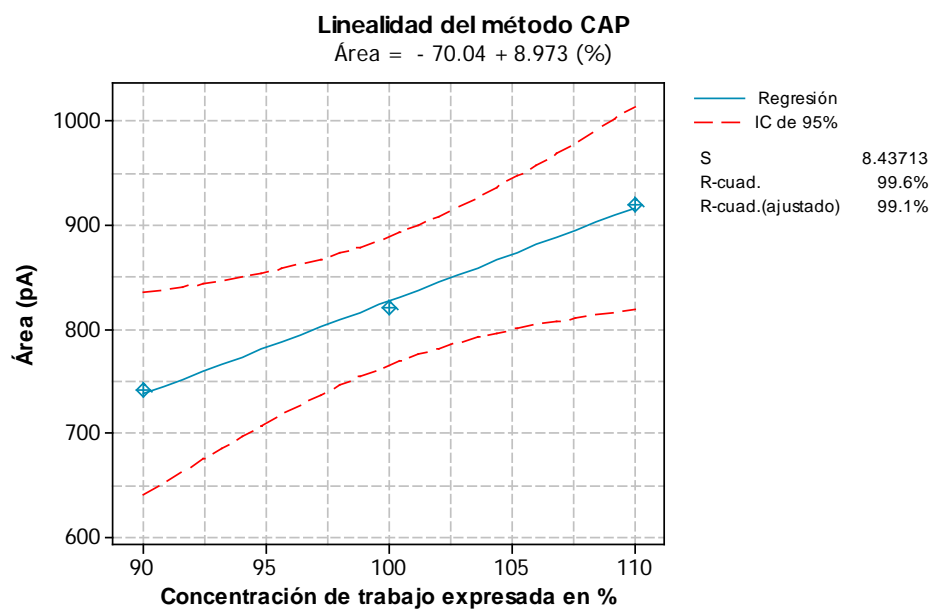
Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	16104.7405	16104.7405	226.164287	0.04226971
Residuos	1	71.20815	71.20815		
Total	2	16175.9486			

**Tabla 37.** Intervalos de confianza para la pendiente y ordenada en la linealidad del método CAP.

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-70.06	59.8677	-1.1702	0.45016192	-830.75	690.63
pendiente	8.9735	0.5966	15.0387	0.04226971	1.39	16.55



**Fig. 31.** Gráfica de Probabilidad normal para la linealidad de CAP en el método.



**Fig. 32.** Curva de calibración para la linealidad de CAP en el método.

**Tabla 38.** Linealidad del método para el recobro de CAP

Sol.	Conc. %	Área (pA)	Promedio	Cantidad adicionada $\mu\text{g/mL}$	Cantidad recuperada $\mu\text{g/mL}$	% Recobro (y)	
1	90	756.0	741.00	540	587.06	108.71	
2	90	686.6					
3	90	780.4					
4	100	785.5	820.40	600	604.35	100.72	
5	100	861.9					
6	100	813.8					
7	110	857.3	920.47	660	638.74	96.78	
8	110	980.7					
9	110	923.4					
		Promedio	610.05			Promedio	102.07
		Sy/x	6.98			DER	6.08
		CV	1.15			CV	<b>5.96</b>

y - es el cociente porcentual de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada  
 $\text{Área}_{\text{referencia } 90\%} = 681.6$ ;  $\text{Área}_{\text{referencia } 100\%} = 814.5$ ;  $\text{Área}_{\text{referencia } 110\%} = 951.1$

**Tabla 39.** Estadísticas de la regresión lineal del recobro de CAP.

Coefficiente de correlación múltiple	0.98221924
Coefficiente de determinación $r^2$	0.96475464
$r^2$ ajustado	0.92950928
Error típico $S_{y/x}$	6.98509497
Observaciones	3

**Tabla 40.** Análisis de varianza para la regresión lineal del recobro de CAP en el método.

Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	1335.54813	1335.54813	27.3725283	0.12023084
Residuos	1	48.7915517	48.7915517		
Total	2	1384.33968			

**Tabla 41.** Intervalos de confianza para la pendiente y ordenada en la linealidad del recobro CAP.

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	351.636283	49.5564	7.0956	0.08913244	-278.04	981.31
pendiente	0.43068875	0.0823	5.2318	0.12023084	-0.61	1.47

**Tabla 42.** Linealidad del método HCT

Solución	Conc. %	Área (pA)	Promedio
1	90	136.2	158.27
2	90	161.6	
3	90	177	
4	100	169.1	172.63
5	100	169.3	
6	100	179.5	
7	110	176.7	203.73
8	110	211.5	
9	110	223.0	
		Pendiente $b_1$	2.27
		Ordenada $b_0$	-49.12
		Coef. determinación $r^2$	0.9568
		Coef. correlación $r$	0.9782

**Tabla 43.** Estadísticas de la regresión para la linealidad de HCT en el método.

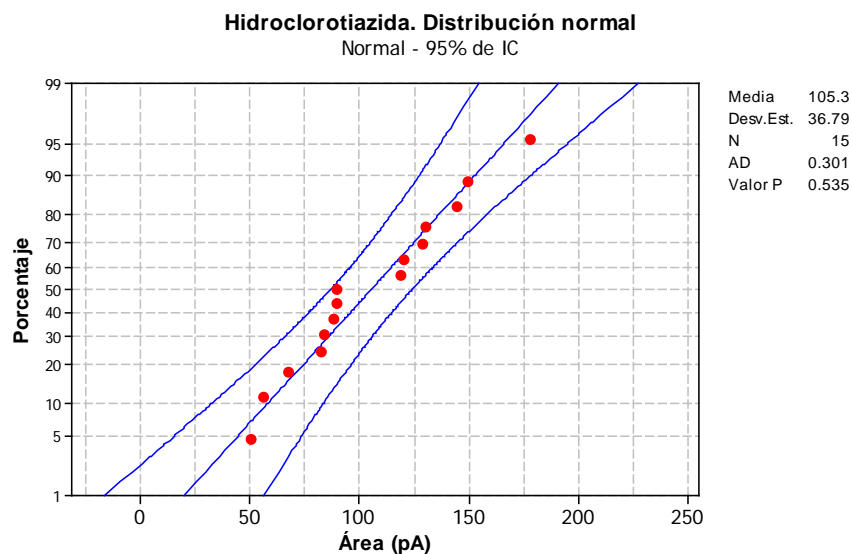
Coeficiente de correlación múltiple	0.97813875
Coeficiente de determinación $r^2$	0.95675542
$r^2$ ajustado	0.91351083
Error típico $S_{y/x}$	6.83407638
Observaciones	3

**Tabla 44.** Análisis de varianza para la regresión lineal para HCT del método.

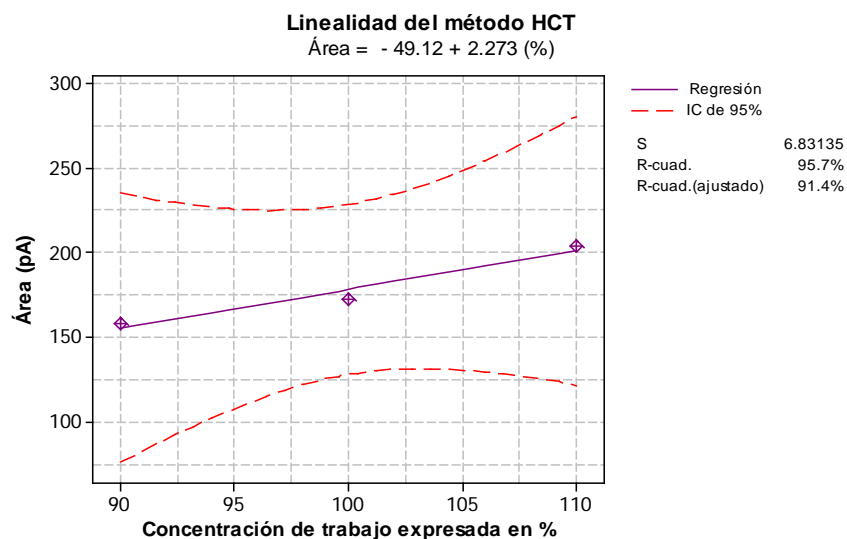
Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	1033.3058	1033.3058	22.1242833	0.13336043
Residuos	1	46.7046	46.7046		
Total	2	1080.0104			

**Tabla 45.** Intervalos de confianza para la pendiente y ordenada en la linealidad del método HCT.

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-26.36	43.6704076	-0.6036	0.65426998	-581.24	528.52
pendiente	2.273	0.48324218	4.7036	0.13336043	-3.86	8.41



**Fig. 33.** Gráfica de Probabilidad normal para la linealidad de HCT en el método.



**Fig. 34.** Curva de calibración para la linealidad del método de HCT.

**Tabla 46.** Linealidad del método para el recobro de HCT.

Sol.	Conc. %	Área (pA)	Promedio	Cantidad adicionada $\mu\text{g/mL}$	Cantidad recuperada $\mu\text{g/mL}$	% Recobro (y)
1	90	136.2	158.27	270	267.08	98.92
2	90	161.6				
3	90	177				
4	100	169.1	172.63	300	278.77	103.25
5	100	169.3				
6	100	179.5				
7	110	176.7	203.73	330	284.28	105.29
8	110	211.5				
9	110	223.0				
Promedio			276.71	Promedio		102.48
Sy/x			2.53	DER		3.25
CV			0.91	CV		3.18

y - es el cociente porcentual de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada  
 $\text{Área}_{\text{referencia } 90\%} = 160$ ;  $\text{Área}_{\text{referencia } 100\%} = 167.2$ ;  $\text{Área}_{\text{referencia } 110\%} = 193.5$

**Tabla 47.** Estadísticas de la regresión lineal del recobro de HCT.

Coefficiente de correlación múltiple	0.97907352
Coefficiente de determinación $r^2$	0.95858496
$r^2$ ajustado	0.91716991
Error típico $S_{y/x}$	2.52859892
Observaciones	3

**Tabla 48.** Análisis de varianza para la regresión lineal del recobro de HCT en el método.

Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	147.990008	147.990008	23.1458161	0.13046785
Residuos	1	6.39381251	6.39381251		
Total	2	154.383821			

**Tabla 49.** Intervalos de confianza para la pendiente y ordenada en la linealidad del recobro HCT.

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	190.688982	17.9393951	10.6292	0.05971535	-37.252	418.6306
pendiente	0.2867345	0.05959965	4.8110	0.13046785	-0.470	1.0440

# Metoprolol – Hidroclorotiazida (MET – HCT)

- Precisión del sistema MET - HCT

**Tabla 50.** Precisión del sistema MET – HCT

Propiedad medida (Área) de la solución de referencia	Metoprolol 1140 µg/mL Área (pA)	Hidroclorotiazida 150 µg/mL Área (pA)
1	638.9	102.2
2	626.9	99.1
3	668.3	95.6
4	684.3	87
5	703.2	99.4
6	715.5	86.8
Promedio	672.85	95.02
Desviación Estándar	35.09	6.63
Coeficiente de Variación	5.21	6.97

$n = 6$

- Linealidad del sistema MET - HCT

**Tabla 51.** Linealidad del sistema MET

Solución	Conc. % <sup>a</sup>	Área (pA)	Promedio
1	80	377.3	375.40
2	80	418.1	
3	80	330.8	
4	90	471.4	522.07
5	90	542.0	
6	90	552.8	
7	100	591.6	608.70
8	100	625.0	
9	100	609.5	
10	110	700.1	743.67
11	110	797.0	
12	110	733.9	
13	120	814.2	840.03
14	120	869.1	
15	120	836.8	
Pendiente		$b_1$	11.51
Ordenada		$b_0$	-532.89
Coef. determinación		$r^2$	0.9941
Coef. correlación		$r$	0.9970

<sup>a</sup> – Representa el % de concentración con respecto al 100% de la concentración de trabajo; Metoprolol 1140 µg/mL

**Tabla 52.** Estadísticas de la regresión para la linealidad de MET.

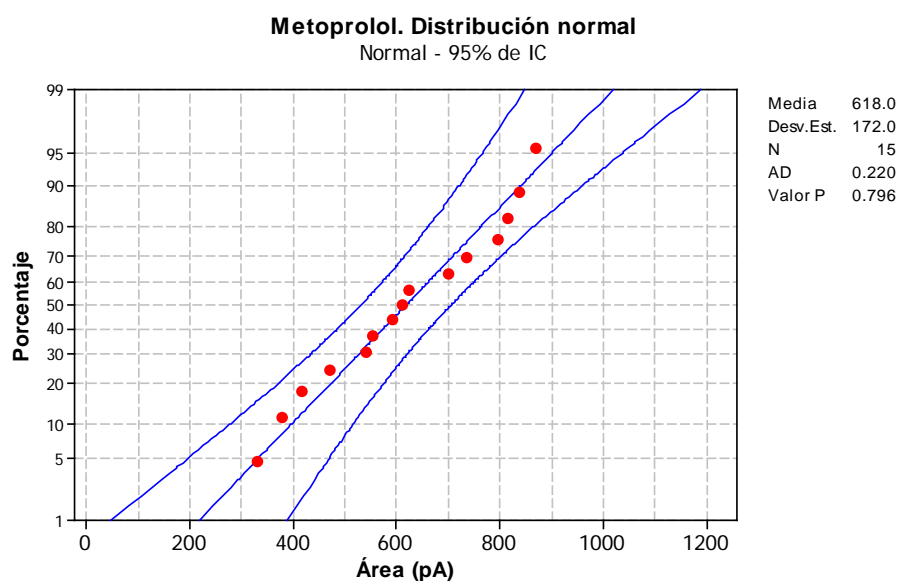
Coefficiente de correlación múltiple	0.99704516
Coefficiente de determinación $r^2$	0.99409905
$r^2$ ajustado	0.99213207
Error típico $S_{y/x}$	16.188549
Observaciones	5

**Tabla 53.** Análisis de varianza para la regresión lineal.

Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	132447.874	132447.874	505.392905	0.00019273
Residuos	3	786.20736	262.06912		
Total	4	133234.081			

**Tabla 54.** Intervalos de confianza para la pendiente y ordenada en la linealidad del sistema MET.

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-532.886	51.7020795	-10.3068	0.0019479	-697.43	-368.35
pendiente	11.5086	0.51192687	22.4809	0.00019273	9.88	13.14



**Fig. 35.** Gráfica de Probabilidad normal para la linealidad de MET.



**Tabla 55.** Linealidad del sistema HCT

Solución	Conc. % <sup>b</sup>	Área (pA)	Promedio
1	80	69.3	63.90
2	80	54	
3	80	68.4	
4	90	78.4	76.40
5	90	63.4	
6	90	87.4	
7	100	82.4	86.76
8	100	81.5	
9	100	96.4	
10	110	86.5	94.00
11	110	91.3	
12	110	104.2	
13	120	99.7	101.60
14	120	95.7	
15	120	109.4	
Pendiente		$b_1$	0.93
Ordenada		$b_0$	-8.47
Coef. determinación		$r^2$	0.9853
Coef. correlación		$r$	0.9926

<sup>b</sup> – Donde representa el % de concentración con respecto al 100% de la concentración de trabajo; Hidroclorotiazida 150 µg/mL.

**Tabla 56.** Estadísticas de la regresión para la linealidad de HCT.

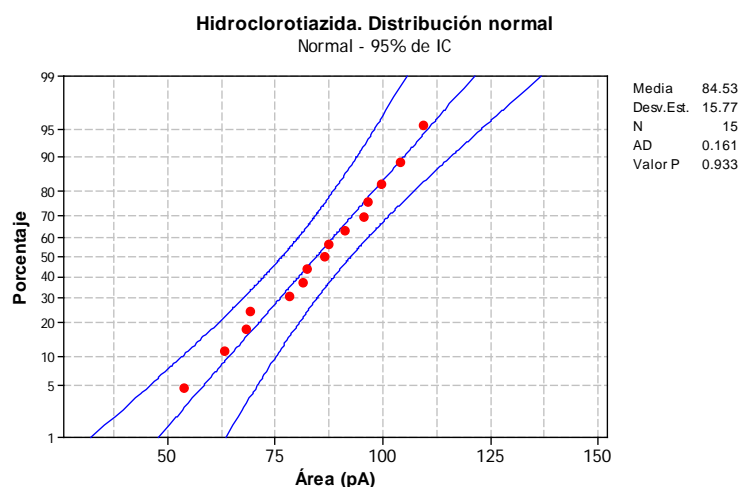
Coeficiente de correlación múltiple	0.99266307
Coeficiente de determinación $r^2$	0.98537996
$r^2$ ajustado	0.98050662
Error típico $S_{y/x}$	2.06821018
Observaciones	5

**Tabla 57.** Análisis de varianza para la regresión lineal.

Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	864.9	864.9	202.19786	0.00075358
Residuos	3	12.83248	4.27749333		
Total	4	877.73248			

**Tabla 58.** Intervalos de confianza para la pendiente y ordenada en la linealidad del sistema MET.

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-8.468	6.6053336	-1.2819943	0.28993758	-29.489	12.5531
pendiente	0.93	0.06540255	14.2196294	0.00075358	0.721	1.1381



**Fig. 36.** Gráfica de Probabilidad normal para la linealidad de HCT.

- Exactitud MET – HCT

**Tabla 59.** Exactitud y repetibilidad para el caso de MET

Placebo analítico adicionado	Área pA	Cantidad adicionada μg	Cantidad recuperada μg	% Recobro (y)
1	960.5	1140	1121.73	98.40
2	923.2	1140	1078.17	94.58
3	918.2	1140	1072.33	94.06
4	876.4	1140	1023.51	89.78
5	802.2	1140	936.86	82.18
6	893.1	1140	1043.01	91.49
Promedio	1018.23			91.75
Desviación Estándar	132.54			5.53
Coefficiente de Variación	13.02			6.03

y - es el cociente porcentual de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada  
 $\text{Área}_{\text{referencia}} = 975.8$

$$t_{0.975,5} = 2.571 \quad n = 6$$

$$IC(\mu) = 91.75 \pm \left( 2.571 \left( \frac{5.53}{\sqrt{6}} \right) \right) = 85.94, 97.55$$

**Tabla 60.** Exactitud y repetibilidad para el caso de HCT

Placebo analítico adicionado	Área pA	Cantidad adicionada μg	Cantidad recuperada μg	% Recobro (y)
1	133.3	150	151.99	101.32
2	114.8	150	130.89	87.26
3	118.6	150	135.23	90.15
4	127.0	150	144.80	96.54
5	118.2	150	134.77	89.85
6	121.8	150	138.88	92.58
Promedio	123.09			92.95
Desviación Estándar	28.42			5.16
Coeficiente de Variación	23.09			5.55

y - es el cociente porcentual de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada  
 $\text{Área}_{\text{referencia}} = 131.5$

$$t_{0.975,5} = 2.571 \quad n = 6$$

$$IC(\mu) = 92.95 \pm \left( 2.571 \left( \frac{5.16}{\sqrt{6}} \right) \right) = 87.53, 98.36$$

- Precisión del método (precisión intermedia) MET - HCT

**Tabla 61.** Precisión método MET – HCT

Día	Propiedad medida (Área) de la solución de referencia	Metoprolol 1140 μg/mL	Hidroclorotiazida 150 μg/mL
1	1	839.4	78.6
	2	803.5	83.6
	3	859.4	88.5
2	1	836.1	75.1
	2	754.5	86.5
	3	997.8	85.6
Promedio		848.45	82.98
Desviación Estándar		81.86	5.13
Coeficiente de Variación		9.65	6.18

$$n = 6$$

**Tabla 62.** Resumen del análisis de varianza para la precisión de MET en el método.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Día 1	3	2502.3	834.1	802.27
Día 2	3	2588.4	862.8	15333.39

**Tabla 63.** Análisis de varianza para la precisión de MET en el método.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre días	1235.535	1	1235.535	0.15314341	0.71550096	7.70864742
Dentro de los días	32271.32	4	8067.83			
Total	33506.855	5				

**Tabla 64.** Resumen del análisis de varianza para la precisión de HCT en el método.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Día 1	3	250.7	83.5666667	24.5033333
Día 2	3	247.2	82.4	40.17

**Tabla 65.** Análisis de varianza para la precisión de HCT en el método.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre días	2.04166667	1	2.04166667	0.06313782	0.81398417	7.70864742
Dentro de los días	129.346667	4	32.3366667			
Total	131.388333	5				

- Linealidad del método MET – HCT

**Tabla 66.** Linealidad de MET en el método.

Solución	Conc. %	Área (pA)	Promedio
1	90	700.2	717.0
2	90	733.8	
3	90	777.9	
4	100	899.9	932.1
5	100	922.3	
6	100	974.1	
7	110	1149.1	1089.1
8	110	1043.5	
9	110	1074.7	
Pendiente		$b_1$	18.61
Ordenada		$b_0$	-947.77
Coef. determinación		$r^2$	0.9919
Coef. correlación		$r$	0.9960

$$t_{0.975,7} = 2.365 \quad n = 9$$

**Tabla 67.** Estadísticas de la regresión para la linealidad de MET.

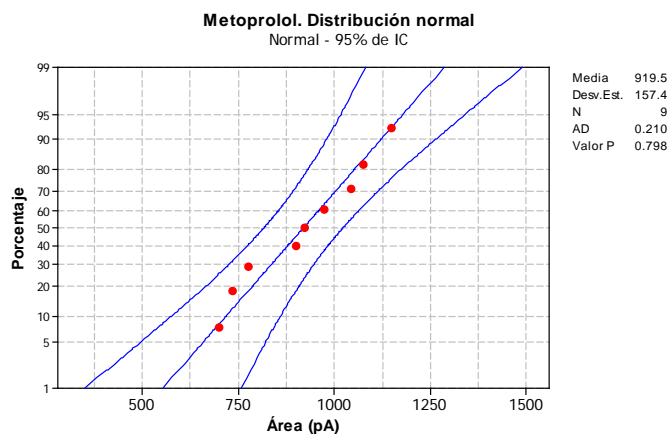
Coeficiente de correlación múltiple	0.99596127
Coeficiente de determinación $r^2$	0.99193886
$r^2$ ajustado	0.98387772
Error típico $S_{y/x}$	23.7192257
Observaciones	3

**Tabla 68.** Análisis de varianza para la regresión lineal para CAP del método.

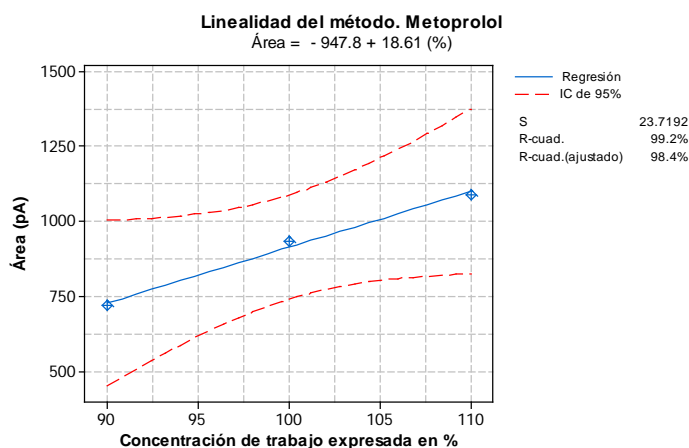
Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	69229.205	69229.205	123.051902	0.05723526
Residuos	1	562.601667	562.601667		
Total	2	69791.8067			

**Tabla 69.** Intervalos de confianza para la pendiente y ordenada en la linealidad del método MET.

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-947.766667	168.278392	-5.6321	0.11186765	-3085.9	1190.41304
pendiente	18.605	1.67720253	11.0928	0.05723526	-2.705	39.9158788



**Fig. 37.** Gráfica de Probabilidad normal para la linealidad de MET en el método.



**Fig 38.** Curva de calibración para la linealidad de MET en el método.

**Tabla 70.** Linealidad del método para el recobro de MET.

Sol.	Conc. %	Área (pA)	Promedio	Cantidad adicionada $\mu\text{g/mL}$	Cantidad recuperada $\mu\text{g/mL}$	% Recobro (y)	
1	90	700.2	737.3	1026	1005.41	97,99	
2	90	733.8					
3	90	777.9					
4	100	899.9	932.1	1140	1305.08	114.48	
5	100	922.3					
6	100	974.1					
7	110	1149.1	1089.1	1254	1547.92	123.44	
8	110	1043.5					
9	110	1074.7					
		Promedio	1286.14			Promedio	111.97
		Sy/x	23.20			DER	12.91
		CV	1.80			CV	11.53

y - es el cociente porcentual de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada  
 $\text{Área}_{\text{referencia } 90\%}=752.4$  ;  $\text{Área}_{\text{referencia } 100\%}=814.2$  ;  $\text{Área}_{\text{referencia } 110\%}=882.3$

**Tabla 71.** Estadísticas de la regresión lineal del recobro de MET.

Coeficiente de correlación múltiple	0.99817652
Coeficiente de determinación $r^2$	0.99635636
$r^2$ ajustado	0.99271272
Error típico $S_{y/x}$	23.1982465
Observaciones	3

**Tabla 72.** Análisis de varianza para la regresión lineal del recobro de MET en el método.

Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	147160.017	147160.017	273.450997	0.03845137
Residuos	1	538.158642	538.158642		
Total	2	147698.176			

**Tabla 73.** Intervalos de confianza para la pendiente y ordenada en la linealidad del recobro MET.

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-1426.42743	164.582254	-8.6669577	0.07313028	-3517.64	664.78838
pendiente	2.37944169	0.14389156	16.536353	0.03845137	0.551126	4.20775726

**Tabla 74.** Linealidad del método HCT

Solución	Conc. %	Área (pA)	Promedio
1	90	90.4	89.47
2	90	80.5	
3	90	97.5	
4	100	110.0	116.87
5	100	116.8	
6	100	123.8	
7	110	129.6	159.93
8	110	174.8	
9	110	175.4	
Pendiente		$b_1$	3.52
Ordenada		$b_0$	-230.24
Coef. determinación		$r^2$	0.9838
Coef. correlación		$r$	0.9919

**Tabla 75.** Estadísticas de la regresión para la linealidad de HCT.

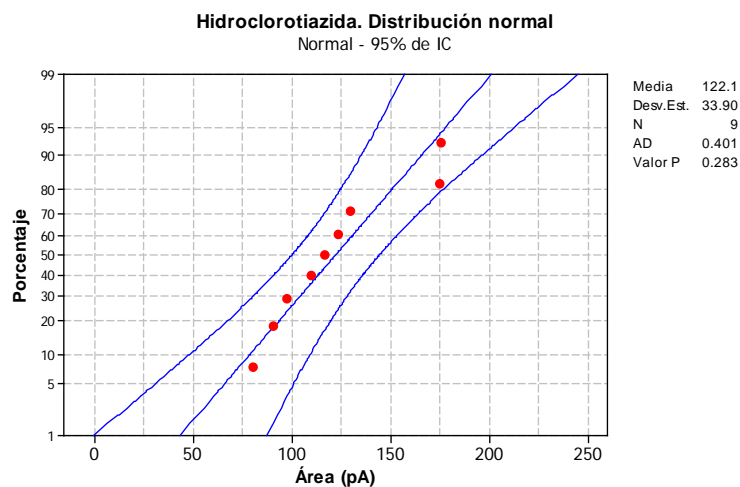
Coefficiente de correlación múltiple	0.9918675
Coefficiente de determinación $r^2$	0.98380115
$r^2$ ajustado	0.96760229
Error típico $S_{y/x}$	6.39316823
Observaciones	3

**Tabla 76.** Análisis de varianza para la regresión lineal para CAP del método.

Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	2482.3058	2482.3058	60.7327598	0.08124597
Residuos	1	40.8726	40.8726		
Total	2	2523.1784			

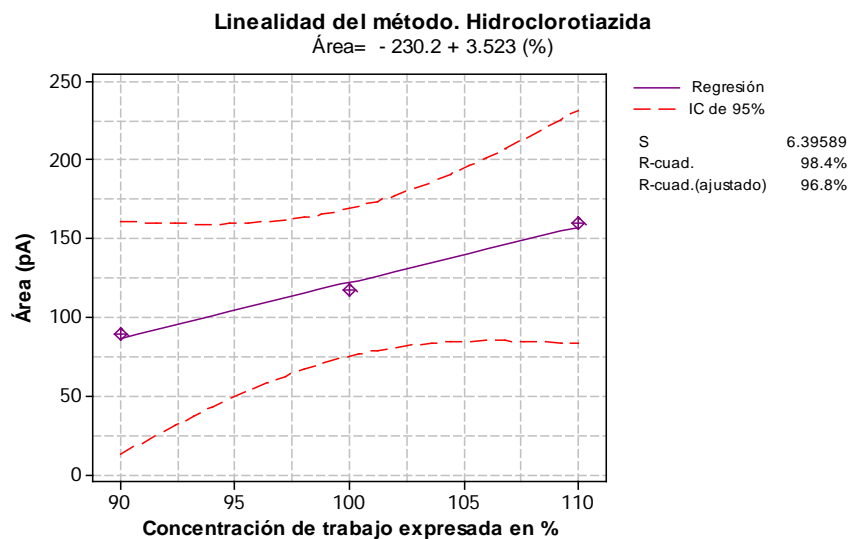
**Tabla 77.** Intervalos de confianza para la pendiente y ordenada en la linealidad del método HCT.

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-194.98	40.8529619	-4.772726	0.13148498	-714.06	324.1060
pendiente	3.523	0.45206526	7.79312	0.08124597	-2.2210	9.267033



**Fig. 39.** Gráfica de Probabilidad normal para la linealidad de HCT en el método.





**Fig. 40.** Curva de calibración para la linealidad de HCT en el método.

**Tabla 78.** Linealidad del método para el recobro de HCT.

Sol.	Conc. %	Área (pA)	Promedio	Cantidad adicionada $\mu\text{g/mL}$	Cantidad recuperada $\mu\text{g/mL}$	% Recobro (y)
1	90	90.4	89.47	135	130.01	96.30
2	90	80.5				
3	90	97.5				
4	100	110.0	116.87	150	157.79	105.19
5	100	116.8				
6	100	123.8				
7	110	129.6	159.93	165	194.04	117.60
8	110	174.8				
9	110	175.4				
Promedio			160.61	Promedio		106.36
Sy/x			3.46	DER		10.70
CV			2.15	CV		10.06

y - es el cociente porcentual de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada  
 $\text{Área}_{\text{referencia } 90\%} = 92.9$  ;  $\text{Área}_{\text{referencia } 100\%} = 111.1$  ;  $\text{Área}_{\text{referencia } 110\%} = 136$

**Tabla 79.** Estadísticas de la regresión lineal del recobro de HCT.

Coeficiente de correlación múltiple	0.99709185
Coeficiente de determinación $r^2$	0.99419215
$r^2$ ajustado	0.9883843
Error típico $S_{y/x}$	3.460301
Observaciones	3

**Tabla 80.** Análisis de varianza para la regresión lineal del recobro de HCT en el método.

Factor	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	2049.66437	2049.66437	171.180777	0.0485634
Residuos	1	11.973683	11.973683		
Total	2	2061.63805			

**Tabla 81.** Intervalos de confianza para la pendiente y ordenada en la linealidad del recobro HCT.

	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-159.5189	24.5494476	-6.497861	0.09721108	-471.449	152.4114
pendiente	2.13420001	0.16312015	13.0836072	0.0485634	0.061561	4.206838