

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS Y AMBIENTALES**

PROYECTO DE TITULACIÓN

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

**“MAGÍSTER EN GESTIÓN INTEGRAL DE LABORATORIOS DE
QUÍMICA”**

TEMA:

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA
DE VALSARTÁN E HIDROCLOROTIAZIDA EN TABLETAS MEDIANTE
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ULTRA ALTO RENDIMIENTO**

AUTOR:

LIGIA ELIZABETH CAIZA LÓPEZ

Guayaquil - Ecuador

2022

Resumen

La combinación de hidroclorotiazida y valsartán es uno de los tratamientos recomendados para la hipertensión arterial. Dado que el problema de los antihipertensivos falsificados o de calidad inferior está determinado en todo el mundo, es fundamental el desarrollo de métodos rápidos y fiables para el análisis de control de calidad de estos medicamentos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar, validar e implementar un nuevo método UHPLC-DAD para cuantificar simultáneamente hidroclorotiazida y valsartán en tabletas.

El método por UHPLC fue desarrollado usando una columna Shim-pack XR-ODS II RP 18 (75 mm x 3.0 mm d.i.; 2.2 μ m), una fase móvil compuesta por acetonitrilo y una solución de trietilamina al 0.1%, pH 2.0 ajustado con ácido ortofosfórico al 85%, en proporción 50:50 con elución isocrática. La velocidad de flujo fue de 0.5 ml/min y la temperatura de la columna fue de 25°C. La detección UV se realizó a 265 nm. El método UHPLC se validó por completo y los resultados se compararon con un método de referencia HPLC-DAD para el análisis de hidroclorotiazida y valsartán en tabletas.

El método UHPLC demostró ser lineal ($r^2 > 0.995$). La recuperación se encontró en el rango de 98 a 102% con la desviación estándar relativa menor al 2.0% para ambos fármacos. No se observaron diferencias significativas entre los contenidos de hidroclorotiazida y valsartán obtenidos por métodos UHPLC y HPLC. Sin embargo, el método UHPLC promovió análisis más rápidos, mejor rendimiento cromatográfico y menor consumo de solvente.

Palabras claves: Hidroclorotiazida, Valsartán, Validación, UHPLC

Abstract

The combination of hydrochlorothiazide and valsartan is one of the recommended treatments for arterial hypertension. Since the problem of counterfeit or substandard antihypertensives is determined worldwide, the development of rapid and reliable methods for quality control analysis of these drugs is essential. Therefore, the aim of this work was to develop, validate and implement a new UHPLC-DAD method to simultaneously quantify hydrochlorothiazide and valsartan in tablets. The UHPLC method was developed using a Shim-pack XR-ODS II RP 18 column (75 mm x 3.0 mm i.d.; 2.2 μ m), a mobile phase consisting of acetonitrile and 0.1% triethylamine solution, pH 2.0 adjusted with 85% orthophosphoric acid in a 50:50 ratio with isocratic elution, at a flow rate of 0.5 ml/min. The column temperature was 25°C. UV detection was performed at 265 nm. The UHPLC method was fully validated and the results were compared with a reference HPLC-DAD method for the analysis of hydrochlorothiazide and valsartan in tablets.

The UHPLC method proved to be linear ($r^2 > 0.995$). Recovery was found to be in the range of 98 to 102% with the relative standard deviation less than 2.0% for both drugs. No significant differences were observed between hydrochlorothiazide and valsartan contents obtained by UHPLC and HPLC methods. However, the UHPLC method promoted faster analysis, better chromatographic performance and lower solvent consumption.

Keywords: hydrochlorothiazide, valsartan, validation, UHPLC

DEDICATORIA

A Dios por estar siempre conmigo guiándome, cuidándome y dándome fortaleza para continuar con mi formación profesional.

A mis Padres ejemplo de honestidad, esfuerzo, perseverancia y deseos de superación.

A mi esposo por su inmenso amor, comprensión y apoyo en esta etapa del camino.

Finalmente, dedico el presente trabajo al regalo más grande que Dios me supo entregar, mi hijo Diego Alejandro por ser mi fuente de motivación e inspiración para poder superarme día a día.

AGRADECIMIENTO

Mi reconocimiento infinito a la Escuela Superior Politécnica del Litoral por darme la oportunidad de enriquecer mis conocimientos; también hago extenso este reconocimiento a los directivos y profesores por la organización del programa de Maestría en Gestión Integral de Laboratorios de Química.

Agradezco a todos los docentes por haber compartido sus conocimientos a lo largo de este programa, mi más grande y sincero agradecimiento al Dr. Joan Vera, principal colaborador durante todo este proceso, quien con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración permitió el desarrollo de este trabajo.

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad por los hechos y doctrinas expuestas en este Proyecto de Titulación, me corresponde exclusivamente y ha sido desarrollado respetando derechos intelectuales de terceros conforme las citas que constan en el documento, cuyas fuentes se incorporan en las referencias o bibliografías. Consecuentemente este trabajo es de mi total autoría. El patrimonio intelectual del mismo, corresponde exclusivamente a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance del Trabajo de Titulación referido.

LIGIA ELIZABETH CAIZA LÓPEZ

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Ph.D. JOEL VIELMA
PRESIDENTE

Ph.D. JOAN VERA
TUTOR

M.Sc. NADIA FLORES
DOCENTE EVALUADOR

ABREVIATURAS O SIGLAS

HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
UHPLC	cromatografía líquida de ultra alto rendimiento
FDA	administración de alimentos y medicamentos
IECA	inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina
HCTZ	hidroclorotiazida
VAL	valsartán
ICH	Consejo Internacional de armonización
PAS	presión arterial sistólica
PAD	presión arterial diastólica
µm	micrómetro
USP	farmacopea oficial de los Estados Unidos
HTA	hipertensión arterial
ECA	enzima convertidora de la angiotensina
DMSO	dimetilsulfóxido
PDA	detector de arreglo de diodos
BB	betabloqueadores
BCC	bloqueadores de los canales de calcio
ARA-II	antagonistas de los receptores de la angiotensina
NYHA	Asociación del corazón de Nueva York
GMP	buenas prácticas de manufactura
ISO	Organización Internacional de Normalización
PVDF	fluoruro de polivinilideno
LOD	límite de detección
LOQ	límite de cuantificación

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO.....	VIII
CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes.....	2
1.2 Descripción del problema	3
1.3 Objetivos	4
1.4 Hipótesis.....	5
1.5 Alcance.....	5
CAPÍTULO 2.....	6
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1 Hipertensión arterial.....	6
2.2 Generalidades de los principios activos.....	7
2.3 Cromatografía.....	9
2.4 Validación.....	14
CAPÍTULO 3.....	19
3. METODOLOGÍA	19
3.1 Materiales y reactivos	20
3.2 Equipos	20
3.3 Sistemas cromatográficos y condiciones	21
3.4 Preparación de soluciones.....	22
3.5 Validación del método	22
3.6 Tratamiento estadístico de datos	26
CAPÍTULO 4.....	27
4. RESULTADOS	27

4.1	Validación.....	28
4.2	Comparación de métodos UHPLC y HPLC para el análisis de hidroclorotiazida y valsartán en tabletas	47
CAPÍTULO 5.....		50
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	50
5.1	Conclusiones	50
5.2	Recomendaciones	51
6.	Referencias.....	52
7.	Apéndices y anexos.....	55

LISTADO DE FIGURAS

Figura 2.1 Estructura química de Valsartán	7
Figura 2.2. Estructura química de Hidroclorotiazida	8
Figura 2.3. Cromatógrafo líquido HPLC WATERS ALLIANCE	10
Figura 2.4. Módulos ineludibles del cromatógrafo de HPLC.....	11
Figura 2.5. Cromatógrafo líquido UPLC ACQUITY H-CLASS	12
Figura 4.1. Cromatograma por UHPLC de HCTZ y VAL	27
Figura 4.2. Cromatograma por HPLC de HCTZ y VAL	28
Figura 4.3. Cromatograma compuesto relacionado B de VAL por UHPLC.....	29
Figura 4.4. Cromatograma compuesto relacionado B de VAL por HPLC	30
Figura 4.5. Curvas de calibración de HCTZ y VAL por UHPLC	31
Figura 4.6. Curvas de calibración de HCTZ y VAL por HPLC	32
Figura 4.7. Residuales estandarizados de HCTZ y VAL por UHPLC	33
Figura 4.8. Residuales estandarizados de HCTZ y VAL por HPLC	34
Figura 4.9. Efecto matriz de HCTZ y VAL por UHPLC	35
Figura 4.10. Efecto matriz de HCTZ y VAL por HPLC.....	36

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1. Datos requeridos para la validación	15
Tabla 2.2. Intervalos especificados mínimos según la ICH Q2.....	17
Tabla 3.1 Elución en gradiente para HPLC	22
Tabla 3.2. Objetivos de validación para UHPLC y HPLC	23
Tabla 3.3. Curva de calibración de VAL e HCTZ.....	24
Tabla 3.4. Valores nominales y alternativos para UHPLC y HPLC	25
Tabla 4.1. Datos de especificidad por UHPLC para HCTZ y VAL	29
Tabla 4.2. Datos de especificidad por HPLC para HCTZ y VAL.....	29
Tabla 4.3. Curvas de calibración de HCTZ y VAL por UHPLC	30
Tabla 4.4. Curvas de calibración de HCTZ y VAL por HPLC.....	31
Tabla 4.5. Comparación curvas de regresión lineal de estándar con matriz por UHPLC y HPLC	35
Tabla 4.6. Porcentaje de recuperación de HCTZ y VAL por UHPLC	37
Tabla 4.7. Porcentaje de recuperación de HCTZ y VAL por HPLC	37
Tabla 4.8. Recuperación media en el rango para HCTZ y VAL por UHPLC	38
Tabla 4.9. Recuperación media en el rango para VAL e HCTZ por HPLC	38
Tabla 4.10. Resultados de repetibilidad de HCTZ y VAL por UHPLC	39
Tabla 4.11. Resultados de repetibilidad de HCTZ y VAL por HPLC	40
Tabla 4.12. Resultados HCTZ 10 mg y VAL 60 mg por UHPLC.....	41
Tabla 4.13. Resultados HCTZ 10 mg y VAL 60 mg por HPLC	41
Tabla 4.14. Resultados estadísticos HCTZ 10 mg y VAL 60 mg por UHPLC y HPLC	42
Tabla 4.15. Resultados HCTZ 20 mg y VAL 160 mg por UHPLC.....	42
Tabla 4.16. Resultados HCTZ 20 mg y VAL 160 mg por HPLC	42

Tabla 4.17. Resultados estadísticos HCTZ 20 mg y VAL 160 mg por UHPLC y HPLC	43
Tabla 4.18. Resultados HCTZ 30 mg y VAL 400 mg por UHPLC	43
Tabla 4.19. Resultados HCTZ 30 mg y VAL 400 mg por HPLC	43
Tabla 4.20. Resultados estadísticos HCTZ 30 mg y VAL 400 mg por UHPLC y HPLC	44
Tabla 4.21. Esquema de Youden para HCTZ y VAL por UHPLC	45
Tabla 4.22. Esquema de Youden para HCTZ y VAL por HPLC	45
Tabla 4.23. Resultados de porcentaje de HCTZ y VAL por UHPLC	46
Tabla 4.24. Resultados de porcentaje de HCTZ y VAL por HPLC.....	46
Tabla 4.25. Diferencias calculadas para HCTZ y VAL por UHPLC y HPLC	46
Tabla 4.26. Resultados del LOD y LOQ HCTZ y VAL por UHPLC	47
Tabla 4.27. Resultados del LOD y LOQ de HCTZ y VAL por HPLC	47
Tabla 4.28. Porcentaje de HCTZ y VAL por UHPLC y HPLC	48
Tabla 4.29. Comparación entre los métodos UHPLC y HPLC para HCTZ y VAL.	49

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial es el principal factor de riesgo corregible de las enfermedades cardiovasculares y, a nivel mundial, afecta a más de mil millones de personas y causa más de diez millones de muertes evitables cada año [1].

Dada la naturaleza de la enfermedad cardiovascular hipertensiva, su tratamiento eficaz se ha basado en la combinación de fármacos con diferentes mecanismos de acción. 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. Recientemente se ha encontrado que la administración oral conjunta de Valsartán e Hidroclorotiazida puede ser utilizada como terapia de segunda línea en aquellos pacientes que no responden adecuadamente a la monoterapia [2].

La farmacopea de los Estados Unidos (USP) describe un método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para el análisis de valsartán e hidroclorotiazida [6], sin embargo, el sistema de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UHPLC) trajo la revolución en la cromatografía líquida de alto rendimiento convencional. UHPLC reduce los tiempos de ejecución de la muestra a un factor de 10, usa hasta un 95 por ciento menos de solvente y mejora significativamente la productividad en el laboratorio.

UHPLC logra la velocidad porque utiliza partículas de menos de dos micras que reducen los tiempos de ejecución de la cromatografía y mejora la resolución. UHPLC fue diseñado como un sistema total para aprovechar la presión ultra alta y las partículas pequeñas. Atributos de separación que dan como resultado un rendimiento excepcionalmente superior con mejoras significativas en resolución, sensibilidad y velocidad.

El sistema UHPLC disminuye tiempo y costos significativos por muestra del proceso analítico mientras mejora la calidad de los resultados, el sistema permite a los cromatógrafos trabajar con mayores eficiencias, caudales y contrapresiones [3]. El presente estudio comprende el desarrollo y validación de la metodología para la cuantificación de hidroclorotiazida y valsartán utilizando la tecnología UHPLC, y la comparación frente a la metodología por cromatografía líquida convencional para formas comprimidos farmacéuticos.

1.1 Antecedentes

El Valsartán fue desarrollado por primera vez por Novartis y vendido bajo la marca DIOVAN. Actualmente posee la mayor cuota de mercado dentro de los fármacos de su tipo. En los EE.UU, valsartán está registrado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para uso en el tratamiento de la hipertensión en niños de 6 años y mayores y adolescentes en diciembre de 2008 [4].

DIOVAN (valsartán) fue etiquetado como el número uno en ventas de medicamentos para la presión arterial alta en el mundo y representó \$ 6 mil millones en ventas en 2010 en todo el mundo[4].

Hay dos tipos de formas de dosificación de valsartán disponible en el mercado. Uno que comprende de un solo componente activo y otro que comprende tres formas de dosificación que contiene una combinación de valsartán con uno o más componentes como hidroclorotiazida, amlodipino besilato, aliskiren. La combinación de valsartán e hidroclorotiazida no está protegido por ninguna patente sino solo por la molécula de valsartán, por lo tanto se espera que las versiones genéricas de este producto se lancen al mismo tiempo que el único producto activo. Desde los últimos ocho años, se ha observado un aumento en la presentación de patentes de Valsartán y sus productos combinados que indiquen claramente la importancia de la molécula del fármaco [4].

Por otra parte en el 2004, la ciencia de la cromatografía ingresó en una nueva dimensión en el rendimiento con la primera y exitosa separación con el poder de

partículas bajo 2 μm . Esto permitió determinar un nuevo nivel de eficiencia y productividad cuando se compara con las técnicas de HPLC tradicionales. Los equipos tienen la capacidad de trabajar con una eficiencia más alta y un rango mucho más amplio de velocidad lineal de flujo cromatográfico, obteniendo resultados superiores.

Hasta hace poco, los tiempos de análisis de 30 minutos eran comunes; por lo tanto los métodos por HPLC debían ser rápidos para cubrir un gran número de muestras en la industria farmacéutica. Con la llegada de la cromatografía con un tamaño de partícula menor a 5 μm y más recientemente, en un rango de 1,8 a 2 μm , los tiempos de análisis fueron acortados y cientos de muestras que requerían días de análisis se podrían realizar en un solo día [5].

1.2 Descripción del problema

La hipertensión arterial (HTA) es una enfermedad crónica la cual en la actualidad se ha convertido en uno de los factores de riesgo para padecer enfermedades cerebrovasculares, cardiovasculares y el fallo renal. La Organización Panamericana de la Salud, establece que la hipertensión arterial es el principal factor de riesgo para padecer enfermedades cardiovasculares, que constituyen la primera causa de muerte [6]. Un 46% de la población ecuatoriana tiene hipertensión arterial y, solo un 15% de esa población que se sabe hipertensa, tiene un control adecuado de sus cifras de presión arterial.

Varias normativas europeas como la *European Society of Hypertension* de 2007 o la *European Society of Cardiology* para el abordaje de la hipertensión arterial de 2007, recomiendan el tratamiento de los pacientes con hipertensión arterial para reducir el riesgo cardiovascular. Los diuréticos, los bloqueantes beta adrenérgicos, los bloqueantes cálcicos, los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y los sartanes son alternativas habituales para el tratamiento de la hipertensión arterial [7].

El uso de medicamentos antihipertensivos falsificados o de calidad inferior es un problema que contribuye a la mortalidad y efectos adversos debido a dosis excesivas o la presencia de ingredientes activos potencialmente tóxicos. Aunque los avances en el análisis químico mejoran el monitoreo de la calidad de los medicamentos. Además, el fracaso del tratamiento puede atribuirse indebidamente a la resistencia a los medicamentos cuando el producto no cumple los requisitos cualitativos y cuantitativos. Por lo tanto, el control de calidad de las preparaciones farmacéuticas comercializadas hoy en día puede ayudar a asegurar la eficacia del tratamiento y evitar el desarrollo de resistencia a los medicamentos contra la hipertensión [8].

Por otra parte, la cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC) es un avance novedoso en la cromatografía líquida rápida, sensible y de alta resolución [9]. Un sistema de presión ultra alta permite el uso de pequeñas columnas llenas de partículas de pequeño diámetro. Las partículas están diseñadas para resistir altas contrapresiones, en contraste con la cromatografía líquida convencional [10]. Por lo tanto, UHPLC tiene ventajas teóricas significativas en velocidad, resolución y sensibilidad de análisis, especialmente en ahorro de tiempo y consumo de solvente [11, 12].

Sin embargo, no se han notificado métodos oficiales con respecto a la cuantificación simultánea de Valsartán e Hidroclorotiazida usando UHPLC. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es desarrollar, validar e implementar un nuevo método UHPLC-DAD para cuantificar simultáneamente Valsartán e Hidroclorotiazida en formulaciones de comprimidos.

1.3 Objetivos

Objetivo General:

Implementar un método analítico validado para la cuantificación simultánea de Valsartán e Hidroclorotiazida en tabletas, mediante cromatografía líquida de ultra alto rendimiento.

Objetivos específicos:

1. Adaptar una metodología analítica para la cuantificación simultánea de Valsartán e Hidroclorotiazida en tabletas, usando UHPLC.
2. Analizar los resultados obtenidos del método validado mediante parámetros estadísticos.
3. Comparar los métodos UHPLC y HPLC para el análisis simultáneo de Valsartán e Hidroclorotiazida en tabletas.

1.4 Hipótesis

El método analítico para la cuantificación simultánea de Valsartán e Hidroclorotiazida en tabletas por cromatografía líquida de ultra alto rendimiento, cumple con los parámetros de desempeño de la validación.

1.5 Alcance

El presente estudio pretende demostrar que la tecnología UHPLC cubre con los parámetros de validación: selectividad, linealidad, precisión, exactitud, robustez, límites de detección y cuantificación requeridos para el desarrollo y la implementación de la metodología USP en comparación con una metodología HPLC en la industria farmacéutica para los activos Valsartán e Hidroclorotiazida en comprimidos orales.

La aplicación de la presente investigación tendrá un alcance nacional e internacional, puesto que la industria farmacéutica en el país está sometida a las exigencias de una entidad regulatoria que impone los requerimientos de calidad, siendo la farmacopea de los Estados Unidos (conocido por sus siglas en inglés como USP) reconocida por la agencia regulatoria nacional que rige la fabricación de medicamentos.

CAPÍTULO 2

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Hipertensión arterial

La presión arterial (HTA) se define como una presión arterial sistólica (PAS) ≥ 140 mmHg o una presión arterial diastólica (PAD) ≥ 90 mmHg. Se utiliza la misma clasificación para jóvenes, adultos de mediana edad y ancianos, mientras que se adoptan otros criterios basados en percentiles para niños y adolescentes, ya que no se dispone de datos de estudios de intervención en estos grupos de edad [13].

2.1.1 Tratamiento farmacológico para la hipertensión

La mayoría de los pacientes requieren tratamiento farmacológico además de intervenciones en el estilo de vida para lograr un control óptimo de la presión arterial. Los medicamentos hipotensores más usados universalmente son: los diuréticos, los betabloqueadores (BB), los bloqueadores de los canales del calcio (BCC), los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA) y más recientemente los antagonistas de los receptores de la angiotensina (ARA-II) [14].

- Diuréticos.- son medicinas que disminuyen la presión arterial al reducir la cantidad de líquido del interior de la circulación sanguínea al favorecer su eliminación por la orina. Ejemplos de diuréticos son: la hidroclorotiazida, el amiloride, la indapamida, la furosemida o la torasemida.
- Beta- Bloqueadores.- este tipo de medicamentos además de reducir la presión arterial enlentecen el ritmo cardiaco. Se utilizan también en pacientes con enfermedades coronarias y con insuficiencia cardiaca. Entre ellos se encuentra el propranolol, atenolol, etc.
- Bloqueadores de los canales del calcio.- estos medicamentos facilitan la relajación de las arterias. Dentro de ellos se encuentran: el nifedipino,

amlodipino, verapamilo y diltiazem. Algunos producen como efecto adverso hinchazón de tobillos y piernas (edemas).

- Inhibidores de la enzima convertora de la angiotensina.- dentro de este grupo se encuentran el captopril, enalapril, ramipril, etc. Impidiendo la acción de una sustancia que facilita la contracción de las arterias. Son uno de los grupos farmacológicos más utilizados. Pueden producir tos como efecto adverso fuerte.
- Antagonistas de los receptores de la angiotensina II.- como el losartán, irbesartán, olmesartán, valsartán, etc. Este grupo de medicamentos también impiden la contracción de las arterias [15].

2.2 Generalidades de los principios activos

2.2.1 Valsartán

Formula química: C₂₄ H₂₉ N₅ O₃

Nombre químico: (2S)-3-metil-2-(N-{{[2'-(2H-1,2,3,4-tetrazol-5-il)-[1,1'-bifenil]-4-il]metilo }pentanamido)ácido butanoico. La estructura se muestra en la figura 2.1

Peso molecular: 435,52 g/mol

Solubilidad: soluble en etanol, DMSO y dimetilformamida a 30 mg/mL.

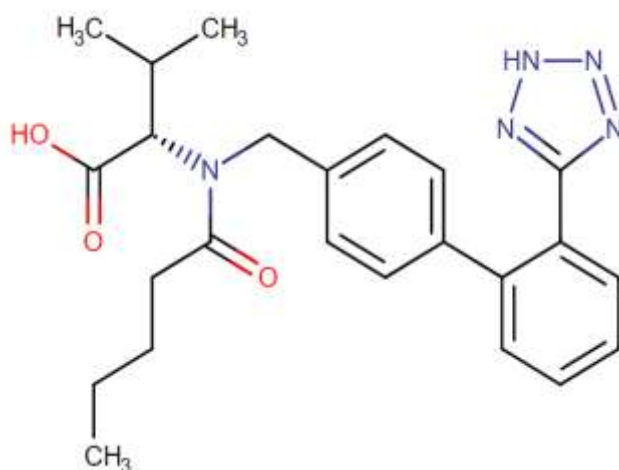


Figura 2.1 Estructura química de Valsartán

Valsartan está indicado para el tratamiento de la hipertensión para reducir el riesgo de eventos cardiovasculares fatales y no fatales, principalmente accidentes cerebrovasculares e infartos de miocardio. También está indicado para el

tratamiento de la insuficiencia cardiaca (clase II-IV de la NYHA) y de la disfunción o insuficiencia ventricular izquierda tras un infarto de miocardio cuando el uso de un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) no es adecuado. Después de una dosis oral, la actividad antihipertensiva de valsartán comienza en aproximadamente 2 horas y alcanza su punto máximo en 4 a 6 horas en la mayoría de los pacientes. Los alimentos disminuyen la exposición al valsartán administrado por vía oral en aproximadamente un 40 % y la concentración plasmática máxima en aproximadamente un 50 % [16].

2.2.2 Hidroclorotiazida

Formula química: $C_7H_8N_3ClO_4S_2$

Nombre químico: 6-cloro-1,1-dioxo-3,4-dihidro-2H-1λ6,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida. La estructura se muestra en la figura 2.2.

Peso molecular: 297,74 g/mol



Figura 2.2. Estructura química de Hidroclorotiazida

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.

La hidroclorotiazida es un diurético tiazídico que se usa para tratar el edema asociado con una serie de afecciones y la hipertensión. El uso de hidroclorotiazida es común, pero está disminuyendo a favor de los inhibidores de la enzima

convertidora de angiotensina. Hay disponibles muchos productos combinados que contienen hidroclorotiazida e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina o bloqueadores de los receptores de angiotensina II.

Una dosis oral de hidroclorotiazida tiene una biodisponibilidad del 65 al 75 %, con un tiempo máximo de 1 a 5 horas y una concentración máxima de 70 a 490 ng/ml después de dosis de 12,5 a 100 mg. Cuando se toma con una comida, la biodisponibilidad es un 10 % más baja, la concentración máxima es un 20 % más baja y el tiempo máximo aumenta de 1,6 a 2,9 horas [16].

2.3 Cromatografía

2.3.1 Generalidades

La cromatografía líquida de alto rendimiento o alta resolución es la técnica mayormente empleada en las áreas de bioquímica, química y farmacia, toxicología, y química analítica, usada para separar los componentes de una sustancia, dependiendo de su estabilidad térmica, actividad biológica de los analitos, permitiendo su identificación y posterior cuantificación [17].

Las técnicas de separación cromatográfica son métodos de separación de múltiples etapas en los cuales los componentes de una muestra se distribuyen entre dos fases, una estacionaria y la otra móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido absorbido sobre un sólido o un gel. La fase móvil puede estar en forma gaseosa o líquida o un fluido supercrítico. La separación puede basarse en adsorción, distribución de masa (partición) o intercambio iónico; o puede basarse en diferencias entre las propiedades fisicoquímicas de las moléculas, tales como tamaño, masa o volumen [18].

2.3.2 Cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía líquida de alta resolución HPLC por sus nombres en inglés *High Performance Liquid Chromatography* permite la separación de compuestos de una mezcla mediante las interacciones específicas con la fase estacionaria permitiendo el paso, identificación y análisis de los componentes de las sustancias en estudio (figura 2.3). El HPLC se caracteriza por la utilización de presión, ya que ayuda a

incrementar la velocidad de los compuestos dentro de la columna. Dentro de sus principales características del HPLC se encuentra su versatilidad ya que este tipo de cromatografía separa macromoléculas, grupos polifuncionales y especies iónicas; también es selectiva y de alto costo, pero efectiva.



Figura 2.3. Cromatógrafo líquido HPLC WATERS ALLIANCE

El equipo instrumental denominado “cromatógrafo de líquidos”, siempre se compone de, al menos, cinco módulos (figura 2.4) unidos mediante tuberías de acero y de otros materiales, usualmente con diámetro externo de 1/16” y ocasionalmente de 1/32” en sistemas de alta resolución. Esos cinco ineludibles módulos son: el sistema de bombeo (una o varias bombas, con o sin formación de gradientes), el inyector de muestras, la columna (con o sin precolumna), el detector y el procesador de datos, que exhiben los cromatogramas con los cálculos oportunos.

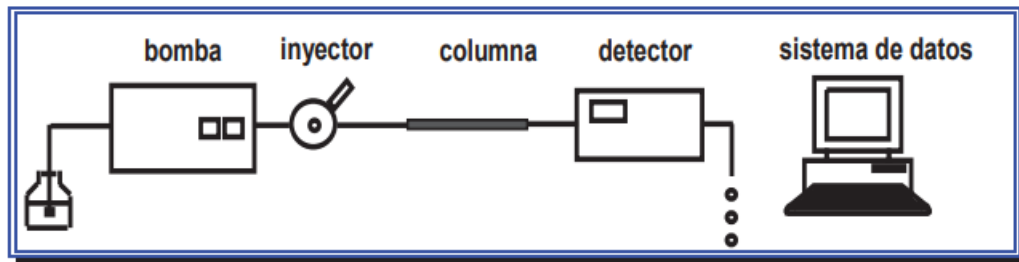


Figura 2.4. Módulos ineludibles del cromatógrafo de HPLC

2.3.3 Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento UHPLC

Para lograr aún más el aumento en resolución, velocidad y sensibilidad en cromatografía líquida, un avance significativo en la instrumentación y tecnología de columna (tamaño de partícula y dimensión de columna). Para lograr los objetivos anteriores, Waters en 2004, lanzó y registró la cromatografía líquida de ultra rendimiento UPLC (figura 2.5), que se basa en pequeñas, partículas porosas (partículas menores a 2 micras). La ecuación de Van Deemter es el principio detrás de esta evolución que se correlaciona la conexión entre la velocidad lineal y la altura del plato. Las pequeñas partículas requieren una alta presión para trabajar con UHPLC es decir, 6000 psi, que suele ser el límite superior de las HPLC convencionales. Se observó que cuando el tamaño de partícula es disminuido por debajo de $2,5 \mu\text{m}$, hay un aumento notable en la eficacia y esta eficacia no disminuye al aumentar la velocidad lineal o tasa de flujo.



Figura 2.5. Cromatógrafo líquido UPLC ACQUITY H-CLASS

El principio subyacente de UHPLC se basa en la relación de Van Deemter que explica la correlación entre la velocidad de flujo y altura del plato. La ecuación de Van Deemter muestra que el rango de flujo con las partículas más pequeñas es mucho mayor en comparación con partículas más grandes para obtener buenos resultados.

$$H=A+\frac{B}{v}+Cv$$

Donde H representa la altura equivalente de los platos teóricos (HETP), A, B & C son constantes, v es la velocidad de flujo (velocidad lineal) del gas portador. El objetivo es minimizar HETP para mejorar la eficiencia de la columna. El término A no depende de la velocidad. Es más pequeño si las columnas se llenan con partículas pequeñas y de tamaño uniforme. El término B denota la tendencia de

difusión natural de las partículas. A velocidades de flujo elevadas, este efecto es menor, entonces este término se divide por v . El término C representa la resistencia cinética al equilibrio durante el proceso de separación.

La resistencia cinética es el lapso de tiempo involucrado en pasar de la fase móvil a la fase estacionaria y viceversa. Por lo tanto, este término es inversamente proporcional a la velocidad lineal [19].

Por otra parte, la prueba de idoneidad del sistema (system suitability) representa una parte integral de método y se utiliza para garantizar el rendimiento adecuado del sistema cromatográfico elegido. Estas pruebas se basan en el concepto de que los equipos, la electrónica, las operaciones analíticas y las muestras a analizar constituyen un sistema integral que puede ser evaluado como tal. La eficiencia, el factor de capacidad, la relación pico a valle, el factor de resolución, la retención relativa y el factor de simetría son los parámetros que se utilizan normalmente para evaluar la idoneidad del sistema.

Dentro de los estudios realizados según Cruz Cancino, Arnol (2021) en su estudio Análisis costo-beneficio de metodologías para el dosaje de dexametasona fosfato solución oftálmica y sulfametoxazol- trimetoprima suspensión oral, demostró que los métodos desarrollados a UHPLC, son beneficiosos y menos costosos para su implementación.

Gómez Herrera, Bryan Alberto (2021) realizó un estudio comparativo entre los métodos analíticos HPLC y UPLC para la cuantificación de atorvastatina en tabletas demostrando que la cromatografía líquida de alta velocidad (UPLC) es más exacta que la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Márquez Yalta, Karina Liseth (2018) desarrollo un nuevo método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas de 100 mg por cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) cumpliendo con los parámetros de validación.

2.4 Validación

2.4.1 El método analítico

El empleo de métodos analíticos se inicia en la etapa de investigación y desarrollo de un medicamento, para luego aplicarse en las diferentes fases de su fabricación, así como en estudios posteriores tales como los de bioequivalencia, analizando el fármaco en fluidos biológicos, para establecer condiciones de intercambiabilidad. Con la aplicación de métodos analíticos podremos dar respuesta a diversas interrogantes que debemos afrontar cuando a calidad de un medicamento nos referimos. Entre otros, los principales son: la identidad y la pureza del principio activo y de los excipientes empleados en la formulación.

En las Farmacopeas podremos encontrar las especificaciones de los métodos a utilizar en cada uno de estos casos, así como la instrumentación más idónea, las cuales habitualmente requieren de la utilización de sustancias de referencia apropiadas, de calidad garantizada, tanto para calibrar los equipos utilizados, como para llegar a un resultado cuantitativo con el método de análisis propuesto.

2.4.2 Validación de métodos analíticos

Según ISO 9000 “Validación es la confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva, de que se han cumplido para una utilización o aplicación específica prevista”. La validación de un proceso analítico según la USP, es el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas (<1225> USP).

Las Buenas Prácticas de Fabricación y Control (GMP) requieren que los métodos analíticos empleados para evaluar las especificaciones establecidas sean apropiados.

Los métodos analíticos se clasifican en 4 categorías:

- **CATEGORÍA I:** Incluye los métodos analíticos para la cuantificación de los componentes mayoritarios de las materias primas o de los principios activos (incluyendo los conservantes) en productos farmacéuticos terminados o semielaborados.
- **CATEGORÍA II:** Incluye los métodos analíticos empleados para la determinación de impurezas en las materias primas o productos de degradación en los productos farmacéuticos. Estos métodos incluyen valoraciones cuantitativas y ensayos límites.
- **CATEGORÍA III:** Incluye métodos analíticos para la determinación de las características de desempeño (como por ejemplo, disolución, liberación de principios activos).
- **CATEGORÍA IV:** Incluye ensayos de identificación.

Para cada categoría de análisis, se necesita diferente información analítica. En la tabla 2.1, se indican los elementos que normalmente se requieren para cada una de estas categorías.

Tabla 2.1. Datos requeridos para la validación

Características de Desempeño Analítico	Datos requeridos para la Validación				
	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis Cuantitativos	Pruebas de Limite		
Exactitud	Sí	Sí	^a	^a	No
Precisión	Sí	Sí	No	Sí	No
Especificidad	Sí	Sí	Sí	^a	Sí
Límite de detección	No	No	Sí	^a	No
Límite de cuantificación	No	Sí	No	^a	No
Linealidad	Sí	Sí	No	^a	No
Intervalo	Sí	Sí	^a	^a	No

^a Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

2.4.3 Descripción de los parámetros de validación

Selectividad/ Especificidad.- este parámetro indica la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes previsibles, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz.

Para los procedimientos analíticos se requiere un análisis simultáneo de: blanco de reactivos, blanco de muestras, la misma matriz con el agregado de una cantidad conocida de analito o una muestra real y el material de referencia certificado.

Linealidad.- la linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad (dentro de un rango determinado) para obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de analito en la muestra.

Puede demostrarse directamente sobre el principio activo (mediante dilución de una solución estándar madre) y/o pesadas de mezclas sintéticas de los componentes del producto farmacéutico utilizando el procedimiento propuesto. Para el establecimiento de la linealidad se recomienda un mínimo de cinco concentraciones [20].

Rango.- el rango de un procedimiento analítico es el intervalo entre la concentración baja y la concentración alta de analito en la muestra (incluidas estas concentraciones) para las cuales se ha demostrado que el procedimiento analítico tiene un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad

La ICH recomienda considerar los siguientes rangos mínimos especificados:

Tabla 2.2. Intervalos especificados mínimos según la ICH Q2

Ensayo	Rango con respecto a la concentración de prueba
Valoración	80% - 120%
Uniformidad de contenido	70% - 130%
Disolución	± 20% ejemplo: si las especificaciones de un producto de liberación controlada cubren una región del 20%, después de 1 hora, hasta el 90%, después de 24 horas, el rango validado sería 0-110%.
Determinación de impurezas	Desde el nivel de notificación de la impureza hasta el 120% de la especificación.

Exactitud.- la exactitud se define como la proximidad entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado para la misma. La exactitud se expresa como porcentaje de recuperación.

ICH recomienda un mínimo de 9 determinaciones utilizando por lo menos 3 concentraciones dentro del rango de cuantificación establecida.

Precisión.- es la proximidad de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos bajo condiciones determinadas. La precisión generalmente, se expresa en términos de una desviación estándar de los resultados de la prueba.

La precisión puede considerarse en 3 niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

Repetibilidad.- la repetibilidad expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación sobre un intervalo de tiempo.

Debe evaluarse utilizando un mínimo de 9 determinaciones que cubran el rango especificado para el procedimiento (por ejemplo, 3 concentraciones con 3 repeticiones cada una) o un mínimo de 6 determinaciones al 100 % de la concentración de prueba.

Precisión intermedia.- expresa variaciones dentro de los laboratorios: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc.

Reproducibilidad.- supone dar la mayor variación en los resultados, es una medida de la variabilidad en los resultados entre laboratorios.

Límite de detección.- el límite de detección de un procedimiento analítico es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto.

Límite de cuantificación.- por otro lado es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser cuantificada con precisión y exactitud.

Robustez.- la robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para permanecer no afectado por pequeñas variaciones deliberadas en los parámetros del método.

En el caso de la cromatografía líquida, ejemplos de variaciones típicas son:

- Influencia de las variaciones de pH en una fase móvil
- Influencia de las variaciones en la composición de la fase móvil
- Diferentes columnas (diferentes lotes y / o proveedores)
- Temperatura
- Tasa de flujo

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGÍA

Para analizar los productos farmacéuticos terminados y sus ingredientes, cuantitativa y cualitativamente, se utilizan métodos instrumentales como la técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Sin embargo, las industrias farmacéuticas se están enfocando en nuevas formas de economizar y acortar los tiempos de análisis que demandan los métodos oficiales con la finalidad de mejorar la eficiencia de los procesos productivos y satisfacer la alta demanda de ensayos de materias primas, productos intermedios y producto terminado. Por esta razón, se hace necesario implementar tecnologías que disminuyan los tiempos de análisis manteniendo la confianza, la calidad y la reproducibilidad de los ensayos clásicos como el HPLC, en este sentido el desarrollo de la tecnología HPLC al estado del arte de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC) ha servido como principal herramienta que permite satisfacer esta necesidad. Es importante mencionar que los principios de UHPLC son los mismos que el HPLC básico, la diferencia está en el diseño del tamaño de partícula del material de la columna que es menos de 2 μm , bombas, inyectoros automáticos y detectores.

En base a lo expuesto, la metodología utilizada en el presente trabajo fue cuantitativa, mediante la cual se desarrolló un método analítico para la cuantificación simultánea de valsartán e hidroclorotiazida en tabletas, utilizando cromatografía líquida de ultra alto rendimiento UHPLC. Además, la presente investigación contempla la comparación del método analítico desarrollado por UHPLC frente al método de referencia por HPLC proporcionado por la farmacopea de los Estados Unidos para la cuantificación de valsartán e hidroclorotiazida en tabletas.

A continuación se indica el equipamiento (instrumentos de medición, software, materiales de referencia, reactivos, consumibles, equipos auxiliares) utilizado para la determinación de los analitos en estudio.

3.1 Materiales y reactivos

Los análisis tanto por UHPLC y HPLC se trabajaron con estándares de referencia de Sigma-Aldrich. Hidroclorotiazida lote LRAC9547 con una pureza declarada de 99.7%, valsartán lote LRAC2970 con una pureza de 98.6% y el compuesto relacionado B de valsartán lote LRAC7756 con 97.4% de pureza.

Los reactivos utilizados fueron: trietilamina, acetonitrilo, ácido trifluoroacético y agua, todos de la pureza y la calidad adecuada para análisis cromatográfico.

Además, se utilizaron balones volumétricos previamente calibrados, mortero de porcelana, viales de 2 mL, filtros jeringa y filtros membrana PVDF de 0,22 μm .

3.2 Equipos

Para la cuantificación por UHPLC, el sistema utilizado fue un cromatógrafo líquido de ultra alto rendimiento ACQUITY UPLC[®] H-Class de Waters[®], el sistema está compuesto por un administrador de solventes cuaternario (QSM), el cual es una bomba de mezcla de baja y alta presión que puede bombear cuatro solventes desgasificados simultáneamente usando un dosificador de gradiente (válvula GPV), un administrador de muestras de flujo continuo a través de la aguja (SM-FTN), un horno de columna que calienta a cualquier temperatura desde 20 °C y un detector de arreglo de diodos PDA con una celda de flujo de 500 nL.

Por otro lado, el método de referencia fue analizado en un cromatógrafo líquido de alta resolución HPLC Alliance de Waters, el sistema está formado por una bomba de mezcla cuaternaria de baja presión y desgasificación de vacío en línea, el automuestreador con control de temperatura programable de 4 a 20 °C, un compartimiento de columna que proporciona temperaturas desde 5 °C por encima de la temperatura ambiente hasta 65 °C y un detector de fotodiodos modelo 2996 con un rango de longitud de onda de 190 a 800 nm.

Otros equipos necesarios para el análisis fueron: balanza analítica, micropipeta mecánica y medidor de pH previamente calibrados y equipos auxiliares como agitador orbital, ultrasonido y bomba de vacío.

3.3 Sistemas cromatográficos y condiciones

La separación por UHPLC se realizó en una columna Shim-pack XR-ODS II RP 18 (75 mm x 3.0 mm d.i.; y 2.2 μm de tamaño de partícula). La fase móvil fue una mezcla de acetonitrilo y una solución de trietilamina (0.1%, pH 2.0 ajustado con ácido ortofosfórico al 85%) en proporción (50:50) con elución isocrática. La temperatura de la columna fue de 25 °C, la velocidad de flujo fue de 0.5 mL/min y el volumen de inyección de 3 μL . La longitud de onda de detección utilizada fue de 265 nm y un tiempo de corrida de 3.5 minutos por inyección. Para la cuantificación y manejo de datos se utilizó el software Empower 3.

En cambio para la separación por HPLC se utilizó una columna Hypersil THERMO C18 (100 mm x 4,6 mm d.i.; 5 μm de tamaño de partícula). La temperatura fue de 25 °C, con una velocidad de flujo de 0,4 mL/min. El volumen de inyección fue de 10 μL , y los analitos fueron monitoreados a 265 nm. El tiempo de corrida por muestra fue de 40 minutos, la fase móvil utilizada fue: una solución A compuesta por acetonitrilo, agua y ácido trifluoroacético en proporción (10:90:0.1) y una solución B compuesta por acetonitrilo, agua y ácido trifluoroacético en proporción (90:10:0.1). El programa del gradiente final se indica en la tabla 3.1. Los datos cromatográficos fueron recogidos y procesados utilizando el software Empower 1.

Tabla 3.1 Elución en gradiente para HPLC

Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)
0	90	10
25	10	90
27	90	10
40	90	10

3.4 Preparación de soluciones

3.4.1 Preparación del disolvente de muestras

Para disolver tanto las muestras como los estándares certificados se utilizó una mezcla de acetonitrilo y agua en proporción (1:1).

3.4.2 Preparación de la solución de muestras

Las muestras utilizadas en UHPLC y HPLC fueron preparadas de la siguiente manera: se pesaron 20 tabletas, las cuales fueron trituradas en un mortero de porcelana hasta polvo fino, luego se pesó una cantidad de polvo equivalente a 160 mg de Valsartán y 12.5 mg de Hidroclorotiazida, la cantidad pesada fue transferida a un balón volumétrico de 100 mL, entonces se agregó 5 mL de agua y se dejó reposar la muestra durante 5 minutos. Luego se adicionó 50 mL de disolvente y se sometió a ultrasonido durante 15 minutos, pasado este tiempo se procedió a agitar la muestra durante 30 minutos en el agitador mecánico, y se volvió al ultrasonido por 5 minutos más, las muestras así obtenidas fueron diluidas a volumen con disolvente. Finalmente se transfirió una alícuota de 0,3 mL a un balón volumétrico de 5 mL, y se aforó con disolvente. Las muestras preparadas fueron filtradas por filtro jeringa PVDF de 0,22 µm y fueron inyectadas.

3.5 Validación del método

La validación del método analítico se realizó tanto para el método desarrollado por UHPLC como para el método de referencia por HPLC, para demostrar que los métodos cumplen con la calidad y confiabilidad de los resultados que garanticen el

cumplimiento de las normativas nacionales. Las características de desempeño aplicadas para los métodos fueron: especificidad, linealidad, exactitud, precisión, robustez, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ). A continuación en la tabla 3.2. se indica los objetivos de validación establecidos para cada parámetro de desempeño para el método de referencia HPLC y el método desarrollado por UHPLC.

Tabla 3.2. Objetivos de validación para UHPLC y HPLC

Parámetros	Objetivos de validación para los métodos por UHPLC y HPLC
Selectividad/ Especificidad	La señal obtenida corresponde únicamente a los analitos en estudio
Linealidad	Ecuación de linealidad: $y = m \cdot x + b$ $r^2 \geq 0.995$ Ninguno de los residuales estandarizados deben exceder un valor absoluto de 3
Exactitud	Porcentaje de recuperación: 98.0 % a 102.0 % $t_{calc} < t_{exp}$
Precisión Repetibilidad Precisión Intermedia	Coefficiente de variación CV _r ≤ 2.0 % Coeficiente de variación CV _R ≤ 2.0 %
Límite de detección	Desviación estándar relativa: < 5.0 %
Límite de cuantificación	Porcentaje de recuperación: 98.0 % a 102.0 %
Robustez	No presentar variaciones significativas en la recuperación media

3.5.1 Selectividad/ Especificidad

Este parámetro fue analizado de acuerdo a lo recomendado por la ICH. Para la selectividad se analizó los estándares de referencia certificados de valsartán e hidroclorotiazida, una muestra a la concentración nominal, el blanco de muestra y blanco de reactivos, la fase móvil y el compuesto relacionado B de valsartán, con lo cual se estudió las posibles interferencias que podrían interferir en la determinación de los analitos. Los estándares, la muestra y los blancos fueron

inyectados una sola vez, la especificidad del método se evaluó comprobando la pureza del pico.

3.5.2 Linealidad

Para la curva de calibración se analizaron 5 niveles de concentración para valsartán: 0.036; 0.048; 0.096; 0.192; 0.240 mg/mL y para hidroclorotiazida: 0.006; 0.009; 0.012; 0.015; 0.018 mg/mL. La concentración de la solución madre del estándar de referencia de valsartán fue de 0.6 mg/mL y de hidroclorotiazida de 0.3 mg/mL. Las concentraciones analizadas fueron preparadas por diluciones independientes a partir de las soluciones madre. Cada concentración se evaluó tres veces, las alícuotas tomadas fueron: 0.6; 0.8; 1.6; 3.2; 4.0 y 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 0.6 para valsartán e hidroclorotiazida respectivamente y diluidas a volumen de 10 mL con disolvente. La curva de calibración analizada para las dosis de valsartán e hidroclorotiazida se indican en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Curva de calibración de VAL e HCTZ

Dosis Valsartán (mg)	Dosis Hidroclorotiazida (mg)	Valsartán (mg/mL)	Hidroclorotiazida (mg/mL)
60	10	0.036	0.006
80	15	0.048	0.009
160	20	0.096	0.012
320	25	0.192	0.015
400	30	0.240	0.018

3.5.3 Exactitud

Para evaluar este parámetro se preparó una mezcla de los componentes del producto farmacéutico a la cual se adicionó cantidades conocidas de los estándares de referencia certificados de los dos principios activos en estudio. Se analizó un total de 9 determinaciones, para cada concentración se realizó tres determinaciones cubriendo el rango especificado 60; 160; 400 mg y 10; 20; 30 mg de valsartán e hidroclorotiazida respectivamente.

3.5.4 Precisión

Este parámetro se evaluó analizando un mínimo de seis muestras de prueba cubriendo el intervalo especificado 60; 160; 400 mg y 10; 20; 30 mg de valsartán e hidroclorotiazida respectivamente. La precisión intermedia se llevó a cabo, analizando muestras en tres días diferentes. La precisión se evaluó, calculando la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

3.5.5 Robustez

Los métodos fueron verificados alterando deliberadamente los siguientes factores: velocidad de flujo, temperatura de la columna, longitud de onda y porcentaje de solvente orgánico en la fase móvil. La evaluación del efecto de las variables se realizó mediante la prueba de Youden-Steiner, efectuando ocho experimentos y determinando el porcentaje de recuperación. Estadísticamente la influencia de un factor se evalúa comparando el valor del efecto con $S\sqrt{2}$, donde S es la desviación estándar obtenida de la repetibilidad del método. Los valores nominales y los valores alternativos para cada factor se indican a continuación en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Valores nominales y alternativos para UHPLC y HPLC

Factor	UHPLC		HPLC	
	Valor (nominal)	Valor (alternativo)	Valor (nominal)	Valor (alternativo)
Flujo	0.5 ml/min	0.4 ml/min	0.4 ml/min	0.6 ml/min
Temperatura de la columna	25°C	20°C	25°C	20°C
Longitud de onda	265 nm	263 nm	265 nm	263 nm
% de solvente orgánico en la FM	50:50	47:53	90:10 10:90 90:10 90:10	93:7 13:87 93:7 93:7

3.5.6 Límite de detección y cuantificación

El límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) fueron calculados utilizando el método basado en la extrapolación de la recta de calibrado a concentración cero. Para ello el método utiliza la pendiente (b) de la curva de

calibración y sustituye el valor real de la señal del blanco por el resultado de la extrapolación de dicha recta (Y_{bl}). Para el cálculo de la desviación estándar de la señal proporcionada por el ruido se debe construir la recta calculada tomando como eje de ordenadas las desviaciones estándar de las respuestas y como eje de abscisas las concentraciones estudiadas. Se considera que la desviación estándar de las respuestas corresponderá al valor de la ordenada en el origen (S_{bl}). Usualmente la constante k se considera de 3 para el LOD y 10 para el LOQ. Tanto para el límite de detección como para el límite de cuantificación se analizaron muestras con concentraciones conocidas próximas al límite de detección y cuantificación, determinando el porcentaje de recuperación y la desviación estándar.

Las fórmulas utilizadas para el cálculo se indican a continuación:

$$\text{LOD} = \frac{Y_{bl} + (K * S_{bl})}{b * \sqrt{n}} \qquad \text{LOQ} = \frac{Y_{bl} + (K * S_{bl})}{b * \sqrt{n}}$$

Donde:

K = constante usualmente se considera 3 para el LOD y 10 para el LOQ

S_{bl} =desviación estándar correspondiente a la señal del blanco

Y_{bl} = ruido de fondo del sistema

b = pendiente de la curva de calibrado

3.6 Tratamiento estadístico de datos

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante una hoja de cálculo en Excel previamente validada. Se emplearon medidas de tendencia central como el promedio, la desviación estándar, el coeficiente de variación, prueba t de student, F de fisher y se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar la idoneidad del método UHPLC con respecto al método de referencia por HPLC.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS

Los parámetros cromatográficos empleados para el desarrollo del método UHPLC se evaluaron inicialmente utilizando una columna Hypersil Gold C18 (50 mm x 2.1 mm) con 1.9 μm de tamaño de partícula y elución isocrática. En estas condiciones, los cromatogramas de los analitos de interés se deformaron considerablemente. Entonces se reemplazó la columna por una Shim-pack XR-ODS II C18 (75 mm x 3.0 mm) con 2.2 μm de tamaño de partícula con lo cual se logró la separación adecuada de hidrocortiazida y valsartán, con tiempos de retención de 0.773 y 2.606 min, respectivamente.

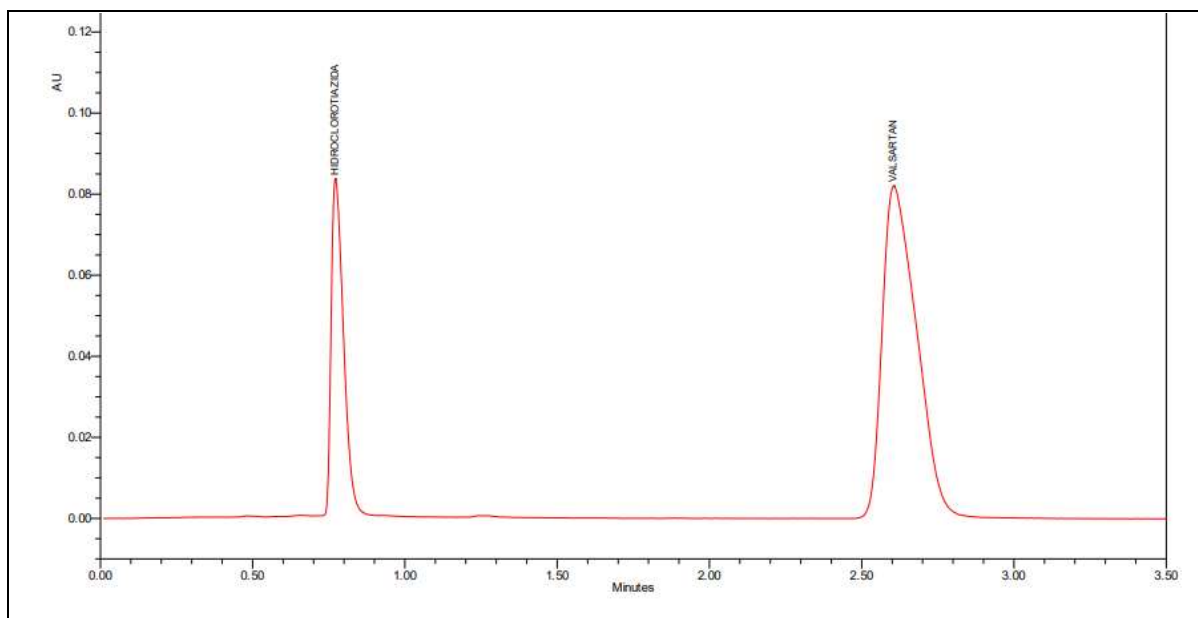


Figura 4.1. Cromatograma por UHPLC de HCTZ y VAL

El análisis de HPLC se realizó utilizando la columna Hypersil THERMO C18 (100 mm x 4.6 mm d.i.; y 5 μm de tamaño de partícula), obteniendo una separación adecuada de los analitos de interés. Los tiempos de retención fueron de 8.781 y 20.939 minutos para hidrocortiazida y valsartán, respectivamente. El cromatograma se indica en la figura 4.2.

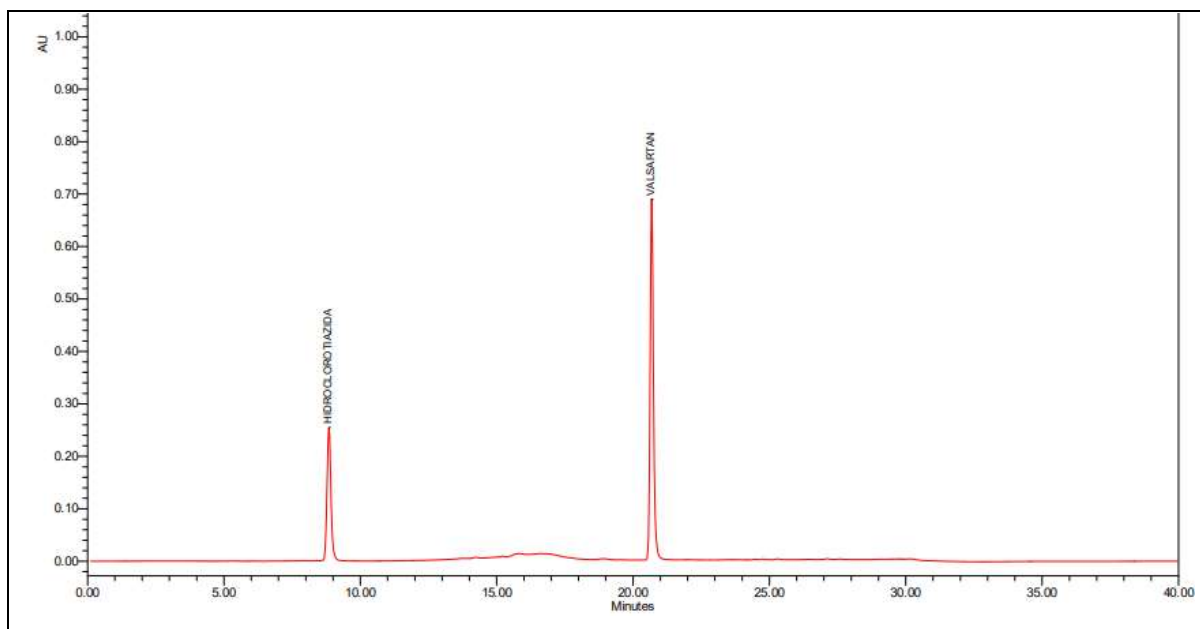


Figura 4.2. Cromatograma por HPLC de HCTZ y VAL

4.1 Validación

Tanto el método de HPLC como el de UHPLC fueron completamente validados, de acuerdo con la ICH Q2. Se evaluaron los parámetros de selectividad, linealidad, precisión, exactitud, robustez, límites de detección y cuantificación para ambos métodos y se compararon los resultados obtenidos con los objetivos de validación. A continuación, se presenta los resultados obtenidos de valoración para cada parámetro de desempeño para determinar simultáneamente los activos hidroclorotiazida (HCTZ) y valsartán (VAL).

4.1.1 Especificidad

Las purezas espectrales de los picos cromatográficos de hidroclorotiazida (HCTZ) y valsartán (VAL) se evaluaron utilizando los espectros UV registrados por el DAD para evaluar posibles picos de interferencia. La pureza de pico de los dos analitos fueron satisfactorios bajo las condiciones de cada método cromatográfico. En las tablas 4.1 y 4.2 se indican los datos de especificidad para el método de UHPLC y HPLC respectivamente para los dos analitos estudiados.

Tabla 4.1. Datos de especificidad por UHPLC para HCTZ y VAL

Inyección	Nombre	Tiempo de retención	Purity angle	Purity threshold	Área	Factor de simetría	USP platos teóricos	Resolución
Estándar	HCTZ	0.773	2.043	3.376	234205	1.4	2853	-
	VAL	2.606	0.54	1.059	660787	1.2	2942	12.7
Muestra	HCTZ	0.772	2.173	4.412	233765	1.4	2893	-
	VAL	2.597	0.568	1.217	668963	1.2	2966	12.7

Tabla 4.2. Datos de especificidad por HPLC para HCTZ y VAL

Inyección	Nombre	Tiempo de retención	Purity angle	Purity threshold	Área	Factor de simetría	USP platos teóricos	Resolución
Estándar	HCTZ	8.781	0.078	0.245	885065	1.2	2149	
	VAL	20.939	1.965	2.817	2848717	1.4	2891	25.3
Muestra	HCTZ	8.820	0.079	0.24	887062	1.2	2110	
	VAL	20.962	1.384	2.526	2886964	1.4	2845	25.3

Además, se analizó el compuesto relacionado B de valsartán por los dos métodos, obteniéndose el pico del compuesto relacionado B en un tiempo de retención de 1.89 min y de 17.81 min para el método por UHPLC y HPLC respectivamente. Con lo cual se demuestra que los métodos son específicos para la detección y cuantificación de los dos analitos en estudio, como se indica en la figura 4.3 y 4.4.

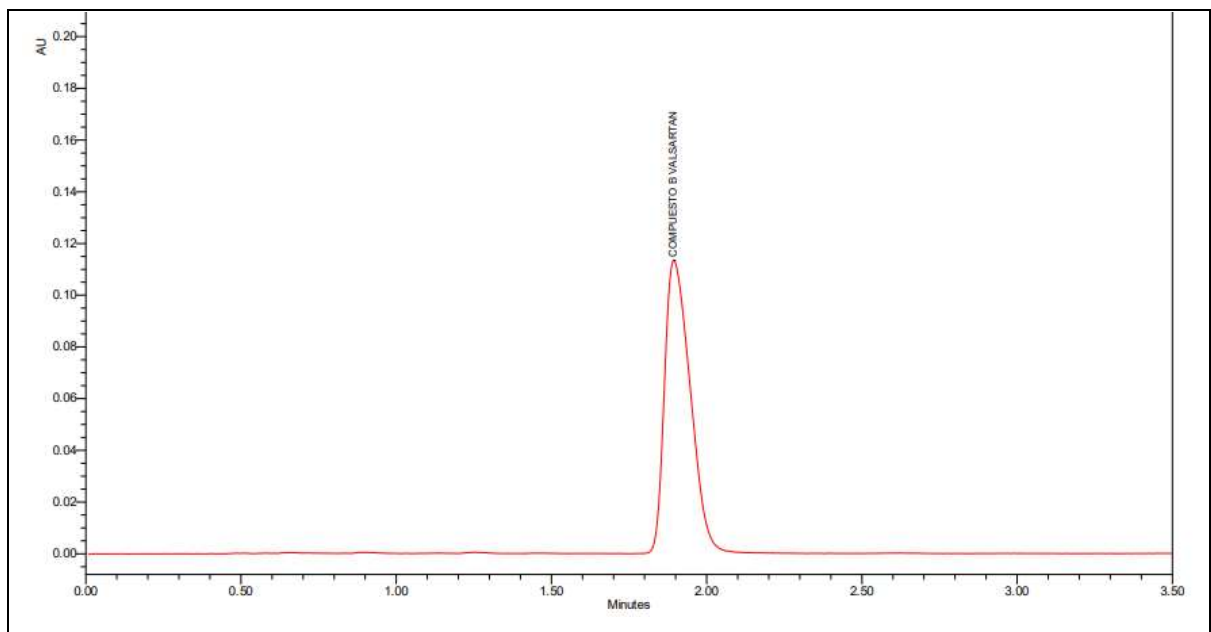


Figura 4.3. Cromatograma compuesto relacionado B de VAL por UHPLC

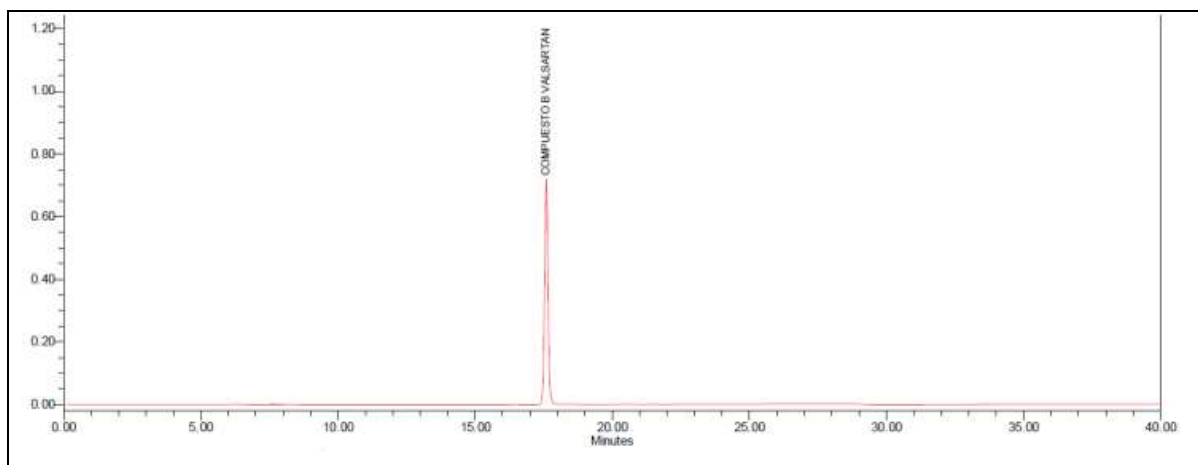


Figura 4.4. Cromatograma compuesto relacionado B de VAL por HPLC

4.1.2 Linealidad

Se encontró correlación lineal entre las áreas y las concentraciones de hidroclorotiazida y valsartán, en el rango ensayado, tanto para los métodos HPLC como UHPLC, utilizando el método de mínimos cuadrados. Las curvas de análisis de regresión se muestran en las figura 4.5 y 4.6. Se observó un comportamiento estándar de los residuales con desviaciones menores a 3 (Figuras 4.7 y 4.8) y no se detectó ninguna desviación significativa de linealidad en el rango ensayado. Los valores obtenidos del coeficiente de regresión (r^2), superiores a 0,995 para ambos compuestos, atestiguaron la linealidad de los métodos. En la tablas 4.3 y 4.4 se presentan los resultados obtenidos para cada curva de calibración de los dos analitos por los dos métodos cromatográficos.

Tabla 4.3. Curvas de calibración de HCTZ y VAL por UHPLC

HCTZ					
Curva	Pendiente	Intercepto	r^2	Sa	Sb
c1	12057.48	-2764.80	0.99873	5271.94	248.52
c2	11797.96	925.60	0.99925	3946.34	186.03
c3	11922.66	-2282.00	0.99981	1988.81	93.75
VAL					
Curva	Pendiente	Intercepto	r^2	Sa	Sb
c1	4116.42	-2386.74	0.99997	2916.07	11.94
c2	4111.51	-2735.03	0.99999	1983.03	8.12
c3	4118.33	-624.49	0.99998	2277.27	9.33

Tabla 4.4. Curvas de calibración de HCTZ y VAL por HPLC

HCTZ					
Curva	Pendiente	Intercepto	r ²	Sa	Sb
c1	45017.40	-14555.2	0.99978	8140.80	383.76
c2	44807.96	-6545.2	0.99864	20266.90	955.39
c3	44841.72	-12245.2	0.99884	18720.43	882.49
VAL					
Curva	Pendiente	Intercepto	r ²	Sa	Sb
c1	17446.62	-2545.76	0.99999	8262.47	33.84
c2	17374.86	15334.89	0.99999	8641.69	35.40
c3	17421.71	12252.09	0.99998	10413.29	42.65

Las curvas de regresión lineal de hidroclorotiazida y valsartán por los métodos de UHPLC y HPLC se indican a continuación:

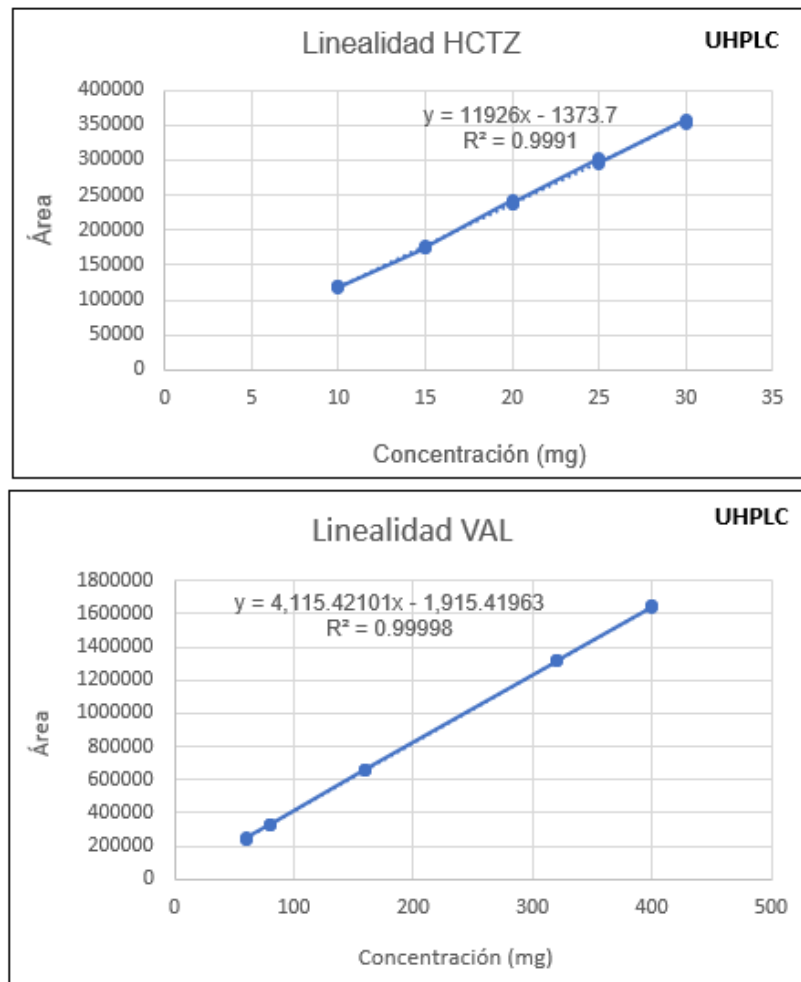


Figura 4.5. Curvas de calibración de HCTZ y VAL por UHPLC

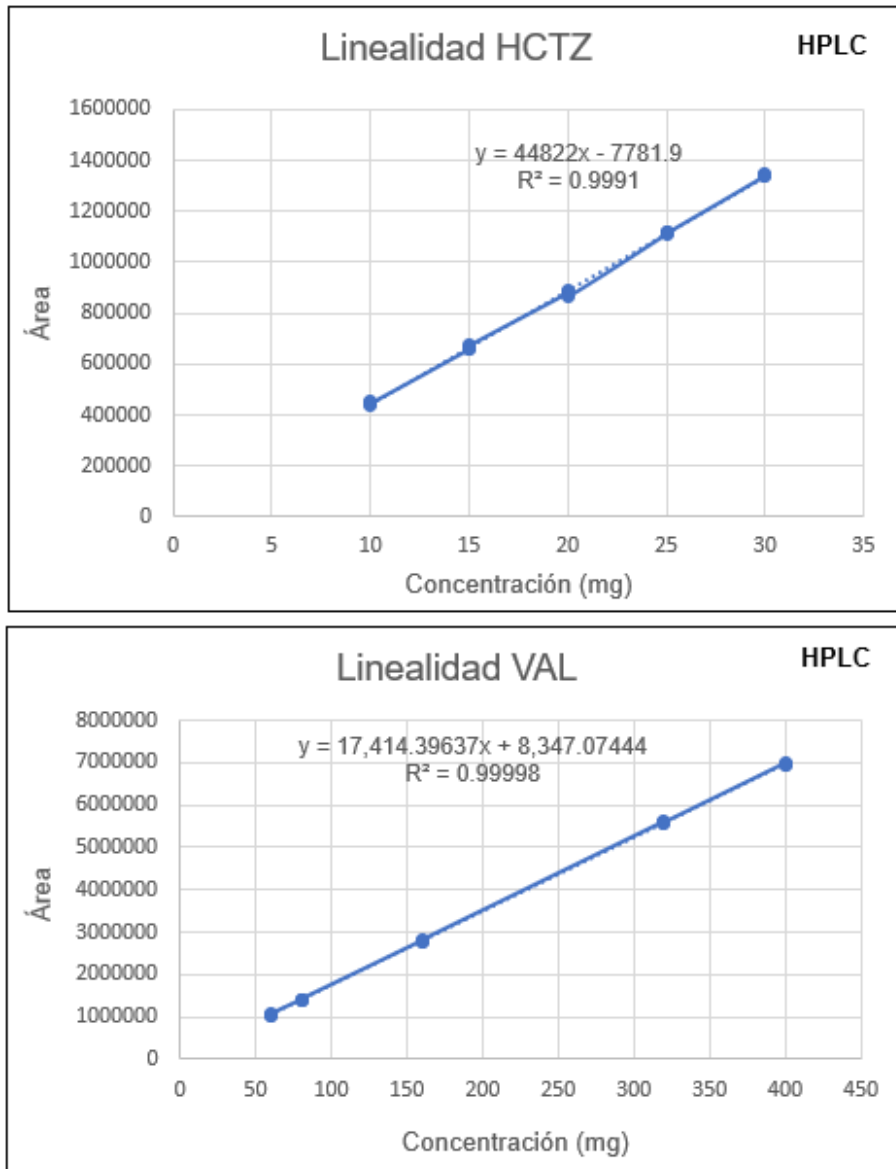


Figura 4.6. Curvas de calibración de HCTZ y VAL por HPLC

En las siguientes figuras se presentan los residuales estandarizados obtenidos en el estudio de linealidad los cuales no muestran ninguna tendencia y ninguno de los residuos estandarizados excede un valor absoluto de 3.

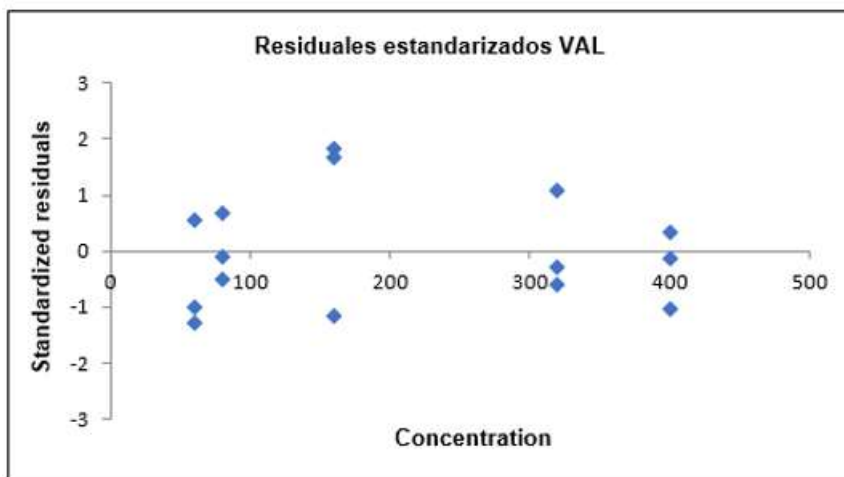
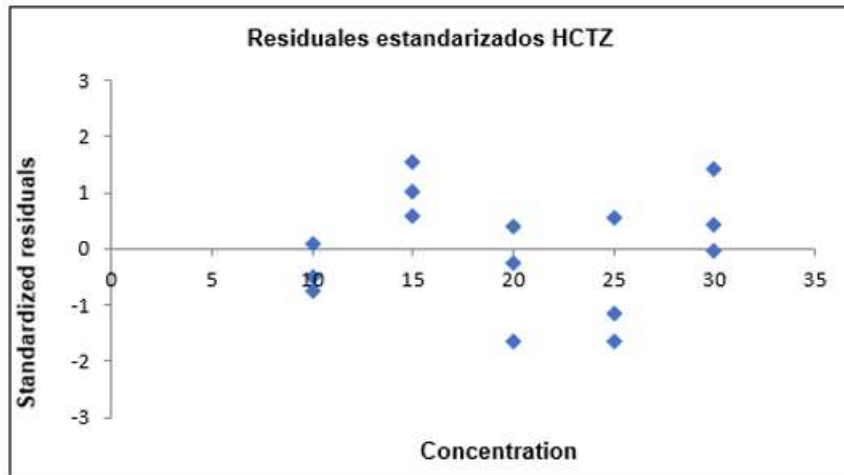


Figura 4.7. Residuales estandarizados de HCTZ y VAL por UHPLC

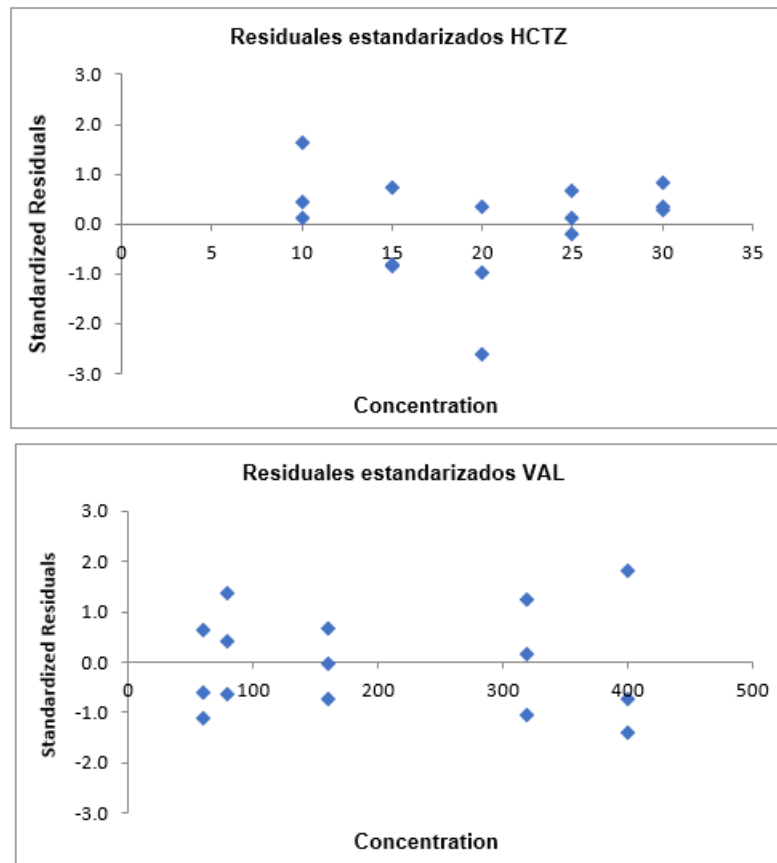


Figura 4.8. Residuales estandarizados de HCTZ y VAL por HPLC

La comparación de las curvas de regresión lineal de estándar frente a las curvas de calibración de estándar con placebos enriquecidos (métodos de curvas de respuesta relativa) fueron evaluadas comparando las pendientes y los interceptos mediante el análisis de varianza. La probabilidad obtenida en la comparación de las rectas de regresión de los dos analitos fueron superiores a 0.05, por lo tanto las curvas de regresión tanto del estándar como placebo enriquecido, comparten el mismo origen y tienen la misma pendiente, es decir son paralelas con un nivel del 95% de confianza. Los resultados obtenidos del valor de probabilidad se indican en la tabla 4.5 y las curvas de estándar y placebo enriquecido se muestran en las figuras 4.9 y 4.10 para los métodos por UHPLC y HPLC respectivamente.

Tabla 4.5. Comparación curvas de regresión lineal de estándar con matriz por UHPLC y HPLC

UHPLC		HPLC	
HCTZ	Probabilidad	HCTZ	Probabilidad
INTERCEPTOS Z (0,1)	0.507	INTERCEPTOS Z (0,1)	0.194
PENDIENTES XZ	0.239	PENDIENTES XZ	0.090
VAL	Probabilidad	VAL	Probabilidad
INTERCEPTOS Z (0,1)	0.682	INTERCEPTOS Z (0,1)	0.524
PENDIENTES XZ	0.152	PENDIENTES XZ	0.587

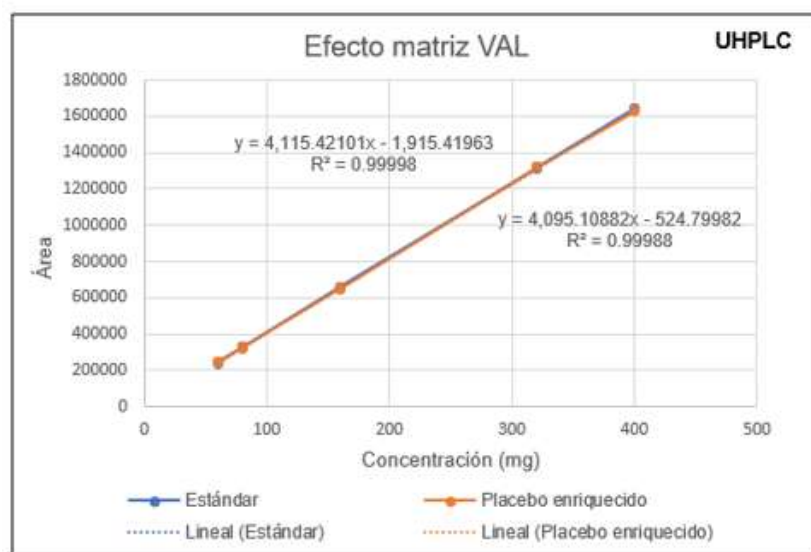
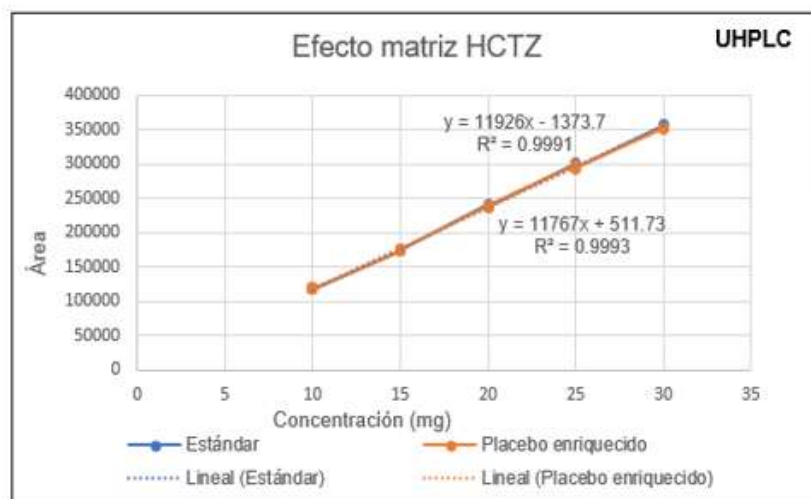


Figura 4.9. Efecto matriz de HCTZ y VAL por UHPLC

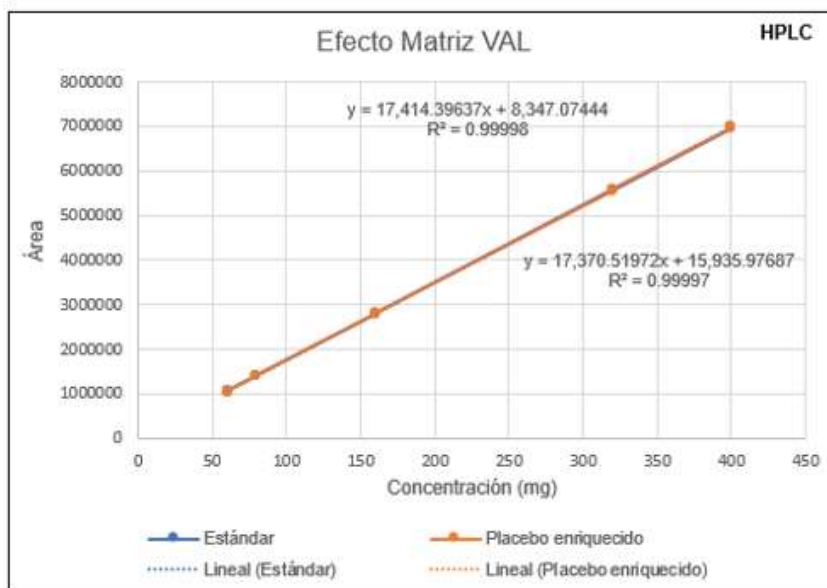
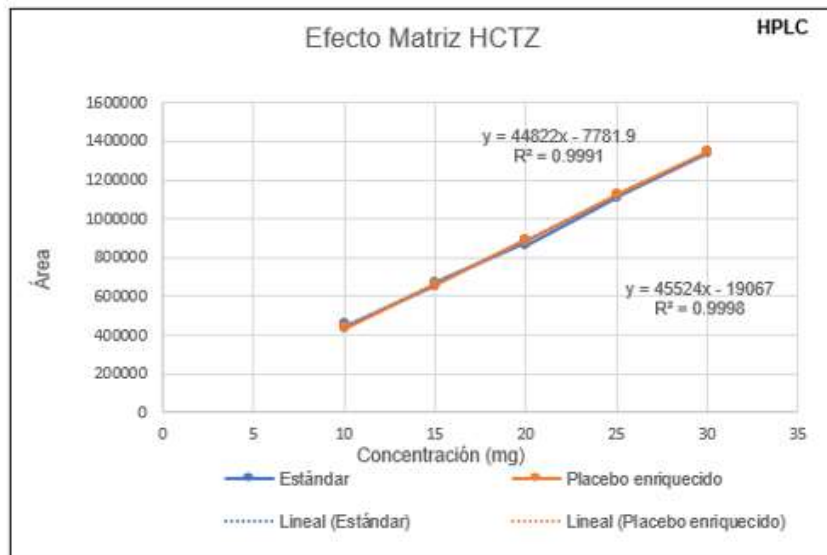


Figura 4.10. Efecto matriz de HCTZ y VAL por HPLC

4.1.3 Exactitud

Los valores de recuperación obtenidos para hidroclorotiazida y valsartán mediante los métodos UHPLC y HPLC se muestran en la Tabla 4.6 y 4.7, respectivamente. El ensayo de adición estándar empleado demostró que ambos métodos eran exactos para el análisis de hidroclorotiazida y valsartán, ya que las tasas de recuperación se encontraron dentro del rango predeterminado de 98.0 a 102.0%. Los valores de tcal obtenidos fueron inferiores al valor texp de 2.31. En las tablas

4.8 y 4.9 se indican los resultados de recuperación en el rango de trabajo con la recuperación media de los dos analitos en estudio.

Tabla 4.6. Porcentaje de recuperación de HCTZ y VAL por UHPLC

Concentración (mg)	% VAL	Concentración (mg)	% HCTZ
60	99.6	10	100.6
60	101.6	10	101.5
60	99.3	10	99.8
160	99.6	20	100.8
160	99.3	20	99.7
160	99.3	20	100.9
400	99.1	30	98.8
400	99.2	30	99.2
400	99.1	30	98.5
Promedio	99.6	Promedio	100.0
D.estándar	0.8	D.estándar	1.0
CV%	0.8	CV%	1.0
tcalc	1.6	tcalc	0.03
texp	2.3	texp	2.3

Tabla 4.7. Porcentaje de recuperación de HCTZ y VAL por HPLC

Concentración (mg)	% VAL	Concentración (mg)	% HCTZ
60	98.9	10	100.4
60	100.3	10	100.1
60	100.1	10	98.4
160	99.7	20	100.6
160	100.7	20	100.2
160	100.3	20	99.5
400	99.9	30	100.5
400	100.1	30	100.6
400	99.7	30	100.9
Promedio	100.0	Promedio	100.1
D.estándar	0.5	D.estándar	0.8
CV%	0.5	CV%	0.8
tcalc	0.3	tcalc	0.5
texp	2.3	texp	2.3

Tabla 4.8. Recuperación media en el rango para HCTZ y VAL por UHPLC

Parámetro de Validación	UHPLC						
	Dosis (mg)	HCTZ (mg)	HCTZ (%)	Dosis (mg)	VAL (mg)	VAL (%)	
% Recuperación	10	10.1	100.6	60	60.1	100.2	
	20	20.1	100.5	160	159.0	99.4	
	30	29.7	98.9	400	396.6	99.2	
	Promedio=		100.0%		Promedio=		99.6%

Tabla 4.9. Recuperación media en el rango para VAL e HCTZ por HPLC

Parámetro de Validación	HPLC						
	Dosis (mg)	HCTZ (mg)	HCTZ (%)	Dosis (mg)	VAL (mg)	VAL (%)	
% Recuperación	10	10.0	99.7	60	59.9	99.8	
	20	20.0	100.1	160	160.4	100.2	
	30	30.2	100.7	400	399.6	99.9	
	Promedio=		100.1%		Promedio=		100.0%

4.1.4 Precisión

Repetibilidad

Los valores de coeficiente de variación de repetibilidad obtenidos para hidroclorotiazida y valsartán mediante los métodos UHPLC y HPLC en el rango de trabajo se muestran en la Tabla 4.10 y 4.11, respectivamente. Los valores CV % obtenidos, inferiores al 2.0%, aseguran la repetibilidad de los métodos UHPLC y HPLC.

Tabla 4.10. Resultados de repetibilidad de HCTZ y VAL por UHPLC

VAL	
Concentración teórica (mg)	Concentración obtenida(mg)
60	60.2
60	60.4
60	60.1
60	59.7
60	59.5
60	60.4
Promedio	60.1
D. estándar	0.4
% CV	0.6

VAL	
Concentración teórica (mg)	Concentración obtenida(mg)
160	158.8
160	160.1
160	160.5
160	158.5
160	160.2
160	159.9
Promedio	159.7
D. estándar	0.8
% CV	0.5

VAL	
Concentración teórica (mg)	Concentración obtenida(mg)
400	399.2
400	400.2
400	400.3
400	399.9
400	400.3
400	399.6
Promedio	399.9
D. estándar	0.5
% CV	0.1

HCTZ	
Concentración teórica (mg)	Concentración obtenida(mg)
10	10.1
10	10.1
10	10.2
10	10.2
10	10.1
10	10.2
Promedio	10.1
D. estándar	0.1
% CV	0.6

HCTZ	
Concentración teórica (mg)	Concentración obtenida(mg)
20	20.4
20	20.1
20	20.1
20	20.2
20	20.0
20	20.0
Promedio	20.1
D. estándar	0.1
% CV	0.7

HCTZ	
Concentración teórica (mg)	Concentración obtenida(mg)
30	30.0
30	30.0
30	30.0
30	30.2
30	30.0
30	30.2
Promedio	30.1
D. estándar	0.1
% CV	0.4

Tabla 4.11. Resultados de repetibilidad de HCTZ y VAL por HPLC

VAL		VAL		VAL	
Concentración teórica (mg)	Concentración obtenida(mg)	Concentración teórica (mg)	Concentración obtenida(mg)	Concentración teórica (mg)	Concentración obtenida(mg)
60	59.7	160	159.2	400	399.7
60	59.4	160	159.1	400	398.9
60	59.8	160	159.6	400	398.6
60	59.8	160	161.3	400	400.0
60	59.8	160	160.9	400	398.9
60	59.2	160	160.2	400	399.4
Promedio	59.6	Promedio	160.0	Promedio	399.2
D. estándar	0.2	D. estándar	0.9	D. estándar	0.5
% CV	0.4	% CV	0.6	% CV	0.1

HCTZ		HCTZ		HCTZ	
Concentración teórica (mg)	Concentración obtenida(mg)	Concentración teórica (mg)	Concentración obtenida(mg)	Concentración teórica (mg)	Concentración obtenida(mg)
10	9.9	20	20.0	30	29.9
10	10.0	20	19.8	30	30.2
10	9.9	20	19.9	30	30.0
10	9.9	20	19.9	30	30.4
10	10.0	20	19.9	30	30.2
10	10.0	20	20.1	30	30.1
Promedio	9.9	Promedio	19.9	Promedio	30.1
D. estándar	0.1	D. estándar	0.1	D. estándar	0.2
% CV	0.8	% CV	0.6	% CV	0.7

Precisión intermedia

El estudio de precisión intermedia se realizó en el rango de trabajo 10, 20 y 30 mg de hidroclorotiazida y 60, 160 y 400 mg de valsartán para los métodos por UHPLC y HPLC. El modelo hipotético analizado fue:

Ho= las medias de los tres días son iguales

Ha= al menos una de las medias de los días es diferente

Los resultados obtenidos de recuperación de los dos analitos para las concentraciones de 10 mg de hidroclorotiazida y 60 mg de valsartán se muestran en las tablas 4.12 y 4.13 para los métodos por UHPLC y HPLC respectivamente.

Tabla 4.12. Resultados HCTZ 10 mg y VAL 60 mg por UHPLC

HCTZ				VAL			
Concentración (mg)	DIA 1 mg	DIA 2 mg	DIA 3 mg	Concentración (mg)	DIA 1 mg	DIA 2 mg	DIA 3 mg
10	10.1	10.2	10.0	60.0	60.2	60.0	60.4
10	10.1	10.1	10.2	60.0	60.4	60.2	60.9
10	10.2	10.1	10.2	60.0	60.1	60.8	61.2
10	10.2	10.1	10.1	60.0	59.7	60.2	60.3
10	10.1	10.1	10.0	60.0	59.5	60.8	59.4
10	10.2	10.1	10.1	60.0	60.4	60.5	60.3

Tabla 4.13. Resultados HCTZ 10 mg y VAL 60 mg por HPLC

HCTZ				VAL			
Concentración (mg)	DIA 1 mg	DIA 2 mg	DIA 3 mg	Concentración (mg)	DIA 1 mg	DIA 2 mg	DIA 3 mg
10	9.9	9.9	10.0	60.0	59.7	59.6	60.2
10	10.0	10.0	9.9	60.0	59.4	60.0	60.0
10	9.9	10.0	9.9	60.0	59.8	59.8	59.3
10	9.9	9.9	10.0	60.0	59.8	59.8	59.5
10	10.0	9.9	10.1	60.0	59.8	59.4	59.9
10	10.0	10.0	9.9	60.0	59.2	60.0	60.3

Los valores de los coeficientes de variación obtenidos para hidroclorotiazida y valsartán mediante los métodos UHPLC y HPLC en el rango de trabajo fueron inferiores al 2.0%, lo que aseguran que los dos métodos son precisos. Para comprobar el modelo hipotético se aplicó un análisis de varianza ANOVA para cada concentración para los métodos de UHPLC y HPLC en el rango de trabajo. Puesto que los valores obtenidos de F_{exp} fueron menores que el valor $F_{crítico}$ de 3.68, se indica que no existe diferencia significativa entre las medias de la recuperación de cada concentración en los tres días.

Los resultados estadísticos de la precisión intermedia intradía e interdía para las concentraciones de 10 mg de hidroclorotiazida y 60 mg de valsartán, se indican en la tabla 4.14.

Tabla 4.14. Resultados estadísticos HCTZ 10 mg y VAL 60 mg por UHPLC y HPLC

HCTZ: 10 mg VAL: 60 mg				
Parámetro de validación	UHPLC		HPLC	
	HCTZ	VAL	HCTZ	VAL
Precisión CV (%)				
Intradía	0.58	0.75	0.87	0.50
Interdía	0.58	0.77	0.87	0.51
Recuperación (mg)	10.11	60.30	9.96	59.75
F _{exp} < F _{crítico}	0.51	1.25	0.23	1.15

A continuación, en las tablas 4.15 y 4.16 se muestran los resultados obtenidos para las concentraciones de 20 mg de hidroclorotiazida y 160 mg de valsartán determinados por los métodos UHPLC y HPLC respectivamente.

Tabla 4.15. Resultados HCTZ 20 mg y VAL 160 mg por UHPLC

HCTZ				VAL			
Concentración (mg)	DIA 1 mg	DIA 2 mg	DIA 3 mg	Concentración (mg)	DIA 1 mg	DIA 2 mg	DIA 3 mg
20	20.4	20.0	20.1	160.0	158.8	160.6	160.5
20	20.1	20.1	20.2	160.0	160.1	160.6	160.9
20	20.1	20.1	20.2	160.0	160.5	159.4	161.3
20	20.2	20.2	19.9	160.0	158.5	162.0	159.2
20	20.0	20.1	20.0	160.0	160.2	160.7	159.1
20	20.0	19.8	20.2	160.0	159.9	158.5	162.7

Tabla 4.16. Resultados HCTZ 20 mg y VAL 160 mg por HPLC

HCTZ				VAL			
Concentración (mg)	DIA 1 mg	DIA 2 mg	DIA 3 mg	Concentración (mg)	DIA 1 mg	DIA 2 mg	DIA 3 mg
20	20.0	19.9	19.8	160.0	159.2	161.9	161.2
20	19.8	20.0	19.8	160.0	159.1	159.3	160.9
20	19.9	20.0	19.8	160.0	159.6	159.5	160.9
20	19.9	19.6	20.0	160.0	161.3	159.3	161.0
20	19.9	19.7	19.9	160.0	160.9	159.5	160.0
20	20.1	19.9	19.9	160.0	160.2	160.3	161.0

Los resultados de los coeficientes de variación y los valores de F_{exp} de las concentraciones de 20 mg y 160 mg de hidroclorotiazida y valsartán por los métodos de UHPLC y HPLC se indican en la tabla 4.17.

Tabla 4.17. Resultados estadísticos HCTZ 20 mg y VAL 160 mg por UHPLC y HPLC

HCTZ: 20 mg VAL: 160 mg				
Parámetro de validación	UHPLC		HPLC	
	HCTZ	VAL	HCTZ	VAL
Precisión CV (%)				
Intradía	0.65	0.71	0.63	0.51
Interdía	0.65	0.72	0.63	0.55
Recuperación (mg)	20.08	160.19	19.88	160.27
F _{exp} < F _{crítico}	0.26	1.09	0.53	1.91

Finalmente se muestran los resultados de recuperación obtenidos por los métodos de UHPLC y HPLC en las tablas 4.18 y 4.19 para las concentraciones de 30 mg y 400 mg de hidroclorotiazida y valsartán respectivamente.

Tabla 4.18. Resultados HCTZ 30 mg y VAL 400 mg por UHPLC

HCTZ				VAL			
Concentración (mg)	DIA 1 mg	DIA 2 mg	DIA 3 mg	Concentración (mg)	DIA 1 mg	DIA 2 mg	DIA 3 mg
30	30.0	30.0	30.0	400.0	399.2	400.0	399.5
30	30.0	30.2	30.0	400.0	400.2	399.8	400.3
30	30.0	30.1	30.5	400.0	400.3	400.9	400.0
30	30.2	30.3	30.1	400.0	399.9	399.5	399.9
30	30.0	30.1	29.8	400.0	400.3	400.4	400.4
30	30.2	30.1	30.1	400.0	399.6	399.6	400.5

Tabla 4.19. Resultados HCTZ 30 mg y VAL 400 mg por HPLC

HCTZ				VAL			
Concentración (mg)	DIA 1 mg	DIA 2 mg	DIA 3 mg	Concentración (mg)	DIA 1 mg	DIA 2 mg	DIA 3 mg
30	29.8	30.1	29.9	400.0	399.7	401.1	399.6
30	30.4	29.8	30.2	400.0	398.9	399.5	401.4
30	30.2	30.3	30.0	400.0	398.6	399.8	400.1
30	30.2	30.2	30.4	400.0	400.0	398.2	400.0
30	29.7	29.6	30.2	400.0	398.9	400.5	399.7
30	29.9	30.1	30.1	400.0	399.4	399.2	399.9

Los resultados de los coeficientes de variación intradía e interdía y los valores de F_{exp} se muestran en la tabla 4.20 de las concentraciones de 30 mg de hidroclorotiazida y 400 mg de valsartán por los métodos de UHPLC y HPLC respectivamente.

Tabla 4.20. Resultados estadísticos HCTZ 30 mg y VAL 400 mg por UHPLC y HPLC

HCTZ: 30 mg VAL: 400 mg				
Parámetro de validación	UHPLC		HPLC	
	HCTZ	VAL	HCTZ	VAL
Precisión CV (%)				
Intradía	0.54	0.11	0.86	0.19
Interdía	0.54	0.11	0.86	0.20
Recuperación (mg)	30.09	400.00	30.06	399.69
F _{exp} < F _{crítico}	0.28	0.20	0.35	1.95

4.1.5 Robustez

Los resultados de robustez obtenidos para hidroclorotiazida y valsartán después de la variación de los parámetros analíticos de los métodos de UHPLC y HPLC se indican en las tablas 4.21, 4.22, respectivamente. Los valores absolutos de los factores fueron inferiores a la expresión $S\sqrt{2}$ lo que demuestra que no existe diferencia significativa entre los porcentajes de recuperación obtenidos empleando las condiciones analíticas establecidas para los métodos y los obtenidos en los experimentos en los que se introdujeron variaciones para la cuantificación de los analitos hidroclorotiazida y valsartán, los resultados se muestran en la tabla 25. Por lo tanto, los métodos de UHPLC y HPLC demostraron ser robustos con respecto al contenido de los dos analitos para los cambios en el flujo, la temperatura de la columna, la longitud de onda y el porcentaje de solvente orgánico en la fase móvil.

Tabla 4.21. Esquema de Youden para HCTZ y VAL por UHPLC

Variables	E 1	E 2	E 3	E 4	E 5	E 6	E 7	E 8
Flujo (ml/min): A=0.5, a=0.4	A	A	A	A	a	a	a	a
Temperatura de la columna (°C): B=25, b=20	B	B	b	b	B	B	b	b
Longitud de onda (nm): C=265, c=263	C	c	C	c	C	c	C	c
% de solvente orgánico en la FM: D=50, d=47	D	D	d	d	d	d	D	D
Tiempo de agitación muestra E=30 min, e=28 min	E	e	E	e	e	E	e	E
Filtrado de la muestra F=0.45, f=0.22	F	f	f	F	F	f	f	F
Filtrado de la FM F=0.45 f=0.22	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

Tabla 4.22. Esquema de Youden para HCTZ y VAL por HPLC

Variables	E 1	E 2	E 3	E 4	E 5	E 6	E 7	E 8
Flujo (ml/min): A=0.6, a=0.4	A	A	A	A	a	a	a	a
Temperatura de la columna (°C): B=30, b=20	B	B	b	b	B	B	b	b
Longitud de onda (nm): C=265, c=263	C	c	C	c	C	c	C	c
% de solvente orgánico en la FM: B=gradiente, b=B-3%	D	D	d	d	d	d	D	D
Tiempo de agitación muestra E=30 min, e=28 min	E	e	E	e	e	E	e	E
Filtrado de la muestra F=0.45, f=0.22	F	f	f	F	F	f	f	F
Filtrado de la FM F=0.45, f=0.22	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

Tabla 4.23. Resultados de porcentaje de HCTZ y VAL por UHPLC

Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z
% Hidroclorotiazida	100.73	101.39	100.49	100.15	100.23	101.19	101.07	101.04
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z
% Valsartán	100.51	99.85	100.11	100.51	100.31	100.53	100.50	100.89

Tabla 4.24. Resultados de porcentaje de HCTZ y VAL por HPLC

Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z
% Hidroclorotiazida	99.67	101.84	99.88	100.04	100.03	99.98	100.05	99.89
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z
% Valsartán	99.92	101.65	99.87	99.96	99.84	100.11	100.01	100.19

Tabla 4.25. Diferencias calculadas para HCTZ y VAL por UHPLC y HPLC

N°	UHPLC		HPLC	
	% HCTZ	% VAL	% HCTZ	% VAL
A-a	-0.19	-0.31	0.37	0.31
B-b	0.20	-0.20	0.41	0.37
C-c	-0.31	-0.09	-0.53	-0.57
D-d	0.54	0.07	0.38	0.50
E-e	0.15	0.22	-0.63	-0.34
F-f	-0.50	0.31	-0.53	-0.43
G-g	0.00	0.22	-0.47	-0.39
Media	100.79	100.40	100.17	100.19
S	0.46	0.31	0.69	0.60
$S*\sqrt{2}$	0.65	0.44	0.97	0.85

4.1.6 Límite de detección y cuantificación

Utilizando el método de UHPLC descrito, los límites de detección y cuantificación fueron los que se indican en la Tabla 4.26 para hidroclorotiazida y valsartán.

Tabla 4.26. Resultados del LOD y LOQ HCTZ y VAL por UHPLC

	Límite detección		Límite de cuantificación	
	(µg/ml)	% CV	(µg/ml)	%
HCTZ	0.1	2.5	0.2	99.9
VAL	0.5	1.8	1.0	99.8

Los límites de detección y cuantificación determinados para el método de HPLC para hidroclorotiazida y valsartán se indican en la Tabla 4.27.

Tabla 4.27. Resultados del LOD y LOQ de HCTZ y VAL por HPLC

	Límite detección		Límite de cuantificación	
	(µg/ml)	% CV	(µg/ml)	%
HCTZ	0.2	4.8	0.6	100.0
VAL	0.8	3.6	2.0	99.0

Los bajos valores de los límites de detección y cuantificación para hidroclorotiazida y valsartán demostraron una sensibilidad adecuada de ambos métodos.

4.2 Comparación de métodos UHPLC y HPLC para el análisis de hidroclorotiazida y valsartán en tabletas

La comparación de los resultados obtenidos en cada parámetro de desempeño analizados por los métodos UHPLC y HPLC con respecto a los objetivos de validación se indican en los apéndices. Todos los resultados cumplieron satisfactoriamente con los objetivos de validación propuestos en la presente investigación con lo cual se declaran validados los dos métodos tanto por UHPLC como HPLC para la cuantificación simultánea de hidroclorotiazida y valsartán en tabletas.

En el apéndice A y B se indican la tablas comparativas de los resultados obtenidos frente a los objetivos de validación para hidroclorotiazida y valsartán por el método de UHPLC, mientras que en el apéndice C y D se muestran los resultados para hidroclorotiazida y valsartán por HPLC.

Además, una vez declarado validadas las dos metodologías se procedió analizar muestras de formulaciones de tabletas de 12.5 mg de hidroclorotiazida y 160 mg de valsartán utilizando los métodos validados por UHPLC y HPLC. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.28. Todas las muestras analizadas presentaron contenidos de hidroclorotiazida y valsartán muy cercanos a la cantidad etiquetada. Para comparar los contenidos medios obtenidos por los métodos UHPLC y HPLC se empleó la prueba t de student. No se observaron diferencias significativas entre los resultados, puesto que los valores de t_{exp} fueron inferiores al valor $t_{crítico}$ de 2.07, demostrando que ambos métodos cromatográficos son equivalentes en cuanto al contenido de hidroclorotiazida y valsartán, los resultados se muestran en la tabla 4.29. Sin embargo, el método UHPLC demostró tiempos de retención más bajos para los picos de los analitos lo que permite un análisis de alto rendimiento.

Tabla 4.28. Porcentaje de HCTZ y VAL por UHPLC y HPLC

N°	HCTZ		VAL	
	UHPLC	HPLC	UHPLC	HPLC
	Concentración (%)	Concentración (%)	Concentración (%)	Concentración (%)
1	100.49	101.08	98.35	101.42
2	98.69	99.06	100.04	99.16
3	101.12	99.78	98.63	98.20
4	102.23	99.18	100.49	99.27
5	101.57	101.02	101.56	101.85
6	100.70	99.07	99.42	100.03
7	100.39	99.17	100.13	98.16
8	100.96	99.42	99.67	99.04
9	99.02	99.98	98.83	99.97
10	101.11	99.90	99.27	99.82
11	99.42	101.06	100.30	100.59
12	100.10	99.24	100.33	100.18

Tabla 4.29. Comparación entre los métodos UHPLC y HPLC para HCTZ y VAL

Resultados	HCTZ		VAL	
	UHPLC	HPLC	UHPLC	HPLC
Contenido (mg/tab)	12.56	12.48	159.60	159.69
Contenido (%)	100.48	99.83	99.75	99.81
CV (%)	1.04	0.80	0.91	1.14
$F_{exp} < F_{crítico}$	2.94 < 4.30		0.02 < 4.30	
$t_{exp} < t_{crítico}$	1.71 < 2.07		0.13 < 2.07	

En base a los resultados obtenidos en cada uno de los parámetros de validación se puede asegurar que el método desarrollado por UHPLC ofrece la ventaja sobre el método oficial usando cromatografía líquida convencional, porque muestra un tiempo de ejecución cromatográfico total más rápido y un mejor rendimiento cromatográfico. Dado que se necesita una gran cantidad de muestras para el análisis de control de calidad, la separación UHPLC muy rápida combinada con una eficiencia adecuada descrita en este trabajo permite la aplicación del método para análisis de rutina.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Con la presente investigación se demostró que el método desarrollado por UHPLC es una técnica adecuada para cuantificar simultáneamente hidroclorotiazida y valsartán en comprimidos farmacéuticos. Sin embargo, para lograr la transferencia exitosa del método oficial a la metodología UHPLC se realizaron cambios en la química de la columna y en la composición de la fase móvil obteniendo la resolución apropiada de los dos analitos.
- Los resultados obtenidos de cada parámetro de desempeño de validación para los métodos UHPLC y HPLC cumplen con los criterios estadísticos establecidos. Los coeficientes de correlación obtenidos fueron superiores a 0.995 y ninguno de los residuales estandarizados superaron el valor de 3 absoluto. Los porcentajes de recuperación no difieren significativamente con respecto al material de referencia certificado a igual que los coeficientes de variación no superaron el 1% lo cual indica que la variabilidad de los métodos no es significativa. Finalmente mediante el estudio de robustez se demostró que no hay diferencia significativa en la recuperación frente a pequeñas variaciones de las condiciones de los métodos.
- En comparación con un método de cromatografía líquida convencional, el método por UHPLC promovió tiempos de retención más bajos y un mejor rendimiento cromatográfico, lo que redujo el tiempo de análisis. Al analizar un lote de producto final de comprimidos de hidroclorotiazida y valsartán por el método validado UHPLC se demostró una calidad y un contenido de fármaco adecuado de acuerdo con las cantidades etiquetadas.

5.2 Recomendaciones

- Se recomienda considerar la validación de métodos analíticos una actividad prioritaria para garantizar la fiabilidad de los resultados analíticos de los medicamentos con la finalidad de asegurar la calidad de los mismos, y la seguridad de los pacientes.
- Seguir los procedimientos analíticos descritos en la presente investigación para mantener la reproducibilidad de los resultados.
- De ser posible, adaptar metodologías analíticas haciendo uso de la tecnología UHPLC, para aplicar enfoques cromatográficos más ecológicos dentro del análisis de control de calidad de los medicamentos.

6. Referencias

- [1] Patel P, Ordunez P, DiPette D, Escobar MC, Hassell T, Wyss F, Hennis A, Asma S, Angell S, for the Standardized Hypertension Treatment and Prevention Network. Improved Blood Pressure Control to Reduce Cardiovascular Disease Morbidity and Mortality: The Standardized Hypertension Treatment and Prevention Project. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2016;18(12):1284–1294. DOI: 10.1111/jch.12861.

- [2] Gutiérrez Gómez, Claudia Marcela; Garzón García, Guillermo 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 *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, vol. 6, núm. 1, 2008, pp. 1-26.

- [3] Anette Müllertz Yvonne Perrie Thomas Rades Editors *Analytical Techniques in the Pharmaceutical Sciences* DOI 10.1007/978-1-4939-4029-5.

- [4] Nadeem Siddiqui, Asif Husain, Lakshita Chaudhry, M Shamsheer Alam, Moly Mitra and Parminder S. Bhasin *Pharmacological and Pharmaceutical Profile of Valsartan: A Review Journal of Applied Pharmaceutical Science* 01 (04); 2011: 12-19.

- [5] Márquez Yalta Katina Liseth *Validación del método analítico por UHPLC para la cuantificación de Ácido Acetilsalicílico en tabletas en 100 mg. Trujillo-Perú* 2018.

- [6] Camacho Murillo Diego Gabriel, *Situación actual de la Hipertensión Arterial en Ecuador en relación con Latinoamérica*, 2017.

- [7] Bunc M, Mohorko P, Pleskovic a Valsartán y combinación con Hidroclorotiazida en hipertensión arterial (siicsalud.com).

- [8] Newton PN, Green MD, Fernández FM, Day NPJ, White NJ. Medicamentos antiinfecciosos falsificados. *Lancet Infect Dis*. 2006;6:602–13.
- [9] Nováková L, Matysová L, Solish P. Ventajas de la aplicación de UPLC en el análisis farmacéutico. *Talanta*. 2006;68:908–18.
- [10] Nováková L, Solichová L, Solich P. Ventajas de la cromatografía líquida de ultra rendimiento sobre la cromatografía líquida de alto rendimiento: comparación de diferentes enfoques analíticos durante el análisis del gel de diclofenaco. *J Sep Sci*. 2006;29:2433–43.
- [11] Wu T, Wang C, Wang X, Xiao H, Ma Q, Zhang Q. Comparación de UPLC y HPLC para el análisis de 12 ftalatos. *Cromatografía*. 2008;68:803–6.
- [12] Wren SAC, Tchelitcheff P. Uso de cromatografía líquida de ultra rendimiento en el desarrollo farmacéutico. *J Chromatog A*. 2006;1119:140–6.
- [13] Llerena Béjar, Luis Israel. “Factores que influyen en el cumplimiento de metas del tratamiento de hipertensión arterial en pacientes que acuden al servicio de consulta externa del Hospital Regional Docente Ambato en el período de noviembre del 2010 a enero del 2011”. Julio 2011.
- [14] Bryan Williams, Institute of Cardiovascular Science, University College London, Maple House, 1st Floor, Suite A, 149 Tottenham Court Road, Londres W1T 7DN, Reino Unido. Guía ESC/ESH 2018 sobre el diagnóstico y tratamiento de la hipertensión arterial. *Rev Esp Cardiol*. 2019;72(2):160.e1-e78.
- [15] Pérez Caballero Manuel Delfín y miembros de la Comisión Nacional Técnica Asesora del Programa de Hipertensión arterial. Hipertensión arterial. Guía para la prevención, diagnóstico y tratamiento / Comisión Nacional Técnica Asesora del Programa de Hipertensión arterial. –La Habana: Editorial Ciencias Médicas, 2008.
- [16] <https://go.drugbank.com/drugs/DB00177>.

- [17] Martha Lucia Ruiz Benítez cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y cromatografía de gases (CG) 2020.
- [18] <621> Cromatografía Farmacopea de los Estados Unidos USP.
- [19] The International Pharmacopoeia - Ninth Edition, 2019 1.14.4 High-performance liquid chromatography.
- [20] Gita Chawla and Chanda Ranjan. Principle, Instrumentation, and Applications of UPLC: A Novel Technique of Liquid Chromatography 2016.
- [21] ICH Q2 Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology 2005.

7. Apéndices y anexos

Apéndice A. Tabla comparativa de resultados frente a los objetivos de validación para HCTZ por UHPLC

Parámetros	Objetivos de validación para los métodos por UHPLC y HPLC	UHPLC		
		HCTZ		
Selectividad/ Especificidad	La señal obtenida corresponde únicamente a los analitos en estudio	Los analitos se separan completamente y no presentan interferencias de la matriz ni de los blancos de reactivos		
Linealidad	Ecuación de linealidad: $y = m \cdot x + b$ $r^2 \geq 0.995$ Ninguno de los residuales estandarizados deben exceder un valor absoluto de 3	$y = 11926.03x - 1373.73$ $r^2 = 0.999$ El valor absoluto máximo de los residuales estandarizados es de 1.7		
Exactitud	Porcentaje de recuperación medio: 98.0 % a 102.0 % $t_{calc} < t_{exp}$	$x = 100.0 \%$ $0.03 < 2.3$		
Precisión Repetibilidad Precisión Intermedia	Coeficiente de variación $CVR \leq 2.0 \%$ Coeficiente de variación $CVR \leq 2.0 \%$ $F_{exp} < F_{crítico}$	10 mg	20 mg	30 mg
		0.58%	0.65%	0.54%
		0.58%	0.65%	0.54%
		0.51	0.26	0.28
Límite de detección	Desviación estándar relativa: $< 5.0 \%$	2.5%		
Límite de cuantificación	Porcentaje de recuperación: 98.0 % a 102.0 %	99.90%		
Robustez	No presentar variaciones significativas en la recuperación media	No existe diferencia significativa del porcentaje entre las condiciones nominales y alternativas del método		

Apéndice B. Tabla comparativa de resultados frente a los objetivos de validación para VAL por UHPLC

Parámetros	Objetivos de validación para los métodos por UHPLC y HPLC	UHPLC		
		VAL		
Selectividad/ Especificidad	La señal obtenida corresponde únicamente a los analitos en estudio	Los analitos se separan completamente y no presentan interferencias de la matriz ni de los blancos de reactivos		
Linealidad	Ecuación de linealidad: $y = m \cdot x + b$ $r^2 \geq 0.995$ Ninguno de los residuales estandarizados deben exceder un valor absoluto de 3	$y = 4115.42928x - 1915.42$ $r^2 = 0.999$ El valor absoluto máximo de los residuales estandarizados es de 1.8		
Exactitud	Porcentaje de recuperación medio: 98.0 % a 102.0 % $t_{calc} < t_{exp}$	$x = 99.6 \%$ $1.6 < 2.3$		
Precisión Repetibilidad Precisión Intermedia	Coeficiente de variación $CV_r \leq 2.0 \%$ Coeficiente de variación $CVR \leq 2.0 \%$ $F_{exp} < F_{crítico}$	60 mg	160 mg	400 mg
		0.75%	0.71%	0.11%
		0.77%	0.72%	0.11%
		1.25	1.09	0.20
Límite de detección	Desviación estándar relativa: $< 5.0 \%$	1.8%		
Límite de cuantificación	Porcentaje de recuperación: 98.0 % a 102.0 %	99.80%		
Robustez	No presentar variaciones significativas en la recuperación media	No existe diferencia significativa del porcentaje entre las condiciones nominales y alternativas del método		

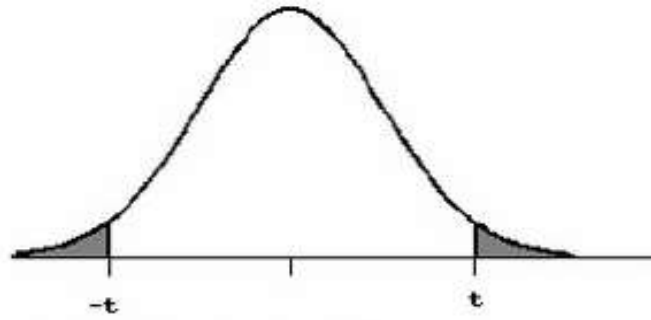
Apéndice C. Tabla comparativa de resultados frente a los objetivos de validación para HCTZ por HPLC

Parámetros	Objetivos de validación para los métodos por UHPLC y HPLC	HPLC		
		HCTZ		
Selectividad/ Especificidad	La señal obtenida corresponde únicamente a los analitos en estudio	Los analitos se separan completamente y no presentan interferencias de la matriz ni de los blancos de reactivos		
Linealidad	Ecuación de linealidad: $y = m \cdot x + b$ $r^2 \geq 0.995$ Ninguno de los residuales estandarizados deben exceder un valor absoluto de 3	$y = 44822.36x - 7781.87$ $r^2 = 0.999$ El valor absoluto máximo de los residuales estandarizados es de 2.6		
Exactitud	Porcentaje de recuperación medio: 98.0 % a 102.0 % $t_{calc} < t_{exp}$	$x = 100.1 \%$ $0.5 < 2.3$		
Precisión Repetibilidad Precisión Intermedia	Coeficiente de variación CVr $\leq 2.0 \%$ Coeficiente de variación CVR $\leq 2.0 \%$ $F_{exp} < F_{critico}$	10 mg	20 mg	30 mg
		0.87%	0.63%	0.86%
		0.87%	0.63%	0.86%
		0.23	0.53	0.35
Límite de detección	Desviación estándar relativa: $< 5.0 \%$	4.8%		
Límite de cuantificación	Porcentaje de recuperación: 98.0 % a 102.0 %	100.0%		
Robustez	No presentar variaciones significativas en la recuperación media	No existe diferencia significativa del porcentaje entre las condiciones nominales y alternativas del método		

Apéndice D. Tabla comparativa de resultados frente a los objetivos de validación para VAL por HPLC

Parámetros	Objetivos de validación para los métodos por UHPLC y HPLC	HPLC		
		VAL		
Selectividad/ Especificidad	La señal obtenida corresponde únicamente a los analitos en estudio	Los analitos se separan completamente y no presentan interferencias de la matriz ni de los blancos de reactivos		
Linealidad	Ecuación de linealidad: $y = m \cdot x + b$ $r^2 \geq 0.995$ Ninguno de los residuales estandarizados deben exceder un valor absoluto de 3	$y = 17414.39x - 8347.07$ $r^2 = 0.999$ El valor absoluto máximo de los residuales estandarizados es de 1.8		
Exactitud	Porcentaje de recuperación medio: 98.0 % a 102.0 % $t_{calc} < t_{exp}$	$x = 100.0 \%$ $0.3 < 2.3$		
Precisión Repetibilidad Precisión Intermedia	Coeficiente de variación $CVR \leq 2.0 \%$ Coeficiente de variación $CVR \leq 2.0 \%$ $F_{exp} < F_{critico}$	60 mg	160 mg	400 mg
		0.50%	0.51%	0.19%
		0.51%	0.55%	0.20%
		1.15	1.91	1.95
Límite de detección	Desviación estándar relativa: $< 5.0 \%$	3.6%		
Límite de cuantificación	Porcentaje de recuperación: 98.0 % a 102.0 %	99.0%		
Robustez	No presentar variaciones significativas en la recuperación media	No existe diferencia significativa del porcentaje entre las condiciones nominales y alternativas del método		

Apéndice E. Tabla de cuantiles de la distribución t de Student



(a) El área de las dos colas está sombreada en la figura.

(b) Si H_A es direccional, las cabeceras de las columnas deben ser divididas por 2 cuando se acota el P-valor.

gl	ÁREA DE DOS COLAS						
	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001	0,0001
1	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	636,619	6366,198
2	1,886	2,920	4,303	6,695	9,925	31,598	99,992
3	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,924	28,000
4	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610	15,544
5	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869	11,178
6	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959	9,082
7	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408	7,885
8	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041	7,120
9	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781	6,594
10	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587	6,211
11	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437	5,921
12	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318	5,694
13	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221	5,513
14	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140	5,363
15	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073	5,239
16	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015	5,134
17	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965	5,044
18	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922	4,966
19	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883	4,897
20	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850	4,837
21	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819	4,784
22	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792	4,736
23	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,767	4,693
24	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745	4,654
25	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725	4,619
26	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707	4,587
27	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,690	4,558
28	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674	4,530
29	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,659	4,506
30	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646	4,482
40	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,551	4,321
60	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,460	4,169
100	1,290	1,660	1,984	2,364	2,626	3,390	4,053
140	1,288	1,656	1,977	2,353	2,611	3,361	4,006
∞	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,291	3,891

Apéndice F. Tabla de valores críticos de la distribución F (0.05)

v/u	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	30	60	∞
1	161,45	199,50	215,71	224,58	230,16	233,99	236,77	238,88	240,54	241,88	243,91	245,95	248,01	250,10	252,20	254,31
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,35	19,37	19,38	19,40	19,41	19,43	19,45	19,46	19,48	19,50
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79	8,74	8,70	8,66	8,62	8,57	8,53
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96	5,91	5,86	5,80	5,75	5,69	5,63
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74	4,68	4,62	4,56	4,50	4,43	4,36
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06	4,00	3,94	3,87	3,81	3,74	3,67
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64	3,57	3,51	3,44	3,38	3,30	3,23
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39	3,35	3,28	3,22	3,15	3,08	3,01	2,93
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14	3,07	3,01	2,94	2,86	2,79	2,71
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98	2,91	2,85	2,77	2,70	2,62	2,54
12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,80	2,75	2,69	2,62	2,54	2,47	2,38	2,30
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59	2,54	2,48	2,40	2,33	2,25	2,16	2,07
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,39	2,35	2,28	2,20	2,12	2,04	1,95	1,84
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,33	2,27	2,21	2,16	2,09	2,01	1,93	1,84	1,74	1,62
60	4,00	3,15	2,76	2,53	2,37	2,25	2,17	2,10	2,04	1,99	1,92	1,84	1,75	1,65	1,53	1,39
∞	3,84	3,00	2,60	2,37	2,21	2,10	2,01	1,94	1,88	1,83	1,75	1,67	1,57	1,46	1,32	1,00