

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



DESARROLLO DE MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE
LOSARTÁN POTÁSICO E HIDROCLOROTIAZIDA TABLETAS POR
ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA VISIBLE PARA LA PRUEBA DE
DISOLUCIÓN

TRABAJO DE GRADO EN MODALIDAD PASANTIA DE INVESTIGACIÓN

PRESENTADO POR:

CESIA SARAHÍ FLORES ROMANO

GUILLERMO SAMUEL PINEDA FLORES

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO(A) EN QUÍMICA Y FARMACIA

NOVIEMBRE 2024

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO JUAN ROSA QUINTANILLA

SECRETARIO GENERAL

LICENCIADO PEDRO ROSALÌO ESCOBAR CASTANEDA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANA

MAESTRA NANCY ZULEYMA GONZÁLEZ SOSA

SECRETARIA

LICENCIADA EUGENIA SORTO LEMUS

DIRECCIÓN GENERAL DE PROCESOS DE GRADO

DIRECTORA GENERAL (AD HONOREM)

MAESTRA KATIA LISSETTE MARTÍNEZ DE PALACIOS

TRIBUNAL EVALUADOR

ASESORES DE ÁREA DE INDUSTRIA FARMACÉUTICA, COSMÉTICOS, VETERINARIA
Y PRODUCTOS AFINES

DOCTORA GUADALUPE DEL CARMEN ABREGO ESCOBAR

MAESTRO ELISEO ERNESTO AYALA MEJÍA

INVESTIGADOR TITULAR:

MAESTRO ENRIQUE POSADA GRANADOS

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer principalmente a Dios por habernos guiado y cuidado a lo largo de nuestra trayectoria universitaria, por habernos bendecido infinitamente en todas las áreas, y sobre todo por permitirnos culminar este hermoso viaje.

A nuestro asesor principal: M.Sc. Enrique Posada Granados, por su ardua labor a favor de esta maravillosa carrera, por su paciencia, apoyo y orientación al momento de cada lección, agradecerle por mostrarnos una de las áreas más complejas e interesantes de nuestra carrera, como lo es la investigación científica, y finalmente, por su confianza, cariño y comprensión a lo largo de esta pasantía de investigación. Se le aprecia mucho.

Al Lic. Julio Henríquez y a la Licda. Aida Rosales, por su paciencia y apoyo durante la realización del servicio social y la pasantía de investigación.

Finalmente, queremos agradecer a todos los docentes de la carrera por impartirnos su conocimiento y forjarnos como profesionales. Gracias infinitas.

DEDICATORIA

Agradecer a Dios todopoderoso, quien me ha guiado por este camino, dándome sabiduría y fortaleza para nunca decaer. Gracias infinitas padre celestial.

A mi Padres, Israel Flores y Aida Romano de Flores. Los pilares fundamentales de mi vida, a los cuales estoy profundamente agradecida por siempre apoyarme, aconsejarme y por mostrarse incondicionales en todo momento. Papá y Mamá, misión cumplida.

A mis hermanos, Israel, Yissela y Azucena por ser mis confidentes, brindarme los mejores consejos y mostrarme las cosas buenas y malas de la vida. Los adoro con todo mi corazón.

A mi familia, por siempre darme palabras de aliento y amor incondicional para nunca decaer a lo largo del camino. Gracias familia.

A mi profesor y gran amigo, Roger Canales, quien me introdujo en el camino de la química y orientó a estudiar esta maravillosa carrera, gracias infinitas.

A mi compañero de tesis, Guillermo Pineda, por habernos apoyado el uno al otro en cada momento a lo largo de estos años, sin él esto no hubiera sido posible.

A mis grandes amigos, Stephany, Sofia, Yessenia, Nivia, Lesly, Isabella y Mauricio, por todos esos momentos de lucha, frustración y victorias. Lo logramos amigos.

Cesia Sarahí Flores Romano

A mi Padre Celestial, por su gran amor y misericordia a lo largo de este trayecto, por darme la vida y las fuerzas necesarias para afrontar cualquier desafío y permitirme culminar mi formación profesional.

A mi madre Floridelma Flores, por ser un pilar fundamental en mi vida, por su apoyo incondicional en todo momento, por guiarme durante toda mi vida por el buen camino y sobre todo por cuidar siempre de mí.

A mi padre, Guillermo Antonio Pineda Taura (QEPD), por haber sido una figura tan importante en mi vida, por cada uno de esas platicas y consejos que jamás se borrarán de mi mente y han sido guía y me han convertido en la persona que soy hoy en día. Sé que me seguirás cuidando allá donde estas, este éxito es para vos.

A mi familia, por todo su apoyo incondicional a lo largo de estos años en cada una de mis decisiones y por haber creído en mí.

A mi persona favorita, Madelyne Bolaños, al amor de mi vida, por todo tu amor y comprensión incluso en aquellos momentos de dificultad, gracias por ser mi motor y por ayudarme a ver las situaciones de la vida siempre de forma positiva, este logro también es por ti.

A mi compañera de tesis, Cesia Flores, por habernos apoyado el uno al otro en cada momento a lo largo de estos años, sin ella esto no hubiera sido posible.

A mis amigos, Stephany, Sofy, Abner, Pedro, Yesenia y Nivia, por todos esos grandes momentos a lo largo de estos años y por todo su cariño. Se les aprecia mucho.

Guillermo Samuel Pineda Flores

INDICE GENERAL

Pag. N°

ABREVIATURAS

RESUMEN

CAPITULO I

1.0 INTRODUCCION 20

CAPITULO II

2.0 OBJETIVOS 23

2.1 Objetivo General 23

2.2 Objetivos Específicos 23

CAPITULO III

3.0 MARCO TEORICO 25

3.1 Generalidades de Losartán potásico. 25

3.1.1 Descripción 25

3.1.2 Propiedades fisicoquímicas 26

3.2 Generalidades de Hidroclorotiazida.(4) 26

3.2.1 Descripción 26

3.2.2 Propiedades fisicoquímicas 27

3.3 Propiedades farmacológicas de Losartán potásico e Hidroclorotiazida. 27

3.3.1 Losartán Potásico 27

3.3.2 Hidroclorotiazida 28

3.4 Propiedades farmacocinéticas Losartán potásico e Hidroclorotiazida. 29

3.4.1 Absorción 29

3.4.2 Distribución 29

3.4.3 Biotransformación 29

3. 4.4	Eliminación	30
3.5	Generalidades de la espectroscopia ultravioleta visible	30
3. 5.1	La Región UV	31
3. 5.2	Región Visible	31
3. 5.3	Origen de los espectros UV-Visible	31
3. 5.4	Identificación: Espectros y estructura.	32
3. 5.5	Confirmación de la identidad	32
3. 5.6	Análisis Cuantitativo	33
3. 5.7	Linealidad	39
3. 5.8	Instrumentación: espectrofotómetro UV-Visible	45
3. 5.9	Tipos de espectrofotómetros	46
3. 5.10	Prueba de Disolución	47
CAPITULO IV		
4.0	DISEÑO METODOLOGICO	51
4.1	Parte práctica: desarrollo analítico	51
4. 1.1	Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de los analitos.	51
4.2	Exploración Analítica y puesta a punto del sistema de lectura	53
4. 2.1	Comprobación del rango de detección fotométrica	55
4.3	Obtención de Datos para creación de Línea de Calibración	58
4. 3.1	Esquema de preparación de soluciones para obtención de línea de calibración	58
4. 3.2	Preparación de soluciones de LOP para línea de calibración	58
4. 3.3	Preparación de soluciones de HCT para la línea de calibración	59
4. 3.4	Preparación del sistema de lectura espectrofotómetro SPECORD 210 plus	60
4. 3.5	Procedimiento de lectura de soluciones estándar para obtención de valores de absorbancia para línea de calibración	61

4.4	Reproducibilidad de los estándares	61
4.5	Determinación del Valor de la Absortividad específica(α) de LOP e HCT para cada longitud de onda por medio de la Línea de Calibración.	61
4.6	Ensayos de Muestra	64
4.6.1	Ensayo Exploratorios	64
4.6.2	Lectura de muestras	65
4.6.3	Cálculos de concentración de LOP e HCT en muestra.	66
4.7	Ensayo según monografía USP “Losartán potásico e Hidroclorotiazida tabletas”	71
4.8	Diseño de Documento de Metodología Analítica	73

CAPITULO V

5.0	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	77
5.1	Etapa Bibliográfica	77
5.2	Caracterización de las propiedades físico-químicas de los analitos	77
5.2.1	Caracterización de la solubilidad de LOP y HCT	77
5.2.2	Caracterización del Comportamiento espectrofotométrico de LOP y HCT	78
5.2.3	Parámetros operativos de la Prueba de Disolución	79
5.3	Comprobación del rango de detección fotométrica del Espectrofotómetro UV-Visible	80
5.4	Selección del punto equivalente del 100% dentro de la línea de calibración	82
5.5	Selección y Evaluación de longitudes de onda	83
5.6	Análisis estadístico de los estándares	95
5.6.1	Repetibilidad del estándar Losartán potásico a longitud de onda α	95
5.6.2	Repetibilidad de LOP estándar a 272 nm a longitud de onda β .	102
5.6.3	Reproducibilidad del estándar LOP a 242 nm a longitud de onda α	103
5.6.4	Repetibilidad del estándar HCT a longitud de onda α 272 nm	109
5.6.5	Repetibilidad de Hidroclorotiazida estándar a longitud de onda β .	117

5. 6.6	Reproducibilidad del estándar HCT a 272 nm (Longitud de onda α)	119
5.7	Determinación del Valor de la Absortividad específica al 1% ($\alpha 1\%$) de LOP e HCT por medio de la Línea de Calibración.	125
5.8	Resultados de ensayos de disolución forzada con muestras	130
5. 8.1	Cálculos de concentración (mg/ml) de LOP e HCT para muestras de disolución forzada: Simultaneo de Ecuaciones	131
5. 8.2	Cálculos de concentración (mg/ml) de LOP e HCT para muestras de disolución forzada: Método Matricial	133
5. 8.3	Calculo de cantidad en miligramos y porcentaje sobre lo rotulado (%SR) en muestras de disolución forzada	137
5.9	Resultados de absorbancia en Prueba de disolución de monografía USP “LOP e HCT tabletas”	140
5. 9.1	Cálculos de concentración de LOP e HCT en muestras de Prueba de Disolución: Simultaneo de Ecuaciones	140
5. 9.2	Cálculos de concentración de LOP e HCT en muestras de Prueba de Disolución: Método Matricial	142
5. 9.3	Calculo de cantidad en miligramos y porcentaje sobre lo rotulado (%SR) en muestras de disolución forzada.	146
5.10	Documento final de Metodología Analítica	14952
CAPITULO VI		
6.0	CONCLUSIONES	154
CAPITULO VII		
7.0	RECOMENDACIONES	157
BIBLIOGRAFIA		
ANEXOS		

INDICE DE TABLAS

Tabla N°		Pág. N°
1	Lista de insumos para la exploración de concentraciones	56
2	Materiales y Equipos para Ensayos de Muestra	66
3	Datos de Absorbancia de Muestras con Disolución Forzada	68
4	Valores de Absorbancia de Muestras en Ensayo.	74
5	Valores de Absorbancia de Muestras en Ensayo.	79
6	Solubilidad según literatura de LOP y HCT en distintos solventes	81
7	Caracterización del comportamiento espectrofotométrico de los analitos	86
8	Valores de absorbancia de HCT para cálculo de coeficiente de determinación (r^2) por longitud de onda	86
9	Valores de absorbancia de LOP para cálculo de coeficiente de determinación (r^2) por longitud de onda	89
10	Distribución de preparaciones estándar para línea de calibración por analista y día	91

Comentado [FK1]: ¿Determinaron uds en forma práctica la solubilidad?

11	Valores de absorbancia por nivel de preparaciones estándar 1-4 de LOP a 242 y 272 nm	94
12	Valores de absorbancia por nivel de preparaciones estándar 1-5 de HCT a 242 y 272 nm	98
13	Repetibilidad del estándar de LOP a 242 nm preparación 1 y 2 (Día 1)	99
14	Repetibilidad. Evaluación estadística de LOP A 242 nm de los factores de respuesta preparación 1 y 2 (Día 1)	101
15	Repetibilidad del estándar de LOP a 242 nm preparación 3 y 4 (Día 2)	102
16	Repetibilidad. Evaluación estadística de los factores de respuesta de LOP a 242nm de la preparación 3 y 4 (Día 2)	104
17	Repetibilidad del estándar de LOP a 272 nm preparación 1,2,3 y 4 (Día 1 y 2)	105
18	Resumen de los resultados de repetibilidad del estándar LOP	106
19	Reproducibilidad del estándar de LOP a longitud de onda α .	107
20	Reproducibilidad. Evaluación estadística de los factores de respuesta de LOP a 242 nm (Variable: Día)	109

21	Reproducibilidad del estándar de LOP a 242 nm	111
22	Resumen de los resultados de reproducibilidad del estándar LOP	112
23	Repetibilidad del estándar de HCT a 272 nm preparación 1 y 2 (Día 1)	113
24	Repetibilidad. Evaluación estadística de los factores de respuesta de HCT a 272 nm de la preparación 1 y 2 (Día 1)	115
25	Repetibilidad del estándar de HCT a 272 nm preparación 3,4 y 5 (Día 2)	116
26	Repetibilidad. Evaluación estadística de los factores de respuesta de HCT de la preparación 3 y 4 (Día 2)	117
27	ANOVA de LOP a 242 nm (variable: preparación)	118
28	Repetibilidad. Evaluación estadística de los factores de respuesta de HCT de la preparación 3 y 5 (Día 2)	120
29	Repetibilidad. Evaluación estadística de los factores de respuesta de HCT de la preparación 4 y 5 (Día 2)	121
30	Repetibilidad del estándar de HCT a 242 nm preparación 1,2,3,4 y 5 (Día 1 y2)	122
31	Resumen de los resultados de repetibilidad del estándar HCT	123

32	Reproducibilidad del estándar de HCT a 272 nm (Variable: Dia 1 y Dia 2)	125
33	Reproducibilidad. Evaluación estadística de los factores de respuesta de HCT a 272nm (Variable: Dia 1 y Dia 2)	127
34	Reproducibilidad del estándar de HCT a 272 nm	129
35	Resumen de los resultados de reproducibilidad del estándar HCT	130
36	Absortividad específica al 1% de LOP a 242 nm	131
37	Absortividad específica al 1% de LOP a 272 nm	132
38	Absortividades específicas al 1% de HCT a 242 nm	133
39	Absortividades específicas al 1% de HCT a 242 nm	141
40	Valores de absorbancia obtenidos en ensayos de disolución forzada	142
41	Valores de absorbancia de ensayo final de prueba de disolución según monografía USP	150

INDICE DE FIGURAS

Figura N°		Pág. N°
1	Formula estructural de Losartán potásico	25
2	Formula estructural de Hidroclorotiazida	26
3	Absorbancias (eje y) frente a concentraciones (eje x)	34
4	Espectro de absorción UV practico de LOP 0.01 mg/ml	80
5	Espectro de absorción UV practico de HCT 0.01 mg/ml	81
6	Espectro de absorción UV de LCP St .al 20% y 100%	82
7	Espectro de absorción UV de HCT St .al 20% y 100%	83
8	Espectro de absorción UV de Mezcla LOP-HCT St. 0.055- 0.014 mg/ml	83
9	Línea de Calibración de LOP ST a 242 nm	87
10	Línea de Calibración de LOP ST a 272 nm	88
11	Línea de Calibración de HCT a 242 nm	88
12	Línea de Calibración de HCT ST a 272 nm	89

INDICE DE ANEXOS

1. Espectro de absorción ultravioleta-visible de LOP
2. Espectro de absorción ultravioleta-visible de HCT
3. Rango de medición fotométrica de espectrofotómetro SPECORD 210 PLUS según manual
4. Monografía de LOP e HCT tabletas
5. Líneas de calibración de estándares a 240, 242, 244, 270, 272, 274 nm

ABREVIATURAS

HPLC:	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
UV-Vis:	Espectrofotometría Ultravioleta-Visible
LOP:	Losartán Potásico
HCT:	Hidroclorotiazida
ICH:	Consejo Internacional de armonización de los requisitos técnicos para el registro de medicamentos de uso humano
OSA:	Organismo Salvadoreño de Acreditación
RTCA:	Reglamento Técnico Centroamericano
ANOVA:	Análisis de Varianza

RESUMEN

En el presente trabajo se propone un método de determinación y cuantificación de Losartán Potásico (LOP) e Hidroclorotiazida (HCT) tabletas bajo la aplicación de la técnica de fotometría ultravioleta-visible. El desarrollo del método se basó en la aplicación de la Ley de Beer para la determinación de dos o más analitos. Se realizaron exploraciones bibliográficas y experimentales, en las cuales se eligió el agua como diluyente y para las exploraciones en el espectro ultravioleta se escogió un rango de 200-800 nm. Se procedió a determinar los máximos y mínimos de absorbancia de cada analito dando como resultado para LOP longitud de onda máxima de 242 nm y mínima 272 nm. HCT una longitud de onda máxima de 272 nm y mínima de 242 nm. Seguidamente se procedió a la creación de una línea de calibración con 10 niveles que van desde 20% (0.1100 mg/ml) hasta 120% (0.6600mg/ml) para LOP y para HCT desde 20% (0.0028 mg/ml) hasta 120% (0.168 mg/ml). La evaluación de los datos obtenidos en cada ensayo de la cuantificación analítica se llevó a cabo mediante la evaluación de las líneas de calibración las cuales se evaluaron estadísticamente mediante el coeficiente de variación y la t de Student, luego se calculó la Absortividad específica de cada principio activo. Al obtener los resultados de absorptividad específica de LOP e HCT se procedió a llevar a cabo la prueba de disolución con las muestras. Posterior a la prueba de disolución se obtuvieron los datos de cuantificación de cada uno de los principios activos, a través de un proceso matemático que se realizó mediante dos vías: por simultáneo de ecuaciones por sustitución simple y método de Cramer a través de resolución matricial, teniendo dos variables (incógnitas) que corresponden con el número de concentraciones de analitos a cuantificar. Los resultados de las muestras fueron los siguientes: un promedio de los %SR del 101.4% para LOP, y de 95.4% para HCT. En los que se obtuvieron los mismos resultados mediante las dos resoluciones matemáticas. Por lo que se concluye que las tabletas evaluadas con el presente método analítico cumplen con lo establecido en la definición expuesta en la monografía USP "Losartán potásico e hidroclorotiazida, tabletas" donde se establece que la muestra debe contener no menos del 95% y no más del 105%.

Comentado [FK2]: OJO

La prueba que están haciendo es de DISOLUCIÓN.
Los límites son otros
Son criterios S1

CAPITULO I

1.0 INTRODUCCIÓN

La UV-Vis permite la caracterización y cuantificación de los analitos presentes en una muestra de una manera sencilla y rápida, tanto para muestras simples como multicomponentes. En la actualidad el análisis de muestras multicomponentes por la técnica espectrofotométrica se va implementando debido a los avances que se han llevado a cabo, reduciendo los tiempos de realización de pruebas de identificación o cuantificación y facilitando el análisis de datos mediante procesos matemáticos en donde se hace uso de las absorbancias de cada longitud de onda correspondiente a los analitos en muestra, permitiendo que en ellos se puedan corregir cada uno de las interferencias obtenidas en los datos, recopilándolos de una forma más exacta y precisa.

En la presente investigación, se buscó demostrar que la técnica UV-Vis es una alternativa apropiada para la prueba de Disolución llevando a cabo un desarrollo de método para la cuantificación simultánea de LOP e HCT tabletas que se encuentren presentes en el mercado del país.

El desarrollo de la metodología analítica permitió obtener en primer lugar los diluentes apropiados tanto para la preparación de los estándares como para la preparación de las muestras. Además, se verificó experimentalmente el espectro ultravioleta de cada uno de los principios activos (con patrones); esto se realizó en un equipo Espectrofotométrico UV-Vis haciendo un barrido en un rango de longitud de onda de 200 a 800 nm, para evaluar la concentración máxima y mínima, en la cual el equipo muestre señales apreciables de absorbancia. La evaluación de los datos obtenidos en cada ensayo de la cuantificación analítica se llevó a cabo mediante la evaluación de linealidad, luego se calculó la Absortividad específica de cada principio activo.

Al obtener los resultados de absortividad de cada uno de los fármacos se procedió a llevar a cabo la prueba de disolución con las muestras. Posterior a la prueba de disolución se obtuvieron los datos de cuantificación de cada uno de los principios activos, a través de un proceso matemático que se realizó mediante dos vías: por simultáneo de ecuaciones por sustitución simple y método de Cramer a través de resolución matricial, teniendo dos variables (incógnitas) que corresponden con el número de concentraciones de analitos a cuantificar.

Con los resultados del estudio, se obtuvieron los parámetros y criterios necesarios para establecer el desarrollo metodológico de esta investigación haciendo uso de la técnica UV-Vis para la determinación simultánea de dos fármacos asociados presentes en un mismo medicamento.

El proyecto se desarrolló en los Laboratorios de Farmacotecnia del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Química y Farmacia.

CAPITULO II

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Desarrollar un método de determinación y cuantificación simultánea por espectrofotometría Ultravioleta-Visible de Losartán potásico e Hidroclorotiazida presentes en tabletas

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de los analitos para el desarrollo de la metodología analítica.
- 2.2.2 Realizar exploración analítica para el establecimiento de las condiciones de la metodología preparativa y del sistema de lectura para la técnica espectrofotométrica.
- 2.2.3 Determinar el valor de absorptividad (ϵ) del estándar de Losartán potásico e Hidroclorotiazida tabletas haciendo uso de la línea de calibración.
- 2.2.4 Realizar ensayos de disolución forzada y prueba de disolución según USP con la técnica espectrofotométrica de Losartán potásico e Hidroclorotiazida tabletas.
- 2.2.5 Elaborar la documentación del método de Disolución de Losartán potásico e Hidroclorotiazida tabletas bajo técnica espectrofotométrica UV-Visible.

CAPITULO III

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades de Losartán potásico. (3)

LOP es un bloqueador de los receptores de angiotensina que se usa para tratar la hipertensión y la nefropatía diabética, y se usa para reducir el riesgo de accidente cerebrovascular.

3.1.1 Descripción

LOP es un bifeníltetrazol donde un grupo 1,1'-bifenilo está unido en la posición 5 y tiene un grupo imidazol-1-ilmetilo trisustituido adicional en la posición 4'. Tiene un papel como agente antihipertensivo, antagonista del receptor de angiotensina., un antagonista del receptor de endotelina y un fármaco antiarritmia. Es un bifeníltetrazol y miembro de los imidazoles. Es un ácido conjugado de LOP(1-).

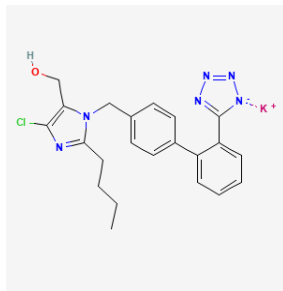


Figura N° 1. Fórmula estructural de Losartán potásico

Fuente: Elaboración propia

Nombre IUPAC: (2-butil-4-cloro-1-([2'-(1H-tetrazol-5-yl)bifenil-4-il]metil)-1H-imidazol-5-il)metanol

Peso molecular: 461,0 g/mol

Fórmula molecular: C₂₂H₂₂ClKN₆O

3. 1.2 Propiedades fisicoquímicas

Polvo cristalino fluido de color blanco a blanquecino. Libremente soluble en agua; soluble en alcoholes; ligeramente soluble en disolventes orgánicos comunes, como acetonitrilo, metiletilcetona / sal monopotásica de LOP

3.2 Generalidades de Hidroclorotiazida,⁽⁴⁾

La HCT es un diurético tiazídico que se usa para tratar el edema asociado con una serie de afecciones y la hipertensión.

3. 2.1 Descripción

La HCT es una benzotiadiazina que es 3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiadiazina 1,1-dióxido sustituido por un grupo cloro en la posición 6 y una sulfonamida en la posición 7. Es un diurético utilizado para el tratamiento de la hipertensión y insuficiencia cardíaca congestiva. Tiene un papel como xenobiótico, contaminante ambiental, diurético y antihipertensivo. Es una benzotiadiazina , una sulfonamida y un compuesto organoclorado.

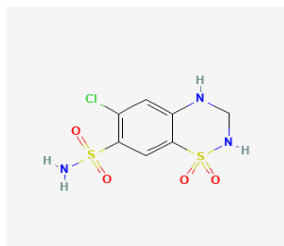


Figura N° 2. Formula estructural de Hidroclorotiazida

Fuente: Elaboración propia

Nombre IUPAC: 6-cloro-1,1-dioxo-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiadiazino-7-sulfonamida.

Peso molecular: 297,741 g/mol

Fórmula molecular: $C_7H_8ClN_3O_4S_2$

3. 2.2 Propiedades fisicoquímicas

Polvo cristalino de color blanco a blanquecino. Soluble en etanol a aproximadamente 750 g/l; soluble en acetona , amoníaco diluido ; libremente soluble en solución de hidróxido de sodio , n-butilamina , dimetilformamida ; moderadamente soluble en alcohol; insoluble en éter, cloroformo , ácidos minerales diluidos y soluble en agua a aproximadamente 722 mg/L a 25 °C.

3.3 Propiedades farmacológicas de Losartán potásico e Hidroclorotiazida.

Se ha demostrado que los componentes tienen un efecto aditivo en la reducción de la presión arterial, por lo que la disminuyen en mayor grado que cada componente por separado. Este efecto se considera resultado de las acciones complementarias de ambas sustancias. Además, como resultado de su acción diurética, HCT aumenta la actividad de la renina plasmática y la secreción de aldosterona, reduce el potasio sérico y aumenta los niveles de angiotensina II. La administración de LOP bloquea todas las acciones fisiológicamente relevantes de la angiotensina II y, mediante la inhibición de la aldosterona, podría tender a atenuar la pérdida de potasio originada por el diurético.

Se ha demostrado que LOP tiene un efecto uricosúrico leve y pasajero. Se ha demostrado que HCT produce pequeñas elevaciones del ácido úrico; la combinación de LOP e HCT tiende a atenuar la hiperuricemia inducida por los diuréticos.

3. 3.1 Losartán Potásico

LOP es un antagonista oral, producido sintéticamente, de los receptores de la angiotensina II (tipo AT1). La angiotensina II, un potente vasoconstrictor, es la principal hormona activa del sistema renina-angiotensina y un determinante importante de la fisiopatología de la hipertensión. La angiotensina II se une al receptor AT1 que se encuentra en muchos tejidos (p. ej. músculo vascular liso, glándula suprarrenal, riñones y corazón) y produce varias e importantes acciones biológicas, incluyendo vasoconstricción y liberación de aldosterona. La angiotensina II también estimula la proliferación de las células musculares lisas. LOP bloquea selectivamente el receptor AT1. In vitro e in vivo, tanto LOP como su metabolito farmacológicamente activo, el ácido carboxílico E-3174,

bloquean todas las acciones fisiológicas importantes de la angiotensina II, independientemente de su origen o vía de síntesis. LOP no tiene un efecto agonista ni bloquea otros receptores hormonales o canales de iones importantes en la regulación cardiovascular. Además, LOP no inhibe la ECA (cininasa II), la enzima que degrada la bradiginina. En consecuencia, no hay aumento de los efectos adversos mediados por la bradiginina. Durante la administración de LOP, la supresión de la retroalimentación negativa que ejerce la angiotensina II sobre la secreción de renina da lugar a un aumento en la actividad de la renina plasmática. El aumento de la actividad de la renina plasmática produce elevaciones plasmáticas de la angiotensina II. Incluso a pesar de estos aumentos, se mantiene la acción antihipertensiva y la supresión de la concentración plasmática de aldosterona, lo que indica que se logra un bloqueo eficaz de los receptores de angiotensina II. Tras la interrupción del tratamiento con LOP, los valores de la actividad de la renina plasmática y de angiotensina II se redujeron en 3 días hasta alcanzar el valor basal. Tanto LOP como su metabolito activo principal tienen mayor afinidad por el receptor AT1 que por el receptor AT2. El metabolito activo es 10-40 veces más activo que LOP basándonos en la relación peso-peso.

En ensayos clínicos controlados, la administración de LOP una vez al día a pacientes con hipertensión esencial leve a moderada produjo reducciones estadísticamente significativas de la presión arterial sistólica y diastólica. La determinación de la presión arterial 24 horas después de la administración, en relación a 5-6 horas después de la administración, demostró un descenso de la presión en 24 horas; se mantuvo el ritmo diurno natural. La reducción de la presión arterial al final del intervalo de dosificación fue de aproximadamente el 70-80% del efecto observado 5-6 horas después de la dosis. La supresión de LOP en pacientes hipertensos no produjo un rebote brusco de la presión arterial. A pesar del descenso importante de la presión arterial, LOP no tuvo un efecto clínicamente relevante sobre la frecuencia cardíaca. LOP es tan eficaz en hombres como en mujeres, y tanto en los hipertensos más jóvenes (menores de 65 años) como en los mayores.

3. 3.2 Hidroclorotiazida

HCT es un diurético tiazídico. No se conoce completamente el mecanismo del efecto antihipertensivo de los diuréticos tiazídicos. Las tiazidas actúan sobre el mecanismo tubular renal de la reabsorción de electrolitos, directamente aumentando la excreción de sodio y de cloruros en 32 cantidades aproximadamente equivalentes. La acción diurética de HCT reduce el volumen plasmático, aumenta la actividad de la renina plasmática y aumenta la excreción de aldosterona,

con los consiguientes aumentos del potasio sérico y pérdida de bicarbonato y descensos en el potasio sérico. La relación renina-aldosterona está mediada por la angiotensina II y, por tanto, la coadministración de un antagonista de la angiotensina II tiende a revertir la pérdida de potasio asociada a los diuréticos tiazídicos. Después de la administración oral, la diuresis empieza a las 24 horas.

3.4 Propiedades farmacocinéticas Losartán potásico e Hidroclorotiazida.

3.4.1 Absorción

Tras la administración oral, LOP se absorbe bien y sufre un metabolismo de primer paso, formando un metabolito activo, el ácido carboxílico, y otros metabolitos inactivos. La biodisponibilidad sistémica de los comprimidos de LOP es de aproximadamente el 33%. Las concentraciones máximas medias de LOP y de su metabolito activo se alcanzan al cabo de 1 hora y de 3-4 horas, respectivamente. Cuando se administra el fármaco con una comida estándar no se producen efectos clínicamente importantes sobre el perfil de concentración plasmática de LOP.

3.4.2 Distribución

Tanto LOP como su metabolito activo se unen a las proteínas plasmáticas, principalmente a la albúmina, en >99%. El volumen de distribución de LOP es de 34 litros. Los estudios en ratas indican que LOP atraviesa la barrera hematoencefálica en proporción escasa o nula.

HCT atraviesa la barrera placentaria, pero no la barrera hematoencefálica, y se excreta en la leche materna.

3.4.3 Biotransformación

LOP Alrededor del 14% de una dosis de LOP administrada por vía oral o intravenosa se transforma en su metabolito activo. Después de la administración oral e intravenosa de LOP marcado con ¹⁴C, la radiactividad del plasma circulante se atribuye principalmente a LOP y a su metabolito activo. En cerca del uno por ciento de los sujetos estudiados se observó una transformación mínima de LOP en su metabolito activo. Además del metabolito activo, se forman metabolitos inactivos, incluidos dos metabolitos importantes formados por hidroxilación de la cadena lateral butilo y un metabolito menor, un glucurónido N-2 tetrazol.

3. 4.4 Eliminación

El aclaramiento plasmático de LOP y de su metabolito activo es de unos 600 y 50 ml/min, respectivamente. El aclaramiento renal de LOP y de su metabolito activo es de unos 74 y 26 ml/min, respectivamente. Cuando se administra LOP por vía oral, alrededor del 4% de la dosis se elimina inalterado en la orina, y aproximadamente el 6% de la dosis se excreta en la orina en forma de metabolito activo. La farmacocinética de LOP y de su metabolito activo es lineal para dosis orales de LOP de hasta 200 mg. 33 Tras la administración oral, las concentraciones plasmáticas de LOP y de su metabolito activo descienden poliexponencialmente, con una semivida terminal de unas 2 horas y de 6-9 horas, respectivamente. Durante la administración de una dosis de 100 mg una vez al día, ni LOP ni su metabolito activo se acumulan significativamente en el plasma. Tanto la excreción biliar como la urinaria contribuyen a la eliminación de LOP y de sus metabolitos. En el hombre, tras una dosis oral de LOP marcado con ¹⁴C, aproximadamente el 35% de la radiactividad se recupera en la orina, y el 58% en las heces.

La HCT no se metaboliza, pero se elimina rápidamente por el riñón. Cuando las concentraciones plasmáticas se controlaron durante al menos 24 horas, se observó que la semivida plasmática variaba entre 5,6 y 14,8 horas. Al menos el 61% de la dosis oral se elimina sin modificar en 24 horas.

3.5 Generalidades de la espectroscopia ultravioleta visible

La radiación ultravioleta (UV) y visible comprende sólo una pequeña parte del espectro electromagnético, que incluye otras formas de radiación como radio, infrarrojo (IR), cósmica y rayos X.

La energía asociada con la radiación electromagnética se define por la siguiente ecuación:

$$E = h\nu \quad (\text{Ecuación N}^\circ 1)$$

donde E es la energía (en julios), h es la constante de Planck (6.62×10^{-34} Js) y ν es la frecuencia (en segundos). (5,6)

3. 5.1 La Región UV

Comprende el rango de longitudes de onda de 195 a 400nm. Los compuestos con dobles enlaces aislados, triples enlaces, enlaces peptídicos, sistemas aromáticos, grupos carbonilos y otros heteroátomos tienen su máxima absorbancia en la región UV, por lo que ésta es muy importante para la determinación cualitativa y cuantitativa de compuestos orgánicos. Diversos factores, como pH, concentración de sal y el disolvente que alteran la carga de las moléculas, provocan desplazamientos de los espectros UV. La fuente de radiación ultravioleta es una lámpara de deuterio.

3. 5.2 Región Visible

Se puede apreciar el color visible de una solución y que corresponde a las longitudes de onda de luz que transmite, no que absorbe. El color que absorbe es el complementario del color que transmite. Por tanto, para realizar mediciones de absorción es necesario utilizar la longitud de onda en la que absorbe luz la solución coloreada. La fuente de radiación visible suele ser una lámpara de tungsteno y nos proporciona suficiente energía por debajo de 320 nm. ^(5,6)

3. 5.3 Origen de los espectros UV-Visible

Cuando la radiación interacciona con la materia, pueden ocurrir varios procesos como reflexión, dispersión, absorbancia, fluorescencia/fosforescencia (absorción y reemisión) y una reacción fotoquímica (absorbancia y rotura de enlaces). En general, cuando se miden espectros UV-visible, sólo es deseable que ocurra absorbancia.

3.5.3.1 Transmitancia y absorbancia

Cuando la luz atraviesa o se refleja en la muestra, la cantidad de luz absorbida es la diferencia entre la radiación incidente (I_0) y la transmitida (I). La cantidad de luz absorbida se expresa como transmitancia o absorbancia. La transmitancia normalmente se da en términos de una fracción de 1 o como porcentaje, y se define como se indica a continuación:

$$T = I / I_0 \quad (\text{Ecuación N}^\circ 2)$$

La absorbancia se define:

$$A = -\log T \quad (\text{Ecuación N}^\circ 3)$$

Para la mayoría de las aplicaciones se utilizan valores de absorbancia, ya que la relación entre ésta y tanto la concentración como el paso óptico es, normalmente, lineal.

3. 5.4 Identificación: Espectros y estructura.

El fundamento de la espectroscopía se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro UV-visible. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica), por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la determinación y caracterización de biomoléculas. ⁽⁵⁾

La espectroscopía UV-visible proporciona información cualitativa limitada. La mayor parte de la absorción de los compuestos orgánicos resulta de la presencia de enlaces π (es decir, insaturados). Un cromóforo es un grupo molecular que, normalmente, contiene un enlace π . Cuando se inserta en un hidrocarburo saturado (que no exhibe un espectro de absorbancia UV-visible), se forma un compuesto con una absorción entre 185 y 1000 nm. ⁽⁵⁻⁷⁾

La presencia de una banda de absorbancia a una determinada longitud de onda es una buena indicación de la presencia de un cromóforo. Sin embargo, la posición del máximo no es fija, sino que depende, en parte, del entorno molecular del cromóforo y del disolvente en el que pueda disolverse la muestra. Otros parámetros, como pH y temperatura, también pueden causar cambios tanto en la intensidad como en la longitud de onda de los máximos de absorbancia.⁽⁸⁾

3. 5.5 Confirmación de la identidad

Aunque los espectros UV-visible no permiten una identificación absoluta, se usan frecuentemente para confirmar la identidad de una sustancia mediante la comparación del espectro medido con uno de referencia.

3. 5.6 Análisis Cuantitativo

3.5.6.1 Ley de Beer

La ley de Beer-Lambert, también conocida como ley de Beer o ley de Beer-Lambert-Bouguer es una relación empírica que relaciona la absorción de luz con las propiedades del material atravesado. En forma independiente, Wilhel Beer y Johann Lambert propusieron que la absorbancia de una muestra a determinada longitud de onda depende de la cantidad de especie absorbente con la que se encuentra la luz al pasar por la muestra. Matemáticamente se expresa de la siguiente manera:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (\text{Ecuación N}^\circ 4)$$

Donde

A : es la absorbancia

ε : es la absortividad

c : es la concentración de las especies absorbentes

l : longitud del camino óptico

La absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración (a mayor número de moléculas mayor interacción de la luz con ella); también depende de la distancia que recorre la luz por la solución, al cual se le denomina camino óptico (a igual concentración, cuanto mayor distancia recorre la luz por la muestra más moléculas se encontrará); y, por último, depende de ε , una constante de proporcionalidad, denominada absortividad, que es específica de cada cromóforo.

(5-7,9)

3.5.6.2 Recta de Regresión.

La ley de Lambert-Beer permite la determinación de concentraciones de disoluciones problema, a partir de una recta de calibrado obtenida midiendo las absorbancias de disoluciones patrón de concentraciones conocidas. Para hacer las determinaciones cuantitativas se elige, en general, la longitud de onda correspondiente a un máximo, pues el error de medición es mínimo y la sensibilidad máxima. Si es válida la ley de Beer para esa sustancia a esas concentraciones, la relación debe ser una recta que pase por el origen de los ejes cartesianos.⁽¹⁰⁾

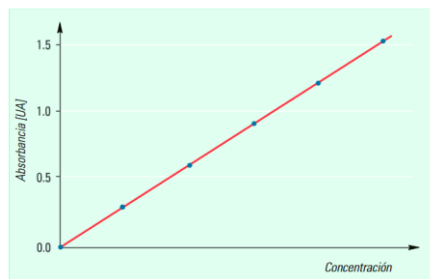


Figura N° 3. Absorbancias frente a concentraciones

Fuente: Elaboración propia

La absorptividad (ϵ) es característico de una sustancia en condiciones definidas de longitud de onda, disolvente y temperatura. En la práctica, la absorptividad medida también depende de las características del instrumento utilizado. Por esta razón, normalmente no se utilizan valores predeterminados del coeficiente de extinción para análisis cuantitativo. En su lugar, se construye una curva de calibración o curva de trabajo para la sustancia a analizar, utilizando una o dos disoluciones patrón con concentraciones conocidas del analito.

3.5.6.3 Principio de aditividad

Según la ley de Beer, la absorbancia es proporcional al número de moléculas que absorben radiación a la longitud de onda especificada. Este principio es cierto si hay presente más de una especie absorbente. Todos los métodos cuantitativos multicomponente están basados en el principio de que la absorbancia de una mezcla a cualquier longitud de onda, es igual a la suma de la absorbancia de cada componente de la mezcla, a esa λ .

Para poder aplicar con éxito la ley de Lambert-Beer a la determinación de concentraciones de mezclas, es necesario que cada compuesto presente un máximo de absorbancia en el espectro ultravioleta-visible a longitudes de onda diferentes.

Para una mezcla en el que se tengan dos incógnitas, el número de longitudes de ondas deberá ser igual al número de componentes a determinar. El tratamiento incluirá la construcción de graficas por el método de los mínimos cuadrados, en el que, se determinarán las absorptividades de las longitudes de onda, con sus respectivas concentraciones. El tratamiento matemático más común para realizar estas determinaciones es el simultaneo de ecuaciones por sustitución para dos incógnitas y el cálculo matricial que permiten determinar dos o más incógnitas. (5,9,11,12)

3.5.6.4 Determinación de la absorptividad específica al 1%

Para poder llevar a cabo la determinación de la absorptividad es necesario construir una línea de calibración, en la cual los valores independientes serán las concentraciones (eje x) versus los términos dependientes las absorbancias (eje y), obedeciendo a la ecuación de primer orden:

$$y = bx + a \quad (\text{Ecuación N}^\circ 5)$$

Sustituyendo los valores de x y y , en que y toma los valores de absorbancia A (respuesta) y x las concentraciones c , queda de la siguiente manera:

$$A = bc + a \quad (\text{Ecuación N}^\circ 6)$$

Sustituyendo la Ecuación N°6 en la N°5, la cual establece que la absorbancia es el resultado de multiplicar la constante de absorptividad por la concentración por la trayectoria óptica de la muestra, queda de la siguiente manera:

$$A = a_{1\%} \cdot c \cdot l \quad (\text{Ecuación N}^\circ 7)$$

Simplificando, la ecuación N°7, en el que el camino óptico que recorre la muestra, o sea la celda comúnmente toma valores de 1 *cm*.

$$A = a_{1\%} \cdot c \quad (\text{Ecuación N}^\circ 8)$$

Despejando el valor de Absorptividad al 1%:

$$a_{1\%} = \frac{A}{c} \quad (\text{Ecuación N}^\circ 9)$$

La absorptividad al ser el resultado de una división de la absorbancia (adimensional) entre los valores de concentración, puede adoptar diferentes nombres: cuando tiene unidades de $\frac{L}{g \cdot cm}$ es conocida como absorptividad específica y cuando unidades de $\frac{L}{mol \cdot cm}$ se llama absorptividad molar.

(5,6,11,12)

3.5.6.5 Método de ecuaciones simultáneas simples

El valor de Absorptividad en las diferentes longitudes de onda, permitirá establecer las ecuaciones en las diferentes longitudes de onda en las que se trabaje, de la siguiente manera:

$$A_1 = a_{1\%_1^m} b c_m + a_{1\%_1^n} b c_n \quad (\text{Ecuación N}^\circ 10)$$

$$A_2 = a_{1\%_2^m} b c_m + a_{1\%_2^n} b c_n \quad (\text{Ecuación N}^\circ 11)$$

Donde:

- 1 y 2 son las longitudes de onda a las cuales se realizan las lecturas en el espectrofotómetro ultravioleta-visible.
- A_1 y A_2 son las absorbancias totales de los analitos presentes en la mezcla a las diferentes longitudes de onda.
- $a_{1\%_1^m}$ y $a_{1\%_2^m}$ son las absorptividades al 1% del analito m , presente en la muestra, a las dos longitudes de onda.
- $a_{1\%_1^n}$ y $a_{1\%_2^n}$ son las absorptividades al 1% del analito n , presente en la muestra, a las dos longitudes de onda.
- c_m y c_n son las concentraciones desconocidas de los analitos m y n respectivamente.
- b es la longitud de celda, que normalmente toma valores de 1 cm .

Las absorptividades de cada compuesto a cada longitud de onda se conocen midiendo las absorptancias de disoluciones de concentraciones conocidas de cada compuesto aislado. Una vez conocidas las absorptividades, tenemos un sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas: las concentraciones de cada compuesto en la mezcla ⁽¹⁰⁾.

Existen diferentes soluciones para encontrar el valor de las incógnitas, las cuales son las concentraciones de los analitos. Haciendo uso del simultaneo de ecuaciones por sustitución se establecen dos ecuaciones, de la siguiente manera:

Despeje de c_m en ecuación N°10, tomando como valor de b igual a 1 cm :

$$c_m = \frac{A_1 - (a1\%_1^n * c_n)}{a1\%_1^m} \quad (\text{Ecuación N°12})$$

Sustituyendo Ecuación N°12 en Ecuación N°11

$$A_2 = a1\%_2^m * \frac{A_1 - a1\%_1^n c_n}{a1\%_1^m} + a1\%_2^n b c_n \quad (\text{Ecuación N°13})$$

Despejando c_N de ecuación N°13

$$c_N = \frac{(A_2 * a1\%_1^m) - (a1\%_2^m * A_1)}{(a1\%_1^m * a1\%_2^n) - (a1\%_2^m * a1\%_1^n)} \quad (\text{Ecuación N° 14})$$

3.5.6.6 Método matricial: regla de cramer para ecuaciones lineales.

La regla de Cramer es un método que permite calcular la solución de un sistema con “n” ecuaciones y “n” incógnitas, siempre y cuando el determinante de la matriz asociada “A” sea diferente a cero.

Esto se resume formalmente a continuación:

Sea un sistema de ecuaciones lineales $Ax = y$.

Si se cumple lo siguiente:

- a) "A" es una matriz cuadrada
- b) $|A| \neq 0$

Sea el siguiente sistema de dos ecuaciones lineales con dos incógnitas:

$$\begin{cases} ax + by = e \\ cx + dy = f \end{cases} \quad (\text{Ecuación N}^\circ 15)$$

Su representación matricial es:

$$\begin{bmatrix} a & b \\ c & d \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x \\ y \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} e \\ f \end{bmatrix} \quad (\text{Ecuación N}^\circ 16)$$

Si el sistema es compatible determinado, la solución viene dada, por la regla de Cramer, por los siguientes cocientes de determinantes:

$$x = \frac{\begin{vmatrix} e & b \\ f & d \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} a & b \\ c & d \end{vmatrix}} = \frac{ed - bf}{ad - bc}, \quad y = \frac{\begin{vmatrix} a & e \\ c & f \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} a & b \\ c & d \end{vmatrix}} = \frac{af - ec}{ad - bc}$$

3.5.6.7 Requisitos de la muestra.

Los métodos de ecuaciones simultáneas simples y cálculo matricial dan resultados exactos sólo si se realiza calibración utilizando patrones puros o mezclas de patrones, para cada componente de la muestra que contribuya al espectro UV. La muestra desconocida no debe tener ninguna capacidad

adicional de absorción e idealmente sus espectros individuales deben de presentar absorbancias máximas a distintas longitudes de onda.⁽⁵⁾

3.5.7 Linealidad

Dentro de este término se incluye la proporcionalidad entre cantidad o concentración de analito y respuesta, así como el intervalo o rango de concentraciones de analito para los cuales el método es satisfactorio. La linealidad se relaciona, además, con la sensibilidad de calibrado o cociente diferencial entre la señal medida y la concentración de analito. Se entiende como linealidad la capacidad de un método analítico de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración de analito en la muestra, dentro de un intervalo determinado. ⁽²⁾

En las medidas UV-visible, la relación lineal más usual es la ley de Beer, que indica que la absorbancia de un soluto es directamente proporcional a su concentración.⁽¹³⁾

3.5.7.1 Determinación de la proporcionalidad y de la linealidad

El ensayo de linealidad puede efectuarse tanto sobre cantidades o soluciones patrón del analito, como sobre muestras problema que contengan cantidades o concentraciones crecientes de analito, efectuándose posteriormente el tratamiento matemático de los resultados analíticos. Normalmente estos cálculos se efectúan con programas de ordenador.

Las fases de este ensayo son las siguientes:

- En primer lugar, conviene cerciorarse de que el intervalo lineal dinámico del sistema instrumental sea más amplio que el intervalo de concentraciones a estudiar. Para ello puede efectuarse un tanteo previo con unos cuantos patrones que abarquen un rango de concentraciones más amplio que el intervalo de concentraciones a establecer (por ejemplo 10 - 200 % del valor declarado). Si la sensibilidad del sistema instrumental se mantiene constante se puede continuar con el estudio completo de linealidad. Si la sensibilidad es variable, es recomendable efectuar el estudio de linealidad a dos niveles de concentración.
- Preparar una serie de patrones de analito de cantidades o concentraciones crecientes. El número de patrones puede estar comprendido entre 3 y 10 y el intervalo de cantidades o concentraciones se selecciona de acuerdo con las cantidades esperadas de analito en la muestra. Así, por ejemplo:

Valoración de una materia prima. Analizar 3-5 patrones a un intervalo de cantidades o concentraciones del 80-120% de la teórica.

Valoración de un principio activo en un producto terminado. Analizar 5-7 soluciones patrón con un intervalo de concentraciones del 50 - 150 % de la teórica. (1,2,14,15)

Si se supone que la cantidad o concentración del analito puede variar ampliamente (ensayos de impurezas o productos de descomposición, determinación de un analito en fluidos biológicos, etc.) los patrones deberán abarcar todo el intervalo de concentraciones previsto (por ejemplo: 10-100 ppm para una impureza; 10 % - 200 % de la concentración promedio del analito en fluidos biológicos).

- Efectuar el análisis siguiendo exactamente el procedimiento descrito. Cada análisis se efectuará como mínimo por duplicado. En procedimientos cromatográficos se recomienda efectuar las inyecciones por triplicado, a no ser que se utilice un procedimiento con patrón interno.
- Determinar la línea de calibración que relaciona respuesta (áreas, alturas, absorbancias, etc.) con cantidad o concentración de analito. Generalmente se halla la recta de regresión por el método de ajuste de los " mínimos cuadrados". En algunos casos se necesita alguna transformación matemática previa (logaritmos, recíprocos) para obtener funciones de calibrado lineales.

$$y = bx + a \quad (\text{Ecuación N}^\circ 17)$$

siendo x la cantidad o concentración, y la respuesta, b el valor de la pendiente y a el valor de la ordenada en el origen.(1,2,14)

3.5.7.2 Representación gráfica de la recta de regresión

Se puede efectuar en papel milimetrado o, preferiblemente, mediante un programa gráfico de ordenador. Conviene representar también los valores experimentales de y . Una gráfica realizada de esta forma da una idea inmediata de la relación entre las dos variables x , y :

- Si la recta no pasa por el origen de coordenadas el método a evaluar está afectado por un error sistemático (sesgo) por defecto o por exceso.
- Si existen diferencias apreciables entre los valores experimentales y los puntos de la recta, significa que la linealidad no es muy buena o que el error experimental es importante y los límites de confianza serán amplios.^(1,2,14)
- Interpretación estadística de la regresión lineal

La representación anterior suele ser suficiente. Sin embargo, conviene efectuar una interpretación estadística de la regresión.

- Coeficiente de Correlación r

El coeficiente de correlación refleja el grado de relación entre las variables x (cantidad o concentración), y (respuesta). Su valor máximo es 1. Si r es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Existen tablas de r que dan el grado de significación del valor obtenido para el coeficiente de correlación.

Fórmula para hallar r :

$$r = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x - \bar{x})^2 \sum(y - \bar{y})^2}} \quad (\text{Ecuación N}^\circ 18)$$

En análisis químico se obtienen valores de r elevados, iguales o superiores a 0,999, si bien en análisis de trazas se aceptan valores más bajos (iguales o superiores a 0,990). Valores muy elevados de r no deben tomarse erróneamente como indicadores de linealidad.

El cuadrado del coeficiente de correlación se denomina coeficiente de determinación e indica la proporción de la varianza total de y que es explicada por el modelo lineal de regresión.

La linealidad se demuestra estadísticamente por otros procedimientos que se describen a continuación. ^(1,2,14)

- Test de linealidad

Existen varios procedimientos para verificar la linealidad:

- Coeficiente de variación de los factores de respuesta (F)

El factor de respuesta es la relación entre la lectura y la cantidad o concentración. Para una cantidad o concentración determinada, el factor de respuesta puede tomarse como una expresión aproximada de la sensibilidad de calibrado a esta cantidad o concentración. En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente; por este motivo se puede tomar el coeficiente de variación de los factores de respuesta como una expresión de la linealidad. Se considera que coeficientes de variación superiores al 5% indican falta de linealidad. En la mayor parte de los casos se trata de una curva sigmoidea (en forma de ese) sobre la cual deberá determinarse la zona de linealidad. (1,2,14)

- Análisis de la varianza de la regresión.

Este método es más riguroso desde el punto de vista matemático, pero sólo puede aplicarse si existen réplicas para cada concentración. El valor de F_{exp} es la relación entre la varianza de curvatura o no linealidad (debida a la falta de ajuste entre la recta de regresión y los datos experimentales) y la varianza dentro de las series (debido al error experimental dentro de las series). Si $F_{exp} < F$ tablas para un grado de significación determinado (generalmente $P = 0,050$ ó $0,01$) implica que la linealidad es correcta.

- Significación Estadística de la Desviación Estándar de la Pendiente b (Test de Proporcionalidad)

A la pendiente b se le llama también coeficiente de regresión. A mayor pendiente, mayor sensibilidad (respuesta del método frente a los cambios de concentración del analito).

- La Desviación Estándar de la Pendiente s_b se utiliza como expresión matemática de la linealidad: a menor Desviación Estándar mejor linealidad. Se determina con una de las fórmulas siguientes

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{Ecuación N}^\circ 19)$$

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}} \quad (\text{Ecuación N}^\circ 20)$$

Siendo $s_{y/x}$ la Desviación Estándar de los Residuos de y (También conocido como: Desviación Estándar del Error Experimental, Error Típico Experimental, Error Aleatorio de la Ordenada o Desviación Estándar de la Regresión) debida a la variación dentro de las series más la variación debida a la falta de ajuste entre la recta de regresión y los datos experimentales.

El valor de $s_{y/x}$ se obtiene por diferentes fórmulas:

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad (\text{Ecuación N}^\circ 21)$$

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y_i^2 - a \sum y_i - b \sum x_i y_i}{n - 2}} \quad (\text{Ecuación N}^\circ 22)$$

- Para expresar la linealidad también se utiliza la desviación estándar relativa $DER(b)$:

$$DER(b) = \frac{s_b}{b} 100 \quad (\text{Ecuación N}^\circ 23)$$

- Los Límites de Confianza de la Pendiente $LC(b)$ se hallan a partir de la expresión:

$$LC(b) = b \pm ts_b \quad (\text{Ecuación N}^\circ 24)$$

siendo t el valor de la distribución de Student para $v = (n - 2)$ grados de libertad a la probabilidad escogida.

- Otro test estadístico de importancia es el Contraste de Significación de la Pendiente:

$$t_{exp}(b) = \frac{|b|}{s_b} \quad (\text{Ecuación N}^\circ 25)$$

En la tabla de $t_{\alpha, v}$ de Student se halla el grado de significación para $v = (n - 2)$ grados de libertad a la probabilidad escogida, en donde la Hipótesis Nula es $H_0: b = 0$

- Significación Estadística de la Desviación Estándar de la Ordenada en el Origen a (Test de Error Sistemático).

El valor de a , ordenada en el origen (También conocido como: intercepción con el eje de ordenadas), indica el error sistemático del método. En el caso ideal debe ser cero.

- La Desviación Estándar de la Ordenada en el Origen s_a se obtiene por las fórmulas:

$$s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{Ecuación N}^\circ 26)$$

$$s_a = s_b \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n}} \quad (\text{Ecuación N}^\circ 27)$$

- La desviación estándar relativa de la Ordenada en el Origen $DER(a)$ es igual a:

$$DER(a) = \frac{S_a}{a} 100 \quad (\text{Ecuación N}^\circ 28)$$

- Los límites de confianza de la Ordenada en el Origen se hallan a partir de la expresión:

$$LC(a) = a \pm t s_a \quad (\text{Ecuación N}^\circ 29)$$

siendo t el valor de la distribución de Student para $v = (n - 2)$ grados de libertad a la probabilidad escogida.

Si estos límites incluyen el cero, se cumple la condición de falta de error sistemático.

- La significación estadística de la Ordenada en el Origen $t_{exp}(a)$ se puede deducir también de la expresión:

$$t_{exp}(a) = \frac{|a|}{S_a} \quad (\text{Ecuación N}^\circ 30)$$

En la tabla de $t_{\alpha,v}$ de Student se halla el grado de significación para $v = (n - 2)$ grados de libertad a la probabilidad escogida, en donde la Hipótesis nula es $H_0: a = 0.05$ (1,2,14)

3. 5.8 Instrumentación: espectrofotómetro UV-Visible

Un espectrofotómetro es un instrumento para medir la transmitancia o absorbancia de una muestra, en función de la longitud de onda de la radiación electromagnética. Los componentes clave de un espectrofotómetro, son:

- Una fuente que genera una banda ancha de radiación electromagnética.
- Un dispositivo de dispersión que selecciona una longitud de onda particular (o más correctamente, una banda de ondas) de la radiación de la fuente.
- Un área de muestra.
- Uno o más detectores para medir la intensidad de la radiación.

Otros componentes ópticos, como lentes o espejos, transmiten la luz a través del instrumento. (5)

3.5.9 Tipos de espectrofotómetros

3.5.9.1 Espectrofotómetro convencional de haz simple

La luz policromática de la fuente se enfoca sobre la rendija de entrada de un monocromador, que transmite selectivamente una estrecha banda de luz. Esta luz, entonces, atraviesa el área de muestra hasta el detector. La absorbancia de la muestra se determina midiendo la intensidad de luz que alcanza el detector cuando no hay muestra (el blanco) y comparándola con la intensidad de la luz que alcanza el detector después de atravesar la muestra. Como se indica anteriormente, la mayoría de los espectrofotómetros contienen dos lámparas, de deuterio y de wolframio y utilizan tubos fotomultiplicadores o, más recientemente, fotodiodos, como detectores. (5,6)

Este diseño es el adecuado para medir la absorbancia en un solo punto del espectro. Es menos apropiado, sin embargo, para medir diferentes compuestos a diferentes longitudes de onda o para obtener espectros de muestras. Para realizar estas tareas con un espectrofotómetro convencional, deben rotarse las partes del monocromador, lo que introduce el problema de irreproducibilidad mecánica en las medidas. Además, la adquisición de datos en serie es un proceso inherentemente lento.

3.5.9.2 Espectrofotómetro de doble haz

El espectrofotómetro de doble haz fue desarrollado para compensar los cambios de intensidad de la lámpara entre las medidas de blanco y muestra. En esta configuración, se coloca un chopper en el paso óptico, cercano a la fuente. El chopper hace que al detector llegue intermitentemente la luz de referencia y la luz que atraviesa la muestra. Gira a una velocidad tal que las medidas alternas de blanco y muestra ocurren varias veces por segundo, corrigiendo, por lo tanto, los cambios a medio y largo plazo de la intensidad de la lámpara (deriva).

Tradicionalmente, la mayor estabilidad de los instrumentos de doble haz, ha sido fundamental en el diseño de los espectrofotómetros de alto rendimiento. Sin embargo, recientes avances en el diseño de lámparas y de la electrónica han mejorado la estabilidad de los espectrofotómetros de haz simple y han llevado a un resurgimiento de esta configuración. Los instrumentos de haz simple

ofrecen mayor sensibilidad y más facilidad de uso, con derivas sólo un factor de dos, peores que las de los instrumentos de doble haz.^(5,6)

3.5.10 Prueba de Disolución

3.5.10.1 Disolución

La disolución es el proceso mediante el cual una sustancia sólida entra en un solvente para dar como resultado una solución. Se define como un proceso dinámico mediante el cual un material es transferido de sólido a solución por unidad de tiempo. La disolución de un fármaco puede describirse en dos etapas. En la primera, las moléculas se liberan de la superficie al medio de disolución circundante, que es una capa estática adyacente a la superficie del sólido. En la segunda etapa, el fármaco difunde en la mayor parte del medio de disolución desde la región de fármaco más concentrada hasta la región de menor concentración.⁽¹⁶⁾

La disolución de un fármaco en una forma de dosificación sólida (tableta o cápsula) está compuesta por al menos dos etapas consecutivas: liberación del fármaco de la matriz de formulación (ejemplo: después de la desintegración de la tableta) y la disolución del fármaco en el medio de disolución. De este modo, para lograr la disolución del fármaco a partir de una forma de dosificación se deben tomar en cuenta las propiedades cohesivas del fármaco formulado y las propiedades físico-químicas intrínsecas de la molécula del fármaco.

Por lo tanto, para el diseño del método de disolución, dependerá de los pasos anteriores, es decir, que la etapa que sea más lenta condicionará el desarrollo del método de disolución. Así, el objetivo de una prueba de disoluciones es ser un método discriminatorio que sea sensible a las variables que impactan en la velocidad de liberación del fármaco y que ayuda a predecir el desempeño biológico.

3.5.10.2 Medio de disolución

Los datos físicos y químicos para el fármaco y la unidad de dosificación deben determinarse antes de seleccionar el medio de disolución. Dos propiedades claves del producto farmacéutico son la solubilidad y la estabilidad del fármaco en solución en función del valor del pH. Cuando se selecciona la composición de medio, se debe evaluar la influencia de las soluciones

amortiguadoras, el valor del pH y los surfactantes respecto a la solubilidad y la estabilidad del fármaco. Las propiedades claves de la unidad de dosificación que pueden afectar la disolución incluyen el mecanismo de liberación (inmediato, retardado o modificado) y la velocidad de desintegración afectados por la dureza, la friabilidad, la presencia de potenciadores de solubilidad y otros excipientes.

Por lo general, cuando se desarrolla un procedimiento de disolución, una meta es tener condiciones de exceso de medio, definido como el volumen de medio igual a por lo menos tres veces el tiempo requerido para formar una solución saturada del fármaco.

No se recomienda emplear una mezcla de un disolvente orgánico y agua como medio de disolución; sin embargo, puede ser aceptable si existe una justificación apropiada para este tipo de medio.

Las características de la disolución de una formulación oral deben evaluarse en el rango de pH fisiológico entre 1.2 y 6.8. Los medios típicos para disolución pueden incluir los siguientes elementos: ácido clorhídrico diluido, agua y surfactantes (con o sin ácidos o soluciones amortiguadoras) tales como polisorbato 80, lauril sulfato de sodio y sales biliares.

Para los aparatos con canastillas o paletas, el volumen del medio de disolución normalmente se encuentra entre 500 mL a 1000 mL, siendo 900mL el volumen más común.

3.5.10.3 Aparatos

La selección del aparato se basa en el conocimiento que se tenga sobre el diseño de la formulación y los aspectos prácticos del desempeño de la forma farmacéutica. El Aparato 1 y el Aparato 2 son los que se utilizan con mayor frecuencia para las formas farmacéuticas orales sólidas.

Para las cápsulas y tabletas de liberación inmediata, los aparatos de mayor uso son el Aparato 1 (canastillas) a 100 rpm o el Aparato 2 (paletas) a 50 ó 75 rpm. La selección de la agitación y la de otros elementos del diseño del estudio para las formas de dosificación de liberación modificada es similar a la de los productos de liberación inmediata.

- El aparato 1

(Aparato con Canastilla) consiste de un vaso, con o sin tapa, de vidrio u otro material inerte y transparente; un motor un eje propulsor metálico y una canastilla cilíndrica. El vaso está parcialmente sumergido en un baño de agua adecuado de cualquier dimensión conveniente o recibe

calor de un dispositivo adecuado, como por ejemplo una camisa de calentamiento. Durante el transcurso de la prueba, el baño de agua o el dispositivo de calentamiento mantienen la temperatura en el interior del vaso a 37 ± 0.5 % y garantizan que el fluido del baño se mantenga en movimiento suave y constante.

El aparato 2

(Aparato con Paleta) consiste en una paleta compuesta por un aspa y un eje, que guarda distancia máxima de 2 mm con respecto a cualquier punto del eje vertical del vaso y rote suavemente sin fluctuaciones que pudieran afectar los resultados. La distancia entre el fondo interno del vaso y el aspa se mantiene en 25 ± 2 mm durante la prueba. La forma de dosificación se hunde hasta el fondo del vaso antes de empezar a rotar el aspa.

CAPITULO IV

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

Se realizó una revisión bibliográfica sobre las propiedades físico-químicas de los principios activos, LOP e HCT individualmente, se enfocó en las propiedades de solubilidad y de comportamiento espectrofotométrico, por medio de sus espectros de absorción en el rango ultravioleta, concentraciones en las que fueron tomados los espectros, valores de solubilidad en diferentes solventes, medios de disolución utilizados para la prueba de disolución. La información se obtuvo haciendo uso de la Farmacopea de Los Estados Unidos (USP), fichas técnicas, monografías, libros y artículos científicos.

Se investigaron, de igual manera, las diferentes concentraciones en las que se encuentran los analitos combinados en tabletas (muestras) en el mercado nacional, y si estos se encuentran a diferentes proporciones.

4.1 Parte práctica: desarrollo analítico

4.1.1 Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de los analitos.

Debido a que cada principio activo presenta factores intrínsecos que pertenecen a su propia individualidad, se hizo la caracterización de las propiedades de solubilidad y de comportamiento espectrofotométrico por cada analito, esta caracterización se realizó de manera bibliográfica en la parte de solubilidad de los analitos y de manera bibliográfica y experimental para el comportamiento espectrofotométrico.

En esta parte fue muy importante información previa obtenida en la etapa bibliográfica, específica de los principios activos para la exploración, como lo son:

- Espectro de Absorción Ultravioleta-Visible de LOP e HCT.
- Concentración de lectura de los espectros.
- Solvente de ensayo de la realización del espectro.

4.1.1.1 Caracterización Físicoquímica: Solubilidad de los Analitos y Muestra.

La caracterización de la solubilidad de LOP e HCT se hizo por medio de la búsqueda en las monografías individuales de cada analito en estudio, estas proporcionaron la solubilidad en términos cualitativos en distintos solventes, los cuales dieron la pauta para conocer el solvente más conveniente a utilizar para realizar las pruebas exploratorias y ensayos.

4.1.1.2 Caracterización Físicoquímica de Analitos: Comportamiento Espectrofotométrico

Se realizó una comprobación de manera experimental de los espectros que se obtuvieron en la etapa bibliográfica, con esto se obtuvo una evidencia práctica que aportó a la caracterización individual del comportamiento espectrofotométrico de los analitos.

Se hizo uso de la siguiente información obtenida de la etapa bibliográfica:

- Solvente
- Espectros UV de LOP e HCT, individuales.
- Concentración de toma de espectros.

Procedimiento para la caracterización:

- Pesar 10.0 mg de estándar en balanza analítica
- Transferir la cantidad pesada a un balón volumétrico de 100.0 ml
- Añadir agua desgasificada al balón volumétrico de 100.0 ml
- Agitar constantemente hasta disolver completamente, y aforar.
- Rotular como solución Madre con concentración de 0.01 mg/ml
- Tomar alícuota de 5.0 ml con pipeta volumétrica y trasladar a balón volumétrico de 50 ml y aforar.
- Rotular como solución de 0.01 mg/ml
- Transferir la solución a celda de cuarzo de 1.0 cm
- Realizar un barrido en la zona de 200 a 400 nm, utilizando el modo "Espectro" en el Espectrofotómetro UV-Visible.

NOTAS:

- Realizar este procedimiento de manera individual por cada uno de los dos analitos.

Con los espectros obtenidos en etapa bibliográfica y práctica, se realizó la caracterización del comportamiento espectrofotométrico de LOP e HCT, gracias a dicha caracterización se conocieron los siguientes elementos que fueron de esencial utilidad en pasos posteriores de nuestro desarrollo del método.

- Longitudes de onda donde se presenten máximos y mínimos de absorción.
- Valores de absorbancia de máximos y mínimos.

4.1.1.3 Parámetros a utilizar en Prueba de Disolución

Se utilizó como guía la USP 44 para ejecutar la prueba de disolución a LOP e HCT tabletas, siguiendo los pasos que se presentan en la monografía “Losartán potásico e Hidroclorotiazida tabletas” específicamente en el apartado de: Pruebas de Desempeño > Disolución> Prueba 1, utilizando tal cual los siguientes parámetros:

- Medio
- Aparato
- Tiempo

4.2 Exploración Analítica y puesta a punto del sistema de lectura para la preparación de la línea de calibración de estándares y el tratamiento de la preparación de la muestra.

4.2.1 Comprobación del rango de detección fotométrica del Espectrofotómetro UV-Visible

En esta sección, se realizó una verificación de manera práctica de la capacidad fotométrica (rango de medición fotométrico) del espectrofotómetro Shimadzu SPECORD 210 plus, esto se realizó para poder poner a punto el sistema de lectura, y conocer de manera práctica hasta que valores de absorbancia el espectrofotómetro utilizado da resultados representativos, desde el nivel más bajo de concentración hasta el nivel más alto, de los analitos en solución.

Para realizar esta comprobación, se realizó la siguiente serie de pasos:

1. Se calculó la concentración en $\frac{mg}{ml}$ que tuvo en solución cada analito luego de realizada la prueba de disolución.

La concentración que representa el 100% del activo en solución, se obtuvo al utilizar la ecuación:

$$\text{Concentración total} = \frac{\text{Gramos totales de analito } x \text{ (mg)}}{\text{Volumen en disolutor (ml)}}$$

Donde,

- Los gramos totales de cada analito se tomaron, basándose en lo que rotula la tableta en miligramos.
 - El volumen se tomó directamente de lo que establece la monografía USP (4.1.1.3 Parámetros a utilizar en Prueba de Disolución)
2. Se prepararon soluciones estándar madre por analito, de las cuales se partió para crear dos niveles de concentración, el de menor y mayor concentración,

(Al tener un conocimiento previo de cuál será la concentración del 100% de cada activo en solución, se eligió el peso de estándar y el volumen a conveniencia para crear las soluciones madre y realizar la dilución de los niveles). La Tabla N° 1 Muestra los insumos que se necesitaron para esta exploración:

Tabla N° 1. Lista de insumos para la exploración de concentraciones

Material y Equipo	Cristalería	Estándares	Diluyente
<ul style="list-style-type: none"> - Espectrofotómetro SPECORD 210 PLUS - Celdas de cuarzo de 1 cm - Balanza SHIMADZU AP224W. 	<ul style="list-style-type: none"> - Balones de 10.0, 50.0 100.0 MI - Pipetas 	<ul style="list-style-type: none"> - LOP - HCT 	<ul style="list-style-type: none"> - Agua desgasificada

Fuente: elaboración propia

4.2.1.1 Preparación de Soluciones de LOP:

- Pesar 11.0 mg de estándar de LOP en balanza analítica.
- Transferir cantidad pesada a un balón volumétrico de 100 ml, diluir con agua desgasificada y aforar.
- Rotular como “LOP solución madre 0.11 mg/ml”
- Tomar una alícuota de 5.0 ml de la solución madre y trasladarla a balón volumétrico de 10 ml
- Aforar con agua desgasificada
- Rotular como “LOP Nivel 100% (0.055 mg/ml)”
- Tomar nuevamente una alícuota de 5.0 ml de la solución madre y trasladarla a un balón volumétrico de 50.0 ml
- Aforar con agua desgasificada
- Rotular como “LCP Nivel 20% (0.011 mg/ml)”

4.2.1.2 Preparación de Soluciones de HCT:

- Pesar 2.8 mg de estándar de HCT en balanza analítica.
- Transferir cantidad pesada a un balón volumétrico de 100.0 ml, diluir con agua desgasificada y aforar.
- Rotular como “HCT solución madre (0.028 mg/ml)”
- Tomar una alícuota de 5.0 ml de la solución madre y trasladarla a balón volumétrico de 10.0 ml
- Aforar con agua desgasificada
- Rotular como “HCT Nivel 100% (0.014 mg/ml)”
- Tomar nuevamente una alícuota de 5.0 ml de la solución madre y trasladarla a un balón volumétrico de 50.0 ml

- Aforar con agua desgasificada
- Rotular como “HCT Nivel 20% (0.0028 mg/ml)”

4.2.1.3 Preparación de solución mezcla de LOP-HCT

- Pesar 11.0 mg de estándar de LOP en balanza analítica.
- Transferir cantidad pesada a un balón volumétrica de 100.0 ml
- Pesar 2.8 mg de estándar de hidroclorotiazida en balanza analítica
- Transferir cantidad pesada al mismo balón de 100.0 ml
- Diluir con agua desgasificada y aforar.
- Rotular balón como “Mezcla LCT-HCT 0.055-0.014 mg/ml

4.2.1.4 Obtención de Espectros de LOP y HCT de absorción para verificación de rango de detección fotométrica

- Tomar alícuota de solución del Nivel 20% y trasladar a celda de cuarzo de 1.0 cm.
- Realizar un barrido en la zona de 200 a 400 nm, utilizando el modo “Espectro” en el Espectrofotómetro UV-Visible.
- Tomar alícuota de solución del Nivel 100% y trasladar a celda de cuarzo de 1 cm.
- Realizar un barrido en la zona de 200 a 400 nm, utilizando el modo “Espectro” en el Espectrofotómetro UV-Visible.
- Tomar alícuota de solución “Mezcla LOP-HCT 0.055-0.014 mg/ml” y trasladar a celda de cuarzo de 1.0 cm.
- Realizar barrido nuevamente en el mismo rango de absorción.

4.2.1.5 Selección del punto equivalente del 100% dentro de la línea de calibración

En esta parte, se utilizarán los resultados obtenidos en la sección 4.2.1 para seleccionar la concentración equivalente al 100% dentro de la línea de calibración.

4.2.1.6 Selección y Evaluación de Longitudes de onda (λ_1 y λ_2)

Preliminarmente, las dos longitudes de onda que se usaran para el desarrollo del método, serán aquellas en las que se presenten máximos de absorción, los cuales serán aportados por LOP e HCT respectivamente.

Adicionalmente, se elegirán longitudes de onda cercanas a los máximos para poder ser evaluadas.

Se plantea realizar los siguientes pasos:

1. Preparar una línea de calibración, formada por seis niveles de concentración, que van del nivel más bajo de concentración (aproximadamente 20%) al nivel más alto (aproximadamente 120%) con respecto al nivel del 100%. Se realizaron por duplicado.
2. Realizar lecturas de los niveles a las longitudes de onda preliminares, utilizando el modo "Fotometría"
3. Obtener matemáticamente el coeficiente de correlación (r) a cada línea de calibración por cada una de las preparaciones
4. Evaluar cada una de las rectas de calibración por preparación mediante el coeficiente de correlación (r)
5. Tomar como longitudes de onda para el estudio, si las líneas de calibración por preparación poseen un " r " mayor a 0.990.
6. Si no se lograra cumplir este requisito, seleccionar otras dos longitudes de onda y realizar el proceso nuevamente.
7. Anotar los valores de coeficiente de correlación obtenidos por cada longitud de onda y preparación.

4.3 Obtención de Datos para creación de Línea de Calibración

4.3.1 Esquema de preparación de soluciones para obtención de línea de calibración

Con el objetivo de obtener una reproducibilidad en las señales de absorbancia y para eliminar cualquier fuente de error se siguió el esquema de trabajo presentado

- Se realizaron preparaciones estándar de LOP y HCT en dos días consecutivos, “Día 1” y “Día 2” realizando dichas preparaciones dos analistas diferentes, “Analista 1” y “Analista 2”.
- En el Día 1, el Analista 1 preparo dos soluciones estándar madre de LOP, con sus respectivas diluciones, mientras que el Analista 2 preparo dos soluciones estándar madre de HCT, de igual forma son sus diluciones.
- En el Día 2, el Analista 2 preparo dos soluciones estándar madre de LOP con sus respectivas diluciones mientras que el Analista 1 preparo tres soluciones estándar madre de HCT con sus diluciones. Haciendo un total de cuatro preparaciones estándar madre de LOP y cinco de HCT, juntando Día 1 y 2.

Al seguir este procedimiento, se omitieron los posibles errores provocados por analista o por mal uso de las pipetas a la hora de realizar las diluciones obteniendo así valores de absorbancia con un mayor grado de confianza.

En secciones 4.3.2 y 4.3.3 se muestran los pasos que se siguieron para la preparación de soluciones usadas en la creación de la línea de calibración.

4.3.2 Preparación de soluciones de LOP para línea de calibración

- Pesar 55.0 mg de estándar de LOP en la balanza analítica
- Transferir cantidad pesada a un balón de 100.0 ml, diluir con agua desgasificada y aforar.
- Rotular como “” LOP Solución Madre 0.55 mg/ml”
- Tomar alícuota de 6.0 ml de solución madre, trasladarla a balón de 50.0 ml y aforar
- Rotular como “LOP 120%”
- Tomar alícuota de 10.0 ml de solución madre, trasladar a balón de 100.0 ml y aforar

- Rotular como “LOP 100%”
- Tomar alícuota de 9.0 ml de solución madre, trasladar a balón de 100.0 ml y aforar.
- Rotular como “LOP 90%”
- Tomar alícuota de 8.0 ml de solución madre, trasladar a balón de 100.0 ml y aforar
- Rotular como “LOP 80%”
- Tomar alícuota de 7.0 ml de solución madre, trasladar a balón de 100.0 ml y aforar.
- Rotular como “LOP 70%”
- Tomar alícuota de 6.0 ml de solución madre, trasladar a balón de 100.0 ml y aforar
- Rotular como “LOP 60%”
- Tomar alícuota de 5.0 ml de solución madre, trasladar a balón de 100.0 ml y aforar.
- Rotular como “LOP 50%”
- Tomar alícuota de 4.0 ml de solución madre, trasladar a balón de 100.0 ml y aforar
- Rotular como “LOP 40%”
- Tomar alícuota de 3.0 ml de solución madre, trasladar a balón de 100.0 ml y aforar.
- Rotular como “LOP 30%”
- Tomar alícuota de 2.0 ml de solución madre, trasladar a balón de 100.0 ml y aforar.
- Rotular como “LCP 20%”

4. 3.3 Preparación de soluciones de HCT para la línea de calibración

- Pesar 35.0 mg de estándar de hidroclorotiazida en la balanza analítica
- Transferir cantidad pesada a un balón de 250.0 ml, diluir con agua desgasificada y aforar.
- Rotular como “” HCT Solución Madre 0.14 mg/ml”
- Tomar alícuota de 6.0 ml de solución madre, trasladarla a balón de 50.0 ml y aforar
- Rotular como “HCT 120%”

- Tomar alícuota de 10.0 ml de solución madre, trasladar a balón de 100.0 ml y aforar
- Rotular como “HCT 100%”
- Tomar alícuota de 9.0 ml de solución madre, trasladar a balón de 100.0 ml y aforar.
- Rotular como “HCT 90%”
- Tomar alícuota de 8.0 ml de solución madre, trasladar a balón de 100.0 ml y aforar
- Rotular como “HCT 80%”
- Tomar alícuota de 7.0 ml de solución madre, trasladar a balón de 100.0 ml y aforar.
- Rotular como “HCT 70%”
- Tomar alícuota de 6.0 ml de solución madre, trasladar a balón de 100.0 ml y aforar
- Rotular como “HCT 60%”
- Tomar alícuota de 5.0 ml de solución madre, trasladar a balón de 100.0 ml y aforar.
- Rotular como “HCT 50%”
- Tomar alícuota de 4.0 ml de solución madre, trasladar a balón de 100.0 ml y aforar
- Rotular como “HCT 40%”
- Tomar alícuota de 3.0 ml de solución madre, trasladar a balón de 100.0 ml y aforar.
- Rotular como “HCT 30%”
- Tomar alícuota de 2.0 ml de solución madre, trasladar a balón de 100.0 ml y aforar.
- Rotular como “HCT 20%”

4. 3.4 Preparación del sistema de lectura espectrofotómetro SPECORD 210 plus

- Abrir AspectUV
- Entrar en Modulo “Fotometría”
- Seleccionar “Configurar método”

- Configurar método para realizar la lectura de valores de absorbancia en las dos longitudes de onda de estudio.

4.3.5 Procedimiento de lectura de soluciones estándar para obtención de valores de absorbancia para línea de calibración

- Realizar lectura de blanco (agua desgasificada)
- Tomar alícuota de solución de nivel del 20% y llevar a celda de cuarzo de 1.0 cm.
- Realizar lectura de valores de absorbancia a las longitudes de onda de estudio.

Se repitieron estos pasos por cada uno de los niveles de concentración (40% al 120%) de cada una de las preparaciones de estándar, tanto de LCP como de HCT.

4.4 Reproducibilidad de los estándares

Se utilizaron el promedio de los datos de las absorbancias (factor de respuesta promedio) de LOP a 242 nm y 272 nm, al igual para HCT 242 nm y 272 nm, tomados por 2 analistas distintos en 4 días diferentes, con el fin de determinar la reproducibilidad de los estándares.

La evaluación se realizó con el coeficiente de variación de los factores de respuesta promedio por cada nivel de cada línea de calibración, en el cual los criterios de evaluación fueron los siguientes:

-Longitud de onda α : $CV_F \leq 10\%$

-Longitud de onda β : $CV_F \leq 15\%$

Obtenidos los valores de coeficiente de variación de los factores de respuesta promedio se evaluó si estaban por debajo de los límites propuestos. Los datos de absorptividad específica de los estándares pudieron ser calculados si estos estaban por debajo del límite de coeficiente de variación.

4.5 Determinación del Valor de la Absortividad específica(a) de LOP e HCT para cada longitud de onda por medio de la Línea de Calibración.

Luego de haber obtenido los valores de absorbancias en cada uno de los niveles de concentración de LOP e HCT a cada una de las dos longitudes de onda, se siguió utilizaron las ecuaciones

planteadas en el marco teórico y se procedió a graficar la concentración en cada nivel (x) versus el promedio del valor de absorbancia (y) dando como resultado una línea de calibración, cuya ecuación es de primer orden:

$$y = mx + b \quad \text{Ecuación (32)}$$

Teniendo en cuenta que la Ley de Beer se ajusta perfectamente a esta relación de primer orden, se realiza la sustitución de variables, donde el valor de absorbancia (A), la variable dependiente sustituye a la “ y ” y el valor de la concentración (C), la variable independiente, sustituye a la “ x ” dando como resultado la siguiente ecuación de trabajo:

$$A = mC + b \quad \text{Ecuación (33)}$$

Al realizar la comparación de esta ecuación con la ecuación representativa de la ley de Beer se obtiene:

$$A = a \cdot b \cdot c \quad \text{Ecuación (34)}$$

Donde:

A : Absorbancia

a : absortividad específica al 1%

b : longitud de la celda (1 cm)

c : concentración del analito.

Debido a que el valor de “ b ” tiene como valor 1, ya que se utilizara una celda con una longitud de recorrido de 1 cm, se puede omitir, dejando la fórmula de la siguiente forma:

$$A = a \cdot c \quad \text{Ecuación (35)}$$

Al igualar ambas ecuaciones se puede establecer que “ m ” es igual a “ a ”, en base a esto podemos concluir que la pendiente es igual al factor de respuesta, en este caso a la absortividad específica de cada analito en estudio.

Para obtener los valores de factor de respuesta, en este caso, la absorptividad específica (a), se resolvió la ecuación 35 para dicha variable, dando como resultado la siguiente ecuación:

$$a = \frac{A}{c} \quad \text{Ecuación (36)}$$

Posteriormente, se obtuvo un valor promedio de absorptividad específica al 1%, utilizando los valores obtenidos con la ecuación 36 para cada nivel (puntos para recta de calibrado). Esto se resume con la ecuación 37

$$a_{px} = \frac{a_{n1} + a_{n2} + a_{n3} + \dots + a_{nx}}{n} \quad \text{Ecuación (37)}$$

Donde:

a_{px} = absorptividad específica de preparación x.

a_{n1} = absorptividad específica de nivel 1 de recta de calibrado

a_{n2} = absorptividad específica de nivel 2 de recta de calibrado

a_{n3} = absorptividad específica de nivel 3 de recta de calibrado

a_{nx} = absorptividad específica de nivel x de recta de calibrado

n = número de niveles para recta de calibrado.

La absorptividad específica se obtuvo de todos los niveles de concentración de LOP e HCT, y por cada uno de las dos longitudes de onda (λ v y w), basados en la curva de calibración de cada uno de ellos.

Posteriormente, se realizó un análisis estadístico a cada una de las rectas de calibrado obtenidas de cada preparación para poder comprobar que los valores de absorptividad específica (factor de respuesta) son normales entre sí; esto con el fin de poder mezclar los datos para obtener una absorptividad específica promedio por cada longitud de onda.

Este análisis estadístico se hizo tanto para las preparaciones de LOP como para las de HCT.

4.6 Ensayos de Muestra

4.6.1 Ensayo Exploratorios

Se tomaron tabletas de Losartán-hidroclorotiazida de la marca MK, con concentración 50-12.5 mg y se sometieron a procedimientos de disolución forzada, con el fin de obtener soluciones donde las concentraciones de los principios activos se liberen 100% o superior respecto a lo rotulado, posteriormente se analizaron dichas muestras en el espectrofotómetro. Se modificaron ciertas condiciones establecidas por la USP, en la monografía de Losartán-hidroclorotiazida tabletas, para poder obtener los resultados deseados. Los materiales y equipos que se necesitaran se detallan en la Tabla N° 2.

Tabla N° 2. Materiales y Equipos para Ensayos de Muestra

Materiales	Equipos	Muestra/Reactivos
-Balones volumétricos	-Disolutor	-Tabletas de Losartán-HCT
-Agitadores magnéticos	-Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible	-Medio de Disolución.
-Diluyente	-Hotplates	
-Pipetas volumétricas		
-Cánulas		
-Jeringas		
-Celda de cuarzo de 1 cm		

Fuente: elaboración propia

4.6.1.1 Disolución forzada con agitación magnética

- Pesar tabletas de LOP-HCT en balanza analítica.
- Agregar una tableta de losartán-HCT MK en balón volumétrico llenado previamente con agua desgasificada
- Colocar balón en hot plate e introducir magneto en el balón

- Elegir parámetros (revoluciones, tiempo, temperatura) a conveniencia con el fin de disolver completamente la tableta.
- Hacer procedimiento por duplicado.
- Una vez disueltas las tabletas, tomar muestra con pipetas
- Trasladar muestras a balones volumétricos y aforar.

4.6.1.2 Disolución forzada Simulando prueba de Disolución

- Montar el equipo de disolución
- Elegir los siguientes parámetros:
 - RPM: 100 rpm
 - Tiempo: 1 hora
 - Temperatura; 37.5 °C
- Llenar vaso de disolutor con agua desgasificada.
- Colocar tableta en el aparato seleccionado (seguir las especificaciones de la monografía USP “Losartán-hidroclorotiazida tabletas” en su apartado de Pruebas de desempeño >Disolución).
- Hacer procedimiento por duplicado.
- Una vez disueltas las tabletas, tomar muestra con cánulas.
- Trasladar muestras a tubos de ensayo.

4.6.2 Lectura de muestras

Finalmente, realizar lecturas de absorbancia en espectrofotómetro, el proceso se realizará de la siguiente manera:

- Tomar muestra con pipeta y colocar la cantidad necesaria en la celda
- Realizar lectura de absorbancia en las longitudes de onda de estudio para cada una de las muestras (se tomarán un total de 4 muestras).

- Anotar valores Tabla N° 3.

Comparar los valores de absorbancia obtenidos en ensayo con los valores obtenidos con los estándares en las exploraciones, para corroborar que no exista ninguna interferencia en la señal de respuesta (excipiente, color).

Tabla N° 3. Datos de Absorbancia de Muestras con Disolución Forzada

MUESTRA	VALORES DE ABSORBANCIA	
	λ_1	λ_2
Balón 1		
Balón 2		
Vaso disolutor 1		
Vaso disolutor 2		

Fuente: elaboración propia

4. 6.3 Cálculos de concentración de LOP e HCT en muestra.

Después de obtener los valores de absorptividad de LOP e HCT estándares a las diferentes longitudes de onda en estudio, y realizar pruebas con las muestras que se utilizaran para obtener los valores de absorbancia de la muestra a las diferentes longitudes de onda, se procederá a realizar la cuantificación analítica de los principios activos en estudio por medio de la creación de ecuaciones que obedecen al principio de aditividad, la cual establece que la absorbancia total de la muestra es obtenida al realizar la suma de la absorbancia individual de cada componente a cierta longitud de onda.

Como previamente se mencionó, se tomarán dos longitudes de onda para realizar la cuantificación, por lo tanto, se harán uso de dos ecuaciones.

Los cálculos realizados se harán utilizando dos métodos matemáticos: Simultaneo de ecuaciones y Resolución de Ecuaciones por medio de Matrices, utilizando el Método de Cramer, por medio de hoja de cálculo en software.

Las ecuaciones a utilizar en este desarrollo se plantearán de la siguiente manera, se usará “L” para referirse a los valores de LOP y “H” para referirse a los valores de HCT:

$$A_1 = a_L^1 b C_L + a_H^1 b C_H \quad \text{Ecuación (38)}$$

$$A_2 = a_L^2 b C_L + a_H^2 b C_H \quad \text{Ecuación (39)}$$

Donde:

C_L : Concentración de LOP.

C_H : Concentración de HCT.

A_1 : Absorbancia de la muestra a longitud de onda 1.

A_2 : Absorbancia de la muestra a longitud de onda 2.

a_H^1 : absortividad especifica de HCT a longitud de onda 1.

a_L^1 : absortividad especifica de LOP a longitud de onda 1.

a_H^2 : absortividad especifica de HCT a longitud de onda 2.

a_L^2 : absortividad especifica de LOP a longitud de onda 2.

4.6.3.1 Cálculo por Simultaneo de Ecuaciones

Teniendo ambas ecuaciones de estudio (Ecuaciones 38 y 39) se procederá con el despeje de variables,

En la ecuación 36 se despejará la variable C_L , obteniendo una nueva ecuación:

$$C_L = \frac{A_1 - a_H^1 C_H}{a_L^1} \quad \text{Ecuación (40)}$$

Posteriormente, se sustituirá la Ecuación 38 en la Ecuación 37

$$A_2 = a_L^2 b \left(\frac{A_1 - a_H^1 C_H}{a_L^1} \right) + a_H^2 b C_H \quad \text{Ecuación (41)}$$

Y se realizará el despeje de la variable C_H , y se obtendrá la ecuación 40:

$$C_H = \frac{A_2 a_L^1 - a_H^2 A_1}{a_L^1 a_H^2 - a_L^2 a_H^1} \quad \text{Ecuación (42)}$$

Luego, se sustituirán los valores dentro de las ecuaciones 38 y 40 para obtener los valores de concentración de LOP e HCT, respectivamente, presentes en la muestra.

Después, se multiplicará cada valor de concentración por su factor de dilución (FD) para encontrar los miligramos disueltos en la prueba:

$$\begin{aligned} C_L \times FD &= mg_L \\ C_H \times FD &= mg_H \end{aligned} \quad \text{Ecuaciones (43 y 44)}$$

Finalmente, se dividirán los miligramos disueltos de cada activo entre los miligramos que rotulan en la muestra, para conocer el % sobre lo rotulado (%SR)

$$\%SR_L = \frac{mg_L \text{ real}}{mg_L \text{ rotula}}$$

Ecuaciones (45 y 46)

$$\%SR_H = \frac{mg_H \text{ real}}{mg_H \text{ rotula}}$$

4.6.3.2 Cálculo por Método Matricial: Regla de Cramer

Teniendo a las ecuaciones 38 y 39 como ecuaciones de estudio, se procederá a la resolución de estas por medio de un sistema matricial de dos incógnitas, conocida también 2x2, utilizando el método de Cramer o solución por determinantes.

$$A_1 = a_L^1 b C_L + a_H^1 b C_H \quad (38)$$

$$A_2 = a_L^2 b C_L + a_H^2 b C_H \quad (39)$$

Como se hizo mención previamente, debido a que se utilizara para las lecturas en el espectrofotómetro, una celda de 1 cm de longitud, la variable “*b*” se vuelve una constante y por eso se puede eliminar, quedando las ecuaciones de estudio de la siguiente manera:

$$A_1 = a_L^1 C_L + a_H^1 C_H \quad \text{Ecuación (47)}$$

$$A_2 = a_L^2 C_L + a_H^2 C_H \quad \text{Ecuación (48)}$$

Dejando solamente los valores de absorptividad de cada analito, (valores obtenidos después de realizar la línea de calibración) para cada longitud de onda y las concentraciones de cada analito, las dos incógnitas.

Las variables a encontrar en las ecuaciones de estudio son las concentraciones de LOP (C_L) y de HCT (C_H),

Teniendo las dos ecuaciones lineales con dos incógnitas se ordenarán como se presentó en la ecuación 40 y 42 y se colocan las variables en su representación matricial como se muestra a continuación:

$$\begin{bmatrix} a_L^1 & a_H^1 \\ a_L^2 & a_H^2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} C_L \\ C_H \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_1 \\ A_2 \end{bmatrix} \quad \text{Ecuación (49)}$$

Se procederá a realizar el arreglo como se presenta en las ecuaciones 49 y 50 y sustituir valores, para obtener los valores de las concentraciones de losartán e HCT presentes en la muestra:

$$C_L = \frac{\begin{vmatrix} A_1 & a_H^1 \\ A_2 & a_H^2 \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} a_L^1 & a_H^1 \\ a_L^2 & a_H^2 \end{vmatrix}} = \frac{(A_1 \times a_H^2) - (a_H^1 \times A_2)}{(a_L^1 \times a_H^2) - (a_H^1 \times a_L^2)} \quad \text{Ecuación (50)}$$

$$C_H = \frac{\begin{vmatrix} a_L^1 & A_1 \\ a_L^2 & A_2 \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} a_L^1 & a_H^1 \\ a_L^2 & a_H^2 \end{vmatrix}} = \frac{(a_L^1 \times A_2) - (A_1 \times a_L^2)}{(a_L^1 \times a_H^2) - (a_H^1 \times a_L^2)} \quad \text{Ecuación (51)}$$

Después, se multiplicará cada valor de concentración por su factor de dilución (FD) para encontrar los miligramos disueltos en la prueba, como se muestra en las ecuaciones 43 y 44:

Finalmente, se dividirán los miligramos disueltos de cada activo entre los miligramos que rotulan en la muestra, para conocer el % sobre lo rotulado (%SR), usando las ecuaciones 45 y 46.

4.7 Ensayo según monografía USP “Losartán potásico e Hidroclorotiazida tabletas”

La presente metodología se guiará en la monografía USP “Losartán potásico e Hidroclorotiazida tabletas” en su apartado de Pruebas de Desempeño-Prueba 1 para realizar la Prueba de Disolución (ver Anexo 4), se realizó el ensayo de acuerdo a dicha monografía, utilizando los siguientes parámetros:

- Medio: Agua; 900 ml, desgasificada
- Aparato 1: 100 rpm
- Tiempo: 30 minutos para LOP y HCT

Se seguirán los siguientes pasos:

- Realizar la Prueba de Disolución utilizando los parámetros establecidos en la monografía USP.

(Se utilizará un total de 6 vasos en el disolutor al momento de realizar la prueba.)

- Tomar muestras con cánulas y trasladar muestras a celda de cuarzo de 1 cm.

(Previamente se determinará si será necesario utilizar dilución para realizar las lecturas de las muestras o si se harán las lecturas de manera directa).

- Leer muestras en el espectrofotómetro, a las dos longitudes de onda previamente elegidas.
- Anotar los valores de absorbancia en la Tabla N° 4.
-

Tabla N° 4. Valores de Absorbancia de Muestras en Ensayo.

VASOS	Valores de Absorbancia	
	λ_1	λ_2

Vaso 1		
Vaso 2		
Vaso 3		
Vaso 4		
Vaso 5		
Vaso 6		

Fuente: elaboración propia

- Utilizar la absortividad especifica
- Con los datos de la Tabla N° 4, realizar los cálculos de las concentraciones.

4.8 Diseño de Documento de Metodología Analítica

	METODO UV-VISIBLE	
<p>LOSARTÁN POTÁSICO-HCT TABLETAS</p> <p><i>DEFINICION</i></p> <p>(Se llenará este espacio de acuerdo a la información establecida en la monografía USP “Losartán potásico e Hidroclorotiazida tabletas.”)</p> <p><i>MATERIALES Y EQUIPO:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Espectrofotómetro UV-visible SPECORD 210 PLUS - Balanzas - Software Aspect Uv - Celda de cuarzo (1 cm de longitud) <p><i>REACTIVOS:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Losartán potásico - Hidroclorotiazida - Solvente según monografía USP <p><i>PREPARACION DE ESTANDAR:</i></p> <p>Pesar en balanza la cantidad previamente elegida de estándar y trasladar a balón volumétrico, añadir diluyente hasta disolver, luego aforar. Repetir proceso para ambos analitos.</p> <p>Dependiendo de la exploración previamente realizada, elegir puntos para conformar curvas de calibración. Repetir proceso para ambos analitos. Elegir de preferencia la cantidad</p>		

mínima de 6 puntos para crear la curva de calibración, incluyendo estos un valor arriba del 100%, el 100% y los valores de preferencia por debajo del 100%.

PREPARACION DE MUESTRA:

DIRECTA:

Al terminada la prueba de disolución, extraer con cánulas y trasladar a tubo de ensayo cantidad suficiente de muestra para ambientar la celda de cuarzo y para lectura.

CON DILUCION:

Al terminar la prueba de disolución, extraer con cánulas y trasladar a beaker pequeño la cantidad necesaria de muestra para realizar la dilución. Transferir con pipeta volumétrica la cantidad previamente elegida de alícuota a un balón volumétrico y llevar a aforo.

PROCEDIMIENTO:

Determinar la cantidad de LOP e HCT disuelta utilizando el espectrofotómetro Ultravioleta-visible, realizando lecturas de absorción a las longitudes de onda elegidas.

CALCULO:

Calcular la cantidad disuelta, en mg, de LOP e HCT haciendo uso de las siguientes formulas:

$$C_L = \frac{A_1 - a_H^1 c_H}{a_L^1} \times FD$$

$$C_H = \frac{A_2 a_L^1 - a_H^2 A_1}{a_L^1 a_H^2 - a_L^2 a_H^1} \times FD$$

Donde:

C_L : Concentracion de LOP.

C_H : Concentracion de HCT.

A_1 : Absorbancia de la muestra a longitud de onda 1.

A_2 : Absorbancia de la muestra a longirud de onda 2.

a_H^1 : absortividad de HCT a longitud de onda 1.

a_L^1 : absortividad de LOP a longirud de onda 1.

a_H^2 : absortividad de HCT a longitud de onda 2.

a_L^2 : absortividad de LOP a longitud de onda 2.

(Documento utilizado para plasmar de manera resumida los pasos a seguir del método para el análisis de muestras.)

CAPITULO V

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Etapa Bibliográfica

Se realizó una búsqueda en monografía y hojas de seguridad sobre las propiedades físico-químicas de ambos analitos, específicamente sobre valores de solubilidad en distintos solventes, se encontró que la solubilidad fue expresada en términos cualitativos. De igual manera, se obtuvieron espectros de absorción ultravioleta en bibliografía que nos dieron pauta para conocer el comportamiento espectrofotométrico de nuestros analitos en estudio de manera individual, dándonos información crucial para el desarrollo de este método.

Los resultados de esta sección se verán reflejados en posteriores secciones de este trabajo.

Comentado [FK3]: Hacer referencia a los anexos. Pues ahí está la información encontrada.

5.2 Caracterización de las propiedades físico-químicas de los analitos

5.2.1 Caracterización de la solubilidad de LOP y HCT

Utilizado la información obtenida en la sección 5.1, se obtuvo la solubilidad de LOP e HCT de manera cualitativa. En la Tabla N°5 se muestra dicha información.

Comentado [FK4]: Es necesario establecer las abreviaturas de los principios activos.

Tabla N° 5. Solubilidad según literatura de LOP y HCT en distintos solventes

ANALITO	SOLUBILIDAD
LCP	Totalmente soluble en agua, metanol etanol y ligeramente soluble en HCL 0,1M. (17)
HCT	Muy ligeramente soluble en agua, soluble en acetona, moderadamente soluble en etanol 96 %. Se disuelve en soluciones diluidas de hidróxidos alcalinos.(4)

Comentado [FK5]: ¿Determinaron uds en forma práctica la solubilidad?

Fuente: elaboración propia

5. 2.2 Caracterización del Comportamiento espectrofotométrico de LOP y HCT

En la sección 5.1 se realizó una búsqueda de los espectros de absorción de LOP y HCT (ver Anexo 1 y 2). La concentración de las soluciones estándar utilizadas para la obtención de estos espectros teóricos fue de 0.1 mg/ml.

Como se planteó en la sección 4.1.1.2, se obtuvieron soluciones estándar de ambos analitos a estas concentraciones y se llevaron a espectrofotómetro Specord 210 Plus para la obtención de espectros de absorción de manera práctica.

La Figura. N° 4 y Figura. N° 5 muestran los espectros de absorción de LOP e HCT, respectivamente, utilizados para realizar la comparación con los espectros teóricos.

Se analizaron espectros teóricos y prácticos y se completó la Tabla N°6.

Comentado [FK6]: Esa tabla lo más seguro es la de la metodología y se convierte, después en la tabla número 7

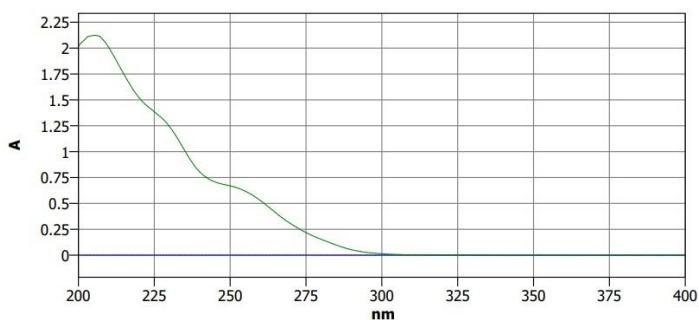


Figura. N° 4. Espectro de absorción UV práctico de LOP 0.01 mg/ml

Fuente: Aspect UV

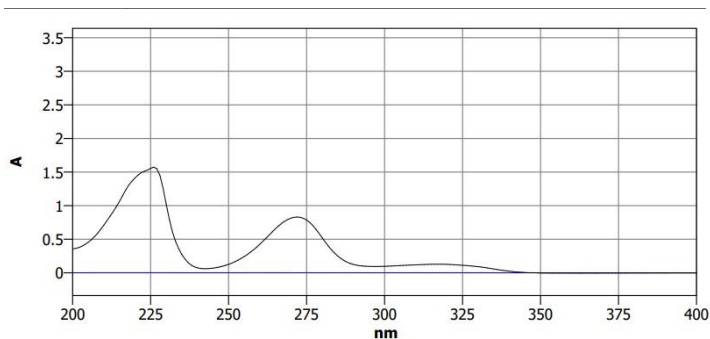


Figura. N° 5. Espectro de absorción UV obtenido experimentalmente de HCT 0.01 mg/ml

Fuente: Aspect UV

Tabla N° 6. Caracterización del comportamiento espectrofotométrico de los analitos

	LCT		HCT	
	Teórico	Practico	Teórico	Practico
λ_{min} y λ_{max}	210/300	205/300	242/272	242/272
	nm	nm	nm	nm

Fuente: elaboración propia

5. 2.3 Parámetros operativos de la Prueba de Disolución

Como se estableció en secciones anteriores, se utilizó la monografía USP 44 de “Losartán-Hidroclorotiazida tabletas” en su apartado de pruebas de desempeño, disolución (Ver Anexo N°4) como base para tomar los parámetros para realizar la prueba de disolución en este trabajo, estos fueron los siguientes:

Medio: Agua Purificada desgasificada, 900 ml

Aparato 1: 100 rpm

Tiempo: 30 minutos para LOP e HCT

5.3 Comprobación del rango de detección fotométrica del Espectrofotómetro UV-Visible

Inicialmente, se realizó una búsqueda en el manual del espectrómetro SPECORD 210 plus para conocer el rango de detección fotométrica que se declara en dicho documento. (Ver Anexo N°3). Se pudo conocer que el rango de detección fotométrica del espectrofotómetro utilizado es de -3 a 3 A.

Partiendo de esta información, se siguió lo planteado en la sección 4.2.1, se realizaron los cálculos para conocer la concentración que presentaran los analitos en solución luego de realizada la prueba de disolución

Partiendo de los cálculos realizados, en las secciones 4.2.1.1 y 4.2.1.2, se crearon las soluciones madre y sus respectivas diluciones para luego ser analizadas en el espectrofotómetro como lo establece la sección 4.2.1.4.

Los resultados obtenidos dicha sección se muestran en la Figura. N° 6 y Figura N°7

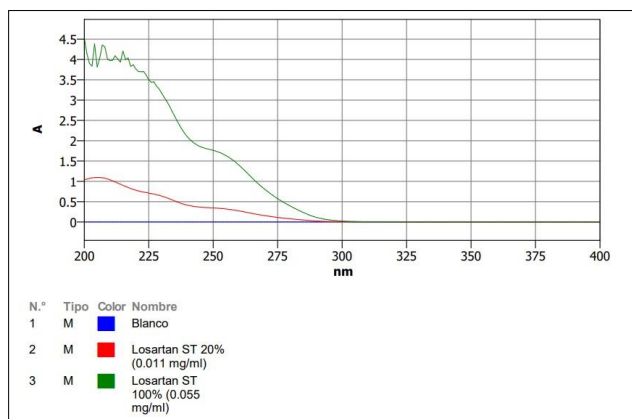


Figura. N° 6. Espectro de absorción UV de LOP St al 20% y 100%

Fuente: Aspect UV

Comentado [FK7]: Es altamente necesario escribir cómo determinaron la concentración a la que se hicieron las exploraciones UV de ambos analitos.... Recuerden que lo que establece a qué concentración se lee, es la concentración de la muestra en el tiempo Q.

El jurado puede pensar que se sacaron de la manga de la camisa la concentración a leer.

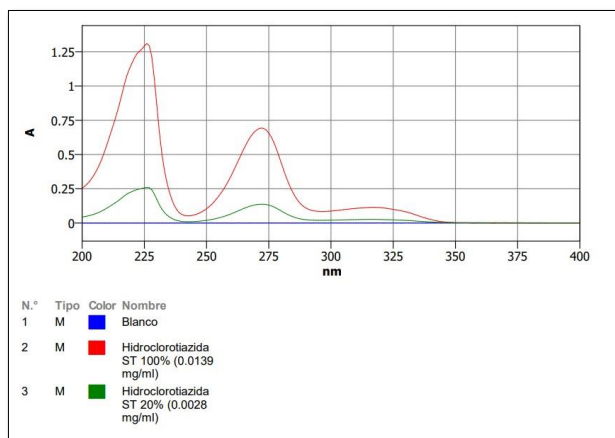


Figura. N° 7. Espectro de absorción UV de HCT St. Al 20% y 100%

Fuente: Aspect UV

Posteriormente, se hizo la lectura de la mezcla de estándares realizada en la sección 4.2.1.3 y se obtuvo el espectro de absorción mostrado en Figura. N° 8.

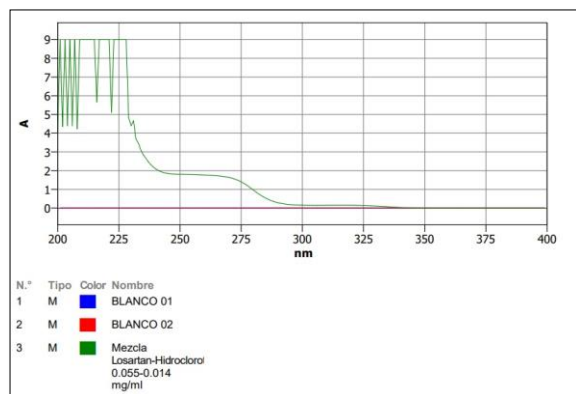


Figura. N° 8. Espectro de absorción UV de Mezcla LOP-HCT St. 0.055-0.014 mg/ml

Fuente: Aspect UV

Al realizar un análisis de la Figura. N° 8 se puede apreciar que el espectro en los niveles altos de absorción, arriba de 3 unidades de absorbancia (A), presenta una saturación en sus picos, dando valores de absorbancia con un porcentaje de error elevado, esto confirma el rango de medición fotométrica expuesto en el manual del equipo, de -3 a 3 A es el correcto.

Habiendo obtenido las Figura. N° 8, podemos confirmar que el equipo es capaz de dar resultados representativos de valores de absorbancia incluso cuando ambos analitos se encuentran en la misma solución al 100% de sus concentraciones esperadas y entra en contexto el principio de aditividad de las señales de absorción, descrito en secciones anteriores, es decir que el equipo no satura aun cuando las señales de cada analito se están sumando.

5.4 Selección del punto equivalente del 100% dentro de la línea de calibración

Se tomó la cantidad total esperada de los ambos analitos en solución luego de realizada la prueba de disolución, como la concentración que representa el 100% dentro de la línea de calibración.

Se realizó el cálculo de la concentración del 100% SR de la muestra, que se planea obtener luego de realizada la prueba de disolución.

Establecidos los parámetros a usar para la prueba de disolución, y las muestras a usar, se tienen los siguientes datos:

- Volumen de medio: 900 ml
- Miligramos totales de LOP en Mx: 50.0 mg
- Miligramos totales de HCT en Mx: 12.5 mg

Se utilizó la ecuación x para la realización del cálculo:

$$\text{Concentración total de LOP} = \frac{\text{Gramos totales de analito } x \text{ (mg)}}{\text{Volumen (ml)}} \quad \text{Ecuación (52)}$$

$$\text{Concentración total de LOP} = \frac{50 \text{ mg de LCP}}{900 \text{ ml}}$$

$$\text{Concentración total} = 0.055 \text{ mg/ml}$$

Comentado [FK8]: Ampliar explicación.

Incluir esquema de dilución de la tableta en vaso disolutor.

Comentado [FK9R8]: ok

$$\text{Concentración total de HCT} = \frac{\text{Gramos totales de analito } x \text{ (mg)}}{\text{Volumen en disolutor (ml)}} \quad \text{Ecuación (53)}$$

$$\text{Concentración total de HCT} = \frac{12.5 \text{ mg de HCT}}{900 \text{ ml}}$$

$$\text{Concentración total} = \mathbf{0.014 \text{ mg/ml}}$$

La concentración al 100% de LOP fue de 0.05 mg/ml

La concentración al 100% de HCT fue de 0.014 mg/ml

5.5 Selección y Evaluación de longitudes de onda

En la sección 5.2.2 se obtuvieron como resultado las longitudes de onda donde los analitos muestran máximos y mínimos de absorción, partiendo de esta información y por lo descrito en secciones anteriores, se eligieron dos longitudes de onda para el desarrollo del método, para la λ_1 se busco seleccionar aquella longitud de onda donde hubiera un máximo de absorción para LOP y un mínimo de absorción de HCT, siguiendo este mismo patrón, para la λ_2 se busco seleccionar aquella longitud de onda que presentara un máximo de absorción para HCT y un mínimo de absorción para LOP

Evaluando las Figura. N° 6 y Figura. N° 7, se decidió tomar preliminarmente, 242 nm y 272 nm como las dos longitudes de onda para realizar el desarrollo del método, esto, ya que en 242 existe un máximo de absorción para LOP y un mínimo de absorción para HCT, y viceversa para 272 nm.

De igual manera, se decidió evaluar 240 y 244 nm, como λ_1 , y a 270m y 274 nm como λ_2 . Se realizaron los pasos presentados en la sección 4.2.1.6 y se obtuvieron los siguientes resultados

Se evaluó cada línea de calibración por analito a cada una de las longitudes propuestas (240, 242, 244, 270, 272, 274 nm)

Tabla N° 7 Valores de absorbancia de HCT para cálculo de coeficiente de determinación (r^2) por longitud de onda

Comentado [FK10]: Incluir a la par de los %, las concentraciones.

Comentado [FK11R10]: ok

N.º	Nombre	240	242	244	270	272	274
1	Blanco 01	-0.0047	-0.0044	-0.0042	-0.0028	-0.0025	-0.0025
2	Blanco 02	-0.0047	-0.0045	-0.0043	-0.0028	-0.0027	-0.0026
3	HCT Estandar. 20% (0.0028 mg/ml)	0.0185	0.0159	0.0164	0.1797	0.1834	0.1791
4	HCT Estandar 40% (0.0056 mg/ml)	0.0446	0.0388	0.0394	0.3647	0.3721	0.3635
5	HCT Estandar 60% (0.0084 mg/ml)	0.0611	0.0528	0.054	0.5432	0.5544	0.5416
6	HCT Estandar 80% (0.0112 mg/ml)	0.0823	0.0716	0.0734	0.7203	0.7353	0.7181
7	HCT Estandar 100% (0.0140 mg/ml)	0.1032	0.0896	0.0921	0.903	0.9226	0.9011
8	HCT Estandar 120% (0.0168 mg/ml)	0.1254	0.1091	0.1122	1.0917	1.1146	1.089
	(r^2)	0.9963	0.9966	0.9958	0.9998	0.9999	0.9998

Fuente: elaboración propia

Tabla N° 8 Valores de absorbancia de LOP para cálculo de coeficiente de determinación (r^2) por longitud de onda

N.º	Nombre	240	242	244	270	272	274
1	Blanco 01	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0001	0.0002
2	Blanco 02	-0.0017	-0.0018	-0.0018	-0.0018	-0.0019	-0.0019
3	LOP Estandar 20% (0.0110 mg/ml)	0.3897	0.3661	0.3501	0.1461	0.1281	0.1115
4	LOP Estandar 40% (0.022 mg/ml)	0.7997	0.7521	0.7198	0.3038	0.2665	0.2316
5	LOP Estandar 60% (0.033 mg/ml)	1.1952	1.1249	1.0769	0.456	0.4	0.3473
6	LOP Estandar 80% (0.044 mg/ml)	1.6009	1.5065	1.443	0.6141	0.5384	0.4675
7	LOP Estandar 100% (0.055 mg/ml)	2.0026	1.8866	1.8053	0.766	0.6722	0.5841
8	LOP Estandar 120% (0.066 mg/ml)	2.3916	2.2539	2.1589	0.9191	0.8062	0.6999
	(r^2)	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999

Fuente: elaboración propia

El Anexo N°5 muestra las líneas de calibración obtenidas por analito a cada una de las longitudes de onda propuestas, en ellas se ven reflejadas los valores de A (pendiente), B (“y” intercepto), y de (r^2), los cuales fueron obtenidos por medio del software AspectUV.

Para la selección de las dos longitudes de onda, se realizó una comparación de los valores de r^2 a 240, 242 y 244 nm para longitud de onda 1 y de 270, 272, y 274 para la longitud de onda 2.

Realizada la comparación de estos valores presentados en las Tabla N°7 y Tabla N°8, se tomó a 242 nm como longitud de onda 1 y a 272 nm como longitud de onda 2.

Cumpliendo con el criterio expuesto previamente donde la longitud de onda 1 debe de ser donde exista un mínimo de absorción para LOP y un máximo de absorción para HCT y viceversa para la longitud de onda 2.

A continuación, se muestran las líneas de calibración obtenidas a 242 y 272 nm, por analito

Comentado [FK12]: Incluir aquí las líneas de calibración a cada longitud de onda... pues son los resultados de la investigación.

Comentado [FK13R12]: ok

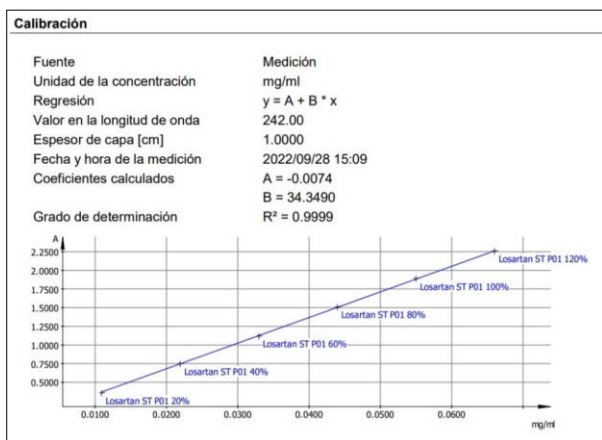


Figura N° 9. Línea de Calibración de LOP ST a 242 nm

Fuente: Aspect UV

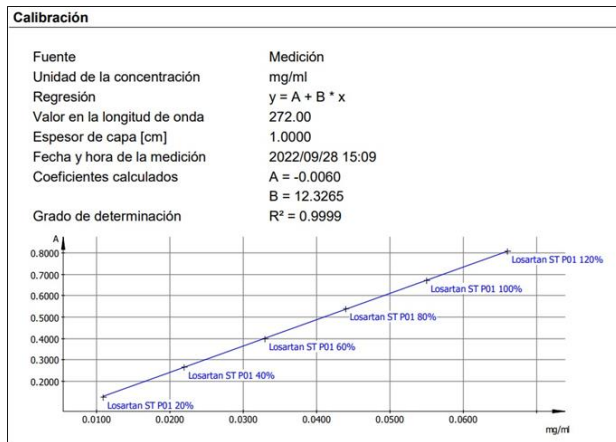


Figura N° 10. Línea de Calibración de LOP ST a 272 nm

Fuente: Aspect UV

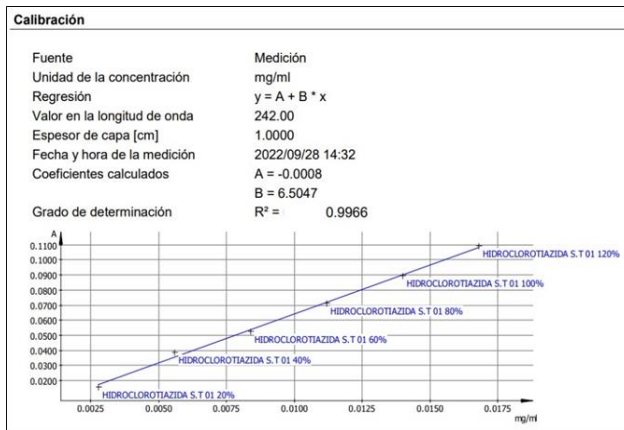


Figura. N° 11. Línea de Calibración de HCT a 242 nm

Fuente: Aspect UV

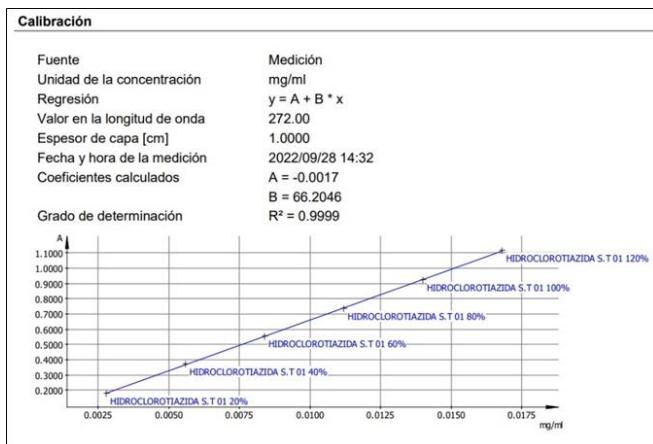


Figura. N° 12. Línea de Calibración de HCT ST a 272 nm

Fuente: Aspect UV

Obtención de Línea de calibración

La sección 4.3.2 y 4.3.3 muestra los pasos que se siguieron para la preparación de las soluciones estándar y sus respectivas diluciones para la obtención de la línea de calibración. Se crearon un total de 4 preparaciones estándar para LOP y 5 para HCT realizadas por diferente analista en dos días diferentes. La Tabla N° 9 muestra la distribución usada para la preparación de dichas soluciones stock.

Tabla N° 9. Distribución de preparaciones estándar para línea de calibración por analista y día

Analistas	DÍA 1	DÍA 2
Analista 1 (Guillermo Pineda)	Prep St. 1,2 de LOP	Prep St. 3,4 y 5 de HCT.
Analista 2 (Cesia Flores)	Prep St. 1 y 2 de HCT.	Prep St. 3 y 4 de LOP.

Fuente: elaboración propia

Comentado [FK14]: Se debe incluir la tabla con todas las líneas de calibración.

Comentado [FK15]: Falta Cesia

Comentado [FK16R15]: ok

Como se estableció en la sección 4.3.5 se realizaron las lecturas de cada uno de los niveles por cada preparación a 242 y 272 nm. A continuación, se muestran las tablas por analito y sus diferentes preparaciones, con sus respectivos resultados de absorptividad por nivel.

Tabla N° 10. Valores de absorbancia por nivel de preparaciones estándar 1-4 de LOP a 242 y 272 nm

LOP Estandar "Preparación 1"				
Nivel	Conc. Teórica (mg/ml)	Conc. (%m/v)	Absorbancia 242 nm	Absorbancia 272 nm
1-20%	.01100	.00110	0.3686	0.1295
2-30%	.01650	.00165	0.5494	0.1952
3-40%	.02200	.00220	0.7406	0.2602
4-50%	.02700	.00270	0.9475	0.3412
5-60%	.03300	.00330	1.1263	0.3972
6-70%	.03800	.00380	1.2963	0.4665
7-80%	.04400	.00440	1.4987	0.5307
8-90%	.04900	.00490	1.6913	0.6036
9-100%	.05500	.00550	1.9475	0.7296
10-120%	.06600	.00660	2.3108	0.8652
LOP Estandar "Preparación 2"				
Nivel	Conc. Teórica (mg/ml)	Conc. (%m/v)	Absorbancia 242 nm	Absorbancia 272 nm
1-20%	.01100	.00110	.3750	0.1322
2-30%	.01650	.00165	.5515	0.1922
3-40%	.02200	.00220	.7284	0.2528
4-50%	.02700	.00270	.9369	0.3339
5-60%	.03300	.00330	1.1222	0.3940
6-70%	.03800	.00380	1.2945	0.4564
7-80%	.04400	.00440	1.4985	0.5274

Comentado [FK17]: la tabla es de varias páginas, así que deben seccionar, y escribir que es continuación. Vean ejemplos de libros....

Comentado [FK18]: Aquí la Concentración es Porcentual. Revisar los conceptos.

Comentado [FK19]: Aquí la Concentración es Porcentual. Revisar los conceptos.

Tabla N°10 (continuación)

8-90%	.04900	.00490	1.6754	0.6002
9-100%	.05500	.00550	1.8814	0.6643
10-120%	.06600	.00660	2.2605	0.7993
LOP Estandar "Preparación 3"				
Nivel	Conc. Teórica (mg/ml)	Conc. (%m/v)	Absorbancia 242 nm	Absorbancia 272 nm
1-20%	.01100	.00110	0.3686	0.1295
2-30%	.01650	.00165	0.5494	0.1952
3-40%	.02200	.00220	0.7406	0.2602
4-50%	.02700	.00270	0.9475	0.3412
5-60%	.03300	.00330	1.1263	0.3972
6-70%	.03800	.00380	1.2963	0.4665
7-80%	.04400	.00440	1.4987	0.5307
8-90%	.04900	.00490	1.6913	0.6036
9-100%	.05500	.00550	1.9475	0.7296
10-120%	.06600	.00660	2.3108	0.8652
LOP Estandar "Preparación 4"				
Nivel	Conc. Teórica (mg/ml)	Conc. (%m/v)	Absorbancia 242 nm	Absorbancia 272 nm
1-20%	.01100	.00110	0.3688	0.1303
2-30%	.01650	.00165	0.5612	0.2013
3-40%	.02200	.00220	0.7358	0.2607
4-50%	.02700	.00270	0.9482	0.3379
5-60%	.03300	.00330	1.1433	0.4076

Comentado [FK20]: Aquí la Concentración es Porcentual.
Revisar los conceptos.

Comentado [FK21]: Aquí la Concentración es Porcentual.
Revisar los conceptos.

Tabla N°10. (Continuación)

6-70%	.03800	.00380	1.3173	0.4707
7-80%	.04400	.00440	1.4997	0.5338
8-90%	.04900	.00490	1.6842	0.6000
9-100%	.05500	.00550	1.8759	0.6684
10-120%	.06600	.00660	2.2472	0.8016

Fuente: elaboración propia

Tabla N° 11. Valores de absorbancia por nivel de preparaciones estándar 1-5 de HCT a 242 y 272 nm.

HCT Estandar "Preparación 1"				
Nivel	Conc. Teórica (mg/ml)	Conc. (%m/v)	Absorbancia 242 nm	Absorbancia 272 nm
1-20%	0.0028	.0003	.0167	.175
2-30%	0.0042	.0004	.0203	.261
3-40%	0.0056	.0006	.0325	.356
4-50%	0.0070	.0007	.0381	.439
5-60%	0.0084	.0008	.0469	.552
6-70%	0.0093	.0009	.0552	.620
7-80%	.0112	.0011	.0632	.728
8-90%	.0126	.0013	.0785	.805
9-100%	.0140	.0014	.0802	.918
10-120%	.0168	.0017	.0955	1.111
HCT Estandar "Preparación 2"				
Nivel	Conc. Teórica (mg/ml)	Conc. (%m/v)	Absorbancia 242 nm	Absorbancia 272 nm
1-20%	0.0028	.0003	.0167	.175
2-30%	0.0042	.0004	.0203	.261
3-40%	0.0056	.0006	.0325	.356
4-50%	0.0070	.0007	.0381	.439
5-60%	0.0084	.0008	.0469	.552

Comentado [FK22]: Aquí la Concentración es Porcentual. Revisar los conceptos.

Comentado [FK23]: Aquí la Concentración es Porcentual. Revisar los conceptos.

Tabla N°11. (continuación)

6-70%	0.0093	.0009	.0552	.620
7-80%	.0112	.0011	.0632	.728
8-90%	.0126	.0013	.0785	.805
9-100%	.0140	.0014	.0802	.918
10-120%	.0168	.0017	.0955	1.111
HCT Estandar "Preparación 3"				
Nivel	Conc. Teórica (mg/ml)	Conc. (%m/v)	Absorbancia 242 nm	Absorbancia 272 nm
1-20%	0.0028	.0003	0.0132	0.1783
2-30%	0.0042	.0004	0.0218	0.2697
3-40%	0.0056	.0006	0.0304	0.3608
4-50%	0.0070	.0007	0.0386	0.459
5-60%	0.0084	.0008	0.0506	0.5531
6-70%	0.0093	.0009	0.0624	0.6444
7-80%	.0112	.0011	0.0676	0.7332
8-90%	.0126	.0013	0.0756	0.8278
9-100%	.0140	.0014	0.0823	0.9073
10-120%	.0168	.0017	0.0964	1.1104
HCT Estandar "Preparación 4"				
Nivel	Conc. Teórica (mg/ml)	Conc. (%m/v)	Absorbancia 242 nm	Absorbancia 272 nm

Comentado [FK24]: Aquí la Concentración es Porcentual. Revisar los conceptos.

Comentado [FK25]: Aquí la Concentración es Porcentual. Revisar los conceptos.

Tabla N°11. (continuación)

1-20%	0.0028	.0003	0.0188	0.185
2-30%	0.0042	.0004	0.0314	0.279
3-40%	0.0056	.0006	0.0371	0.3659
4-50%	0.0070	.0007	0.0425	0.4608
5-60%	0.0084	.0008	0.0525	0.5601
6-70%	0.0093	.0009	0.0615	0.6466
7-80%	.0112	.0011	0.0657	0.7328
8-90%	.0126	.0013	0.0741	0.822
9-100%	.0140	.0014	0.0812	0.9141
10-120%	.0168	.0017	0.0965	1.1023
HCT Estandar "Preparación 5"				
Nivel	Conc. Teórica (mg/ml)	Conc. (%m/v)	Absorbancia 242 nm	Absorbancia 272 nm
1-20%	0.0028	.0003	0.0212	0.1854
2-30%	0.0042	.0004	0.0266	0.2741
3-40%	0.0056	.0006	0.0416	0.3715
4-50%	0.0070	.0007	0.0497	0.4647
5-60%	0.0084	.0008	0.05	0.547
6-70%	0.0093	.0009	0.0585	0.6387
7-80%	.0112	.0011	0.0701	0.734
8-90%	.0126	.0013	0.0756	0.8231

Comentado [FK26]: Aquí la Concentración es Porcentual. Revisar los conceptos.

Tabla N°11. (continuación)

9-100%	.0140	.0014	0.0824	0.9229
10-120%	.0168	.0017	0.0964	1.0814

Fuente: elaboración propia

5.6 Análisis estadístico de los estándares

Para realizar el siguiente análisis estadístico se tomaron las líneas de calibración de cada preparación para luego realizar un análisis con el parámetro de repetibilidad de estándar tomando como variable las preparaciones, los cuales se evaluaron mediante el coeficiente de variación y contraste de significación de t de Student para la comparación de dos medias suponiendo varianzas iguales. Seguidamente se realizó el parámetro de reproducibilidad del estándar tomando como variables las preparaciones por día y analistas, los cuales se evaluaron mediante las mismas pruebas de repetibilidad.

5. 6.1 Repetibilidad del estándar Losartán potásico a longitud de onda α

Se determinó la repetibilidad del estándar de LOP tomando los valores de los niveles que van desde 20% al 120% plasmadas en las 4 líneas de calibración (4 preparaciones).

La evaluación se realizó con el coeficiente de variación de los factores de respuesta promedio por cada nivel de cada línea de calibración, en el cual los criterios de evaluación fueron los siguientes:

-Longitud de onda α : $CV_F \leq 10\%$

-Longitud de onda β : $CV_F \leq 15\%$

La longitud de onda α corresponde al máximo de absorbancia que presenta cada estándar en su espectro U.V y β al mínimo, siendo para LOP α 242 nm y β 272 nm.

Al igual también se realizó contraste de significación de Student para la Comparación de dos Medias suponiendo varianzas iguales.

Tabla N° 12. Repetibilidad del estándar de LOP a 242 nm preparación 1 y 2 (Dia 1)

Analista	Guillermo P.			
Estándar	Losartán P.			
Longitud de onda	242 nm		Preparación 01	Preparación 02
	NIVEL	conc. (m/v%)	Factor de Respuesta (mg*ml-1)	Factor de Respuesta (mg*ml-1)
	20%	0.0011	335.091	340.909
	30%	0.00165	332.97	334.242s
	40%	0.0022	336.636	331.091
	50%	0.0027	350.926	347.000
	60%	0.0033	341.303	340.061
	70%	0.0038	341.132	340.658
	80%	0.0044	340.614	340.568
	90%	0.0049	345.163	341.918
	100%	0.0055	354.091	342.073
	120%	0.0066	350.121	342.500
MEDIA			342.805	340.102
Desviación estándar			7.12	4.44
Varianza			50.73	19.69
CV%			2.08	1.30
Dato Max.			332.97	347.00
Dato Min.			354.091	331.09

Fuente: elaboración propia

Tabla N° 13. Repetibilidad. Evaluación estadística de LOP A 242 nm de los factores de respuesta preparación 1 y 2 (Día 1)

Prueba F para varianzas de dos muestras		
α: 0.01		
	Preparación 1	Preparación 2
Media	342.8046528	340.1020201
Varianza	50.72892669	19.69217838
Observaciones	10	10
Grados de libertad	9	9
F	2.576095225	
P(F<=f) una cola	0.087425192	
Valor crítico para F (una cola)	5.351128861	
Para t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
α: 0.01		
	Preparación 1	Preparación 2
Media	642.5491061	642.5491061
Varianza	1319.218535	1319.218535
Observaciones	10	10
Varianza agrupada	1319.218535	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	18	
Estadístico t	0	
P(T<=t) una cola	0.5	
Valor crítico de t (una cola)	2.55237963	
P(T<=t) dos colas	1	
Valor crítico de t (dos colas)	2.878440473	

Fuente: elaboración propia

Al observar los datos en la Tabla N° 12, la repetibilidad con estándar de LOP a longitud de onda α 242 nm, el coeficiente de variación de los factores de respuesta de las líneas de calibración de la preparación 1 es $CV_{F(\text{prep1})}=2.08$ Y $CV_{F(\text{prep2})}=1.30$ para preparación 2. Lo que indica que están por debajo de $CV_{F\alpha} \leq 10\%$, por lo tanto, en ambas preparaciones el comportamiento de la variabilidad de los factores de respuesta es aceptable.

En la Tabla N° 13 se puede observar que la línea de calibración de preparación 1 y 2 se comportan con una variabilidad similar, lo cual se puede verificar en la prueba F que presenta un valor de F menor que el valor crítico de F (una cola) y presenta un nivel de significancia de 0.08 mayor a 0.01. Por lo tanto, se procede a evaluar el factor de respuesta promedio de las líneas de calibración de preparación 1 y 2 mediante una prueba t suponiendo varianzas iguales; en donde con ayuda del análisis estadístico se verifica que los factores de respuesta promedio de las preparaciones 1 y 2 son similares, ya que el valor estadístico de t es menor al valor crítico de t (dos colas) y también posee una probabilidad de ocurrencia mayor que el nivel de significancia.

Los resultados de los coeficientes de variación de las líneas de calibración de las preparaciones 1 y 2 indica que es posible obtener factores de respuesta de preparaciones de estándar repetibles durante el día 1 del análisis.

Tabla N° 14. Repetibilidad del estándar de LOP a 242 nm preparación 3 y 4 (Día 2)

Repetibilidad con Estándar Día 02				
Analista	Cesia F.			
Estándar	Losartán P.			
Longitud de onda	242 nm		Preparación 03	Preparación 04
	NIVEL	conc. (m/v%)	Factor de Respuesta (mg*ml-1)	Factor de Respuesta (mg*ml-1)
	20%	0.0011	335.091	335.273
	30%	0.00165	332.970	340.121
	40%	0.0022	336.636	334.455
	50%	0.0027	350.926	351.185
	60%	0.0033	341.303	346.455
	70%	0.0038	341.132	346.658
	80%	0.0044	340.614	340.841
	90%	0.0049	345.163	343.714
	100%	0.0055	354.091	341.073
	120%	0.0066	350.121	340.485
MEDIA			342.805	342.026
Desviación estándar			7.12	5.15
Varianza			50.73	26.56
CV%			2.08	1.51
Dato Max.			354.09	351.19
Dato Min.			332.97	334.45

Fuente: elaboración propia

Tabla N° 15. Repetibilidad. Evaluación estadística de los factores de respuesta de LOP a 242 nm de la preparación 3 y 4 (Día 2)

Prueba F para varianzas de dos muestras		
$\alpha: 0.01$		
	Preparación 3	Preparación 4
Media	342.8046528	342.0258881
Varianza	50.72892669	26.56195513
Observaciones	10	10
Grados de libertad	9	9
F	1.909834063	
P(F<=f) una cola	0.174590473	
Valor crítico para F (una cola)	5.351128861	
Para t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
$\alpha: 0.01$		
	Preparación 3	Preparación 4
Media	342.8046528	342.0258881
Varianza	50.72892669	26.56195513
Observaciones	10	10
Varianza agrupada	38.64544091	
Grados de libertad	18	
Estadístico t	0.280118714	
P(T<=t) una cola	0.391290123	
Valor crítico de t (una cola)	1.734063607	
P(T<=t) dos colas	0.782580246	
Valor crítico de t (dos colas)	2.10092204	

Fuente: elaboración propia

Al observar los datos en la Tabla N° 14, la repetibilidad con estándar de LOP a longitud de onda α 242 nm, el coeficiente de variación de los factores de respuesta de las líneas de calibración es $CV_{F(\text{prep}3)}=2.08$ Y $CV_{F(\text{prep}4)}=1.51$ para preparación 3 y 4, respectivamente. Lo que indica que están por debajo de $CV_{F\alpha} \leq 10\%$, por lo tanto, en ambos niveles el comportamiento de la variabilidad de los factores de respuesta es aceptable.

En la Tabla N° 15 se puede observar que la línea de calibración de preparación 3 y 4 se comportan con una variabilidad similar, lo cual se puede verificar en la prueba F que presenta un valor de F menor que el valor crítico de F (una cola) y presenta un nivel de significancia de 0.17 mayor a 0.01. Por lo tanto, se procede a evaluar el factor de respuesta promedio de las líneas de calibración de preparación 3 y 4 mediante una prueba t suponiendo varianzas iguales; en donde con ayuda del análisis estadístico se verifica que los factores de respuesta promedio de las preparaciones 3 y 4 son similares, ya que el valor estadístico de t es menor al valor crítico de t (dos colas) y también posee una probabilidad de ocurrencia mayor que el nivel de significancia.

Los resultados de los coeficientes de variación de las líneas de calibración de las preparaciones 3 y 4 indica que es posible obtener factores de respuesta de preparaciones de estándar repetibles durante el día 2 de análisis.

5. 6.2 Repetibilidad de LOP estándar a 272 nm a longitud de onda β .

Para la evaluación de los factores de respuesta a la longitud de onda β (272 nm) de las cuatro preparaciones estándar de LOP, se analizaron solamente los valores de sus respectivos coeficientes de variación.

Tabla N° 16. Repetibilidad del estándar de LOP a 272 nm preparación 1,2,3 y 4 (Dia 1 y 2)

Repetibilidad con Estándar Dia 01 y 02						
Analista	Guille P. y Cesia F.					
Estándar	Losartán					
Longitud de onda	$\beta=272$ nm		Prep 1	Prep 2	Prep 3	Prep 4
			Factor de	Factor de	Factor de	Factor de
			respuesta abs.	respuesta abs.	respuesta abs.	respuesta abs.
	NIVEL	conc.	Especifica	Especifica	Especifica	Especifica
		(m/v%)	(mg*ml-1)	(mg*ml-1)	(mg*ml-1)	(mg*ml-1)
	20%	0.0011	117.727	120.182	117.727	118.455
	30%	0.00165	118.303	116.485	118.303	122.000
	40%	0.0022	118.273	114.909	118.273	118.500
	50%	0.0027	126.370	123.667	126.370	125.148
	60%	0.0033	120.364	119.394	120.364	123.515
	70%	0.0038	122.763	120.105	122.763	123.868
	80%	0.0044	120.614	119.864	120.614	121.318
	90%	0.0049	123.184	122.490	123.184	122.449
	100%	0.0055	132.655	120.782	132.655	121.527
	120%	0.0066	131.091	121.106	131.091	121.455
MEDIA			123.134	119.898	123.134	121.824
Desviación estándar			5.32	2.58	5.32	2.14
Varianza			28.31	6.68	28.31	4.60
CV%			4.32	2.15	4.32	1.76
Dato Max.			132.65	123.67	132.65	125.15
Dato Min.			117.73	114.91	117.73	118.45

Fuente: elaboración propia

Al observar los datos en la Tabla N° 16, se observa que los coeficientes de variación de los factores de respuesta de las líneas de calibración son $CV_{F(\text{prep1})}=4.32$, $CV_{F(\text{prep2})}=2.15$, $CV_{F(\text{prep3})}=4.32$, y $CV_{F(\text{prep4})}=1.76$ para las preparaciones 1,2,3 y 4, respectivamente, lo que indica que están por debajo de $CV_{F\beta} \leq 15\%$, por lo tanto se concluye que en todos los niveles de las cuatro preparaciones

de LOP a 272 nm, el comportamiento de la variabilidad de los factores de respuesta es aceptable, permitiendo así el procesamiento de todos los factores de respuesta como un solo grupo, para obtener un factor de respuesta (absortividad específica) promedio para luego ser utilizado en los cálculos posteriores.

El resumen de los resultados de las evaluaciones de Repetibilidad del estándar LOP, están en la Tabla N°17.

Tabla N. ° 17. Resumen de los resultados de repetibilidad del estándar LOP

Evaluación	Limite Propuesto	Resultado	
		Preparación 1 Preparación 2	Preparación 3 Preparación 4
Coefficiente de variación de los factores de respuesta en cada preparación a la longitud de onda α	$CV_{FR\alpha} \leq 10\%$	$CV_{F(pre\ 1)} = 2.08\%$ $CV_{F(pre\ 2)} = 1.30\%$	$CV_{F(pre\ 3)} = 2.08\%$ $CV_{F(pre\ 4)} = 1.51\%$
Coefficiente de variación de los factores de respuesta en cada preparación a la longitud de onda β	$CV_{FR\beta} \leq 15\%$	$CV_{F(pre\ 1)} = 4.32\%$ $CV_{F(pre\ 2)} = 2.15\%$	$CV_{F(pre\ 3)} = 4.32\%$ $CV_{F(pre\ 4)} = 1.76\%$
Contraste de significación de t de Student para la Comparación de dos Medias suponiendo varianzas iguales	$H_0: \bar{X}_1 = \bar{X}_2$	0.5 > 0.05	0.39 > 0.05

Fuente: elaboración propia

5. 6.3 Reproducibilidad del estándar LOP a 242 nm a longitud de onda α

Se realizó la comprobación de la reproducibilidad de estándares de LOP, usando los datos de la repetibilidad de Preparación 1-2 y Preparación 3-4, con el fin de determinar la influencia de la variable “Día” y “Analista” en los factores de respuesta.

Tabla N° 18. Reproducibilidad del estándar de LOP a 242 nm longitud de onda α .

NIVEL	Preparación 1-2 Factor de respuesta: abs. Especifica (mg*ml-1)	Preparación 3-4 Factor de respuesta: abs. Especifica (mg*ml-1)
20%	335.091	335.091
30%	332.970	332.970
40%	336.636	336.636
50%	350.926	350.926
60%	341.303	341.303
70%	341.132	341.132
80%	340.614	340.614
90%	345.163	345.163
100%	354.091	354.091
120%	350.121	350.121
20%	340.909	335.273
30%	334.242	340.121
40%	331.091	334.455
50%	347.000	351.185
60%	340.061	346.455
70%	340.658	346.658
80%	340.568	340.841
90%	341.918	343.714
100%	342.073	341.073
120%	342.500	340.485
MEDIA	341.453	342.415
Desviación estándar	5.940	6.064
Varianza	35.280	36.771
CV%	1.740	1.771
Dato Max.	354.091	354.091
Dato Min.	331.091	332.970

Fuente: elaboración propia

Tabla N° 19. Reproducibilidad. Evaluación estadística de los factores de respuesta de LOP a 242 nm (Variable: Día)

Prueba F para varianzas de dos muestras		
$\alpha: 0.01$		
	Día 1	Día 2
Media	341.4533365	342.4152704
Varianza	35.27952953	36.77106887
Observaciones	20	20
Grados de libertad	19	19
F	0.95943715	
P(F<=f) una cola	0.464514978	
Valor crítico para F (una cola)	0.330321039	
Para t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
$\alpha: 0.01$		
	Día 1	Día 2
Media	341.4533365	342.4152704
Varianza	35.27952953	36.77106887
Observaciones	20	20
Varianza agrupada	36.0252992	
Grados de libertad	38	
Estadístico t		
P(T<=t) una cola	-0.506805666	
Valor crítico de t (una cola)	0.307609779	
P(T<=t) dos colas	2.428567631	
Valor crítico de t (dos colas)	0.615219558	

Fuente: elaboración propia

La Tabla N° 18 muestra un valor de CV% de 1.74% para la Preparación 1-2 (Dia 1) y un valor de 1.77% para la Preparación 3-4 (Dia 2), entrando ambos dentro del criterio de evaluación propuesto en el presente trabajo que es de $CV\% \leq 10\%$.

Partiendo de esto, se realizó la Prueba F para varianzas de dos muestras, para conocer si las varianzas de los dos grupos son iguales

Realizado el cálculo de la comprobación de varianzas entre el Dia 1 y Preparación Dia 2, en la Tabla N°19 se puede observar que tiene un valor α de 0.464 el cual es superior al valor de α establecido de 0.01, dando como conclusión que las varianzas de los factores de respuesta de los niveles de las preparaciones 1-2 y 3-4 son iguales.

Partiendo de esto, se realizó la “Prueba t suponiendo varianzas iguales” para comprobar si las medias de dichas preparaciones son iguales.

Al realizar dicha prueba, se obtuvo un valor de $\alpha=0.0307$ el cual es mayor que el valor de α propuesto de 0.01, dicho esto, se puede concluir que las medias de los factores de respuesta de las preparaciones 1-2 y 3-4 son iguales, por lo cual, los factores de respuesta de las cuatro preparaciones se pueden tomar como uno solo grupo y así calcular el coeficiente de variación.

Tabla N° 20. Reproducibilidad del estándar de LOP a 242 nm longitud de onda α

NIVEL	Preparación 1-4 Factor de respuesta: abs. Específica (mg*ml-1)
20%	335.091
30%	332.970
40%	336.636
50%	350.926
60%	341.303
70%	341.132
80%	340.614
90%	345.163
100%	354.091
120%	350.121
20%	340.909
30%	334.242
40%	331.091
50%	347.000
60%	340.061
70%	340.658
80%	340.568
90%	341.918
100%	342.073
120%	342.500
20%	335.091
30%	332.970
40%	336.636
50%	350.926
60%	341.303
70%	341.132
80%	340.614
90%	345.163
100%	354.091

Tabla N°20. (continuación)

	120%	350.121
	20%	335.273
	30%	340.121
	40%	334.455
	50%	351.185
	60%	346.455
	70%	346.658
	80%	340.841
	90%	343.714
	100%	341.073
	120%	340.485
<hr/>		
MEDIA		341.934
Desviación estándar		5.945
Varianza		35.339
CV%		1.739
Dato Max.		354.091
Dato Min.		331.091
<hr/>		

Fuente: elaboración propia

En la Tabla N° 20 el valor del coeficiente de variación de los factores de respuesta de las preparaciones 1-4 es $CV=1.739\%$, el cual es menor al límite propuesto de $CV \leq 10\%$.

Se puede concluir que las variables de “Día” y “Analista” no generan variabilidad significativa en los factores de respuesta”, debido a esto, se permitió la mezcla de todos los factores de respuesta por cada nivel de las 4 preparaciones estándar de LOP para obtener un valor de factor de respuesta (absortividad específica) promedio para ser utilizado en los cálculos posteriores.

A continuación, se presenta en la Tabla N.ª 21 resumen con los resultados de las evaluaciones de reproducibilidad de LOP a 242 nm.

Tabla N.ª 21. Resumen de los resultados de reproducibilidad del estándar LOP

Evaluación	Límite Propuesto	Resultado
Coeficiente de variación de los factores de respuesta (variable: día) a la longitud de onda α	$CV_{FR\alpha} \leq 10\%$	$CV_{F(día 1)} = 1.740\%$ $CV_{F(día 2)} = 1.771\%$
Coeficiente de variación de los factores de respuesta a la longitud de onda α	$CV_{FR\alpha} \leq 10\%$	$CV_F = 1.740\%$
Contraste de significación de Student para la Comparación de dos Medias suponiendo varianzas iguales (Variable: día)	$H_0: \bar{X}_1 = \bar{X}_2$	0.307 > 0.05

Fuente: elaboración propia

5. 6.4 Repetibilidad del estándar HCT a longitud de onda α 272 nm

Se determinó la repetibilidad del estándar de HCT tomando los valores de los niveles que van desde 20% al 120% plasmadas en las 5 líneas de calibración (5 preparaciones).

La evaluación se realizó con el coeficiente de variación de los factores de respuesta promedio por cada nivel de cada línea de calibración, en el cual los criterios de evaluación fueron los siguientes:

-Longitud de onda α : $CV_F \leq 10\%$

Longitud de onda β : $CV_F \leq 15\%$

La longitud de onda α corresponde al máximo de absorbancia que presenta cada estándar en su espectro U.V y β al mínimo, siendo para HCT α 272 nm y β 242 nm.

Al igual también se realizó contraste de significación de Student para la Comparación de dos Medias suponiendo varianzas iguales.

Tabla N° 22. Repetibilidad del estándar de HCT a 272 nm preparación 1 y 2 (Día 1)

Repetibilidad con Estándar Día 01				
Analista	Cesia F.			
Estándar	Hidroclorotiazida.			
Longitud de onda	272 nm		Preparación 01	Preparación 02
	NIVEL	conc. (m/v%)	Factor de Respuesta (mg*ml-1)	Factor de Respuesta (mg*ml-1)
	20%	0.0003	583.333	583.333
	30%	0.0004	652.500	652.500
	40%	0.0006	593.333	593.333
	50%	0.0007	627.143	627.143
	60%	0.0008	690.000	690.000
	70%	0.0009	688.889	688.889
	80%	0.0011	661.818	661.818
	90%	0.0013	619.231	619.231
	100%	0.0014	655.714	655.714
	120%	0.0017	653.529	653.529
	MEDIA		642.549	642.549
	Desviación estándar		36.32	36.32
	Varianza		1319.22	1319.22
	CV%		5.65	5.65
	Dato Max.		690.00	690.00
	Dato Min.		583.33	583.33

Fuente: elaboración propia

Tabla N° 23. Repetibilidad.

Evaluación estadística de los factores de respuesta de HCT a 272 nm
de la preparación 1 y 2 (Día 1)

Prueba F para varianzas de dos muestras		
α: 0.01		
	Preparación 1	Preparación 2
Media	642.5491061	642.5491061
Varianza	1319.218535	1319.218535
Observaciones	10	10
Grados de libertad	9	9
F	1	
P(F<=f) una cola	0.5	
Valor crítico para F (una cola)	0.186876457	
Para t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
α: 0.01		
	Preparación 1	Preparación 2
Media	642.5491061	642.5491061
Varianza	1319.218535	1319.218535
Observaciones	10	10
Varianza agrupada	1319.218535	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	18	
P(T<=t) una cola	0.5	
Valor crítico de t (una cola)	2.55237963	
P(T<=t) dos colas	1	
Valor crítico de t (dos colas)	2.878440473	

Fuente: elaboración propia

Al observar los datos en la Tabla N° 22, la repetibilidad con estándar de HCT a longitud de onda α 272 nm, el coeficiente de variación de los factores de respuesta de las líneas de calibración de la preparación 1 es $CV_{F(\text{prep1})}=5.65$ Y $CV_{F(\text{prep2})}=5.65$ para preparación 2. Lo que indica que están por debajo de $CV_{F\alpha} \leq 10\%$, por lo tanto, en ambas preparaciones el comportamiento de la variabilidad de los factores de respuesta es aceptable.

En la Tabla N° 23 se puede observar que la línea de calibración de preparación 1 y 2 se comportan con una variabilidad similar, lo cual se puede verificar en la prueba F que presenta un valor de F menor que el valor crítico de F (una cola) y presenta un nivel de significancia de 0.5 mayor a 0.01. Por lo tanto, se procede a evaluar el factor de respuesta promedio de las líneas de calibración de preparación 1 y 2 mediante una prueba t suponiendo varianzas iguales; en donde con ayuda del análisis estadístico se verifica que los factores de respuesta promedio de las preparaciones 1 y 2 son similares, ya que el valor estadístico de t es menor al valor crítico de t (dos colas) y también posee una probabilidad de ocurrencia mayor que el nivel de significancia.

Los resultados de los coeficientes de variación de las líneas de calibración de las preparaciones 1 y 2 indica que es posible obtener factores de respuesta de preparaciones de estándar repetibles durante el día 1 del análisis.

Tabla N° 24. Repetibilidad del estándar de HCT a 272 nm preparación 3,4 y 5 (Dia 2)

Fuente:

Repetibilidad con Estándar Dia 02					
Analista	Guille.				
Estándar	Hidroclorotiazida.				
Longitud de onda	272 nm		Preparación 03	Preparación 04	Preparación 05
	NIVEL	conc. (m/v%)	Factor de Respuesta (mg*ml-1)	Factor de Respuesta (mg*ml-1)	Factor de Respuesta (mg*ml-1)
	20%	0.0003	594.333	616.667	618.000
	30%	0.0004	674.250	697.500	685.250
	40%	0.0006	601.333	609.833	619.167
	50%	0.0007	655.714	658.286	663.857
	60%	0.0008	691.375	700.125	683.750
	70%	0.0009	716.000	718.444	709.667
	80%	0.0011	666.545	666.182	667.273
	90%	0.0013	636.769	632.308	633.154
	100%	0.0014	648.071	652.929	659.214
	120%	0.0017	653.176	648.412	636.118
MEDIA			653.757	660.069	657.545
Desviación estándar			37.23	36.24	30.55
Varianza			1386.37	1313.19	933.22
CV%			5.70	5.49	4.65
Dato Max.			716.00	718.44	709.67
Dato Mín.			594.33	609.83	618.00

elaboración propia

Tabla N° 25. Repetibilidad. Evaluación estadística de los factores de respuesta de HCT de la preparación 3 y 4 (Día 2)

Prueba F para varianzas de dos muestras		
α: 0.01		
	Preparación 3	Preparación 4
Media	653.7568537	660.0685005
Varianza	1386.367065	1313.194874
Observaciones	10	10
Grados de libertad	9	9
F	1.055720741	
P(F<=f) una cola	0.468473729	
Valor crítico para F (una cola)	5.351128861	
Para t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
α: 0.01		
	Preparación 3	Preparación 4
Media	653.7568537	660.0685005
Varianza	1386.367065	1313.194874
Observaciones	10	10
Varianza agrupada	1349.78097	
Grados de libertad	18	
Estadístico t	-0.384145759	
P(T<=t) una cola	0.352685359	
Valor crítico de t (una cola)	2.55237963	
P(T<=t) dos colas	0.705370718	
Valor crítico de t (dos colas)	2.878440473	

Fuente: elaboración propia

Tabla N° 26 Repetibilidad. Evaluación estadística de los factores de respuesta de HCT de la preparación 3 y 5 (Día 2)

Prueba F para varianzas de dos muestras		
α: 0.01		
	Preparación 3	Preparación 5
Media	653.7568537	657.5448982
Varianza	1386.367065	933.2176512
Observaciones	10	10
Grados de libertad	9	9
F	1.485577414	
P(F<=f) una cola	0.282422806	
Valor crítico para F (una cola)	5.351128861	
Para t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
α: 0.01		
	Preparación 3	Preparación 5
Media	653.7568537	657.5448982
Varianza	1386.367065	933.2176512
Observaciones	10	10
Varianza agrupada	1159.792358	
Grados de libertad	18	
Estadístico t	-0.248719571	
P(T<=t) una cola	0.403196704	
Valor crítico de t (una cola)	2.55237963	
P(T<=t) dos colas	0.806393407	
Valor crítico de t (dos colas)	2.878440473	

Fuente: elaboración propia

Tabla N° 27. Repetibilidad. Evaluación estadística de los factores de respuesta de HCT de la preparación 4 y 5 (Día 2)

Prueba F para varianzas de dos muestras		
$\alpha: 0.01$		
	Preparación 4	Preparación 5
Media	660.0685005	657.5448982
Varianza	1313.194874	933.2176512
Observaciones	10	10
Grados de libertad	9	9
F	1.40716892	
P(F<=f) una cola	0.309526562	
Valor crítico para F (una cola)	5.351128861	
Para t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
$\alpha: 0.01$		
	Preparación 4	Preparación 5
Media	660.0685005	657.5448982
Varianza	1313.194874	933.2176512
Observaciones	10	10
Varianza agrupada	1123.206263	
Grados de libertad	18	
Estadístico t	0.168374438	
P(T<=t) una cola	0.434083105	
Valor crítico de t (una cola)	2.55237963	
P(T<=t) dos colas	0.86816621	
Valor crítico de t (dos colas)	2.878440473	

Fuente: elaboración propia

Al observar los datos en Tabla N° 24, la repetibilidad con estándar de HCT a longitud de onda α 272 nm (Dia 2), el coeficiente de variación de los factores de respuesta de las líneas de calibración es $CV_{F(\text{prep}3)}=5.70$, $CV_{F(\text{prep}4)}=5.49$ y $CV_{F(\text{prep}5)}=4.65$ para preparación 3, 4 y 5, respectivamente. Lo que indica que están por debajo de $CV_{F\alpha} \leq 10\%$, por lo tanto, varios niveles el comportamiento de la variabilidad de los factores de respuesta es aceptable.

En la Tabla N° 25 se puede observar que la línea de calibración de preparación 3 y 4 se comportan con una variabilidad similar, lo cual se puede verificar en la prueba F que presenta un valor de F menor que el valor crítico de F (una cola) y presenta un nivel de significancia de 0.468 mayor a 0.01.

Por lo tanto, se procede a evaluar el factor de respuesta promedio de las líneas de calibración de preparación 3 y 4 mediante una prueba t suponiendo varianzas iguales; en donde con ayuda del análisis estadístico se verifica que los factores de respuesta promedio de las preparaciones 3 y 4 son similares, ya que el valor estadístico de t es menor al valor crítico de t (dos colas) y también posee una probabilidad de ocurrencia mayor que el nivel de significancia.

Los resultados de los coeficientes de variación de las líneas de calibración de las preparaciones 3 y 4 de HCT indica que es posible obtener factores de respuesta de preparaciones de estándar repetibles durante el día de análisis.

Se puede tomar la misma conclusión para la comparación entre las preparaciones 3-5, y 4-5

5. 6.5 Repetibilidad de Hidroclorotiazida estándar a longitud de onda β .

Para la evaluación de los factores de respuesta a la longitud de onda β (242 nm) de las cinco preparaciones estándar de HCT, se analizaron solamente los valores de sus respectivos coeficientes de variación

Tabla N° 28. Repetibilidad del estándar de HCT a 242 nm preparación 1,2,3,4 y 5 (Dia 1 y 2)

Repetibilidad con Estandar Dia 01 y 02						
Analista	Guille P. y Cesia F.					
Estandar	Hidroclorotiazida					
Longitud de onda	$\beta = 242$ nm					
NIVEL	conc. (m/v%)	Prep 1	Prep 2	Prep 3	Prep 4	Prep 5
		Factor de respuesta abs. Especifica (mg*ml-1)	Factor de respuesta abs. Especifica (mg*ml-1)	Factor de respuesta abs. Especifica (mg*ml-1)	Factor de respuesta abs. Especifica (mg*ml-1)	Factor de respuesta abs. Especifica (mg*ml-1)
20%	0.0003	55.667	55.667	44.000	62.667	70.667
30%	0.0004	50.750	50.750	54.500	78.500	66.500
40%	0.0006	54.167	54.167	50.667	61.833	69.333
50%	0.0007	54.429	54.429	55.143	60.714	71.000
60%	0.0008	58.625	58.625	63.250	65.625	62.500
70%	0.0009	61.333	61.333	69.333	68.333	65.000
80%	0.0011	57.455	57.455	61.455	59.727	63.727
90%	0.0013	60.385	60.385	58.154	57.000	58.154
100%	0.0014	57.286	57.286	58.786	58.000	58.857
120%	0.0017	56.176	56.176	56.706	56.765	56.706
MEDIA		56.627	56.627	57.199	62.916	64.244
Desviación estándar		3.13	3.13	6.94	6.61	5.21
Varianza		9.77	9.77	48.23	43.64	27.19
CV%		5.52	5.52	12.14	10.50	8.12
Dato Max.		61.33	61.33	69.33	78.50	71.00
Dato Min.		50.75	50.75	44.00	56.76	56.71

Fuente: elaboración propia

Al observar los datos en la Tabla N° 28 se observa que los coeficientes de variación de los factores de respuesta de las líneas de calibración son $CV_{F(pre1)}=5.52$, $CV_{F(pre2)}=5.52$, $CV_{F(pre3)}=12.14$, $CV_{F(pre4)}=10.50$ y $CV_{F(pre5)}=8.12$ para las preparaciones 1,2,3,4, y 5 respectivamente, lo que indica que están por debajo de $CV_{F\beta} \leq 15\%$, por lo tanto se concluye que en todos los niveles de las

cinco preparaciones de HCT a 242 nm, el comportamiento de la variabilidad de los factores de respuesta es aceptable, permitiendo así el procesamiento de todos los factores de respuesta como un solo grupo, para obtener un factor de respuesta (absortividad específica) promedio para luego ser utilizado en los cálculos posteriores. El resumen de los resultados de las evaluaciones de Repetibilidad del estándar HCT, están en la Tabla N° 29

Tabla N° 29. Resumen de los resultados de repetibilidad del estándar HCT

Evaluación	Limite Propuesto	Resultado	
		Preparación 1 Preparación 2	Preparación 3 Preparación 4 Preparación 5
Coficiente de variación de los factores de respuesta en cada preparación a la longitud de onda α	$CV_{FR\alpha} \leq 10\%$	$CV_{F(pre1)} = 5.65\%$ $CV_{F(pre2)} = 5.65\%$	$CV_{F(pre3)} = 5.70\%$ $CV_{F(pre4)} = 5.49\%$ $CV_{F(pre5)} = 4.65\%$
Coficiente de variación de los factores de respuesta en cada preparación a la longitud de onda β	$CV_{FR\beta} \leq 15\%$	$CV_{F(pre1)} = 5.52\%$ $CV_{F(pre2)} = 5.52\%$	$CV_{F(pre3)} = 12.14\%$ $CV_{F(pre4)} = 10.50\%$ $CV_{F(pre5)} = 8.12\%$
Contraste de significación de Student para la Comparación de dos Medias suponiendo varianzas iguales	$H_0: \bar{X}_1 = \bar{X}_2$	Pre 1-2: $0.5 > 0.05$	Pre 3-4: $0.352 > 0.05$ Pre 3-5: $0.403 > 0.05$ Pre 4-5: $0.434 > 0.05$

Fuente: elaboración propia

5. 6.6 Reproducibilidad del estándar HCT a 272 nm (Longitud de onda α)

Se realizó la comprobación de la reproducibilidad de estándares de HCT, usando los datos de la repetibilidad de Preparación 1-2 y Preparación 3-4-5, con el fin de determinar la influencia de la variable “Día” y “Analista” en los factores de respuesta.

Tabla N° 30. Reproducibilidad del estándar de HCT a 272 nm (Variable: Día 1 y Día 2)

NIVEL	Preparación 1-2 Factor de respuesta: abs. Especifica (mg*ml-1)	Preparación 3,4,5 Factor de respuesta: abs. Especifica (mg*ml-1)
20%	583.333	594.333
30%	652.500	674.250
40%	593.333	601.333
50%	627.143	655.714
60%	690.000	691.375
70%	688.889	716.000
80%	661.818	666.545
90%	619.231	636.769
100%	655.714	648.071
120%	653.529	653.176
20%	583.333	616.667
30%	652.500	697.500
40%	593.333	609.833
50%	627.143	658.286
60%	690.000	700.125
70%	688.889	718.444
80%	661.818	666.182
90%	619.231	632.308
100%	655.714	652.929
120%	653.529	648.412
20%		618.000
30%		685.250
40%		619.167

Tabla N°30. (continuación)

	50%	663.857
	60%	683.750
	70%	709.667
	80%	667.273
	90%	633.154
	100%	659.214
	120%	636.118
MEDIA	642.549	657.123
Desviación estándar	35.352	33.68047907
Varianza	1249.786	1134.37467
CV%	5.502	5.125
Dato Max.	690.000	718.444
Dato Min.	583.333	594.333

Fuente: elaboración propia

Tabla N° 31. Reproducibilidad. Evaluación estadística de los factores de respuesta de HCT a 272nm (Variable: Día 1 y Día 2)

Prueba F para varianzas de dos muestras		
$\alpha: 0.01$		
	Día 1	Día 2
Media	642.5491061	657.1234175
Varianza	1249.78598	1134.37467
Observaciones	20	30
Grados de libertad	19	29
F	1.101740027	
P(F<=f) una cola	0.397599595	
Valor crítico para F (una cola)	2.598744015	

Para t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

Tabla N°31. (continuación)

$\alpha: 0.01$		
	Día 1	Día 2
Media	642.5491061	657.1234175
Varianza	1249.78598	1134.37467
Observaciones	20	30
Varianza agrupada	1180.058314	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	48	
Estadístico t	-1.469694037	
P(T<=t) una cola	0.074084571	
Valor crítico de t (una cola)	2.406581273	
P(T<=t) dos colas	0.148169142	
Valor crítico de t (dos colas)	2.682204027	

Fuente: elaboración propia

La Tabla N° 31 muestra un valor de CV% de 5.502% para la Preparación 1-2 (Día:1) y un valor de 5.125% para la Preparación 3-4-5 (Día: 2), entrando ambos dentro del criterio de evaluación propuesto en el presente trabajo que es de CV% $\leq 10\%$. Partiendo de esto, se realizó la Prueba F para varianza de dos muestras, para conocer si las varianzas de los dos grupos son iguales

Realizado el cálculo de la comprobación de varianzas entre la Preparación 1-2 y Preparación 3-4-5, en la Tabla N° 23 se puede observar que tiene un valor α de 0.3976 el cual es superior al valor de α establecido de 0.01, dando como conclusión que las varianzas de los factores de respuesta de los niveles de las preparaciones 1-2 y 3-4 son iguales. Partiendo de esto, se realizó la “Prueba t suponiendo varianzas iguales” para comprobar si las medias de dichas preparaciones son iguales.

Al realizar dicha prueba, se obtuvo un valor de $\alpha=0.07$ el cual es mayor que el valor de α propuesto de 0.01, dicho esto, se puede concluir que las medias de los factores de respuesta de las preparaciones 1-2 y 3-4-5 son iguales, por lo cual, los factores de respuesta de las cinco preparaciones se pueden tomar como uno solo grupo y así calcular el coeficiente de variación.

Tabla N° 32. Reproducibilidad del estándar de HCT a 272 nm

NIVEL	Preparación 1 a la 5 Factor de respuesta: abs. Especifica (mg*ml-1)
20%	583.333
30%	652.500
40%	593.333
50%	627.143
60%	690.000
70%	688.889
80%	661.818
90%	619.231
100%	655.714
120%	653.529
20%	583.333
30%	652.500
40%	593.333
50%	627.143
60%	690.000
70%	688.889
80%	661.818
90%	619.231
100%	655.714
120%	653.529
20%	594.333
30%	674.250
40%	601.333
50%	655.714
60%	691.375
70%	716.000
80%	666.545
90%	636.769

100%	648.071
------	---------

Tabla N°32. (continuación)

120%	653.176
20%	616.667
30%	697.500
40%	609.833
50%	658.286
60%	700.125
70%	718.444
80%	666.182
90%	632.308
100%	652.929
120%	648.412
20%	618.000
30%	685.250
40%	619.167
50%	663.857
60%	683.750
70%	709.667
80%	667.273
90%	633.154
100%	659.214
120%	636.118
MEDIA	651.294
Desviación estándar	34.756
Varianza	1207.994
CV%	5.336
Dato Max.	718.444
Dato Min.	583.333

Fuente: elaboración propia

En la Tabla N° 32 el valor del coeficiente de variación de los factores de respuesta de las preparaciones 1-5 es CV=5.336%, el cual es menor al límite propuesto de CV≤10%.

Se puede concluir que las variables de “Día” y “Analista” no generan variabilidad significativa en los factores de respuesta”, debido a esto, se permitió la mezcla de todos los factores de respuesta por cada nivel de las 5 preparaciones estándar de HCT para obtener un valor de factor de respuesta (absortividad específica) promedio para ser utilizado en los cálculos posteriores.

El resumen de los resultados de reproducibilidad de HCT a 272 nm se presentan en la Tabla N° 33

Tabla N° 33. Resumen de los resultados de reproducibilidad del estándar HCT

Evaluación	Limite Propuesto	Resultado
Coeficiente de variación de los factores de respuesta (variable: día) a la longitud de onda α	$CV_{FR\alpha} \leq 10\%$	$CV_{F(dia\ 1)} = 5.502\%$ $CV_{F(dia\ 2)} = 5.125\%$
Coeficiente de variación de los factores de respuesta a la longitud de onda α	$CV_{FR\alpha} \leq 10\%$	$CV_F = 5.336\%$
Contraste de significación de t de Student para la Comparación de dos Medias suponiendo varianzas iguales	$H_0: \bar{X}_1 = \bar{X}_2$	0.07 > 0.05

Fuente: elaboración propia

5.7 Determinación del Valor de la Absortividad específica al 1% ($\alpha_{1\%}$) de LOP e HCT por medio de la Línea de Calibración.

Se utilizó la ecuación 36 para obtener la absortividad específica por cada uno de los niveles de concentración de todas las preparaciones tanto de LOP como de HCT.

A continuación, se muestra el cálculo de absorptividad específica del nivel 1 (20%) de “LOP Estándar Preparación 01” a 242 nm

$$a_{1\%} = \frac{A}{c_{1\%}}$$

Donde:

$a_{1\%}$: absorptividad específica al 1% a 242 nm de Losartán

A : valor de absorbancia (ver Tabla N° 4)

c : valor de concentración (%m/v) del nivel elegido

Luego,

$$a_{1\%} = \frac{0.3686}{0.0011 \text{ mg/ml}}$$

$$a_{1\%} = 335.091 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$$

La solución ST de Losartán potásico en su nivel del 20% de concentración presenta una absorptividad específica de **335.091** a 242 nm.

Nota: Se repitió este proceso con cada una de los niveles que conforman cada punto en la línea de calibración, por cada una de las preparaciones estándar por analito. Dichos resultados se ven reflejados en la Tabla N° 36

Después de realizado los cálculos de absorptividad por cada nivel de concentración se obtuvo un valor promedio de absorptividad por cada preparación a cada una de las dos longitudes de onda de estudio, 242 y 272 nm. El Anexo N°8 muestra la tabla con todos los valores de absorptividad específica al 1% obtenidos.

Estos valores de absorptividades específicas fueron usados para los cálculos de concentración posteriores.

Tabla N° 34. Absortividad específica al 1% de LOP a 242 nm

Concentración LOP (mg/ml)	Absortividad esp. al 1% (mg·ml ⁻¹) a 242 nm			
	Preparación 1	Preparación 2	Preparación 3	Preparación 4
Nivel 20% (0.011 mg/ml)	335.091	340.909	355.455	335.273
Nivel 30% (0.0167 mg/ml)	332.970	334.242	339.939	340.121
Nivel 40% (0.022 mg/ml)	336.636	331.091	339.318	334.455
Nivel 50% (0.028 mg/ml)	350.926	347.000	352.185	351.185
Nivel 60% (0.033 mg/ml)	341.303	340.061	345.121	346.455
Nivel 70% (0.039 mg/ml)	341.132	340.658	350.237	346.658
Nivel 80% (0.044 mg/ml)	340.614	340.568	346.318	340.841
Nivel 90% (0.050 mg/ml)	345.163	341.918	350.204	343.714
Nivel 100% (0.055 mg/ml)	354.091	342.073	347.582	341.073
Nivel 120% (0.066 mg/ml)	350.121	342.500	346.788	340.485
Promedio (\bar{x})	342.805	340.102	347.315	342.026

Fuente: elaboración propia

Tabla N° 35. Absortividad específica al 1% de LOP a 272 nm

Concentración LOP (mg/ml)	Absortividad esp. al 1% (mg·ml ⁻¹) a 272 nm			
	Preparación 1	Preparación 2	Preparación 3	Preparación 4
Nivel 20% (0.011 mg/ml)	117.727	120.182	133.455	118.455
Nivel 30% (0.0167 mg/ml)	118.303	116.485	120.788	122.000
Nivel 40% (0.022 mg/ml)	118.273	114.909	120.000	118.500
Nivel 50% (0.028 mg/ml)	126.370	123.667	124.815	125.148
Nivel 60% (0.033 mg/ml)	120.364	119.394	122.636	123.515
Nivel 70% (0.039 mg/ml)	122.763	120.105	125.132	123.868
Nivel 80% (0.044 mg/ml)	120.614	119.864	124.136	121.318
Nivel 90% (0.050 mg/ml)	123.184	122.490	125.592	122.449
Nivel 100% (0.055 mg/ml)	132.655	120.782	124.964	121.527
Nivel 120% (0.066 mg/ml)	131.091	121.106	124.561	121.455
Promedio (\bar{x})	123.134	119.898	124.608	121.824

Fuente: elaboración propia

Tabla N° 36. Absortividades específicas al 1% de HCT a 242 nm

Concentración HCT (mg/ml)	Absortividad esp. al 1% (mg·ml ⁻¹) a 242 nm				
	Preparación 1	Preparación 2	Preparación 3	Preparación 4	Preparación 5
Nivel 20% (0.0028 mg/ml)	626.429	642.857	636.786	660.714	662.143
Nivel 30% (0.0042 mg/ml)	620.952	630.952	642.143	664.286	652.619
Nivel 40% (0.0055 mg/ml)	635.714	642.857	644.286	653.393	663.393
Nivel 50% (0.0069 mg/ml)	627.000	647.143	655.714	658.286	663.857
Nivel 60% (0.0083 mg/ml)	657.262	657.143	658.452	666.786	651.190
Nivel 70% (0.0097 mg/ml)	666.129	682.796	692.903	695.269	686.774
Nivel 80% (0.0111 mg/ml)	650.268	646.429	654.643	654.286	655.357
Nivel 90% (0.0125 mg/ml)	639.206	651.587	656.984	652.381	653.254
Nivel 100% (0.0140 mg/ml)	655.429	650.714	648.071	652.929	659.214
Nivel 120% (0.0166 mg/ml)	661.369	655.952	660.952	656.131	643.690
Promedio (\bar{x})	643.976	650.843	654.593	661.446	659.149

Fuente: elaboración propia

Tabla N° 37. Absortividades específicas al 1% de HCT a 272 nm

Concentración HCT (mg/ml)	Absortividad esp. al 1% (mg·ml ⁻¹) a 272 nm				
	Preparación 1	Preparación 2	Preparación 3	Preparación 4	Preparación 5
Nivel 20% (0.0028 mg/ml)	59.642	59.642	47.143	67.143	75.714
Nivel 30% (0.0042 mg/ml)	48.333	48.333	51.905	74.762	63.333
Nivel 40% (0.0055 mg/ml)	58.035	58.035	54.286	66.250	74.286
Nivel 50% (0.0069 mg/ml)	54.428	54.428	55.143	60.714	71.000
Nivel 60% (0.0083 mg/ml)	55.833	55.833	60.238	62.500	59.524
Nivel 70% (0.0097 mg/ml)	59.354	59.354	67.097	66.129	62.903
Nivel 80% (0.0111 mg/ml)	49.285	49.285	60.357	58.661	62.589
Nivel 90% (0.0125 mg/ml)	62.301	62.301	60.000	58.810	60.000
Nivel 100% (0.0140 mg/ml)	57.285	57.285	58.786	58.000	58.857
Nivel 120% (0.0166 mg/ml)	56.845	56.845	57.381	57.440	57.381
Promedio (\bar{x})	56.134	56.134	57.234	63.041	64.559

Fuente: elaboración propia

5.8 Resultados de ensayos de disolución forzada con muestras

Se realizaron los procedimientos presentados en las secciones 4.6.1.1 y 4.6.1.2 y se obtuvieron los siguientes resultados de valores de absorbancia presentados en la Tabla N° 38

Comentado [FK27]: Pensaría que es mejor presentar en el siguiente orden:

- Disolución Forzada (tanto balón como disolutor)
- Prueba de Liberación (disolución)

Tabla N° 38. Valores de absorbancia obtenidos en ensayos de disolución forzada

Procedimiento	Valor de absorbancia	
	242 nm	272 nm
Dilución forzada con agitación magnética Balón 1	2.0075	1.6052
Dilución forzada con agitación magnética Balón 2	2.0163	1.6440
Disolución forzada en disolutor Vaso 1	1.9991	1.5810
Disolución forzada en disolutor Vaso 2	2.0162	1.5874

Fuente: elaboración propia

5. 8.1 Cálculos de concentración (mg/ml) de LOP e HCT para muestras de disolución forzada: Simultaneo de Ecuaciones

Como fue detallado en las secciones 4.6.3.1 y 4.6.3.2 se realizó el cálculo de las concentraciones de analitos en solución, por medio de dos sistemas matemáticos, simultaneo de ecuaciones, y resolución por matrices.

Se usaron los siguientes datos, para sustituir las variables dentro de las ecuaciones 38 y 40

(Las absorbancias a 242 y 272 corresponden al Balón 1 dentro de la sección 5.5, para este ejemplo)

$$a_H^{242} \text{ al } 1\%: 59.420$$

$$a_L^{242} \text{ al } 1\%: 343.062$$

$$a_H^{272} \text{ al } 1\%: 654.00$$

Comentado [FK28]: Es necesario explicar de dónde sale cada valor de Absortividad.

a_L^{272} al 1%: 122.366

A_{242} : 2.0075

A_{272} : 1.6052

Sustituyendo los valores dentro de la ecuación 40:

$$C_H = \frac{A_{272} a_L^{242} - a_L^{272} A_{242}}{a_L^{242} a_H^{272} - a_L^{272} a_H^{242}} \quad (40)$$

$$C_H = \frac{(1.6052 \times 343.062) - (122.366 \times 2.0075)}{(343.062 \times 654.00) - (122.366 \times 59.42)} \quad (40)$$

$$C_H (\%m/v) = 0.00141$$

$$C_H = 0.0141 \text{ mg/ml}$$

Para encontrar la C_L se sustituyen de igual forma las variables en la ecuación 38

$$C_L = \frac{A_{242} - a_H^{242} C_H}{a_L^{242}} \quad (38)$$

$$C_L = \frac{2.0075 - (59.420 * 0.00141)}{343.062}$$

$$C_L \text{ al } 1\% = 0.00561 \text{ mg/ml}$$

$$C_L = 0.0561 \text{ mg/ml}$$

Obteniendo como resultado que la concentración de LOP en la tableta dentro del Vaso 1 es de 0.0561 mg/ml y de HCT es de 0.0141 mg/ml.

NOTA: Estos cálculos fueron utilizados para cada una de los ensayos de muestras en la sección 5.5 como con la sección 5.6 del presente trabajo.

5. 8.2 Cálculos de concentración (mg/ml) de LOP e HCT para muestras de disolución forzada: Método Matricial

Partiendo de las dos ecuaciones de trabajo

$$A_{242} = a_L^{242} C_L + a_H^{242} C_H \quad (36)$$

$$A_{272} = a_L^{272} C_L + a_H^{272} C_H \quad (37)$$

Donde:

(Las absorbancias a 242 y 272 corresponden al Balón 1 dentro de la sección 5.5, para este ejemplo)

$$a_H^{242} \text{ al } 1\%: 59.420$$

$$a_L^{242} \text{ al } 1\%: 343.062$$

$$a_H^{272} \text{ al } 1\%: 654.00$$

$$a_L^{272} \text{ al } 1\%: 122.366$$

$$A_{242}: 2.0075$$

$$A_{272}: 1.6052$$

Comentado [FK29]: Es necesario explicar de dónde sale cada valor de Absortividad.

Se sustituyen las variables dentro de las ecuaciones:

$$2.0075 = 343.06 * C_L + 59.42 * C_H$$

$$1.6052 = 122.37 * C_L + 654.00 * C_H$$

Posteriormente, se colocan ambas ecuaciones en su arreglo matricial

$$\begin{array}{c} X \quad Y \\ \frac{1}{2} \quad \left| \begin{array}{cc|c} 343.06 & 59.42 & C_L \\ 122.37 & 654 & C_H \end{array} \right| = \left| \begin{array}{c} 2.0075 \\ 1.6052 \end{array} \right| \end{array}$$

La resolución matricial consiste en encontrar los siguientes valores:

- Determinante del sistema (ΔS)
- Determinante de x, o este caso LOP (ΔLOP)
- Determinante de y, o este caso HCT (ΔHCT)

El determinante del sistema (Δ_s) se obtiene restando los productos obtenidos de la multiplicación los valores de columna Y1 y X2 del producto obtenido de la multiplicación de los valores de la columna X1 y Y2, esto se representa de la siguiente manera:

$$\begin{array}{cc} X & Y \\ \frac{1}{2} & \begin{vmatrix} 343.06 & 59.42 \\ 122.37 & 654 \end{vmatrix} \end{array}$$

$$(\Delta_s) = (X1 * Y2) - (Y1 * X2)$$

$$(\Delta_s) = (343.06 * 654) - (59.42 * 122.37)$$

$$(\Delta_s) = 217,090.01$$

El determinante de “x” se obtiene de la misma manera, solamente que los valores de la columna “X” son sustituidos por los valores independientes:

$$\begin{array}{cc} X & Y \\ \frac{1}{2} & \begin{vmatrix} 2.0075 & 59.42 \\ 1.6052 & 654 \end{vmatrix} \end{array}$$

$$(\Delta_x) = (X1 * Y2) - (Y1 * X2)$$

$$(\Delta x) = (2.0075 * 654) - (59.42 * 1.6052)$$

$$(\Delta x) = 1217.52$$

El determinante de "y" se obtiene, sustituyendo los valores de la columna Y, con los valores independientes

$$\begin{array}{cc} X & Y \\ \frac{1}{2} & \begin{vmatrix} 343.06 & 2.0075 \\ 122.37 & 1.6052 \end{vmatrix} \end{array}$$

$$(\Delta y) = (X1 * Y2) - (Y1 * X2)$$

$$(\Delta y) = (343.06 * 1.6052) - (2.0075 * 122.37)$$

$$(\Delta y) = 305.02$$

La concentración de LOP e HCT se obtiene dividiendo el determinante de x y y entre el determinante del sistema.

Para LOP

$$C_L = \frac{\Delta x}{\Delta s}$$

$$C_L = \frac{1217.52}{217,090.01}$$

$$C_L \text{ al } 1\% = 0.00561 \text{ mg/ml}$$

$$C_L = 0.0561 \text{ mg/ml}$$

Para HCT:

$$C_H = \frac{\Delta y}{\Delta s}$$

$$C_H = \frac{288.30}{217,090.01}$$

$$C_H \text{ al } 1\% = 0.00141 \text{ mg/ml}$$

$$C_H = 0.0141 \text{ mg/ml}$$

NOTA: Estos cálculos fueron utilizados para obtener la concentración de la muestra del Balón 2, y de igual forma, para las muestras de disolución forzada en vaso de disolutor.

5. 8.3 Calculo de cantidad en miligramos y porcentaje sobre lo rotulado (%SR) en muestras de disolución forzada

Para la realización de estos cálculos, se tomaron los resultados de la tableta del Vaso 1 en la Tabla N°38.

Se sustituyen los valores de concentración de ambos analitos, en las ecuaciones

$$C_L \times FD = mg_L$$

$$C_H \times FD = mg_H$$

Se multiplica el valor de la concentración en mg/ml por el factor de dilución

$$0.0561 \times 900 = mg_L$$

$$0.0141 \times 900 = mg_H$$

$$50.49 \text{ mg} = mg_L$$

$$12.69 \text{ mg} = mg_H$$

Se utiliza la siguiente ecuación para el cálculo

$$\%SR_L = \frac{mg_L \text{ real}}{mg_L \text{ rotula}}$$

$$\%SR_H = \frac{mg_H \text{ real}}{mg_H \text{ rotula}}$$

Para Losartán,

$$\%SR_L = \frac{50.49 \text{ mg}}{50 \text{ mg}} \times 100\%$$

$$\%SR_L = 100.98\%$$

Para Hidroclorotiazida:

$$\%SR_H = \frac{12.69 \text{ mg}}{12.5 \text{ mg}} \times 100\%$$

$$\%SR_H = 101.52\%$$

NOTA: Estos cálculos fueron utilizados para cada una de los ensayos de muestras en la sección 5.5 como con la sección 5.6 del presente trabajo.

La siguiente tabla muestra los resultados de valores de concentración (mg/ml) obtenidos de LOP y HCT de las muestras utilizadas en las pruebas de disolución forzada, usando los dos métodos matemáticos propuestos.

De igual manera, muestra los valores de peso en miligramos de cada analito, al igual que el porcentaje sobre lo rotulado.

Tabla N° 39. Valores de concentración (mg/ml) obtenidos de LOP y HCT de las muestras utilizadas en las pruebas de disolución forzada

Prueba		Conc. (mg/ml)				Peso (mg)				%SR			
		Simultaneo		Matrices		Simultaneo		Matrices		Simultaneo		Matrices	
		LOP	HCT	LOP	HCT	LOP	HCT	LOP	HCT	LOP	HCT	LOP	HCT
Disolución con agitación magnetica	Balon 1	0.0561	0.0141	0.0561	0.0141	50.49	12.69	50.49	12.69	100.98	101.52	100.98	101.52
	Balon 2	0.0562	0.0146	0.0563	0.0146	50.58	13.14	50.67	13.14	101.34	105.00	101.34	105.00
Disolución Forzada en Disolutor	Vaso 1	0.0559	0.0137	0.0559	0.0137	50.31	12.33	50.31	12.33	100.62	98.64	100.62	98.64
	Vaso 2	0.0564	0.0137	0.0564	0.0137	50.76	12.33	50.76	12.33	101.52	98.64	101.52	98.64

Fuente: elaboración propia

5.9 Resultados de absorbancia en Prueba de disolución de monografía USP “LOP e HCT tabletas”

Se realizó la prueba de disolución según la monografía USP, como lo presenta la sección 4.8 y se obtuvieron los siguientes valores de absorbancia, presentados en la *Tabla N° 40*

Tabla N° 40. Valores de absorbancia de ensayo final de prueba de disolución según monografía USP

Tabletas	Valor de absorbancia	
	242 nm	272 nm
Tableta 1	2.0132	1.5585
Tableta 2	1.9748	1.5581
Tableta 3	2.0730	1.5915
Tableta 4	1.9744	1.5287
Tableta 5	2.0395	1.5657
Tableta 6	1.9948	1.5358

Fuente: elaboración propia

5. 9.1 Cálculos de concentración de LOP e HCT en muestras de Prueba de Disolución: Simultaneo de Ecuaciones

Como fue detallado en las secciones 4.6.3.1 y 4.6.3.2 se realizó el cálculo de las concentraciones de analitos en solución, por medio de dos sistemas matemáticos, simultaneo de ecuaciones, y resolución por matrices.

Se usaron los siguientes datos, para sustituir las variables dentro de las ecuaciones 38 y 40

Las absorbancias a 242 y 272 corresponden a la Tableta 1, según Tabla 40

La obtención de los valores de absorbancia específica se muestra en la sección 5.4.

$$a_H^{242} \text{ al } 1\%: 59.420$$

$$a_L^{242} \text{ al } 1\%: 343.062$$

$$a_H^{272} \text{ al } 1\%: 654.00$$

$$a_L^{272} \text{ al } 1\%: 122.366$$

$$A_{242}: 2.0132$$

$$A_{272}: 1.5585$$

Sustituyendo los valores dentro de la ecuación 40:

$$C_H = \frac{A_{272} a_L^{242} - a_L^{272} A_{242}}{a_L^{242} a_H^{272} - a_L^{272} a_H^{242}} \quad (40)$$

$$C_H = \frac{(1.5585 \times 343.062) - (122.366 \times 2.0132)}{(343.062 \times 654.00) - (122.366 \times 59.42)} \quad (40)$$

Comentado [FK30]: Es necesario explicar de dónde sale cada valor de Absortividad.

$$C_H \text{ al } 1\% = 0.00133 \text{ mg/ml}$$

$$C_H = 0.0133 \text{ mg/ml}$$

Para encontrar la C_L se sustituyen de igual forma las variables en la ecuación 38

$$C_L = \frac{A_{242} - a_H^{242} C_H}{a_L^{242}} \quad (38)$$

$$C_L = \frac{2.0132 - (59.420 * 0.00133)}{343.062}$$

$$C_L \text{ al } 1\% = 0.00563 \text{ mg/ml}$$

$$C_L = 0.0563 \text{ mg/ml}$$

Obteniendo como resultado que la concentración de LOP en la tableta 1 es de 0.0133 mg/ml y de HCT es de 0.0563 mg/ml.

NOTA: Se siguió este procedimiento con cada uno de los valores de absorbancia por cada tableta.

5. 9.2 Cálculos de concentración de LOP e HCT en muestras de Prueba de Disolución: Método Matricial

Partiendo de las dos ecuaciones de trabajo

$$A_{242} = a_L^{242} C_L + a_H^{242} C_H \quad (36)$$

$$A_{272} = a_L^{272} C_L + a_H^{272} C_H \quad (37)$$

Se sustituyen las variables dentro de las ecuaciones:

$$2.0132 = 343.06 * C_L + 59.42 * C_H$$

$$1.5585 = 122.37 * C_L + 654.00 * C_H$$

Posteriormente, se colocan ambas ecuaciones en su arreglo matricial

$$\begin{array}{c} \text{X} \quad \text{Y} \\ \frac{1}{2} \quad \left| \begin{array}{cc|c} 343.06 & 59.42 & C_L \\ 122.37 & 654 & C_H \end{array} \right| = \left| \begin{array}{c} 2.0132 \\ 1.5585 \end{array} \right| \end{array}$$

La resolución matricial consiste en encontrar los siguientes valores:

- Determinante del sistema (Δ_s)

- Determinante de x, o este caso LOP (Δ_{LoP})
- Determinante de y, o este caso HCT (Δ_{HCT})

El determinante del sistema (Δ_s) se obtiene restando los productos obtenidos de la multiplicación los valores de columna Y1 y X2 del producto obtenido de la multiplicación de los valores de la columna X1 y Y2, esto se representa de la siguiente manera:

$$\begin{array}{cc} X & Y \\ \frac{1}{2} & \begin{vmatrix} 343.06 & 59.42 \\ 122.37 & 654 \end{vmatrix} \end{array}$$

$$(\Delta_s) = (X1 * Y2) - (Y1 * X2)$$

$$(\Delta_s) = (343.06 * 654) - (59.42 * 122.37)$$

$$(\Delta_s) = 217,090.01$$

El determinante de “x” se obtiene de la misma manera, solamente que los valores de la columna “X” son sustituidos por los valores independientes:

$$\begin{array}{cc} X & Y \\ \frac{1}{2} & \begin{vmatrix} 2.0132 & 59.42 \\ 1.5585 & 654 \end{vmatrix} \end{array}$$

$$(\Delta x) = (X1 * Y2) - (Y1 * X2)$$

$$(\Delta x) = (2.0132 * 654) - (59.42 * 1.5585)$$

$$(\Delta x) = 1224.03$$

El determinante de “y” se obtiene, sustituyendo los valores de la columna Y, con los valores independientes

X	Y
$\frac{1}{2}$	$\begin{array}{cc} 343.06 & 2.0132 \\ 122.37 & 1.5585 \end{array}$

$$(\Delta y) = (Y1 * X2) - (X1 * Y2)$$

$$(\Delta y) = (343.06 * 1.5585) - (2.0132 * 122.37)$$

$$(\Delta y) = 288.30$$

La concentración de LOP e HCT se obtiene dividiendo el determinante de x y y entre el determinante del sistema.

Para LOP

$$C_L = \frac{\Delta x}{\Delta s}$$

$$C_L = \frac{1224.03}{217,090.01}$$

$$C_L \text{ al } 1\% = 0.00564 \text{ mg/ml}$$

$$C_L = 0.0564 \text{ mg/ml}$$

Para HCT:

$$C_H = \frac{\Delta y}{\Delta s}$$

$$C_H = \frac{288.30}{217,090.01}$$

$$C_H \text{ al } 1\% = 0.00133 \text{ mg/ml}$$

$$C_H = 0.0133 \text{ mg/ml}$$

NOTA: Se siguió este procedimiento con cada uno de los valores de absorbancia por cada tableta.

5.9.3 Cálculo de cantidad en miligramos y porcentaje sobre lo rotulado (%SR) en muestras de disolución forzada.

Para la realización de estos cálculos, se tomaron los resultados de la Tableta 1 en la Tabla N°40.

Se sustituyen los valores de concentración de ambos analitos, en las ecuaciones

$$C_L \times FD = mg_L$$

$$C_H \times FD = mg_H$$

Se multiplica el valor de la concentración en mg/ml por el factor de dilución

$$0.0564 \times 900 = mg_L$$

$$0.0133 \times 900 = mg_H$$

$$50.76 \text{ mg} = mg_L$$

$$11.97 \text{ mg} = mg_H$$

Se utiliza la siguiente ecuación para el cálculo

$$\%SR_L = \frac{mg_L \text{ real}}{mg_L \text{ rotula}}$$

$$\%SR_H = \frac{mg_H \text{ real}}{mg_H \text{ rotula}}$$

Para Losartán,

$$\%SR_L = \frac{50.76 \text{ mg}}{50 \text{ mg}} \times 100\%$$

$$\%SR_L = 101.5\%$$

Para Hidroclorotiazida,

$$\%SR_H = \frac{11.97 \text{ mg}}{12.5 \text{ mg}} \times 100\%$$

$$\%SR_H = 95.76\%$$

NOTA:

Este cálculo se utilizó para las demás tabletas

La siguiente tabla muestra los resultados de valores de concentración (mg/ml) obtenidos de LOP y HCT de las muestras utilizadas en las pruebas de disolución según monografía USP, usando los dos métodos matemáticos propuestos. De igual manera, muestra los valores de peso en miligramos de cada analito, al igual que el porcentaje sobre lo rotulado.

Tabla N° 41. Valores de concentración (mg/ml) obtenidos de LOP y HCT de las muestras utilizadas en las pruebas de disolución

Tableta	Concentración (mg/ml)				Peso (mg)				%SR			
	Simultaneo		Matrices		Simultaneo		Matrices		Simultaneo		Matrices	
	LOP	HCT	LOP	HCT	LOP	HCT	LOP	HCT	LOP	HCT	LOP	HCT
Tableta 1	0.0564	0.0133	0.0564	0.0133	50.76	11.97	50.76	11.97	101.52	95.76	101.52	95.76
Tableta 2	0.0552	0.0135	0.0552	0.0135	49.68	12.15	49.68	12.15	99.36	97.2	99.36	97.2

Tabla N°41. (continuación)

Tableta 3	0.0581	0.0135	0.0581	0.0135	52.29	12.15	52.29	12.15	104.58	97.2	104.58	97.2
Tableta 4	0.0553	0.0130	0.0553	0.0130	49.77	11.7	49.77	11.7	99.54	93.6	99.54	93.6
Tableta 5	0.0571	0.0132	0.0571	0.0132	51.39	11.88	51.39	11.88	102.78	95.04	102.78	95.04
Tableta 6	0.0559	0.0130	0.0559	0.0130	50.31	11.7	50.31	11.7	100.62	93.6	100.62	93.6

Fuente: elaboración propia

5.10 Documento final de Metodología Analítica

	METODO UV-VISIBLE	
LOSARTÁN POTÁSICO-HIDROCLOROTIAZIDA TABLETAS		
<i>DEFINICION</i>		
Las tabletas de Losartán potásico e hidroclorotiazida contienen no menos del 95% y no más del 105% de la cantidad declarada de losartán potásico e hidroclorotiazida.		
<i>MATERIALES Y EQUIPO:</i>		
<ul style="list-style-type: none"> - Espectrofotómetro UV-visible SPECORD 210 PLUS - Balanza analítica - Software Aspect Uv 		

- Celda de cuarzo (1 cm de longitud)

REACTIVOS:

- Losartán potásico
- Hidroclorotiazida
- Agua desgasificada

PREPARACION DE ESTANDAR:

Solución estándar de Losartán:

Pesar en balanza 55 mg de Losartán y trasladar a balón volumétrico de 100 ml, añadir agua desgasificada hasta disolver, luego aforar y rotular como solución madre LOP 0.55 mg/ml

Crear línea de calibración partiendo de solución madre, conformada por 2 niveles de concentración, el nivel mínimo y el máximo, siendo la máxima concentración del 120% y la menor concentración de 20%.

Ssolución estándar de Hidroclorotiazida:

Pesar en balanza 35 mg de Hidroclorotiazida y trasladar a balón volumétrico de 250 ml, añadir agua desgasificada hasta disolver, luego aforar y rotular como solución madre HCT 0.14 mg/ml

Crear línea de calibración partiendo de solución madre, conformada por 10 niveles de concentración, siendo la máxima concentración del 120% y la menor concentración de 20%.

Comentado [FK31]: Discutir esto.
Los niveles de concentración, sólo se efectúan cuando se realiza LINEALIDAD.

En análisis rutinario se trabaja:
- 1 nivel, 2 o 3 preparaciones
- 2 niveles, 2 preparaciones

PREPARACION DE MUESTRA:

DIRECTA:

Al terminada la prueba de disolución, extraer con cánulas y trasladar a tubo de ensayo cantidad suficiente de muestra para ambientar la celda de cuarzo y para lectura.

CON DILUCION:

Al terminar la prueba de disolución, extraer con cánulas y trasladar a beaker pequeño la cantidad necesaria de muestra para realizar la dilución. Transferir con pipeta volumétrica la cantidad previamente elegida de alícuota a un balón volumétrico y llevar a aforo.

PROCEDIMIENTO:

Determinar la cantidad de LOP e HCT disuelta utilizando el espectrofotómetro Ultravioleta-visible, realizando lecturas de absorción a las longitudes de onda elegidas.

CALCULO:

Calcular la cantidad disuelta, en mg, de LOP e HCT haciendo uso de las siguientes formulas:

$$mg_L = \frac{A_{242} - a_H^{242} C_H}{a_L^{242}} \times FD$$

$$mg_H = \frac{A_{272} a_L^{242} - a_L^{272} A_{242}}{a_L^{242} a_H^{272} - a_L^{272} a_H^{242}} \times FD$$

Donde:

C_L : Concentracion de LOP.

C_H : Concentracion de HCT.

A_{242} : Absorbancia de muestra a 242 nm.

A_{272} : Absorbancia de muestra a 272 nm.

a_H^{242} al 1%: absortividad especifica al 1% de HCT a 242 nm.

a_L^{242} al 1%: absortividad especifica al 1% de LOP a 242 nm.

a_H^{272} al 1%: absortividad especifica al 1% de HCT a 272 nm.

a_L^{272} al 1%: absortividad especifica al 1% de LOP a 272 nm.

CAPITULO VI

6.0 CONCLUSIONES

1. El uso de esta metodología analítica para la cuantificación de dos analitos en una misma forma farmacéutica, se debe tener en cuenta el comportamiento espectrofotométrico individual de cada analito, idealmente, como requisito mínimo, el analito "x" debe poseer un máximo de absorción, mientras que el analito "y" un mínimo de absorción a una misma longitud de onda.
2. La caracterización de las propiedades físico-químicas de LOP e HCT permitieron establecer como disolvente adecuado "agua desgasificada" para el desarrollo de la metodología analítica, así como también la puesta a punta de las condiciones del sistema de lectura de la técnica espectrofotométrica, lo que permitió determinar el sistema de longitudes de onda máximo de LOP de 242 nm y mínimo 272 nm, y para HCT de máximo 272 nm y mínimo de 242 nm.
3. En la reproducibilidad de los estándares a partir de los factores de respuesta obtenidos de la línea de calibración, los resultados reflejan que es posible cuantificar en las dos longitudes de onda α y β tanto para LOP y HCT, mediante la evaluación del coeficiente de variación y el Contraste de significación de Student para la Comparación de dos Medias suponiendo varianzas iguales, el que se obtuvo resultados menores a los límites propuestos demostrando así que la variabilidad de las medias y las varianzas son similares contrastando días de preparación así como analistas.
4. En la repetibilidad de los estándares a partir de los factores de respuesta obtenidos de la línea de calibración, los resultados reflejan que es posible cuantificar en las dos longitudes de onda α y β tanto para LOP y HCT, mediante la evaluación del coeficiente de variación y el Contraste de significación de Student para la Comparación de dos Medias suponiendo varianzas iguales, el que se obtuvo resultados menores a los límites propuestos demostrando así que la variabilidad de las medias y las varianzas son similares contrastando cada preparación con sus respectivos días de elaboración.

Comentado [FK32]: Esta podría ser una recomendación o conclusión de la metodología analítica

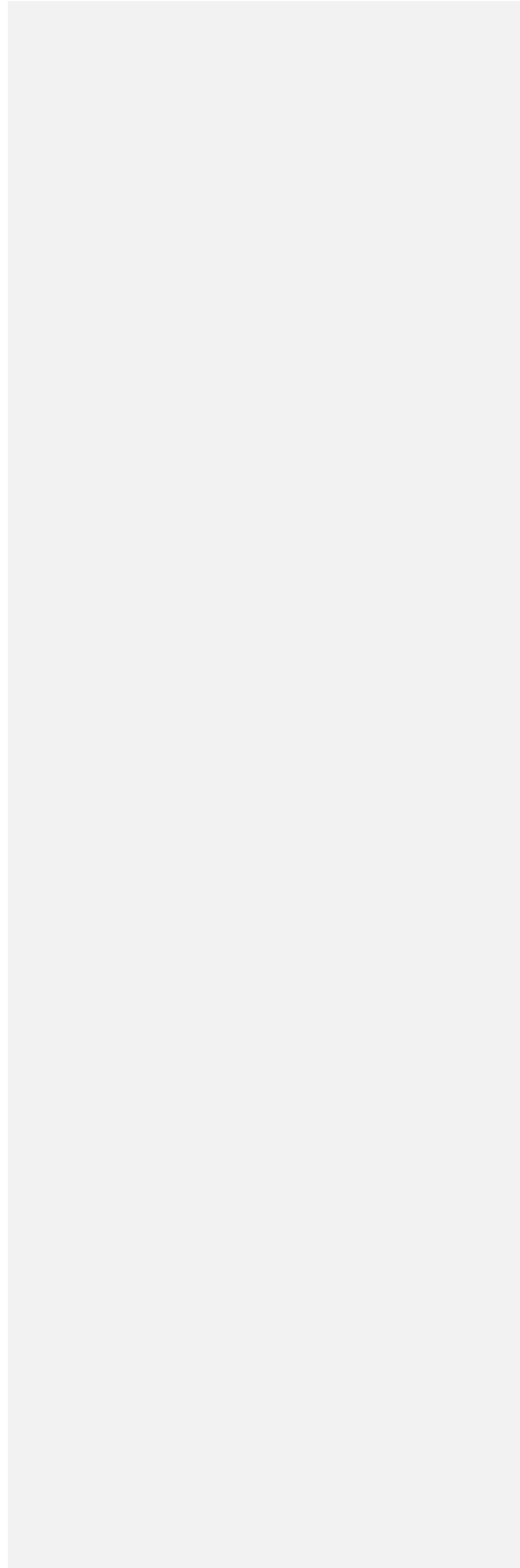
5. Basándose en los resultados obtenidos, el método desarrollado puede aplicarse de manera eficiente como alternativa al HPLC como herramienta para la cuantificación de los activos en las distintas pruebas de control de calidad como son perfil de disolución, y contenido químico.

6. Las tabletas evaluadas con el presente método analítico cumplen lo establecido en la definición expuesta en la monografía USP "Losartán potásico e hidroclorotiazida, tabletas" donde se establece que la muestra debe contener no menos del 95% y no más del 105%. Los resultados confirman esto dando un promedio de los %SR del 101.4% para LOP, y de 95.4% para HCT.

Comentado [FK33]: OJO

La prueba que están haciendo es de DISOLUCIÓN.
Los límites son otros
Son criterios S1

CAPITULO VII



7.0 RECOMENDACIONES

1. Continuar la investigación con otra variedad de principios activos que cuenten con señales en el UV-Vis, siempre enfocada a la cuantificación de dos o más principios activos empleando la técnica espectrofotométrica.
2. Efectuar estudios de aplicación farmacéutica con la técnica UV-Vis a fin de ampliar el uso de esta frente a otras técnicas convencionales de HPLC, en todas las pruebas farmacéuticas que sea factible su aplicación.
3. A la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, desarrollar a futuro investigaciones que amplíen el conocimiento sobre el uso de la técnica espectrofotométrica, en la determinación cuantitativa de formas farmacéuticas que posean más de un analito.

BIBLIOGRAFIA

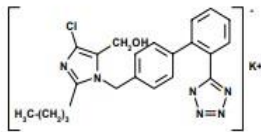
1. Posada E, El Salvador S, Salvador C. Validación de la metodología de contenido químico de ibuprofeno en tabletas por calorimetría diferencial de barrido. 2014.
2. Castro Cels M. Asociación Española De Farmacéuticos De La Industria. Validación De Métodos Analíticos.
3. PubChem. Losartán [Internet]. [citado 12 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3961>
4. PubChem. Hydrochlorothiazide [Internet]. [citado 19 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3639>
5. Fundamentos de la espectroscopía UV-visible moderna.
6. Hanlan J, Skoog DA, West DM. Principles of Instrumental Analysis. Stud Conserv [Internet]. 1973;18(1):45. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2307/1505543>
7. Khanage SG, Mohite PB, Jadhav S. Development and validation of UV-visible spectrophotometric method for simultaneous determination of eperisone and Paracetamol in solid dosage form. Adv Pharm Bull [Internet]. 2013;3(2):447–51. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5681/apb.2013.073>
8. Panchale WA, Gulhane CA, Manwar JV, R. L. Bakal. Simultaneous estimation of salbutamol sulphate and ambroxol HCl from their combined dosage form by UV-VIS spectroscopy using simultaneous equation method. GSC Biol Pharm Sci [Internet]. 2020;13(3):127–34. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.30574/gscbps.2020.13.3.0397>
9. Martínez JLS. CURSO: INSTRUMENTACIÓN Y MÉTODOS DE ANÁLISIS QUÍMICO.
10. Vetuschi C, Giannandrea A. Anti-beer evaluation of hydrochlorothiazide and losartán by UV derivative spectrophotometry. Anal Lett [Internet]. 2003;36(5):1051–64. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1081/al-120019262>

11. Thube C, Dhagude J, Pawar PY. Simultaneous estimation and validation of losartán potassium and hydrochlorothiazide in bulk and tablet dosage form by using different spectrophotometric method. 2014;7.
12. Skoog H, Crouch D, James S. Principios de análisis instrumental. Sexta.
13. Miller J. Estadística Y Quimiometría Para Química Analítica. Madrid.: Pearson Educación S.A.; 2002.
14. International Conference On Harmonisation. Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1). 2005.
15. Twinbrook P. The United States Pharmacopeical Convention, Inc. United States Pharmacopeia of the United States of America. 2008;953:2821–2.
16. Guo K, Yin Q, Yang Y, Zhang M, Wang J. Solubility of Losartán Potassium in Different Pure Solvents from (293.15 to 343.15) K. J Chem Eng Data 1 de julio de. 2008;53(7):1467–9.

ANEXOS

ANEXO N° 1: Espectro de absorción ultravioleta-visible de LOP

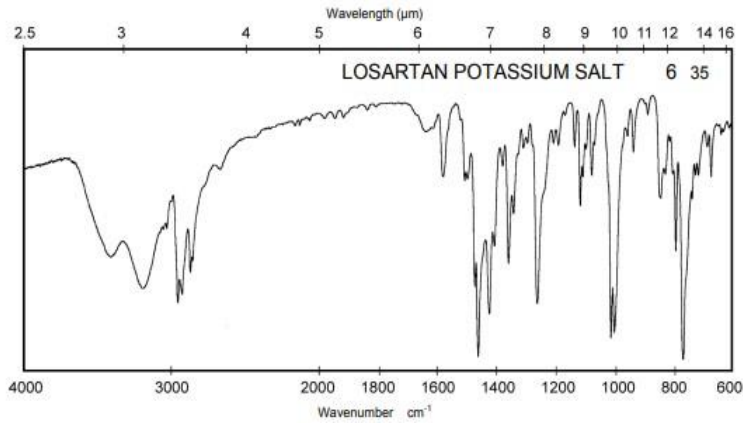
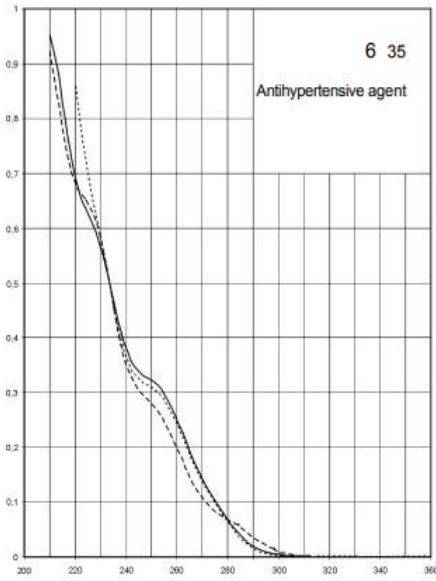
Name **LOSARTAN
POTASSIUM SALT**



M_r 461.0

Concentration 1 mg / 100 ml

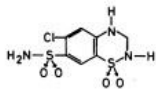
Solvent Symbol	Methanol	Water	0.1 M HCl	0.1 M NaOH
Maximum of absorption				
$E_{1\%}^{1cm}$				
E				



+

ANEXO N° 2: Espectro de absorción ultravioleta-visible de HCT.

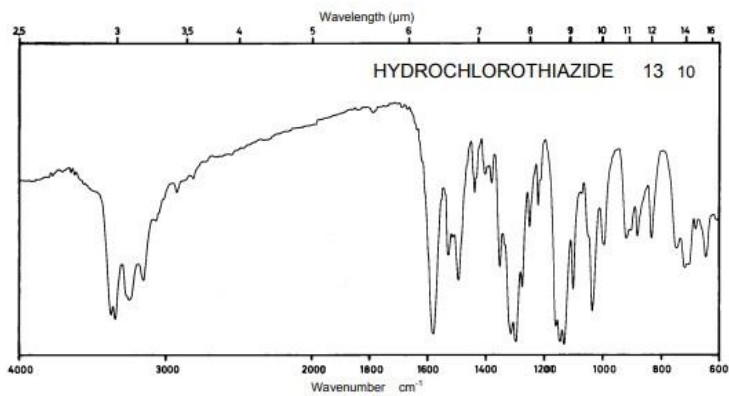
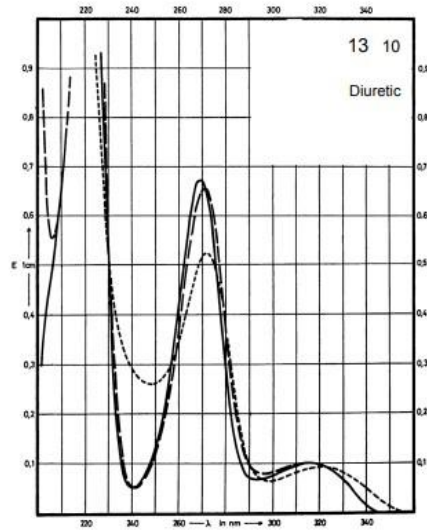
Name: HYDROCHLORO-
THIAZIDE



M_r 297.8

Concentration 1 mg / 100 ml

Solvent Symbol	Methanol	Water	0.1 M HCl	0.1 M NaOH
Maximum of absorption	315 nm 269 nm	---	315 nm 271 nm	320 nm 272 nm
$E_{1\%}^{1cm}$	99 868	---	99 851	91 523
E	2950 19890	---	2950 19350	2710 15570



ANEXO N°3. Rango de medición fotométrica de espectrofotómetro SPECORD 210 PLUS según manual

Características técnicas de los espectrómetros

SPECORD 200/210 PLUS

Principio óptico	SPECORD 200/210 PLUS: Espectrofotómetro de doble haz
Receptor	SPECORD 200 PLUS: dos fotodiodos de gran superficie no termostatizados SPECORD 210 PLUS: dos fotodiodos termostatizados (CDD; Cooled Double Detection)
Óptica	Monocromador con rejilla holográfica División del recorrido óptico en dos mediante el divisor de haz
Rango de longitudes de onda	190 - 1100nm
Rango de indicación fotométrica	-8 a 8 A
Rango de medición fotométrica	-3 a 3 A
Precisión de la longitud de onda de la línea de deuterio a 656,1 nm	$\leq \pm 0,1$ nm

ANEXO N.º 4: Monografía de LOP e HCT tabletas.

Losartán Potásico e Hidroclorotiazida, Tabletas

DEFINICIÓN

Las Tabletas de Losartán Potásico e Hidroclorotiazida contienen no menos de 95,0% y no más de 105,0% de la cantidad declarada de losartán potásico ($C_{22}H_{27}ClKN_4O$) e hidroclorotiazida ($C_7H_6ClN_2O_2S_2$).

IDENTIFICACIÓN

- A. Los tiempos de retención de los picos principales de la *Solución muestra* corresponden a los de la *Solución estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.
- B. Los espectros UV de los picos principales de la *Solución muestra* corresponden a los de la *Solución estándar*, según se obtienen en la *Valoración*.

VALORACIÓN

Cambio en la redacción:

PROCEDIMIENTO

Solución amortiguadora A: 2,76 g/L de fosfato monobásico de sodio (688 1-009-2020) en agua. Ajustar con ácido fosfórico a un pH de 2,5.

Solución amortiguadora B: 1,25 g/L de fosfato monobásico de potasio y 1,5 g/L de fosfato dibásico de sodio en agua. El pH de la solución resultante es aproximadamente 7,0-7,5.

Solución A: Acetonitrilo y *Solución amortiguadora B* (7:93)

Solución B: Acetonitrilo

Fase móvil: Ver la *Tabla 1*.

Tabla 1

Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)
0	100	0
12	92	8
28	38	62
30	100	0
35	100	0

Diluyente: Acetonitrilo y *Solución amortiguadora A* (60:40)
Solución estándar: Transferir cantidades apropiadas de ER Losartán Potásico USP y ER Hidroclorotiazida USP a un matraz volumétrico adecuado y disolver en *Diluyente* (50% del volumen del matraz). Diluir con *Solución amortiguadora A* a volumen hasta obtener una solución con concentraciones según se indica en la *Tabla 2*. Pasar una porción de la solución a través de un filtro de PTFE o equivalente con un tamaño de poro de 0,45 µm.

Tabla 2

Contenido de la Tableta Losartán Potásico/ Hidroclorotiazida (mg)	Concentración de ER Losartán Potási- co USP (mg/mL)	Concentración de ER Hidroclorotiazida USP (mg/mL)
50/12,5	0,4	0,1
100/12,5	0,4	0,05
100/25	0,4	0,1

Solución madre de la muestra: Transferir 10 Tabletas a un matraz volumétrico adecuado y agregar *Diluyente* según se indica en la *Tabla 3*. Mezclar bien y agitar mecánicamente o

mezclar hasta que el sólido se disperse. Diluir con *Solución amortiguadora A* a volumen y someter a ultrasonido.

Tabla 3

Contenido de la Tableta Losartán Potásico/ Hidroclorotiazida (mg)	Volumen de Ma- traz (mL)	Volumen de Diluyente (mL)
50/12,5	250	210
100/12,5	500	420
100/25	500	420

Solución muestra: Diluir una porción de *Solución madre de la muestra* primero con acetonitrilo (20% del volumen del matraz) y luego con *Solución amortiguadora A*, hasta obtener una solución con concentraciones nominales de losartán potásico e hidroclorotiazida similares a los de la *Solución estándar*. Pasar una porción de esta solución a través de un filtro de PTFE o equivalente con un tamaño de poro de 0,45 µm y usar el filtrado.

Sistema cromatográfico

(Ver *Cromatografía* (621), *Aptitud del Sistema*.)

Modo: HPLC.

Detector: UV 280 nm. Para *Identificación B*, usar un detector de arreglo de diodos en el intervalo 190-400 nm.

Columna: 3,9 mm × 15 cm; relleno L7 de 5 µm

Temperatura de la columna: 35°

Velocidad de flujo: 1 mL/min

Volumen de inyección: 20 µL

Aptitud del sistema

Muestra: *Solución estándar*

[NOTA—Los tiempos de retención relativos para hidroclorotiazida y losartán son 1,0 y 3,0, respectivamente.]

Requisitos de aptitud

Factor de asimetría: No más de 2,5 para el pico de losartán

Desviación estándar relativa: No más de 2,0% para los picos de hidroclorotiazida y de losartán

Análisis

Muestras: *Solución estándar* y *Solución muestra*
 Calcular el porcentaje de la cantidad declarada de losartán potásico ($C_{22}H_{27}ClKN_4O$) o hidroclorotiazida ($C_7H_6ClN_2O_2S_2$) en la porción de Tabletas tomada:

$$\text{Resultado} = (r_u/r_s) \times (C_s/C_u) \times 100$$

r_u = respuesta del pico de losartán o hidroclorotiazida de la *Solución muestra*

r_s = respuesta del pico de losartán o hidroclorotiazida de la *Solución estándar*

C_s = concentración de ER Losartán Potásico USP o ER Hidroclorotiazida USP en la *Solución estándar* (mg/mL)

C_u = concentración nominal de losartán potásico o hidroclorotiazida en la *Solución muestra* (mg/mL)

Criterios de aceptación: 95,0%-105,0%

PRUEBAS DE DESEMPEÑO

DISOLUCIÓN (711)

Prueba 1

Medio: Agua; 900 mL, desgasificada

Aparato 1: 100 rpm

Tiempo: 30 minutos para losartán y para hidroclorotiazida

Solución amortiguadora: 1,36 g/L de fosfato monobásico de potasio en agua. Ajustar con ácido fosfórico a un pH de 2,5.

Fase móvil: Acetonitrilo y *Solución amortiguadora* (40:60)

Solución madre de losartán potásico: 0,44 mg/mL de ER Losartán Potásico USP en *Medio*

Solución madre de hidroclorotiazida: 0,14 mg/mL de ER Hidroclorotiazida USP, que se prepara disolviendo en metanol (10% del volumen del matraz). Diluir con *Medio* a volumen.

Solución estándar: Transferir volúmenes apropiados de *Solución madre de losartán potásico* y *Solución madre de hidroclorotiazida* a un matraz volumétrico de 100 mL según los esquemas de dilución en la *Tabla 4*. Diluir con *Medio* a volumen.

Tabla 4

Contenido de la Tabla	Alícuota de Solución Madre de Losartán Potásico (mg)	Alícuota de Solución Madre de Hidroclorotiazida (mL)
Losartán Potásico/Hidroclorotiazida (mg)		
50/12,5	12,5	10,0
100/12,5	25,0	10,0
100/25	25,0	20,0

Solución muestra: Pasar una porción de la solución en análisis a través de un filtro adecuado con un tamaño de poro de 0,45 µm.

Sistema cromatográfico
(Ver *Cromatografía* (621), *Aptitud del Sistema*.)

Modo: HPLC

Detector: UV 230 nm

Columna: 4,6 mm × 25 cm; relleno L7 de 10 µm

Temperatura de la columna: 35°

Velocidad de flujo: 2,3 mL/min

Volumen de inyección: 20 µL

Tiempo de corrida: No menos de 2 veces el tiempo de retención del pico de losartán

Aptitud del sistema

Muestra: *Solución estándar*

[NOTA—Los tiempos de retención relativos para hidroclorotiazida y losartán son 1,0 y 2,7, respectivamente.]

Requisitos de aptitud

Resolución: No menos de 2 entre los picos de hidroclorotiazida y losartán

Desviación estándar relativa: No más de 2,0% para los picos de hidroclorotiazida y de losartán

Análisis

Muestras: *Solución estándar* y *Solución muestra*

Calcular la cantidad disuelta de losartán potásico (C₂₂H₂₇ClKN₃O) o hidroclorotiazida (C₇H₄ClN₂O₄S₂), como porcentaje de la cantidad declarada:

$$\text{Resultado} = (r_u/r_s) \times C_s \times V \times (1/L) \times 100$$

r_u = respuesta del pico de losartán o hidroclorotiazida de la *Solución muestra*

r_s = respuesta del pico de losartán o hidroclorotiazida de la *Solución estándar*

C_s = concentración de ER Losartán Potásico USP o ER Hidroclorotiazida USP en la *Solución estándar* (mg/mL)

V = volumen de *Medio*, 900 mL

L = cantidad declarada (mg/Tableta)

Tolerancias: No menos de 85% (Q) de la cantidad declarada de losartán potásico (C₂₂H₂₇ClKN₃O) y no menos de 75% (Q) de la cantidad declarada de hidroclorotiazida (C₇H₄ClN₂O₄S₂)

Prueba 2: Si el producto cumple con esta prueba, el etiquetado indica que el producto cumple con la *Prueba de Disolución 2* de la USP.

Medio, Aparato 1 y Tiempo: Proceder según se indica en la *Prueba 1*.

Solución amortiguadora: 1,78 g/L de fosfato dibásico de sodio dihidrato en agua. Ajustar con ácido fosfórico a un pH de 6,5.

Fase móvil: Acetonitrilo y *Solución amortiguadora* (32:68)

Diluyente: Acetonitrilo y agua (40:60)

Solución madre del estándar 1: 1,1 mg/mL de ER Losartán Potásico USP en *Diluyente*. Puede ser necesario someter a ultrasonido para disolver completamente.

Solución madre del estándar 2: 0,28 mg/mL de ER Hidroclorotiazida USP en *Diluyente*. Puede ser necesario someter a ultrasonido para disolver completamente.

Solución estándar: Transferir volúmenes apropiados de *Solución madre del estándar 1* y *Solución madre del estándar 2* a un matraz volumétrico de 100 mL según los esquemas de dilución en la *Tabla 5*. Diluir con *Medio* a volumen.

Tabla 5

Contenido de la Tabla	Alícuota de Solución Madre del Estándar 1 (mL)	Alícuota de Solución Madre del Estándar 2 (mL)
Losartán Potásico/Hidroclorotiazida (mg)		
50/12,5	5	5
100/12,5	10	5
100/25	10	10

Solución muestra: Pasar una porción de la solución en análisis a través de un filtro adecuado con un tamaño de poro de 0,45 µm.

Sistema cromatográfico
(Ver *Cromatografía* (621), *Aptitud del Sistema*.)

Modo: HPLC

Detector: UV 225 nm

Columna: 4,6 mm × 25 cm; relleno L1 de 5 µm

Temperatura del muestreador automático: 8°

Velocidad de flujo: 1,2 mL/min

Volumen de inyección: 10 µL

Tiempo de corrida: No menos de 2 veces el tiempo de retención del pico de losartán

Aptitud del sistema

Muestra: *Solución estándar*

[NOTA—Los tiempos de retención relativos para hidroclorotiazida y losartán son 1,0 y 1,4, respectivamente.]

Requisitos de aptitud

Desviación estándar relativa: No más de 2,0% para los picos de hidroclorotiazida y de losartán

Análisis

Muestras: *Solución estándar* y *Solución muestra*

Calcular las cantidades disueltas de losartán potásico (C₂₂H₂₇ClKN₃O) e hidroclorotiazida (C₇H₄ClN₂O₄S₂), como porcentaje de la cantidad declarada:

$$\text{Resultado} = (r_u/r_s) \times C_s \times (1/L) \times V \times 100$$

r_u = respuesta del pico de losartán o hidroclorotiazida de la *Solución muestra*

r_s = respuesta del pico de losartán o hidroclorotiazida de la *Solución estándar*

- C_1 = concentración de ER Losartán Potásico USP o ER Hidroclorotiazida USP en la *Solución estándar* (mg/mL)
 L = cantidad declarada (mg/Tableta)
 V = volumen de *Medio*, 900 mL

Tolerancias: No menos de 85% (Q) de la cantidad declarada de losartán potásico ($C_{20}H_{22}ClKN_2O$) y no menos de 80% (Q) de la cantidad declarada de hidroclorotiazida ($C_7H_4ClN_2O_2S_2$)

- **UNIFORMIDAD DE UNIDADES DE DOSIFICACIÓN (905):** Cumplen con los requisitos.

IMPUREZAS

IMPUREZAS ORGÁNICAS

Solución amortiguadora A, Solución amortiguadora B, Solución A, Solución B, Fase móvil, Diluyente, Solución estándar, Solución muestra y Sistema cromatográfico: Proceder según se indica en la *Valoración*.

Solución estándar de clorotiazida: 0,1 mg/mL de ER Clorotiazida USP, que se prepara disolviendo en *Diluyente* (50% del volumen del matraz). Diluir con *Solución amortiguadora A* a volumen y someter a ultrasonido.

Solución estándar de compuesto relacionado A de benzotiadiazina: 0,1 mg/mL de ER Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina USP, que se prepara disolviendo en *Diluyente* (50% del volumen del matraz). Diluir con *Solución amortiguadora A* a volumen y someter a ultrasonido.

Solución de degradación de losartán: [NOTA—Esta solución contiene los productos de degradación dímero 1-H y dímero 2-H, y losartán potásico.] Pesar 12 mg de ER Losartán Potásico USP en un matraz de 50 mL. Disolver en 5 mL de agua. Pipetear y transferir 5,0 mL de ácido clorhídrico 0,1 N a esta solución y colocarla en un horno a 105° durante 1–2 horas. Retirar del horno y dejar que se enfríe a temperatura ambiente. Pipetear y transferir 5,0 mL de hidróxido de sodio 0,1 N al matraz, y diluir con agua a volumen.

Solución estándar diluida: Diluir porciones de *Solución estándar* y *Solución estándar de compuesto relacionado A de benzotiadiazina* primero con acetonitrilo (30% del volumen del matraz), luego con *Solución amortiguadora A* hasta obtener una solución con concentraciones nominales basadas en el contenido de la Tableta según se indica en la *Tabla 6*.

Tabla 6

Contenido de la Tableta Losartán Potásico/Hidroclorotiazida (mg)	Concentración de ER Losartán Potásico USP (µg/mL)	Concentración de ER Hidroclorotiazida USP (µg/mL)	Concentración de ER Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina USP (µg/mL)
50/12,5	4	1	1
100/12,5	4	0,5	1
100/25	4	1	1

Solución de aptitud del sistema: Disolver cantidades pesadas de ER Losartán Potásico USP y ER Hidroclorotiazida USP en un matraz volumétrico adecuado en *Diluyente* (50% del volumen del matraz). Agregar un volumen de *Solución de degradación de losartán* equivalente a aproximadamente el 25% del volumen del matraz, al mismo matraz. Transferir cantidades apropiadas de *Solución estándar de clorotiazida* y *Solución estándar de compuesto relacionado A de benzotiadiazina* al mismo matraz, y diluir con *Solución amortiguadora A* a

volumen hasta obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,4 mg/mL de losartán, 0,1 mg/mL de hidroclorotiazida y 0,001 mg/mL de compuesto relacionado A de benzotiadiazina y de clorotiazida. Ajustar con ácido fosfórico a un pH de 2,5 y mezclar bien. Pasar una alícuota de la solución a través de un filtro de PTFE o equivalente con un tamaño de poro de 0,45 µm y usar el filtrado.

Solución de sensibilidad: Pipetear y transferir 5,0 mL de *Solución estándar diluida* a un matraz volumétrico de 50 mL. Agregar 15 mL de acetonitrilo, diluir con *Solución amortiguadora A* a volumen y mezclar bien.

Aptitud del sistema

Muestras: *Solución estándar, Solución estándar diluida, Solución de aptitud del sistema* y *Solución de sensibilidad*
 [NOTA—El tiempo de corrida es aproximadamente 1,6 veces el tiempo de retención del pico de losartán. Ver la *Tabla 7* para los tiempos de retención relativos.]

Requisitos de aptitud

Resolución: No menos de 1,5 entre clorotiazida y compuesto relacionado A de benzotiadiazina; y no menos de 1,5 entre compuesto relacionado A de benzotiadiazina e hidroclorotiazida, *Solución de aptitud del sistema*

Factor de asimetría: No más de 2,5 para el pico de losartán, *Solución estándar*

Desviación estándar relativa: No más de 2,0% para los picos de hidroclorotiazida y de losartán, *Solución estándar*; no más de 10,0% para los picos de hidroclorotiazida y de losartán, *Solución estándar diluida*
Relación señal-ruido: No menos de 10 para cada componente de la primera inyección. Si esto no se cumple, la relación señal-ruido debe ser mayor de 3 con una desviación estándar relativa de las áreas de menos de 25% entre 3 inyecciones repetidas, *Solución de sensibilidad*

Análisis

Muestras: *Solución muestra* y *Solución estándar diluida*
 Calcular el porcentaje de compuesto relacionado A de benzotiadiazina (expresado como el equivalente a hidroclorotiazida) en la porción de Tabletas tomada:

$$\text{Resultado} = (r_0/r_s) \times (C_1/C_0) \times (M_1/M_2) \times 100$$

- r_0 = respuesta del pico de compuesto relacionado A de benzotiadiazina de la *Solución muestra*
 r_s = respuesta del pico de compuesto relacionado A de benzotiadiazina de la *Solución estándar diluida*
 C_1 = concentración de ER Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina USP en la *Solución estándar diluida* (mg/mL)
 C_0 = concentración nominal de hidroclorotiazida en la *Solución muestra* (mg/mL)
 M_1 = peso molecular de hidroclorotiazida, 298
 M_2 = peso molecular de compuesto relacionado A de benzotiadiazina, 286

Calcular el porcentaje de cada impureza especificada en la porción de Tabletas tomada:

$$\text{Resultado} = (r_0/r_s) \times (C_1/C_0) \times 100$$

- r_0 = respuesta del pico de cada impureza individual de la *Solución muestra*
 r_s = respuesta del pico de losartán de la *Solución estándar diluida*
 C_1 = concentración de ER Losartán Potásico USP en la *Solución estándar diluida* (mg/mL)
 C_0 = concentración nominal de losartán potásico en la *Solución muestra* (mg/mL)

Para Tabletas con un contenido de 50/12,5 y 100/25 mg de losartán potásico/hidroclorotiazida, respectivamente, calcular el porcentaje de cualquier otra impureza en la porción de Tabletas tomada:

$$\text{Resultado} = (r_U/r_S) \times (C_S/C_U) \times 100$$

r_U = respuesta del pico de cada impureza individual de la *Solución muestra*

r_S = respuesta del pico de losartán de la *Solución estándar diluida*

C_S = concentración de ER Losartán Potásico USP en la *Solución estándar diluida* (mg/mL)

C_U = concentración nominal de losartán potásico en la *Solución muestra* (mg/mL)

Para Tabletas con un contenido de 100/12,5 mg de losartán potásico/hidroclorotiazida, calcular el porcentaje de cualquier otra impureza en la porción de Tabletas tomada:

$$\text{Resultado} = (r_U/r_S) \times (C_S/C_U) \times 100$$

r_U = respuesta del pico de cada impureza individual de la *Solución muestra*

r_S = respuesta del pico de hidroclorotiazida de la *Solución estándar diluida*

C_S = concentración de ER Hidroclorotiazida USP en la *Solución estándar diluida* (mg/mL)

C_U = concentración nominal de hidroclorotiazida en la *Solución muestra* (mg/mL)

Criterios de aceptación Ver la *Tabla 7*.

Nombre	Tiempo de Retención Relativo	Criterios de Aceptación, No más de (%)
Clorotiazida ^a	0,57	—
Compuesto relacionado A de benzotiadiazina	0,69	1,0

Tabla 7 (continuación)

Nombre	Tiempo de Retención Relativo	Criterios de Aceptación, No más de (%)
Hidroclorotiazida	1,0	—
Losartán	2,7	—
Dimero-1-H ^b	3,3	0,5
Dimero-2-H ^c	3,5	0,5
Cualquier producto de degradación no especificado	—	0,2
Impurezas totales ^d	—	2,0

^a Esta impureza del proceso (no es un producto de degradación) se relaciona con hidroclorotiazida y se controla en el fármaco.

^b Relacionado con losartán potásico: Sal potásica de 5-[4'-(2-butil-5-[(5-14')-(2-butil-4-cloro-5-hidroximetil-1H-imidazol-1-0)metil]bifenil-2-0)-1H-tetrazol-1-0)metil]-4-cloro-1H-imidazol-1-0)metil]bifenil-2-0]tiazolol.

^c Relacionado con losartán potásico: Sal potásica de 5-[4'-(2-butil-5-[(5-14')-(2-butil-4-cloro-5-hidroximetil-1H-imidazol-1-0)metil]bifenil-2-0)-2H-tetrazol-2-0)metil]-4-cloro-1H-imidazol-1-0)metil]bifenil-2-0]tiazolol.

^d Las impurezas totales incluyen la suma de todas las impurezas especificadas y las impurezas no especificadas que son iguales a o mayores de 0,1%.

REQUISITOS ADICIONALES

• **ENVASADO Y ALMACENAMIENTO:** Conservar en envases cerrados herméticamente. Proteger de la luz. Almacenar a temperatura ambiente controlada.

• **ETIQUETADO:** Cuando se especifica más de una prueba de *Disolución*, el etiquetado indica la prueba de *Disolución* usada, solo si no se usa la *Prueba 1*.

• **ESTÁNDARES DE REFERENCIA USP (11)**

ER Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina USP

4-Amino-6-cloro-1,3-bencenodisulfonamida.

$C_{12}H_{10}ClN_2O_2S_2$ 285,73

ER Clorotiazida USP

ER Hidroclorotiazida USP

ER Losartán Potásico USP

ANEXO N°5 Líneas de Calibración de Estándares a 240,242,44,270,272,274 nm

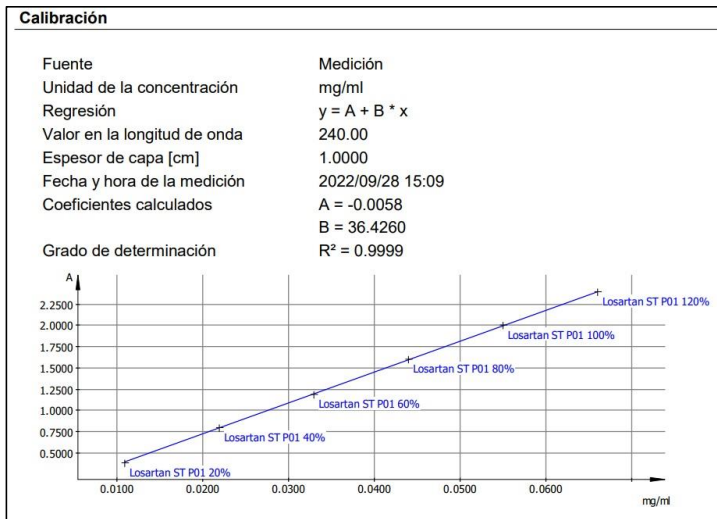


Figura. N° 13. Línea de Calibración de LOP ST a 240 nm

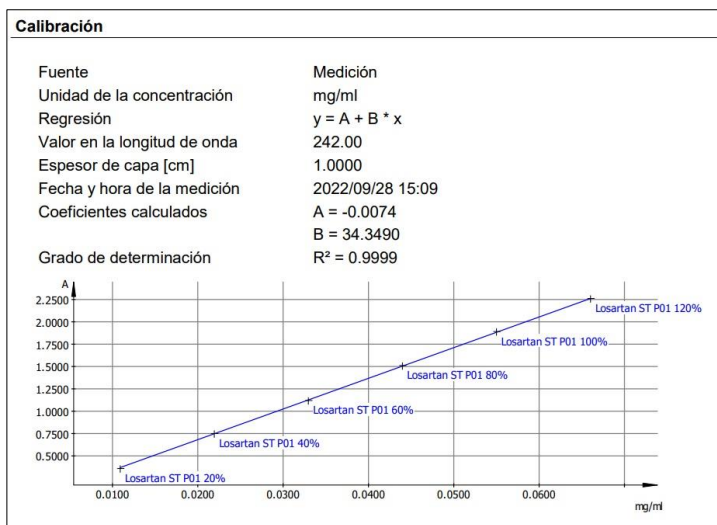


Figura. N° 14. Línea de Calibración de LOP ST a 242 nm

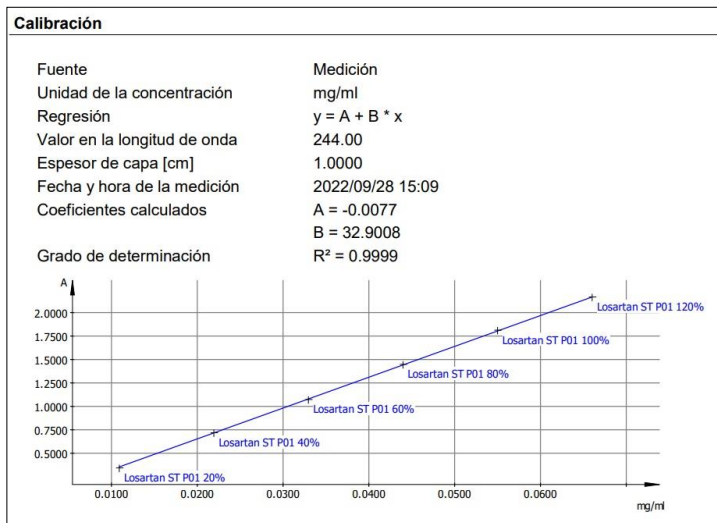


Figura. N° 15. Línea de Calibración de LOP ST a 244 nm

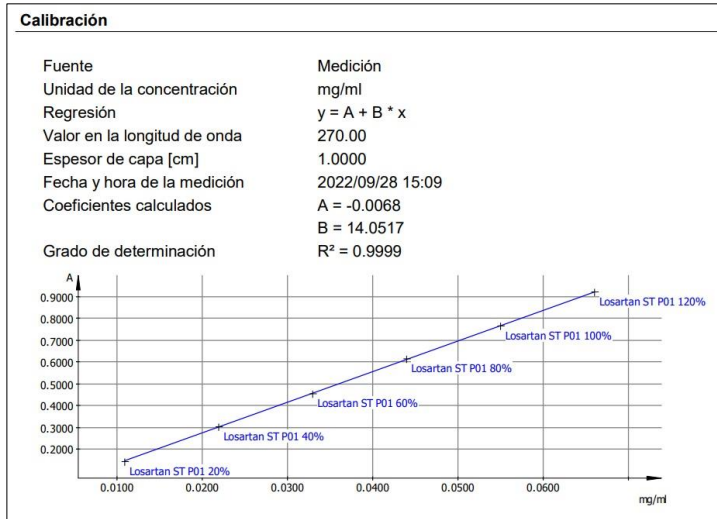


Figura. N° 16. Línea de Calibración de LOP ST a 270 nm

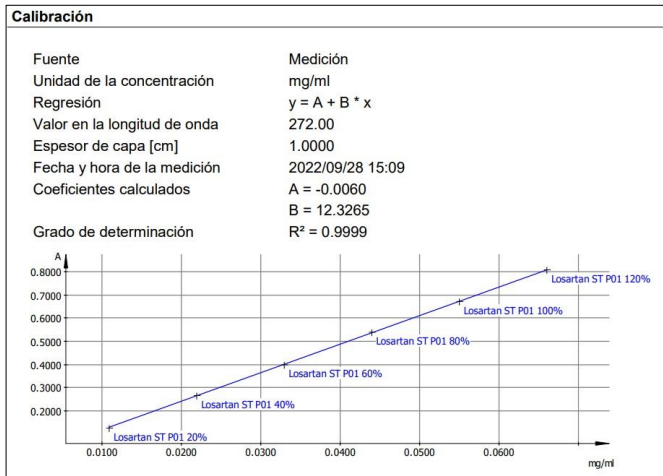


Figura. N° 17. Línea de Calibración de LOP ST a 272 nm

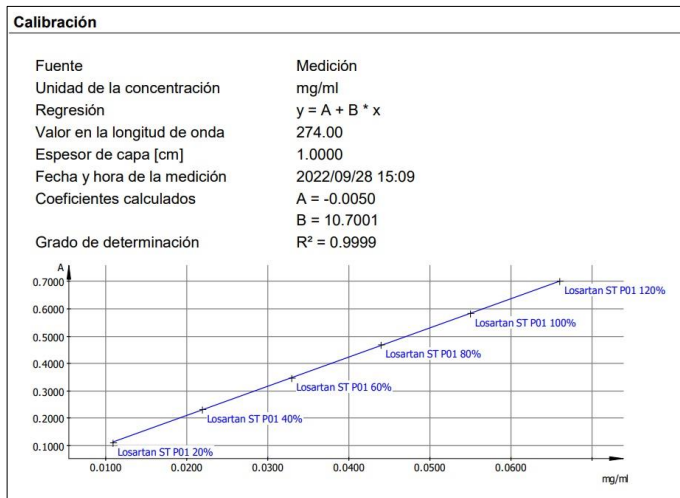


Figura. N° 18. Línea de Calibración de LOP ST a 274 nm

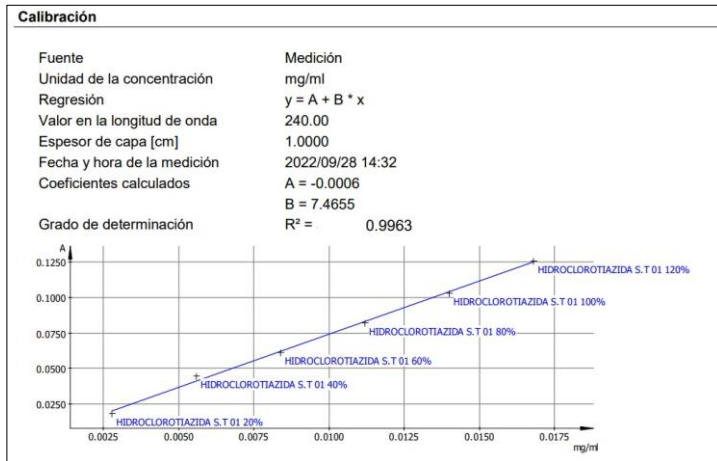


Figura. N° 19. Línea de Calibración de HCT a 240 nm

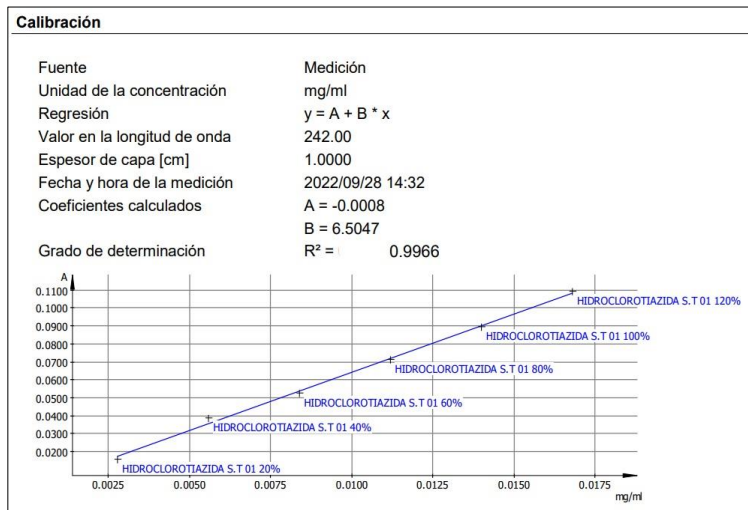


Figura. N° 20. Línea de Calibración de HCT a 242 nm

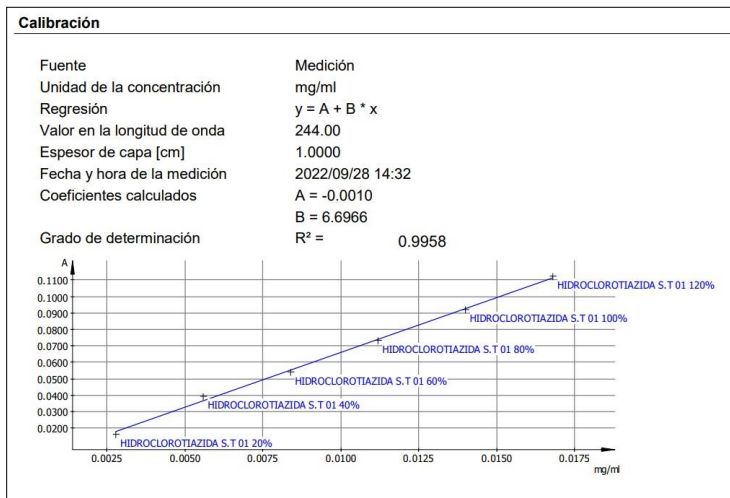


Figura. N° 21. Línea de Calibración de HCT a 244 nm

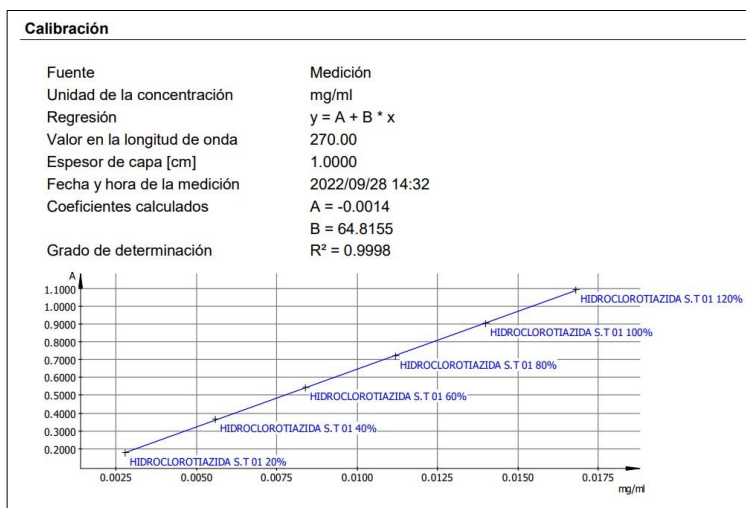


Figura. N° 22. Línea de Calibración de HCT a 270 nm

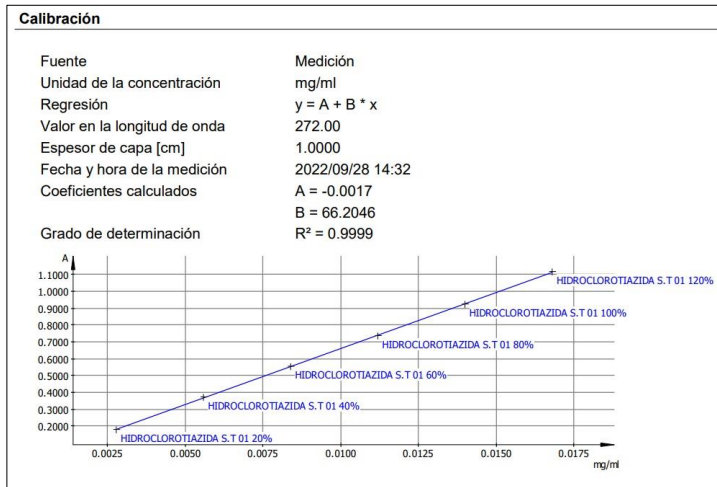


Figura. N° 23. Línea de Calibración de HCT ST a 272 nm

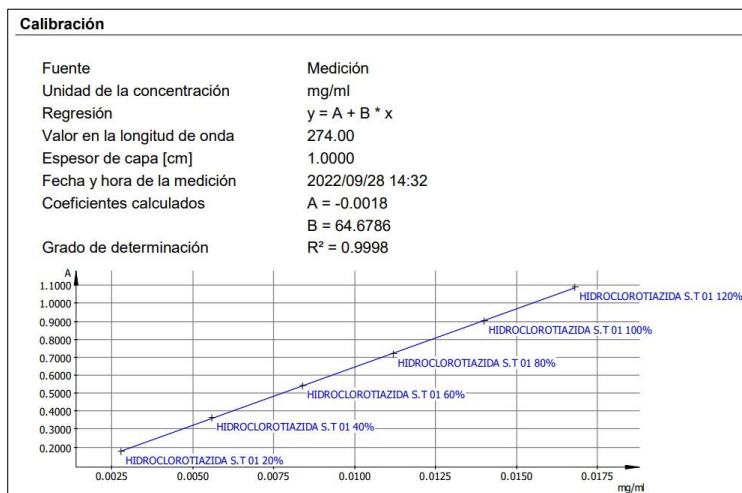


Figura. N° 24. Línea de Calibración de HCT ST a 274 nm