

Revista Bistua
ISSN 01204211
Universidad de Pamplona
Colombia

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA PARA LA CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA
DE VALSARTAN, HIDROCLOROTIAZIDA Y EL COMPUESTO
RELACIONADO A DE BENZOTIADIAZINA EN TABLETAS RECUBIERTAS**

Claudia Marcela Gutiérrez Gómez, Guillermo Garzón García*

* Universidad Santiago de Cali, Centro de Investigaciones en Ciencias Básicas,
Ambientales y Desarrollo Tecnológico, CICBA, Programa de Química, Cali,
Colombia.

e-mail: ggarzon@usc.edu.co

RESUMEN

Este trabajo muestra los resultados obtenidos durante el desarrollo y validación de una metodología analítica para la cuantificación simultánea de Valsartán, Hidroclorotiazida y el Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina en tabletas recubiertas, por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en fase normal a 265 nm con detección espectrofotométrica (detector de arreglo de diodos), y cuya aplicación está en el control de calidad de este producto.

Se realizaron varios cambios en la fase móvil y la columna, teniendo en cuenta las condiciones propuestas por el foro de la farmacopea USP 28 con las cuales se culminó satisfactoriamente la validación del producto, ya que no es un producto que se encuentre en alguna de las farmacopeas oficiales.

La validación se realizó dentro de la categoría I y se evaluaron los parámetros de especificidad, linealidad, precisión, precisión intermedia, exactitud, estabilidad y límite de detección y cuantificación. De acuerdo con los resultados obtenidos se concluye que la metodología cumple con todos los parámetros evaluados.

PALABRAS CLAVES

Valsartán – Hidroclorotiazida – Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina
– Farmacopea USP –Cromatografía líquida – Desarrollo – Validación.

ABSTRACT

This work shows the results of the validation of an analytic methodology for the simultaneous quantification of Valsartan, Hidroclorotiazida and Compound Related to of Benzotiadiazina in pills recovered by high performance liquid chromatography (HPLC) in normal phase to 265 nm with spectrophotometric detector (detecting of arrangement of diodes), and whose application is in the quality control of this product.

Initially the utilized parameters for the validation presented some inconveniences during the linearity tests, since it is not a product that is in some of the official pharmacopoeias; he/she decided then to carry out some changes in the mobile phase and the column, keeping in mind the conditions proposed by the forum of the Pharmacopeia USP 28 with which it culminated the validation of the product satisfactorily.

The validation was carried out according to category I and the parameters of specificity, linearity, precision, intermediate precision, accuracy, stability and detection and quantification limit were evaluated. According with the obtained results it is concluded that the methodology fulfills all the evaluated parameters.

KEY WORDS

Valsartán - Hidroclorotiazida - Compound Related **A** of Benzotiadiazina – High Performance Liquid Chromatography – Pharmacopeia –Development – Validation.

INTRODUCCIÓN

Dada la naturaleza multifactorial de la enfermedad cardiovascular hipertensiva, su tratamiento eficaz se ha basado en la combinación de fármacos con diferentes mecanismos de acción (1). Los diuréticos, en particular, aumentan la respuesta antihipertensiva a los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) al hacer que la presión arterial se torne dependiente de renina (2). Recientemente se ha encontrado que la administración oral concomitante de Valsartán e Hidroclorotiazida puede ser utilizada como terapia de segunda línea en aquellos pacientes que no responden adecuadamente a la monoterapia (3).

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se ha utilizado para la determinación de Valsartán en fluidos biológicos, al igual que para la determinación simultánea de Valsartán e Hidroclorotiazida en formas farmacéuticas de dosificación oral(4,5). En la farmacopea de los EEUU (USP) sólo es oficial la monografía para tabletas de Hidroclorotiazida, cuyo ensayo se basa en una metodología HPLC (6,7).

Con el presente trabajo se pretende desarrollar, estandarizar y validar un método analítico por Cromatografía Líquida da Alta Eficiencia para la cuantificación simultánea de Valsartán, Hidroclorotiazida y el compuesto relacionado A de Benzotiadiazina (un potencial compuesto de degradación de la hidroclorotiazida) en una forma farmacéutica sólida (tabletas), buscando con

ello soportar los estudios de estabilidad y de control de calidad del producto en mención (8).

Las normas internacionales de aseguramiento de la calidad de estos fármacos establecen que los métodos utilizados en los estudios de estabilidad deben ser validados, demostrándose las propiedades indicativas de estabilidad (9). En este sentido, la legislación colombiana también adopta esta posición y la hace mandataria en la Resolución Número 002514 del Ministerio de Salud (10), donde se disponen de medidas para la presentación de los estudios de estabilidad por parte de las empresas que deseen fabricar y/o comercializar un producto farmacéutico en Colombia.

Las estructuras químicas del compuesto relacionado A de Benzotiadiazina, Hidroclorotiazida y Valsartán se encuentran en las Figuras 1, 2 y 3 respectivamente.

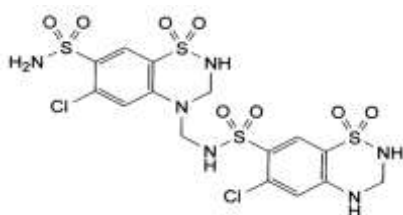


Figura 1. Estructura química del Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina

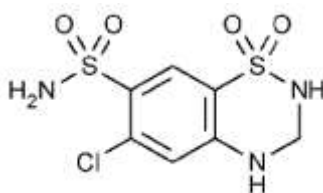


Figura 2. Estructura química de la Hidroclorotiazida

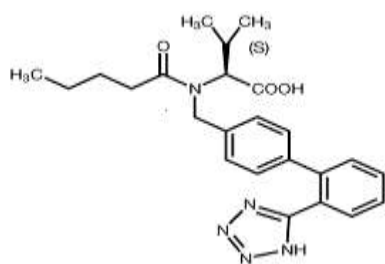


Figura 3. Estructura química del Valsartán

METODOLOGÍA

Materiales y reactivos

Estándares primarios USP de Valsartán, Hidroclorotiazida y Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina, acetonitrilo HPLC Merck, ácido trifluoroacético Mallincrodt, agua HPLC.

Equipos e instrumentos

El sistema HPLC empleado fue un *Waters Alliance 2690* con detector de arreglo de diodos *Waters 996* y software *Millenium 32* (versión 3.2).

Optimización del método

Luego de ensayos preliminares, la separación se llevó a cabo utilizando una columna Luna C₁₈ (2) con unas dimensiones de 150 mm x 4.6 mm y un tamaño

de partícula de 5 µm. La fase móvil está compuesta de ácido trifluoroacético 0.2% y acetonitrilo **en régimen gradiente**, en las proporciones indicadas en la Tabla 1. El flujo se mantuvo constante a 0.5 mL/min; la detección se realizó a 265 nm.

Tabla 1. Gradiente de elución para la separación y cuantificación de valsartán, hidroclorotiazida y compuesto relacionado A de benzotiadiazina.

Tiempo (min.)	Ácido trifluoroacético 0.2% (%)	Acetonitrilo (%)
0 - 15	80 – 20	20 – 80
15 - 25	20 – 80	80 – 20
25	80	20

Descripción de las pruebas

Para la prueba de especificidad **los compuestos estudiados** se sometieron a condiciones de degradación forzadas (hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina, oxidación con peróxido y oxidación con luz ultravioleta); además, se analizó una muestra placebo. En la prueba de linealidad se prepararon muestras a concentraciones de 70%, 80%, 100%, 120% y 130% de la concentración analítica de trabajo de los analitos. Para la prueba de precisión (repetibilidad) del método, se analizaron seis muestras individuales preparadas a la concentración analítica de trabajo; en la prueba de precisión intermedia se procedió análogamente, pero en un día diferente al de la realización de la

prueba de precisión del método, en otro equipo diferente al utilizado en la prueba de precisión y/o realizando la prueba otro analista. Para la evaluación de la exactitud, se utilizaron los datos obtenidos en la prueba de linealidad del método en cada uno de los niveles de concentración. En el ensayo de estabilidad de la muestra en solución diluyente, se analizó una de las muestras preparadas al 100% de la concentración analítica de trabajo en la prueba, a intervalos de tiempo comprendidos entre una y dieciséis horas. El límite de detección y cuantificación para el compuesto relacionado A Benzotiadiazina se calculó a partir de los resultados de la curva de linealidad del método.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para este análisis se tomó el valor promedio de 64 inyecciones de diferentes concentraciones y realizadas en diferentes días; se asumió como $t_0 = 1,0$ min., tiempo en el cual aparece una muy pequeña señal no registrada en los cromatogramas debido a una impureza del agua con que se trabajó y que no es retenida por la columna; adicionalmente se tomaron como tiempos de retención de los activos y el compuesto relacionado A los siguientes datos: Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina 6,05 min., Hidroclorotiazida 7,17 min. y Valsartán 15,21 min. En la Tabla 2 se presentan los resultados para la idoneidad del sistema cromatográfico para cada analito.

Las concentraciones para las pruebas de linealidad de Benzotiadiazina, Hidroclorotiazida y Valsartán a diferentes niveles de concentración en mg /mL son las siguientes: 70%: 0,0021; 0,0218; 0,2800, 80%: 0,0024; 0,0250; 0,3200; 100%: 0,0030; 0,0313; 0,400; 120%: 0,0036; 0,0375; 0,4800; 130%: 0,0039; 0,0405; 0,5200.

Tabla 2. Resultados de la idoneidad

Compuesto	Etapas	N	T	K	Resolución
Compuesto Relacionado A de benzotiadiazina	Inicio	3484	1.274	5.442	N/A
	Final	3382	1.295	5.309	N/A
Hidroclorotiazida	Inicio	6047	1.312	6.152	1.49
	Final	5598	1.377	5.975	1.64
Valsartán	Inicio	57082	1.505	14.212	25.04
	Final	64237	1.589	13.885	25.01

Validación de la metodología analítica

Especificidad

Placebo: El cromatograma obtenido para el placebo no muestra ninguna señal en el tiempo de retención de la Benzotiadiazina Compuesto Relacionado A, Hidroclorotiazida y Valsartán, que afecte su cuantificación.

Hidrólisis Ácida: Los picos correspondientes a Hidroclorotiazida y Valsartán se observan espectralmente puros evidenciándose resolución entre la hidroclorotiazida y el compuesto relacionado A de benzotiadiazina.

Hidrólisis Alcalina: En el cromatograma no se detectan compuestos de degradación; la Hidroclorotiazida y el Valsartán se muestran espectralmente puros.

Oxidación con Peróxido de Hidrógeno: Los picos correspondientes a Hidroclorotiazida y Valsartán se observan espectralmente puros.

Oxidación con Luz Ultravioleta: No se observa evidencia de sustancias de degradación que interfieran con la cuantificación de los principios activos.

Linealidad

Prueba de Linealidad: Se observa el área bajo la curva linealmente proporcional a la concentración de los analitos en la muestra en un intervalo determinado entre 70% - 130%.

Coefficiente de Correlación: El valor observado experimentalmente del coeficiente de correlación (R) entre la cantidad de principio activo adicionado y la cantidad recuperada es de 0.9906 para el compuesto relacionado A de Benzotiadiazina; 0,9941 para la Hidroclorotiazida y 0,9947 para el Valsartán.

La Prueba de *Student* para el coeficiente de correlación rechaza la hipótesis nula de no correlación. El coeficiente de variación de los factores de respuesta para los datos es de 3.1% para el compuesto relacionado A de Benzotiadiazina, 2.7% para la Hidroclorotiazida y 2.6% para el Valsartán.

En las Figuras 4, 5 y 6 se muestran las gráficas de linealidad entre la concentración del analito (mg/mL) y la respuesta obtenida (área bajo la curva) para el compuesto relacionado A de Benzotiadiazina, Hidroclorotiazida y Valsartán respectivamente.

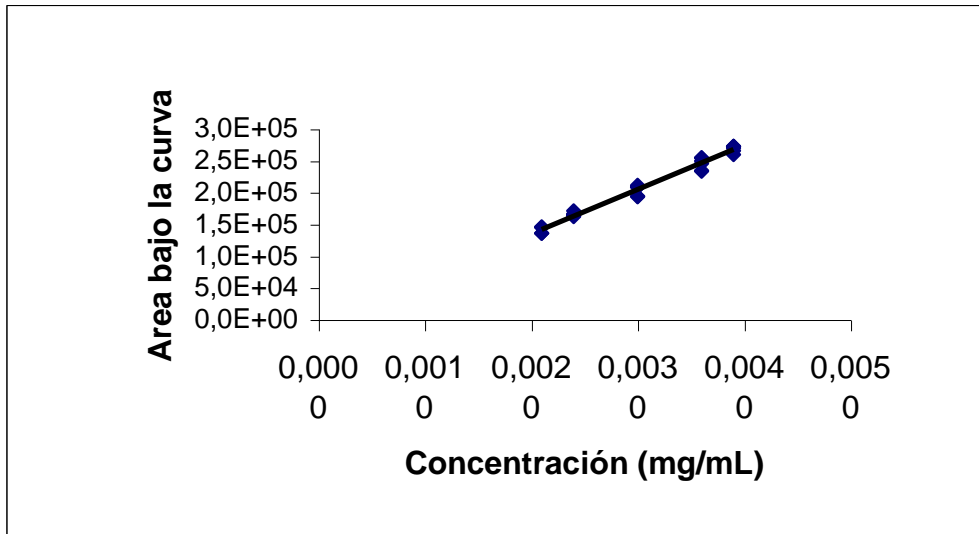


Figura 4. Gráfica de linealidad para Benzotiadiazina A

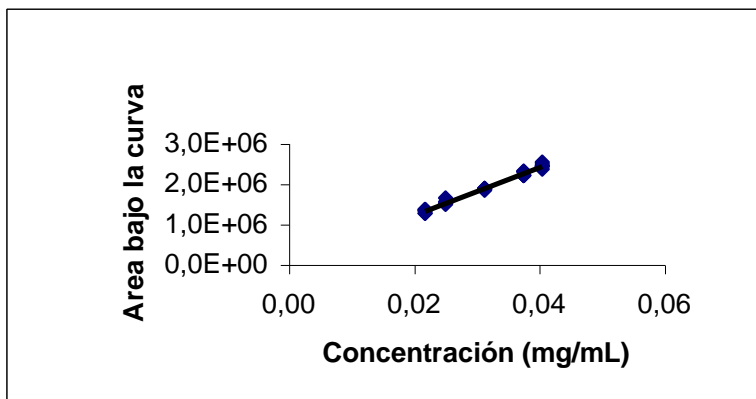


Figura 5. Gráfica de linealidad para Hidroclorotiazida

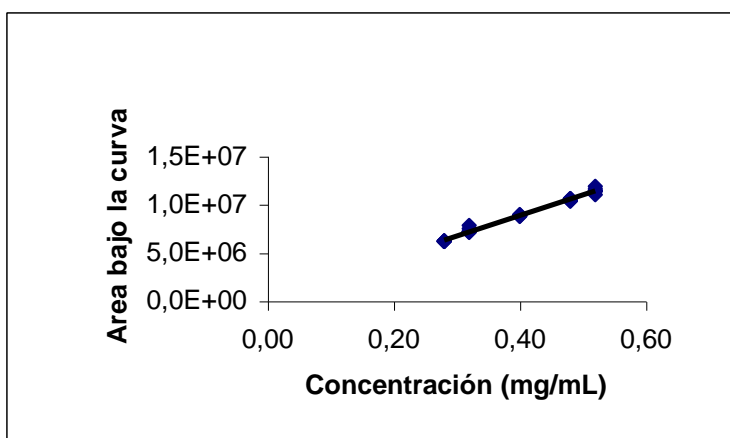


Figura 6. Gráfica de linealidad para Valsartán

Precisión del método

El coeficiente de variación para las respuestas obtenidas para el análisis de seis muestras individuales a la concentración analítica de trabajo, fue de 8.6% para el Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina, 1,2% para la Hidroclorotiazida y 1,4% para el Valsartán. Los resultados están expresados como porcentaje de recuperación, basándose en el análisis individual de seis muestras al 100%.

Precisión intermedia

El coeficiente de variación para las respuestas obtenidas entre los dos analistas fue de 11.4% para el Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina, 1,8% para la Hidroclorotiazida y 1,8% para el Valsartán. Los resultados se expresan como porcentaje de recuperación, basándose en el análisis individual de seis muestras al 100%.

Exactitud

El porcentaje de recuperación promedio obtenido fue de 101.3% para el Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina, 102,4% para la Hidroclorotiazida y 102,2% para el Valsartán; no existiendo diferencia significativa entre la recuperación media y el 100%; además el factor concentración no tiene influencia en la variabilidad de los resultados.

Estabilidad de la muestra en la solución diluyente

En el estudio realizado durante 16 horas sobre una muestra preparada a la concentración de trabajo, se encontró que las respuestas obtenidas para el Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina, Hidroclorotiazida y Valsartán no variaron significativamente (menor al 2%) frente a la respuesta obtenida inicialmente.

Límites de detección y cuantificación para el compuesto relacionado A de Benzotiadiazina

Los límites de detección y de cuantificación obtenidos a partir de la prueba de linealidad del compuesto relacionado A de benzotiadiazina fueron **0.08 y 0.21 ppm**, respectivamente. Estos límites están por debajo del límite máximo permitido de dicho compuesto en el producto, el cual se encuentra en máximo **1 ppm**.

Los resultados obtenidos en las diferentes pruebas desarrolladas para la validación del método, según los criterios establecidos de aceptación, se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados obtenidos para la validación del método analítico separación y cuantificación de Valsartán, Hidroclorotiazida y Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina.

PARÁMETRO		CRITERIO ESTABLECIDO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
Linealidad	Benzotiadiazina	$r \geq 0,990$	0,9906
		$RSD \leq 5,0\%$	3,1%
		$t_b > t_{0,05,n-2}$ ($t_{\text{tabla}} = 2,056$)	37,006
	Hidroclorotiazida	$r \geq 0,990$	0,9948
		$r^2 > 0,980$	0,9881
		$RSD \leq 5,0\%$	2,7%
		$t_b > t_{0,05,n-2}$ ($t_{\text{tabla}} = 2,048$)	48,296
	Valsartán	$r \geq 0,990$	0,9987
		$RSD \leq 5,0\%$	2,6%
$t_b > t_{0,05,n-2}$ ($t_{\text{tabla}} = 2,048$)		51,297	
Especificidad	Valsartán	Ausencia de señal en el placebo a los tiempos de retención de los analitos; no interferencia de potenciales compuestos de degradación en la valoración de los analitos de interés.	Conforme
Precisión del método	Benzotiadiazina	$RSD < 12,0\%$	11,1%
	Hidroclorotiazida	$RSD \leq 5,0\%$	1,2%
	Valsartán	$RSD \leq 5,0\%$	1,4%
Exactitud	Benzotiadiazina	$t_{\text{exp}} < t_t$ ($t_{\text{tabla}} = 2,1604$)	0,1216
	Hidroclorotiazida	$t_{\text{exp}} < t_t$ ($t_{\text{tabla}} = 2,1604$) Prueba Student	0,4117
	Valsartán	$t_{\text{exp}} < t_t$ ($t_{\text{tabla}} = 2,1604$) Prueba Student	0,4114
Límite de detección	Benzotiadiazina	< 30 ppm	0,08 ppm
Límite cuantificación	Benzotiadiazina	≤ 30 ppm	0,21 ppm

CONCLUSIONES

Por todo lo anterior se puede afirmar que el método cromatográfico para la cuantificación e identificación de Hidroclorotiazida y Valsartán en el producto Hidroclorotiazida 12,5 mg y Valsartán 160 mg tabletas recubiertas cumple con los parámetros exigidos para la validación de un método analítico, garantizando de esta manera que los resultados obtenidos al aplicarlos en el análisis del producto terminado y en los estudios de estabilidad de la forma farmacéutica son confiables.

Con el nuevo método analítico, se agilizará el proceso de análisis y liberación del producto terminado, brindando garantía de la veracidad de los resultados obtenidos a los clientes internos del proceso de manufactura y comercialización.

También se logrará disminuir los tiempos de análisis, reducir las cantidades de reactivos utilizados y proporcionar la validez y confiabilidad en los resultados de cuantificación.

En resumen, el método de análisis cumple con todos los parámetros de validación propuestos dentro de los rangos establecidos por los proveedores del Equipo, la USP 28 y el INVIMA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Webb R, Navarrete A. y DAVIS S.; Effects of Valsartan and Hydrochlorothiazide alone and in combination on blood pressure and heart rate in conscious-telemetered spontaneously hypertensive rats. *AJH.*, 11(1), **1998**, 59-65.
- (2) Hardman J. y Limbird L. E.; Las bases farmacológicas de la terapéutica de Godman & Gilman. 9^a Ed. Mc Graw-Hill Interamericana, México, **1996**. pp 800.
- (3) Siragy H.; *Am. J. Cardiol.* **84**, **1999**, 3S-8S.
- (4) Carlucci G., Dicarlo V. y Mazzeo P.; Simultaneous determination of valsartan and hydrochlorothiazide in tablets by high performance liquid chromatography. *Anal. Lett.* 33(12), **2000**, 2494-2500.
- (5) Tatar S. and Saglik S.; Comparison of UV and second derivative spectrometric and LC methods for the determination of valsartan in pharmaceutical formulation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30, **2002**, 371-375.
- (6) The United States Pharmacopeia Convention; United States Pharmacopeia 27 / National Formulary 22. Rockville, **2004**. pp 900.
- (7) Colombia, Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. Decreto 677 de 1995. Santa Fe de Bogotá: INVIMA, **1995**.
- (8) The United States Pharmacopeia Convention; United States Pharmacopeia 27 / National Formulary 22. Rockville, **2004**. pp 2231.
- (9) ICH. Harmonized tripartite guideline for stability testing of new drug substances and products (ICH Q1A). Ginebra: ICH, **1994**.

(10) Colombia, Ministerio de Salud. Resolución Número 002514 de 1995.

Santa Fe de Bogotá. Minsalud, **1995**.

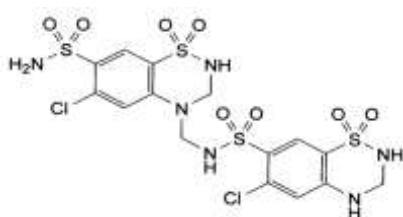


Figura 1. Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina

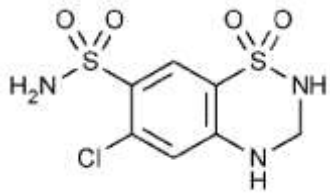


Figura 2. Hidroclorotiazida

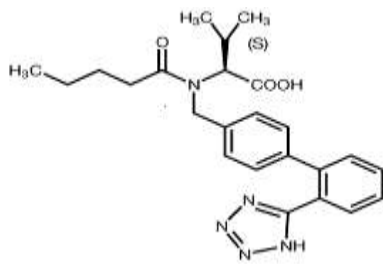


Figura 3. Valsartán

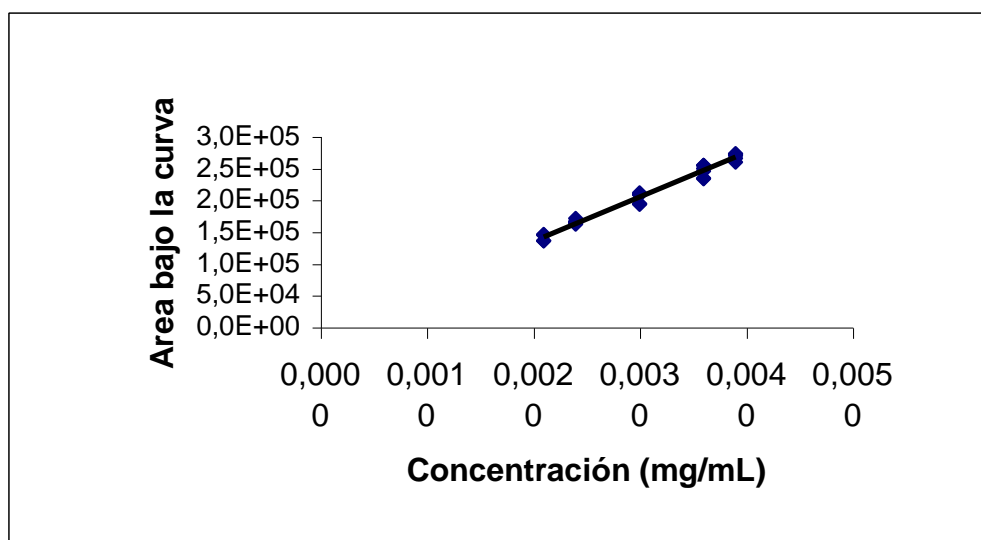


Figura 4. Gráfica de linealidad para Benzotiadiazina A

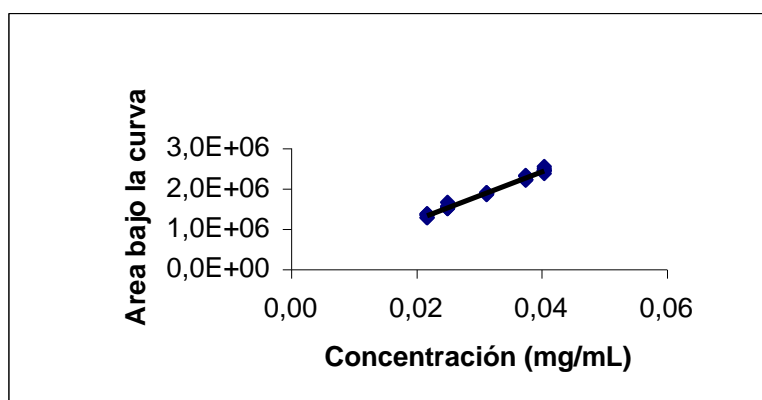


Figura 5. Gráfica de linealidad para Hidroclorotiazida

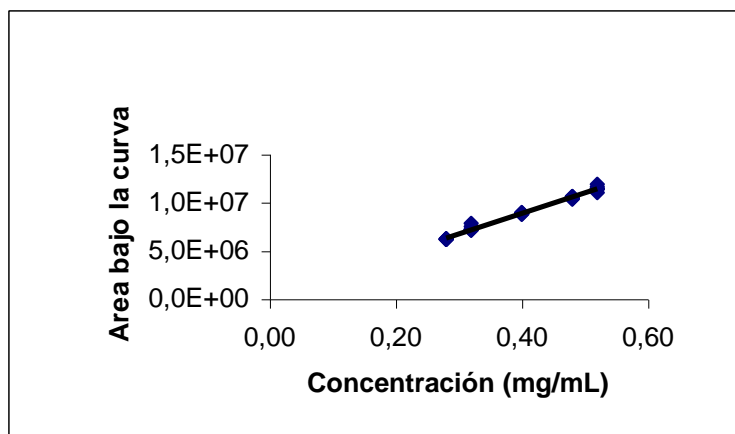


Figura 6. Gráfica de linealidad para Valsartán

Tabla 1. Gradiente de elución para la separación y cuantificación de valsartán, hidroclorotiazida y compuesto relacionado A de benzotiadiazina.

Tiempo (min.)	Ácido trifluoroacético 0.2% (%)	Acetonitrilo (%)
0 - 15	80 - 20	20 - 80
15 - 25	20 - 80	80 - 20
25	80	20

Tabla 2. Resultados de la idoneidad

Compuesto	Etapa	N	T	K	Resolución
Compuesto Relacionado A de benzotiadiazina	Inicio	3484	1.274	5.442	N/A
	Final	3382	1.295	5.309	N/A
Hidroclorotiazida	Inicio	6047	1.312	6.152	1.49
	Final	5598	1.377	5.975	1.64
Valsartán	Inicio	57082	1.505	14.212	25.04
	Final	64237	1.589	13.885	25.01

Tabla 3. Resultados obtenidos para la validación del método analítico de separación y cuantificación de Valsartán, Hidroclorotiazida y Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina.

PARÁMETRO		CRITERIO ESTABLECIDO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
Linealidad	Benzotiadiazina	$r \geq 0,990$	0,9906
		$RSD \leq 5,0\%$	3,1%
		$t_b > t_{0,05,n-2}$ ($t_{\text{tabla}} = 2,056$)	37,006
	Hidroclorotiazida	$r \geq 0,990$	0,9948
		$r^2 > 0,980$	0,9881
		$RSD \leq 5,0\%$	2,7%
	Valsartán	$t_b > t_{0,05,n-2}$ ($t_{\text{tabla}} = 2,048$)	48,296
		$r \geq 0,990$	0,9987
		$RSD \leq 5,0\%$	2,6%
		$t_b > t_{0,05,n-2}$ ($t_{\text{tabla}} = 2,048$)	51,297
Especificidad	Valsartán	Ausencia de señal en el placebo a los tiempos de retención de los analitos; no interferencia de potenciales compuestos de degradación en la valoración de los analitos de interés.	Conforme
Precisión del método	Benzotiadiazina	$RSD < 12,0\%$	11,1%
	Hidroclorotiazida	$RSD \leq 5,0\%$	1,2%
	Valsartán	$RSD \leq 5,0\%$	1,4%
Exactitud	Benzotiadiazina	$t_{\text{exp}} < t_t$ ($t_{\text{tabla}} = 2,1604$)	0,1216
	Hidroclorotiazida	$t_{\text{exp}} < t_t$ ($t_{\text{tabla}} = 2,1604$) Prueba Student	0,4117
	Valsartán	$t_{\text{exp}} < t_t$ ($t_{\text{tabla}} = 2,1604$) Prueba Student	0,4114
Límite de detección	Benzotiadiazina	< 30 ppm	0,08 ppm
Límite cuantificación	Benzotiadiazina	≤ 30 ppm	0,21 ppm