

# ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE LOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS: HPLC Y UPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ATORVASTATINA EN TABLETAS



## AUTORES:

- MSc. Pilar Asunción Soledispa Cañarte
- MSc. Glenda Marcela Sarmiento Tomalá
- Mag. Zoraida del Carmen Burbano Gómez
- Mag. Francisca Patricia Jiménez Granizo
- Mag. Giomara Margarita Quizhpe Monar
- MSc. Alexandra Jenny López Barrera

**ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE LOS MÉTODOS  
CROMATOGRÁFICOS:HPLC Y UPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN  
DE ATORVASTATINA EN TABLETAS**

MSc. Pilar Asunción Soledispa Cañarte  
MSc. Glenda Marcela Sarmiento Tomalá  
Mag. Zoraida del Carmen Burbano Gómez  
Mag. Francisca Patricia Jiménez Granizo  
Mag. Giomara Margarita Quizhpe Monar  
MSc. Alexandra Jenny López Barrera

**Título: ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE LOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS: HPLC Y UPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ATORVASTATINA EN TABLETAS.**

**Autores:**

MSc. Pilar Asunción Soledispa Cañarte  
MSc. Glenda Marcela Sarmiento Tomalá  
Mag. Zoraida del Carmen Burbano Gómez  
Mag. Francisca Patricia Jiménez Granizo  
Mag. Giomara Margarita Quizhpe Monar  
MSc. Alexandra Jenny López Barrera

**REVISIÓN TÉCNICA:**

**DISEÑO Y MAQUETACIÓN:**

Bárbara Bravo

© de los textos: los autores

© de la presente edición: CEO Editorial

PRIMERA EDICIÓN: 8 DE ENERO DEL 2024

ISBN: 978-9942-7177-8-8

Publicado por acuerdo con los autores

Capacitación y Estrategia Online

CEO Editorial

Guayaquil – Ecuador

Fecha: 8-1-2024 Cámara Ecuatoriana de Libro

NOTA EDITORIAL: Las opiniones y contenidos en esta obra son de responsabilidad exclusiva de sus autores

## TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN .....	8
CAPITULO I PROBLEMA.....	9
Planteamiento del Problema.....	9
Formulación del problema .....	9
Justificación e importancia.....	9
Objetivos.....	10
CAPITULO II MARCO TEÓRICO.....	11
INTRODUCCIÓN A LA TÉCNICA DE HPLC.....	11
Antecedentes sobre cromatografía .....	12
Antecedentes.....	17
CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
Tipo de Investigación.....	19
Materiales .....	20
Muestra .....	22
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	25
Resultados de estándar y muestra atorvastatina por HPLC.....	25
Prueba de comparación de métodos.....	43
Tiempo de retención HPLC y UPLC .....	44
Discusión .....	47
Conclusiones.....	48
Recomendaciones .....	48
BIBLIOGRAFÍA .....	49

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Equipo HPLC Alliance Waters 2695	6
Gráfico 2 - HPLC Resultado, estándar y muestra	22
Gráfico 3 - HPLC, Standard; Vial1; Inyection 1	25
Gráfico 4 - HPLC, Standard; Vial 1; Inyection 2	26
Gráfico 5 - HPLC, Standard; Vial 1; Inyection 3	27
Gráfico 6 - HPLC, Standard; Vial 1; Inyection 4	28
Gráfico 7 - HPLC, Standard; Vial 1; Inyection 5	29
Gráfico 8- HPLC, Muestra; Vial 2; Inyection 1	30
Gráfico 9 - HPLC, Muestra; Vial 3; Inyection 1	31
Gráfico 10 - UPLC resultado, estándar y muestra	32
Gráfico 11 - UPLC, Estándar; Vial 1; Inyection 1	34
Gráfico 12 - UPLC, Estándar, Vial 1; Inyection 2	35
Gráfico 13 - UPLC, Estándar; Vial 1; Inyection 3	36
Gráfico 14 - UPLC, Estándar; Vial 1; Inyection 4	37
Gráfico 15 - Sample Type: Estándar; UPLC, Vial 1	37
Gráfico 16 - UPLC, Estándar; Vial 1; Inyection 5	38
Gráfico 17 - UPLC, Muestra; Vial 2; Inyection 1	39
Gráfico 18 - UPLC, Muestra; Vial 3; Inyection 1	40
Gráfico 19 - Comparación del tiempo de retención de la atorvastatina	41
Gráfico 20 - Prueba de t de Student	42
Gráfico 21 - Gráfica de turkey para comparar la variabilidad de métodos	43

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2 - Equipos empleados para la cuantificación de atorvastatina	17
Tabla 3 - Materiales empleados para la cuantificación de atorvastatina	18
Tabla 4 - Materiales empleados para la cuantificación de atorvastatina	19
Tabla 5 - Aptitud del Sistema HPLC	21
Tabla 6 - Aptitud del sistema UPLC	21
Tabla 7 - Sample type: Estándar	23
Tabla 8 - Sample Type: Muestra	24
Tabla 9 - Sample Type: Estándar	25
Tabla 10 - Sample Type: Standard Inyention 3	27
Tabla 11 - Sample Type: Standard. Inyention 4	28
Tabla 12 - Sample Type: Standard Inyention 5	29
Tabla 13 - Sample Type - Muestra Vial 2; Inyention 1	30
Tabla 14 - Sample Type: Muestra; Vial 3; Inyention 1	31
Tabla 15 - Sample Type: Estándar UPLC	32
Tabla 16 - Sample Type: Estándar UPLC, Inyention 1	34
Tabla 17 - Sample Type: Estándar UPLC; Inyention 2	35
Tabla 18 - Sample Type: Estándar, UPLC, Vial 1, Inyention 3	36
Tabla 19 - Sample Type: Estándar, UPLC; Vial 1, Inyention 5	38
Tabla 20 - Sample Type: Muestra, UPLC, Vial 2; Inyention 1	39
Tabla 21 - Sample Type: Muestra, UPLC; Vial 3; Inyention 1	40
Tabla 22 - Valoración del coeficiente de Correlación Intraclase (CCI)	41
Tabla 23 - Resultados de prueba t de Student	43

## PRÓLOGO

El 25,8% de la población entre 18 a 69 años, presentan tres o más factores de riesgo para enfermedades crónicas no transmisibles, entre las de mayor incidencia esta la presión arterial elevada, hiperglicemia, glucosa alterada y colesterol elevado. Se plantea un estudio comparativo entre dos métodos analíticos para cuantificar la atorvastatina. El método de cromatografía líquida de alta velocidad (UPLC) y el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Realizando una comparación de las variables como el tiempo de retención y concordancia entre los métodos cromatográficos. El análisis se la realizo en tabletas de 80 mg que contienen atorvastatina, se inyectaron cinco estándares y una muestra por duplicado para cada método, utilizando medidas estadísticas como coeficiente de variación, coeficiente de concordancia y el teste Student. Los resultados obtenidos fueron que coeficiente de variación fue de 0.0378% para el método por HPLC y en el método por UPLC, el coeficiente de variación fue de 0.8729, se estableció que están dentro del rango permitido y un coeficiente de concordancia de 0.810 lo que significa que los dos métodos son eficaces para cuantificar atorvastatina.

## INTRODUCCIÓN

En el País hay más de 10 mil principios activos que son controlados, vigilados y regulados por el ARCSA, de acuerdo con la “Política Nacional de Medicamentos 2017-2021”, estas entidades son las encargadas de realizar los ensayos de verificación para productos elaborados y comercializados en el Ecuador. Entre estos se encuentra la atorvastatina en tabletas, un medicamento genérico nuevo en el mercado ecuatoriano (SAE, 2018).

Dentro de las estatinas se encuentra el medicamento de estudio conocido como atorvastatina, que bloquea la enzima hidroximetil glutaril coenzima A (HMG- CoA); por lo que es usado clínicamente para disminuir los niveles de colesterol y triglicéridos, teniendo una gran biodisponibilidad en la forma farmacéutica de tabletas recubiertas (Carretero, 2018)

(SEACE, 2011) menciona que la Atorvastatina (como sal cálcica), su administración es por vía oral y su presentación común es de forma farmacéutica comprimido y comprimido recubierto.

Para realizar las pruebas de control de calidad de las tabletas que contienen atorvastatina, se utilizarán distintos métodos como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía líquida de alta velocidad (UPLC). Ésta última tiene la capacidad de alcanzar presiones de hasta el doble que la cromatografía líquida de alta resolución, logrando que el análisis sea más rápido. Una de las áreas en las cuales se enfoca el químico farmacéutico, está la verificación de la calidad de medicamentos, por eso es muy importante que se mantenga al día en cuanto al avance de la tecnología, elaboración y validación de nuevos métodos para dichos análisis.

Uno de los inconvenientes más comunes en la industria farmacéutica es el tiempo, ya que cada día manufacturan centenares de medicamentos y uno de los análisis más importantes es la identificación y concentración del principio activo de una forma farmacéutica. Por lo tanto, se realizará una comparación entre la Cromatografía líquida de alta velocidad (UPLC), y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en el análisis de la atorvastatina.



# CAPITULO I PROBLEMA

## Planteamiento del Problema

Se puede establecer que existe una gran demanda en la obtención de medicamentos que sean seguros y eficaces para el paciente. Pero, para poder llegar a determinar esto, se debe asegurar la calidad de este a través de un íntegro y extenso proceso; que conlleva desde el inicio de una previa y extensiva investigación – desarrollo, seguido de la fabricación del fármaco, pasando por un rígido control de calidad para luego almacenarlo, distribuirlo en los puntos y a su vez llegar a brindarle la información de la medicina al profesional que se encargará de prescribirlo.

Villalta (2015) expone que:

Los métodos cromatográficos se han utilizado a lo largo de la historia para identificar y separar compuestos, basándose en la distribución y absorción, pero las exigencias cada día son mayores por lo que se han creado equipos cromatográficos capaces de cuantificar la concentración de los compuestos. (p.1)

Por consiguiente, se puede definir que la técnica que presenta el método UPLC se encuentra desarrollada en base al método HPLC. Argumentando que el método de operación de ambas es igual, con la leve diferencia que la UPLC es más eficaz debido a que emplea una presión de bomba alta y esta es de 100 MPA en comparación de la bomba de presión de la HPLC que solo es de 40 MPA.

Otro punto para acotar es la amplia diferencia en el análisis de las partículas, pues el HPLC examina partículas cuyo tamaño se encuentra oscilado en 5 micrómetros. En cambio, el otro método cromatográfico, llega a analizar partículas mucho más diminutas, aproximadamente de 2 micrómetros.

## Formulación del problema

¿Qué método cromatográfico es más eficiente para cuantificar la atorvastatina en tabletas?

## Justificación e importancia

La presente investigación es de suma importancia debido a que se comparará dos métodos cromatográficos que son útiles para cuantificar un principio activo, con estos análisis se garantizará la eficiencia de los equipos para mostrar resultados precisos en torno al tiempo de

análisis y sobre todo la calidad del principio activo (atorvastatina) que es comercializada a nivel nacional, para reducir los niveles plasmáticos de colesterol total, colesterol LDL y triglicéridos e incremento los HDL protectores.

Además, según los datos obtenidos por el Ministerio de Salud Pública (MSP, 2020) indica que: En Ecuador las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte, en el 2019 alcanzó el 26,49% del total de defunciones. Según la encuesta STEPS de 2018, el 25,8% de la población, entre 18 a 69 años, presentan tres o más factores de riesgo para enfermedades crónicas no transmisibles, entre las de mayor incidencia está presión arterial elevada, hiperglicemia, glucosa alterada y colesterol elevado.

Por este motivo, unos resultados precisos garantizarán mejores beneficios para aquellos pacientes que se le administren atorvastatina, además de esto; al comparar los dos métodos cromatográficos se tendrá una proyección más clara acerca del HPLC y UPLC con respecto a la cuantificación de compuestos y principios activos presente en medicamentos.

#### Hipótesis

Los dos métodos cromatográficos HPLC y UPLC son eficientes para la cuantificar atorvastatina.

### **Objetivos**

#### **Objetivo General**

Comparar los métodos cromatográficos: HPLC y UPLC para la cuantificación de atorvastatina en tabletas.

#### **Objetivos Específicos**

Establecer los procedimientos y condiciones óptimas para el análisis de la atorvastatina por los métodos cromatográficos HPLC y UPLC.

Determinar el coeficiente de correlación de los métodos cromatográficos HPLC y UPLC en la cuantificación de atorvastatina en tabletas.

## CAPITULO II MARCO TEÓRICO

### INTRODUCCIÓN A LA TÉCNICA DE HPLC

La cromatografía líquida en la actualidad es de gran importancia, tras varias décadas de los estudios de Tsvet, los primeros modelos surgidos por 1965 desaparecerían, para que ocupen su lugar una generación de cromatógrafos más precisos, accesibles y comprensibles. Después, en 1985 la cuarta generación donde el ordenador controla las condiciones instrumentales, al mismo tiempo que obtiene y recopila datos, confirmando su idoneidad (García &Yusá Marco, 2008).

En la figura 1 se observa un equipo de cromatografía líquida de alta resolución, HPLC Alliance Waters 2695.

**Gráfico 1** - Equipo HPLC Alliance Waters 2695



Fuente: (DoTmed Corporation , 2020)

### CROMATOGRAFÍA

Como base principal en la separación de sustancias coloreadas, Tsvet invento una técnica a la cual la llamo cromatografía. Donde *chroma* significa color y *graphos* escritura, también anticipo que lograrían examinar sustancias sin color y por aquello la definió como “un método en el que distintos componentes de unamezcla son separados en una columna adsorbente, con un aporte continuo de fase líquida” (García & Yusá Marco, 2008).

La definición oficial para cromatografía fue presentada por el Comité Especial de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry)<sup>1</sup>: “un método usado principalmente para separar los componentes de una muestra, en el que dichos componentes se distribuyen entre dos fases, una estacionaria, mientras que la otra se mueve. La fase estacionaria

*puede ser solida o liquida soportada sobre un sólido, o un gel. La fase estacionaria puede presentarse en una columna o un lecho o film. La fase móvil puede ser gaseosa o liquida”* (García & Yusá Marco, 2008)

Para Tsvet, la cromatografía solo representaba una absorción, pero en realidad también puede ser intercambio iónico, exclusión, afinidad, partición. Los tiempos van cambiando y la tecnología e innovación acerca de la cromatografía liquida van mejorando; siendo estos más sensibles, por lo que incluso los términos han evolucionado proporcionalmente, obteniendo variantes como: cromatografía liquida de alta resolución, alta presión, alta eficiencia o moderna (García & Yusá Marco, 2008).

<sup>1</sup> IUPAC Analytical Chemistry Division, Commission of Analytical Nomenclature. PureAppl. Chem., 37, 447 (1974)

### **Antecedentes sobre cromatografía**

Entre 1903 y 1906 surgieron las primeras investigaciones de parte de Tsvet, que uso columnas de adsorción de líquidos para lograr separar pigmentos presentes en vegetales. Después por 1930 Kuhn y Lederer, y Reichstein y Max Euw separaron productos naturales con referencia al método de Tsvet. En 1940, la cromatografía planar de capa fina y de papel fueron remedios analíticos solo cualitativas. Martin y Synge en 1941 describieron que<sup>2</sup> *“la fase móvil puede ser no solo liquida, sino un vapor, para separar sustancias volátiles en una columna por la que se hace fluir un gas a través de un gel impregnado de un solvente novolátil”* conocida como (cromatografía gas-liquido o GLC creada en 1952, luego de once años) (García & Yusá Marco, 2008).

#### **HPLC sus Inicios**

En 1958 lograron las primeras separaciones de aminoácidos de forma práctica. Una columna con un sistema de presurización que mantenía las presiones constantes, un detector idóneo para detectar los compuestos separados y eluidos, fue lo que causo el nacimiento de la cromatografía liquida, conocida por primera vez, como de alta presión (*HPLC, High Pressure Liquid Chromatography*), después con columnas más eficientes y detectores mucho más sensibles, alta resolución (*HPLC, High Performance Liquid Chromatography*), en 1969 se plantearon la autonomía entre cromatografía liquida y cromatografía de gases y aparecieron otras variantes de retención como adsorción, partición, intercambio iónico. Huber, Horvatgh, Preiss y Lipsky establecieron lo que actualmente conocemos como HPLC (García & Yusá Marco, 2008).

<sup>2</sup> Martin, A. J. P. t Synge, R. L. M.; Biochem. J., 35, 91 (1941)

## **Tipos de cromatografía HPLC**

### **Cromatografía en fase normal o líquido-sólido, HPLSC**

Conocida como (*HPLSC, high performance Liquid-solid Chromatography*) la fase móvil normalmente es una mezcla de líquidos como benceno, ciclohexano de polaridad baja y la fase estacionaria como sílice, alúmina con características polares, es de gran importancia para eluir solutos medianamente polares e isómeros posicionales, además de esto, las interacciones son de fuerzas de van der Waals (Rodríguez, 2013).

Cromatografía en fase reversa o partición, líquido-líquido, HPLLC La separación es por diferencias hidrofóbicas, la fase móvil es polar y la fase estacionaria es apolar, en donde los solutos más polares eluyen primero, por ende; los solutos con menor polaridad tienen mayor afinidad con la fase estacionaria y los más usados son los grupos orgánicos (Rodríguez, 2013).

### **Cromatografía de intercambio iónico, HPIEC**

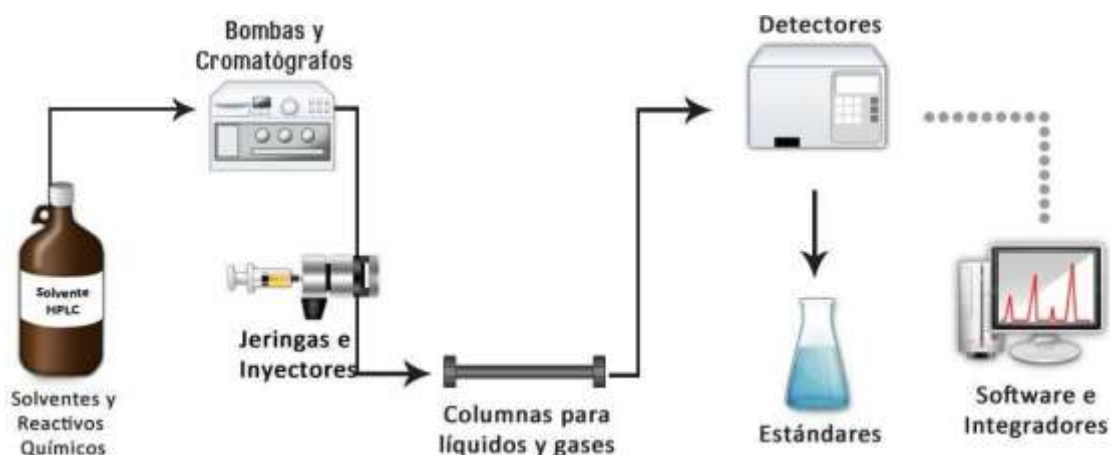
Conocida como (*HPIEC, High-Performance Ion Exchange Chromatography*) se fundamenta en que; la atracción iónica empieza en la fase estacionaria que se la conoce como (retención) y luego la fase móvil se (eluye), para que se den estas condiciones las cargas del soluto o de los solutos deben ser contrarias a la fase estacionaria y se los clasifican en intercambio catiónico e intercambio aniónico (Rodríguez, 2013).

### **Cromatografía de Exclusión molecular, HPSEC**

La retención va a estar determinado por el tamaño del poro, por lo cual, las moléculas con mayor tamaño tendrán mayor dificultad para penetrar los poros de la fase estacionaria y, por ende; estarán durante un periodo corto en la columna, en cambio, las moléculas de menor tamaño penetrarán fácilmente dicha porosidad, manteniéndose más tiempo en la columna y como resultado su retención será mayor aparentemente (Rodríguez, 2013).

## Partes de un sistema Cromatográfico

Ilustración 1 - Diagrama de un cromatógrafo básico



Fuente: (HPLC Química, 2021)

En un equipo cromatográfico, él o los reservorios son los encargados de contener la fase móvil, solventes y mezclas combinadas; ya sean estas apolares o polares, dependiendo la muestra a cuantificar sus concentraciones van a variar dependiendo el método analítico, estos medios deben ser filtrados para evitar algún material extraño en la solución. Los reservorios normalmente son de vidrio y pueden utilizarse varios, dependiendo si se prepara una solución gradiente (Suarez & Morales, 2018).

Para que la fase móvil y solventes ingresen por todo el sistema cromatográfico se necesitan presiones y velocidad de flujo constantes, dependiendo el tiempo, diámetro de columna y composición de la fase móvil. El volumen de inyección está entre 5  $\mu\text{l}$  y 5 ml, todo este sistema complejo usa unas bombas con presiones que pueden llegar a 6000 psi, las bombas más usadas son las de desplazamiento, recíprocas y las neumáticas. El uso de desgasificadores son incorporados en el equipo, que consiste en un sistema de bombeo al vacío (Suarez & Morales, 2018).

Un componente fundamental es la precisión para la separación cromatográfica, para aquello la reproducibilidad con la que se inyecta la muestra en la columna es muy importante, un sistema de inyección automático ayuda a que la muestra ingrese a la fase móvil de manera precisa y exacta (Suarez & Morales, 2018).

Los detectores actuales en HPLC son ubicados en serie dependiendo de las características de la muestra, al momento de detectar un compuesto y mandar una señal eléctrica a un ordenador con un software que registra el pico, con alta sensibilidad, reproducibilidad, la respuesta es corta para

percibir todos los analitos, un tipo de detectores son los que miden la propiedad de compuestos, los principales son de absorbancia y fluorescencia (Alfonso, 2008).

Para que una separación cromatográfica tenga éxito, se necesitan columnas capaces de realizar esta operación, esta debe soportar presiones constantes para garantizar que la fase móvil entre y salga correctamente. Normalmente estas columnas son hechas a partir de acero inoxidable, sus diámetros varían según los compuestos a identificar o cuantificar, pero pueden ser entre 50 a 300 mm de longitud con un tamaño de partícula entre 3 a 10  $\mu\text{m}$ , es aquí donde estará la fase estacionaria, también su porosidad es un factor importante para considerar, ya que existen dos tipos básicos de rellenos; uno pelicular y el otro poroso. Las precolumnas son colocadas por delante de la columna, ayudan a eliminar partículas que con el tiempo se depositan en la columna principal y un horno mantiene la temperatura adecuada para que se dé la separación cromatográfica (Alfonso, 2008).

El software dependiente del modelo cromatográfico procesa las señales eléctricas que envía el detector, donde un cromatograma es analizado e interpretado (Suarez & Morales, 2018).

UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography)

Basándose en el principio de HPLC, la cromatografía líquida de alta velocidad surgida por el 2004, sus primeros diseños renovaron aún más la velocidad e precisión para identificar y cuantificar compuestos químicos; unas columnas con rellenos en la fase estacionaria inferiores a 2  $\mu\text{m}$  y diámetros pequeños mejoran la resolución, sensibilidad, separaciones de componentes en tiempos mucho más cortos en comparación con HPLC. El sistema de bombeo UPLC llega hasta presiones de 15000 psi en comparación con la cromatografía líquida de alta resolución que llega máximo a 4000 psi (Zapata, 2016).

**Ilustración 2** - UPLC Waters



*Fuente: (Waters, s.f.)*

Waters patentó el sistema cromatográfico conocido como UPLC, siendo reproducible con el sistema cromatográfico HPLC de su misma empresa, con una gran capacidad de ser reproducible y fiable. El tiempo, tamaño de muestra son inferiores con una ventaja de tener mayor resolución, además de esto; el tamaño de partícula es inferior a 2  $\mu\text{m}$ , con un sistema cuaternario que ayuda a mezclar los componentes, la facilidad de transferir los métodos de HPLC a UPLC, que incluyen una calculadora dentro de su software. Varios tipos de detectores como él (PDA) fotodiodos en serie, (RI) índice de refracción, (FLR) fluorescencia, (UV) que permite tener una sensibilidad altamente confiable (Waters, s.f.).

Al realizar este estudio, podremos tener una idea más clara relacionada al sistema cromatográfico UPLC y HPLC, comparando varios parámetros de calidad y como se adecuó el sistema para transferir el método de cuantificación de atorvastatina por HPLC al UPLC.

## II.2 Estudios realizados

Según Elkady, Tammam, & Maaty, (2017) en su trabajo adaptaron el método cromatográfico HPLC a UPLC para cuantificar atorvastatina en tabletas con su metodología ya validada, demostraron mayor eficacia en UPLC.

Funes, Meza, & Ponce, (2015) realizaron una cuantificación de atorvastatina por HPLC, implementando una separación isocrática con fase móvil compuesta de acetonitrilo y ácido ortofosfórico (50:50), en una longitud de onda de 245 nm, dando una concentración dentro de los parámetros requeridos.

Mendez, (2010) Cuantificó y validó un método en HPLC para atorvastatina tabletas, usando como fase móvil acetato de amonio 0.002 M pH 3.0 y acetonitrilo (60:40) con una longitud de onda de 248 nm. Su metodología presentó linealidad, exactitud y precisión satisfactorias.

Simionato, y otros, (2014) con una metodología de fase inversa cuantificaron la atorvastatina en tabletas usando una fase móvil isocrática compuesta por ácido acético 0.1 % y acetonitrilo (45:55) a una longitud de onda de 246 nm.

Rajasekaran, Sasikumar, & Dharuman, (2011) implementaron una cromatografía por HPLC fase inversa demostrando que su método es válido para cuantificar atorvastatina, usando como fase móvil acetonitrilo y trietilamina 0.4% (pH 5.5 ajustado con ácido ortofosfórico) a una longitud de onda de 231 nm.



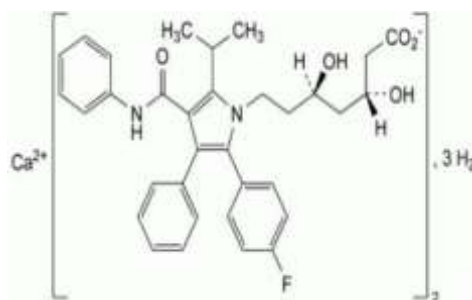
## Antecedentes

La tesis se basa en la comparación de métodos cromatográficos, cuantificando la atorvastatina en tabletas, sabiendo que; como materia prima y estándar de referencia es (atorvastatina cálcica trihidrato).

## Atorvastatina

La atorvastatina [R-(R,R)]-2-(4-Fluorofenil) β,d-dihidroxi-5-(1-metiletil)-3-fenil-4 [(fenilamino) carbonil]-1 H-pirrol-1-heptanoico sal cálcica (2:1) trihidrato, es una estatina que corresponde al conjunto de medicamentos conocidos como inhibidores de la enzima hidroximetil glutaril – coenzima A reductasa (HMG-CoA)(Colome, 2008).

Ilustración 3 - Molécula de Atorvastatina



Fuente: (SEACE, 2011)

**(C 33 H 34 F N2 O5)2Ca.3H2O**

En manufactura de comprimidos, la atorvastatina se usa la forma de (sal cálcica), en este caso fue la atorvastatina cálcica trihidrato de peso molecular de 1209.41 g/mol, como características fisicoquímicas tenemos que es un polvo blanco cristalino, con poca solubilidad en etanol, insoluble en cloruro de metileno, soluble en metanol, ligeramente soluble en agua y soluciones buffer de fosfato pH 7.4 e acetonitrilo (Funes, Meza, & Ponce, 2015).

La atorvastatina (como sal cálcica) está indicada para reducir los niveles de colesterol VLDL y LDL, de esta forma aumentan los receptores de LDL en el hígado. Los triglicéridos y colesterol se unen a este órgano junto a las lipoproteínas de muy baja densidad (Vldl) liberándose en el plasma y distribuyéndose en tejidos periféricos (Colome, 2008).

La atorvastatina también está indicada para el tratamiento y prevención de enfermedad cardiovascular, Hipercolesterolemia Homocigota Familiar, Hiperlipidemia, hipercolesterolemia

primario, colesterol total, triglicéridos. Las dosis empiezan desde los 10 mg y máximo de 80 mg, siendo esta última la concentración máxima para pacientes. (Vidal Vademecum Spain, 2020).

Luego de su administración vía oral, la atorvastatina alcanza su biodisponibilidad al cabo de 1 o 2 horas, con una absorción del 85% a nivel intestinal y un metabolismo hepático de primer paso de hasta 30%, como hipolipemiente es eficiente durando unas 20 horas; el 98% se unen a proteínas del plasma y 381 litros de volumen medio son distribuidos por todo el organismo, siendo su vía de eliminación principalmente por la bilis. De acuerdo con la clasificación biofarmacéutica, la atorvastatina al tener baja solubilidad en pH inferiores a 4, las soluciones acuosas se las definen como de alta permeabilidad y baja solubilidad ubicándola como la clase II (Arquieta, 2018).

## CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS

### Tipo de Investigación

El presente trabajo de titulación es de carácter experimental cuantitativo, utilizando tabletas de atorvastatina en su forma cálcica trihidrato, usando no menos de 20 tabletas, triturándola hasta obtener un polvo fino y pesando un equivalente de 80 mg de atorvastatina que fue valorada en los equipos cromatográficos HPLC y UPLC.

### Equipos, Aparatos, Materiales y Reactivos

#### Equipos

**Tabla 2** - Equipos empleados para la cuantificación de atorvastatina

EQUIPOS	DESCRIPCIÓN
Balanza analítica Marca: Sartorius Modelo: ED2245	Balanza analítica Sartorius ED224S Extend ED, 220 g x 0,1 con calibración externa Tipo de Verificación de calibración: Interno
Balanza Analítica Marca: Methers Toledo Modelo: AG204	Balanza analítica Methers Toledo AG204, 210 g, con calibración externa Tipo de Verificación de calibración: Interno
Sonicador Marca: Branson Modelo: 3510-R-HS	Sonicador ultrasonido marca Branson, modelo 3510-R-HS.
HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) Marca: Waters® Modelo: Alliance 2695	HPLC de la marca Waters®, modelo Alliance 2695, detector Waters 2998, una bomba mezcladora cuaternaria de baja presión y desgasificación al vacío en línea.
Columna para HPLC Marca: Merck	Purospher STAR RP-18 Tapa de extremo LiChroCART 150-4.6 Cartucho HPLC, 5 µm

UPLC (cromatografía líquida de alta velocidad) Marca: Waters® Modelo: Acquity H-Class UPLC	UPLC de la marca Waters®, modelo Acquity H-Class, gran flexibilidad de la mezcla cuaternaria de eluyentes con las prestaciones avanzadas de las separaciones UPLC - alta resolución, sensibilidad y rendimiento optimizado.
Columna para UPLC Marca: Waters®	ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 50 mm, 1/pk

Fuente: Autor

## Materiales

**Tabla 3** - Materiales empleados para la cuantificación de atorvastatina

MATERIALES	DESCRIPCIÓN
Matraces Aforados de 25 ml, 100ml,1000 ml,	Matraces con capacidad volumétrica, volúmenes exactos.
Viales 2 ml color ámbar de vidrio	Viales destinados para la muestras y estándar de HPLC y UPLC
Jeringas 5 ml	Jeringas para corroborar a la filtración de muestras y estándar
Espátulas	Espátulas para tomar pequeñas cantidades de polvos.
Mortero de porcelana con pistilo	Mortero y pistilo útiles para triturarsolidos a polvo
Filtros para HPLC 0.45 µm	Filtros con diámetro de poro 0.45µm para filtran impurezas
Filtros para UPLC 0.22 µm	Filtros con diámetro de poro 0.22µm para filtran impurezas
Matraz Kitasato 1000 ml	Matraz Kitasato usado en filtración al vacío para cualquier tipo de soluciones y para la filtración de disolventes para HPLC e UPLC

Botellas vidrio color ámbar de 1000 ml	Botellas de vidrio color ámbar usadas como reservorios de disoluciones, agua, buffer fosfato, acetonitrilo
--	--

Platillos de aluminio para pesaje	Platillos de aluminio desechables usados para pesar muestras pequeñas
-----------------------------------	---

Fuente: Autor

## Reactivos

**Tabla 4** - Materiales empleados para la cuantificación de atorvastatina

REACTIVOS	DESCRIPCIÓN
Estándar: Atorvastatina cálcica USP Marca: MERCK	Estándar primario de atorvastatina cálcica trihidrato USP Patrón de referencia para HPLC y UPLC
Agua destilada, agua tipo 1	Agua destilada para preparación de muestra y agua ultrapura para la preparación de estándar en HPLC y UPLC
Acetonitrilo grado HPLC	Acetonitrilo es usado como disolvente en la preparación de la fase móvil. HPLC y UPLC en Fase reversa
Metanol grado HPLC y metanol 99.9%	Metanol es usado como Solvente de elección en fase reversa para HPLC y UPLC y el metanol 99.9% es implementado para la dilución de las muestras
Fosfato Monobásico de Potasio	Un compuesto inorgánico que es el medio para la preparación de fase móvil como buffer fosfato para HPLC y UPLC en la fase reversa.
Ácido fosfórico	Medio para acidificar el buffer fosfato a pH óptimo.

Fuente: Autor

## Muestra

Para el análisis comparativo entre los equipos cromatográficos, se utilizó tabletas de atorvastatina 80 mg. El presente trabajo se lo efectuó en una industria farmacéutica ecuatoriana llamada “Kronos Laboratorios” ubicada en la ciudad de Guayaquil, en el área de control de calidad, donde realice el análisis comparativo entre HPLC y UPLC para cuantificar atorvastatina.

Metodología Experimental

## Preparación de la muestra

Se peso no menos de 20 tabletas, un promedio de 1281.5 mg, luego se las trituro hasta polvo fino. Se Pesó 320.4 mg de polvo equivalente a 80 mg de atorvastatina; se transfirió a un matraz volumétrico de 100 ml y agregue 75 ml de metanol, lo sometí a ultrasonido por 10 minutos, deje enfriar; lleve a volumen con el mismo solvente y agite. por último, agregue un volumen de la solución en viales con capacidad de 5 ml color ámbar y elimine impurezas utilizando filtros PDVF de 0.22  $\mu\text{m}$ .

Esta solución contiene nominalmente 0.2 mg/ml de atorvastatina

## Preparación del estándar de referencia

Pesar con exactitud 5.4 mg de SRef atorvastatina cálcica ( $\text{C}_{66}\text{H}_{68}\text{CaF}_2\text{N}_4\text{O}_{10}$ ), equivalente a 5 mg de atorvastatina ( $\text{C}_{66}\text{H}_{68}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_{10}$ ), transferir a un matraz volumétrico de 25 ml, agregar metanol para disolver, llenar a volumen con el mismo solvente; agitar y mezclar.

Esta solución contiene nominalmente 0.2 mg/ml de atorvastatina.

## Análisis de las muestras

Preparación de las soluciones para cuantificar atorvastatina

- **Solución A:** Acetonitrilo
- **Solución B:** *Buffer Fosfato* — transferir 4.082 g de Fosfato monobásico de Potasio a un matraz volumétrico de 1000 ml, disolver en 800 ml de agua, ajustar el pH de la solución hasta

$2.9 \pm 0.1$  utilizando ácido fosfórico y llevar a volumen con agua.

- **Fase Móvil:** Solución A: Solución B (60:40)

## Procedimiento por el método de cromatografía líquida de altaresolución (HPLC)

### Condiciones Cromatográficas

**Tabla 5** - Aptitud del Sistema HPLC

Detector	UV 245 nm
Columna	L1 (5 $\mu$ m) 4.6 x 150 mm
Velocidad de Flujo	0.21 ml/min
Volumen de inyección	10 $\mu$ l
Fase móvil	Solución A : Solución B(60:40)
Tipo de elución	Gradiente en Fase Reversa
Software	Empower 3 Waters®

Fuente: Autor

Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (10  $\mu$ L) de lapreparación estándar y de la preparación de valoración.

Procedimiento por el método de cromatografía líquida de ultraresolución (UPLC)

### Condiciones Cromatográficas

**Tabla 6** - Aptitud del sistema UPLC

Detector	UV 245 nm
Columna	L1 (1.7 $\mu$ m) 2.1 x 50 mm
Velocidad de Flujo	0.21 ml/min
Volumen de inyección	0.5 $\mu$ l

Fase móvil	Solución A : Solución B(60:40)
Tipo de elución	Gradiente en fase reversa
Software	Empower 3 Waters®

Fuente: Autor

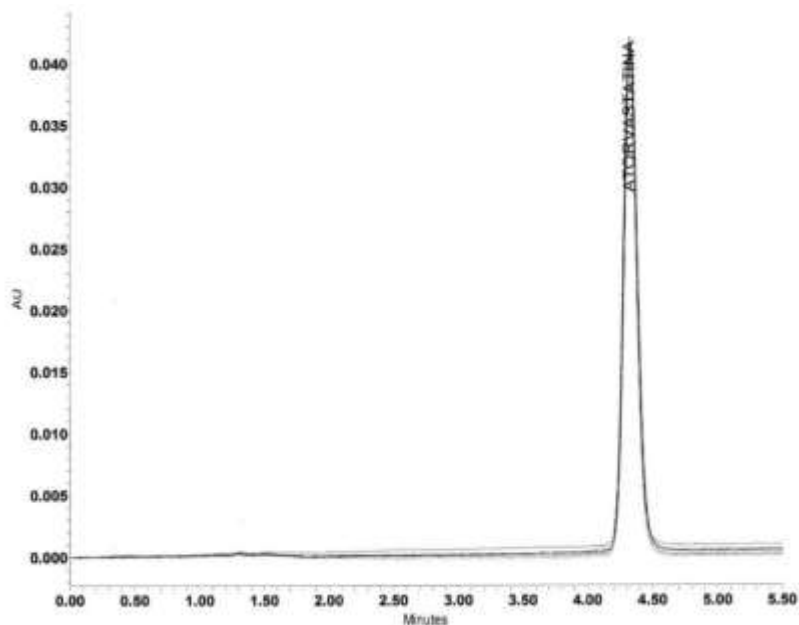
Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (0.5 µL) de la preparación estándar y de la preparación de valoración.



## CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Resultados de estándar y muestra atorvastatina por HPLC

Gráfico 2 - HPLC Resultado, estándar y muestra



-Estándar; Vial 1; inyection 1; Channel 2998 Chi 245nm@1.2nm; Date Acquired 10/02/2021 16:34:41 ECT

-Estándar; Vial 1; inyection 2; Channel 2998 Chi 245nm@1.2nm; Date Acquired 10/02/2021 16:40:58 ECT

-Estándar; Vial 1; inyection 3; Channel 2998 Chi 245nm@1.2nm; Date Acquired 10/02/2021 16:47:16 ECT

-Estándar; Vial 1; inyection 4; Channel 2998 Chi 245nm@1.2nm; Date Acquired 10/02/2021 16:53:35 ECT

-Estándar; Vial 1; inyection 5; Channel 2998 Chi 245nm@1.2nm; Date Acquired 10/02/2021 16:59:52 ECT

-Muestra 19L01T23; Vial 2; inyection 1; Channel 2998 Chi 245nm@1.2nm; Date Acquired 10/02/2021 17:06:12 ECT

-Muestra 19L01T23; Vial 3; inyection 1; Channel 2998 Chi 245nm@1.2nm; Date Acquired 10/02/2021 17:12:30 ECT

Report Method: ATORVASTATINA 80 mg

## Sample type: Estándar

**Tabla 7** - Sample type: Estándar

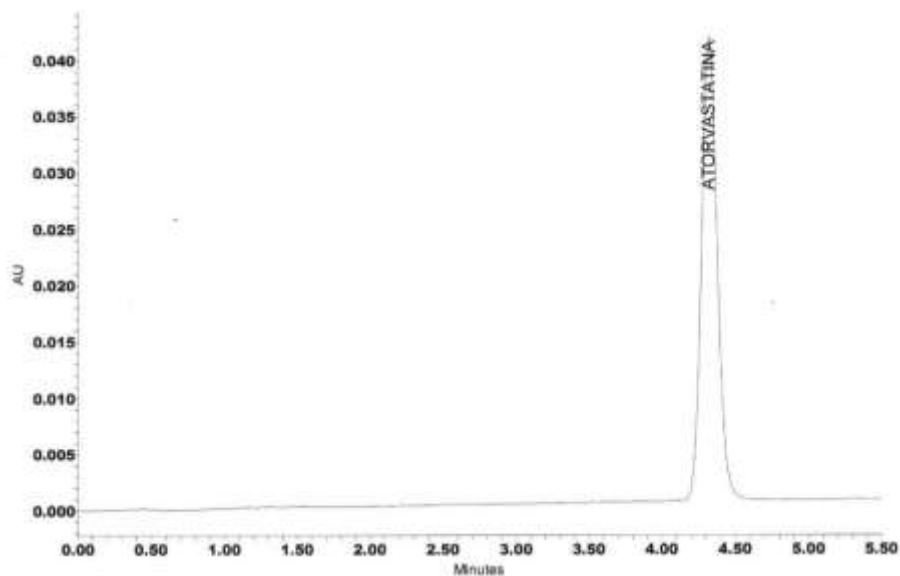
	Sample Name	Name	Sample Type	RT	Area	Height	Amount	Porcentaje
1	Estandar	Atorvastatina	Standard	4.326	305735.809	41249.23	0.1984	0.25
2	Estandar	Atorvastatina	Standard	4.333	303885.612	40918.41	0.1984	0.25
3	Estandar	Atorvastatina	Standard	4.323	304626.420	41042.92	0.1984	0.25
4	Estandar	Atorvastatina	Standard	4.318	306213.941	41348.00	0.1984	0.25
5	Estandar	Atorvastatina	Standard	4.322	304758.841	41159.68	0.1984	0.25
Mean				4.324	305044.12	41143.65	0.20	0.2
Std. Dev.				0.005	928.02	168.85	0.00	
% RSD				0.12	0.30	0.41	0.00	

## Sample Type: Muestra

**Tabla 8** - Sample Type: Muestra

	Sample Name	Name	Sample Type	RT	Area	Height	Amount	Porcentaje
1	19L01T23	Atorvastatina	Muestra	4.332	304894.097	40662.06	79.2843	99.11
2	19L01T23	Atorvastatina	Muestra	4.330	304893.300	40679.50	79.2352	99.04
Mean				4.331	304893.70	40670.78	79.26	99.1

Std.				0.002	0.56	12.33	0.03	
Dev.								
% RSD				0.04	0.00	0.03	0.04	



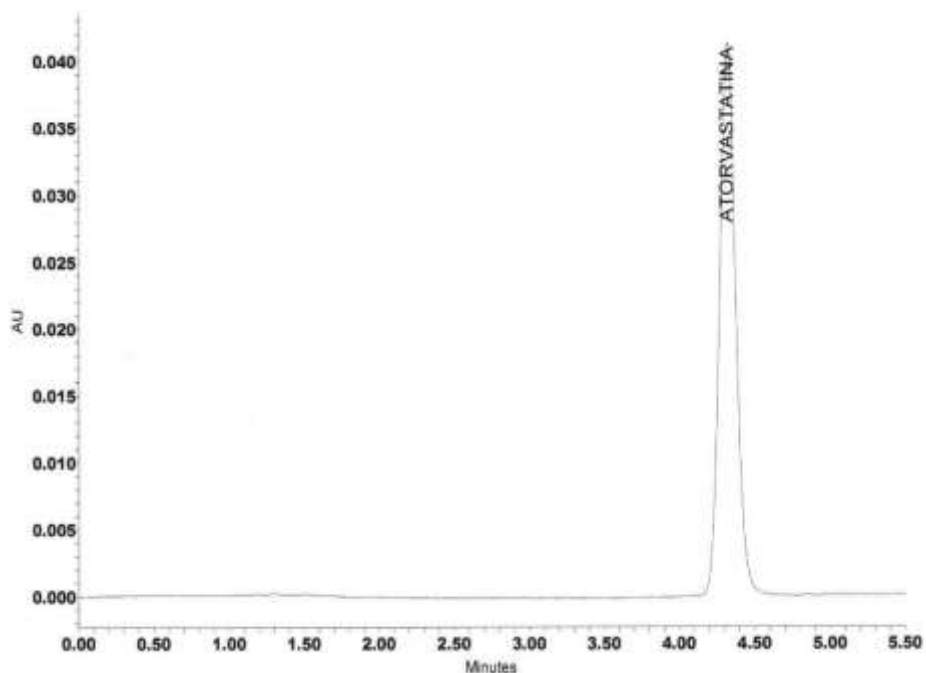
-Estándar; Vial 1; inyección 1; Channel 2998 Chi 245nm@1.2nm; Date Acquired 10/02/2021 16:34:41 ECT

### Sample Type: Estándar

**Tabla 9** - Sample Type: Estándar

	Sample name	Name	Sample type	RT	Area	Height	Amount	Porcentaje
1	Estandar	Atorvastatina	Standard	4.322	304758.841	41159.68	0.1984	0.25
Mean				4.322	304758.84	41159.68	0.20	0.2
Std. Dev.								
% RSD								

	USP Plate Count	USP Tailing
1	7942.46	1.111



-Estándar; Vial 1; inyection 2; Channel 2998 Chi 245nm@1.2nm; Date Acquired 10/02/2021 16:40:58 ECT

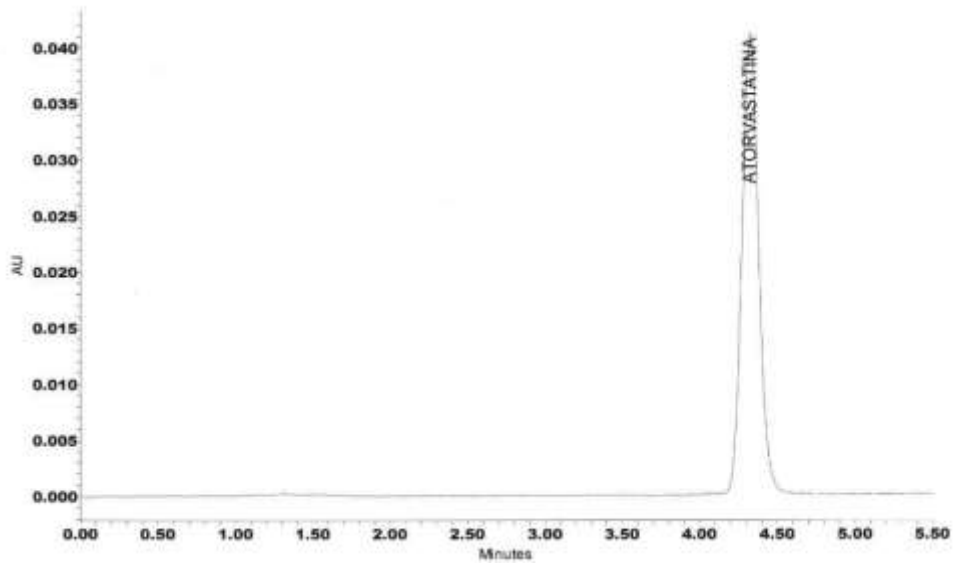
### Sample Type: Standard

**Tabla 10** - Sample Type: Standard Inyction 2

	Sample name	Name	Sample type	RT	Area	Height	Amount	Porcentaje
1	Estandar	Atorvastatina	Standard	4.318	306213.941	41348.00	0.1984	0.25
Mean				4.318	306213.94	41348.00	0.20	0.2
Std. Dev.								
% RSD								

### Sample Type: Standard

	USP Plate Count	USP Tailing
1	7893.90	1.121



-Estándar; Vial 1; inyection 3; Channel 2998 Chi 245nm@1.2nm; Date Acquired 10/02/2021 16:47:16 ECT

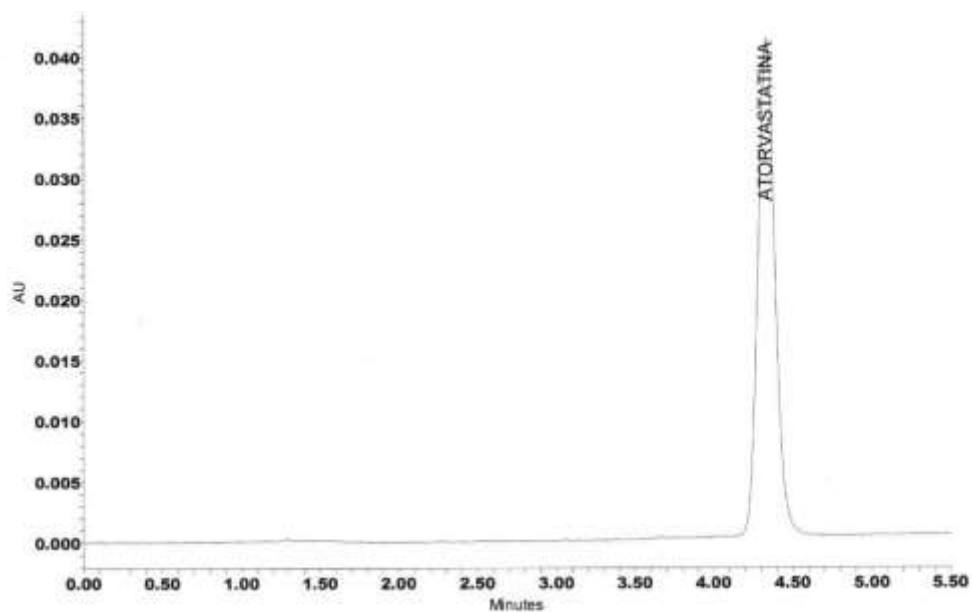
### Sample Type: Standard

**Tabla 10** - Sample Type: Standard Inyction 3

	Sample name	Name	Sample type	RT	Area	Height	Amount	Porcentaje
1	Estandar	Atorvastatina	Standard	4.323	304626.420	41042.92	0.1984	0.25
Mean				4.323	304626.42	41042.92	0.20	0.2
Std. Dev.								
% RSD								

### Sample Type: Standard

	USP Plate Count	USP Tailing
1	7910.31	1.122



-Estándar; Vial 1; inyection 4; Channel 2998 Chi 245nm@1.2nm; Date Acquired 10/02/2021 16:53:35 ECT

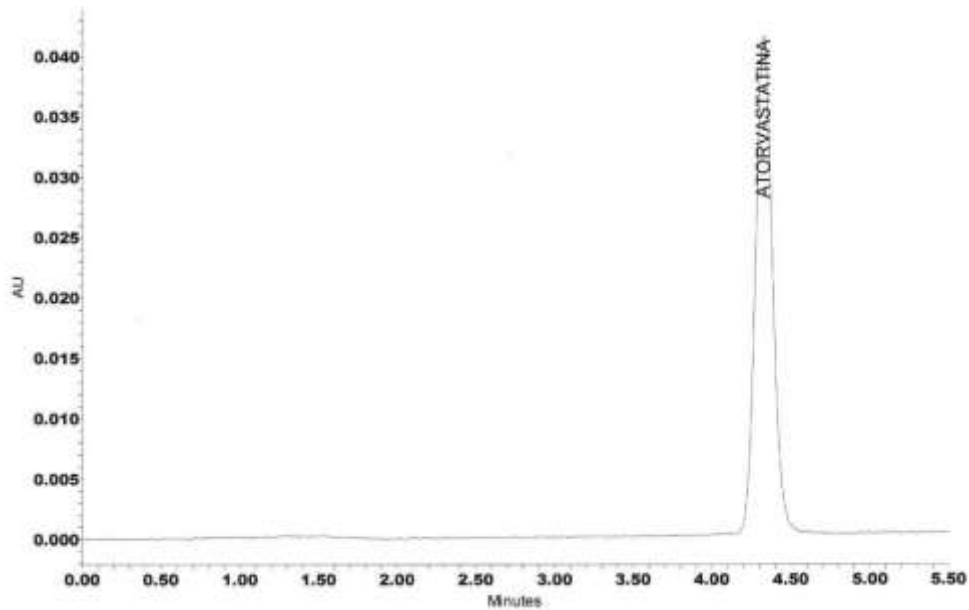
### Sample Type: Standard

**Tabla 11** - Sample Type: Standard. Inyction 4

	Sample name	Name	Sample type	RT	Area	Height	Amount	Porcentaje
1	Estandar	Atorvastatina	Standard	4.333	303885.612	41042.92	0.1984	0.25
Mean				4.333	303885.61	41042.92	0.20	0.2
Std. Dev.								
% RSD								

### Sample Type: Standard

	USP Plate Count	USP Tailing
1	7890.04	1.116



-Estándar; Vial 1; inyection 5; Channel 2998 Chi 245nm@1.2nm; Date Acquired 10/02/2021 16:59:52 ECT

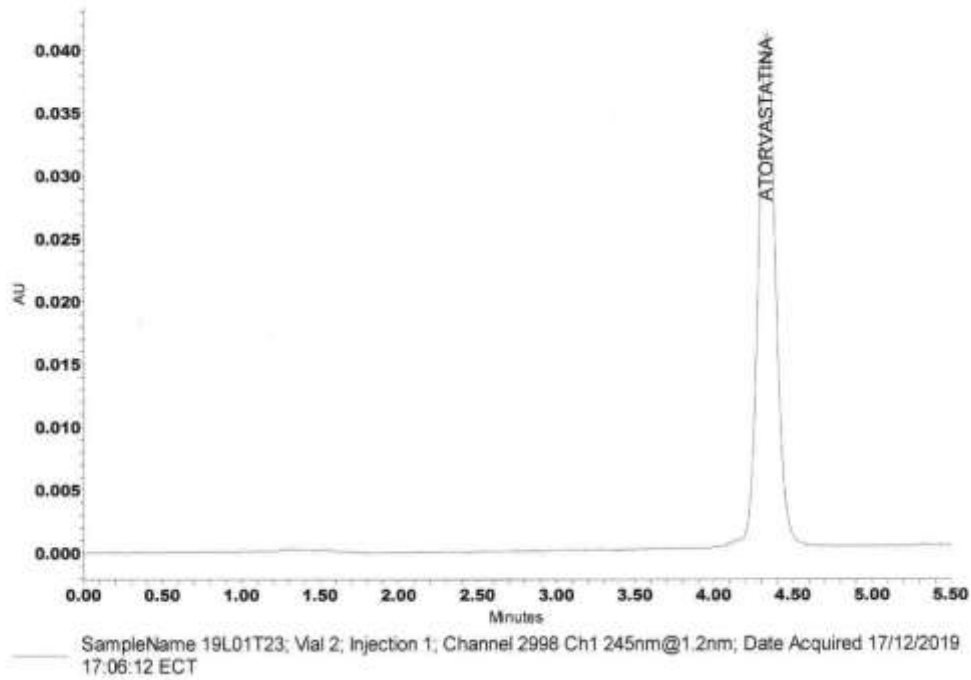
### Sample Type: Standard

**Tabla 12** - Sample Type: Standard Inyction 5

	Sample name	Name	Sample type	RT	Area	Height	Amount	Porcentaje
1	Estandar	Atorvastatina	Standard	4.326	305735.809	41249.23	0.1984	0.25
Mean				4.326	303885.61	41249.23	0.20	0.2
Std. Dev.								
% RSD								

### Sample Type: Standard

	USP Plate Count	USP Tailing
1	7802.67	1.118

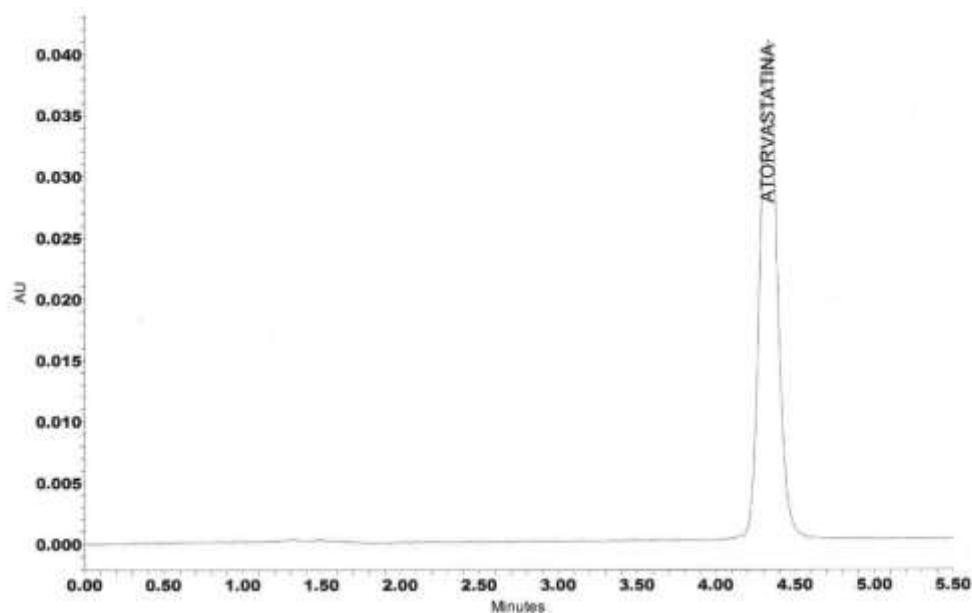


-Estándar; Vial 2; inyection 1; Channel 2998 Chi 245nm@1.2nm; Date Acquired 10/02/2021 17:06:12 ECT

**Tabla 13** - Sample Type - Muestra Vial 2; Inyeton 1

	Sample name	Name	Sample type	RT	Area	Height	Amount	Porcentaje
1	Estandar	Atorvastatina	Muestra	4.332	304894.097	40662.06	79.2843	99.11
Mean				4.332	304894.10	40662.06	79.28	99.1
Std. Dev.								
% RSD								





-Estándar; Vial 3; inyection 1; Channel 2998 Chi 245nm@1.2nm; Date Acquired 10/02/2021 17:12:30 ECT

### Sample Type: Muestra

**Tabla 14** - Sample Type: Muestra; Vial 3; Inyction 1

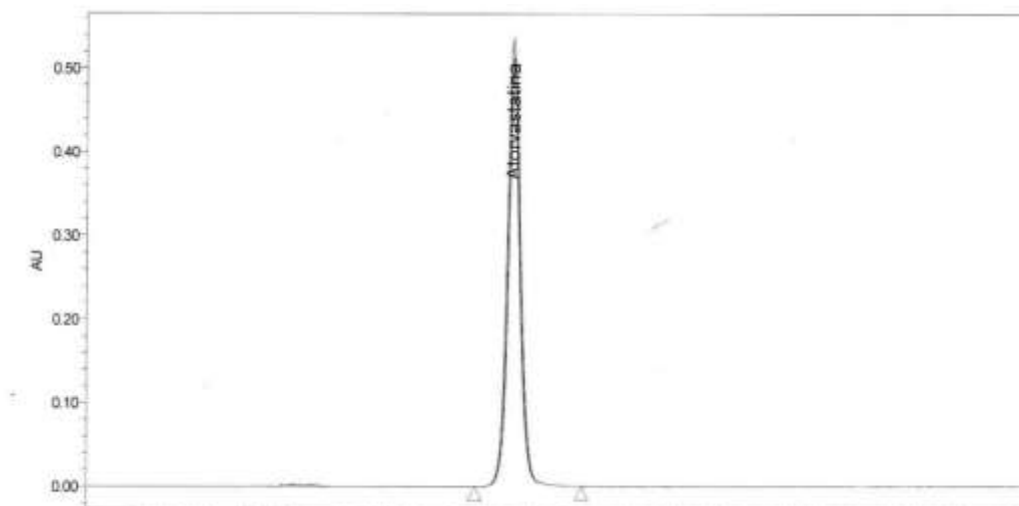
	Sample name	Name	Sample type	RT	Area	Height	Amount	Porcentaje
1	Estandar	Atorvastatina	Muestra	4.330	304893.300	40679.50	79.235 2	99.04
Mean				4.330	304893.30	40679.50	79.24	99.0
Std. Dev.								
% RSD								

## Sample Type: Muestra

	USP Plate Count	USP Tailing
1	7786.51	1.116

Resultados de estándar y muestra atorvastatina por UPLC

Gráfico 10 - UPLC resultado, estándar y muestra



-Estándar; Vial 1; inyección 1; Date Acquired 10/02/2021 11:12:30 ECT

-Estándar; Vial 1; inyección 2; Date Acquired 10/02/2021 11:15:31 ECT

-Estándar; Vial 1; inyección 3; Date Acquired 10/02/2021 11:18:33 ECT

-Estándar; Vial 1; inyección 4; Date Acquired 10/02/2021 11:21:34 ECT

-Estándar; Vial 1; inyección 5; Date Acquired 10/02/2021 11:54:36 ECT

-Muestra 19L01T23; Vial 2; inyección 1; Date Acquired 10/02/2021 11:30:45 ECT

-Muestra 19L01T23; Vial 3; inyección 1; Date Acquired 10/02/2021 11:33:47 ECT

Report Method: ATORVASTATINA 80 mg

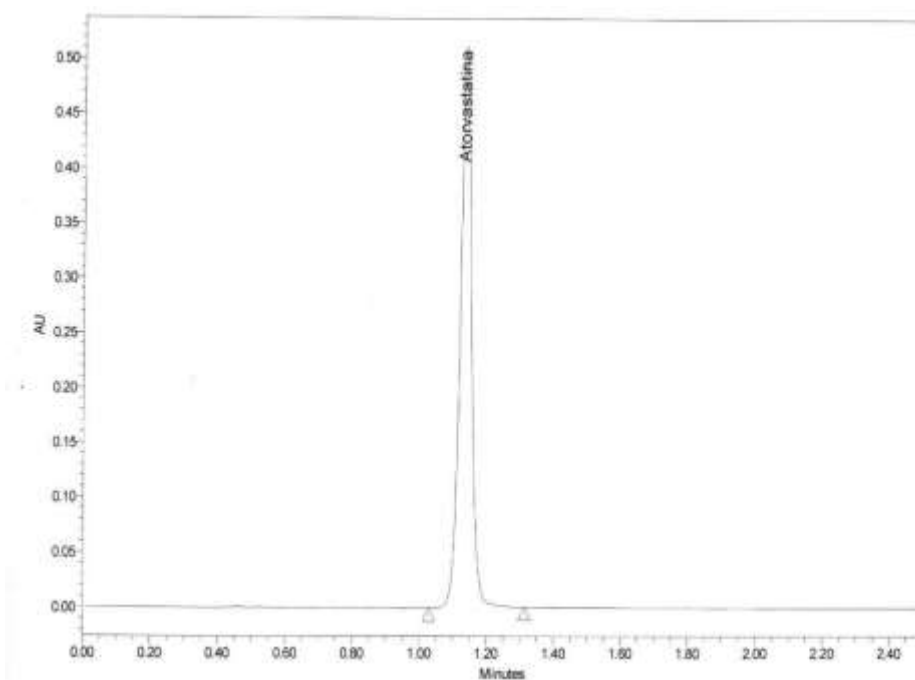
## Sample type: Estándar

**Tabla 15** - Sample Type: Estándar UPLC

	Sample Name	Name	Sample Type	RT (min)	Heigt	Area	Amount	Porcentaje
1	Estandar	Atorvastatina	Standard	1.134	514918.858	1188056.487	0.20	0.25
2	Estandar	Atorvastatina	Standard	1.133	515927.549	1185564.128	0.20	0.25
3	Estandar	Atorvastatina	Standard	1.130	514073.728	1181702.376	0.20	0.25
4	Estandar	Atorvastatina	Standard	1.134	514937.411	1187176.237	0.20	0.25
5	Estandar	Atorvastatina	Standard	1.133	511923.180	1185974.054	0.20	0.25
Mean				1.133	514356.15	1185694.66	0.20	0.25
Std. Dev.				0.002	1510.21	2439.61	0.00	0.00
% RSD				0.14	0.29	0.21	0.00	0.00

### Sample type: Muestra

	Sample Name	Name	Sample Type	RT	Area	Height	Amount	Porcentaje
1	19L01T23	Atorvastatina	Muestra	1.128	1224271.108	533297.9	81.97	102.46
						42		
2	19L01T23	Atorvastatina	Muestra	1.131	1239538.046	538602.7	82.99	103.74
						96		
Mean				1.130	1231904.58	535950.3	82.48	103.10
						7		
Std. Dev.				0.002	10795.36	3751.10	0.72	0.90
% RSD				0.19	0.88	0.70	0.88	0.88

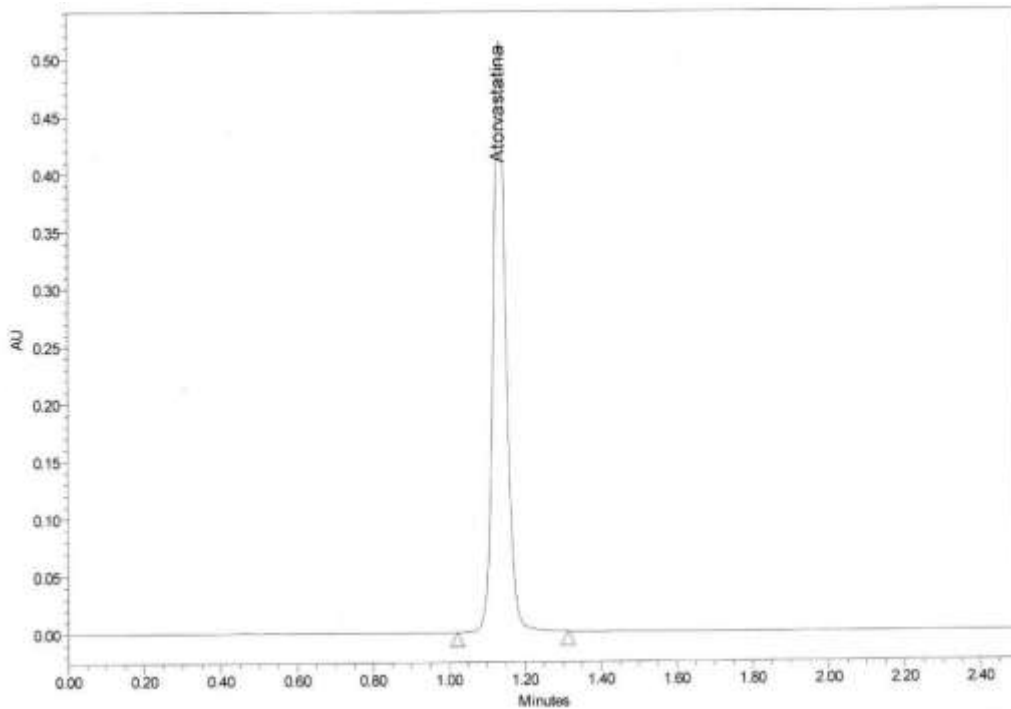


-Estándar; Vial 1; inyección 1; Date Acquired 10/02/2021 11:12:30 ECT

## Sample type: Estándar

**Tabla 16** - Sample Type: Estándar UPLC, Inyexion 1

	Sample name	Name	Sampletype	RT	Area	Height	Amount	Porcentaje	USP Pate Count	USP Tailing
1	Estandar	Atorvastatina	Muestra	1.133	1185974.054	511923.180	0.1985	0.25	5961.27	1.100
Mean				1.133	1185974.05	511923.18	0.20	0.25		
Std. Dev.										
% RSD										

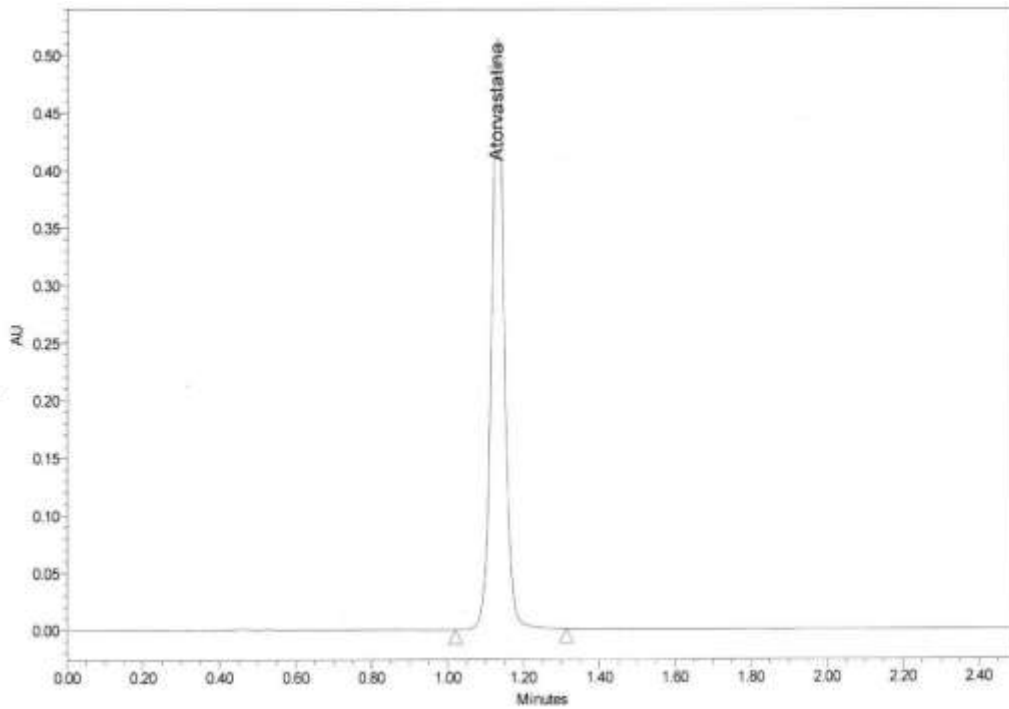


-Estándar; Vial 1; inyexion 2; Date Acquired 10/02/2021 11:15:31 ECT

## Sample type: Estándar

**Tabla 17** - Sample Type: Estándar UPLC; Inyction 2

	Sample name	Name	Sample type	RT	Area	Height	Amount	Porcentaje	USP Pate Count	USP Tailing
I	Estandar	Atorvastatina	Muestra	1.134	1187176.237	514937.411	0.1985	0.25	6028.98	1.100
Mean				1.134	118716.24	514937.41	0.20	0.25		
Std. Dev.										
% RSD										

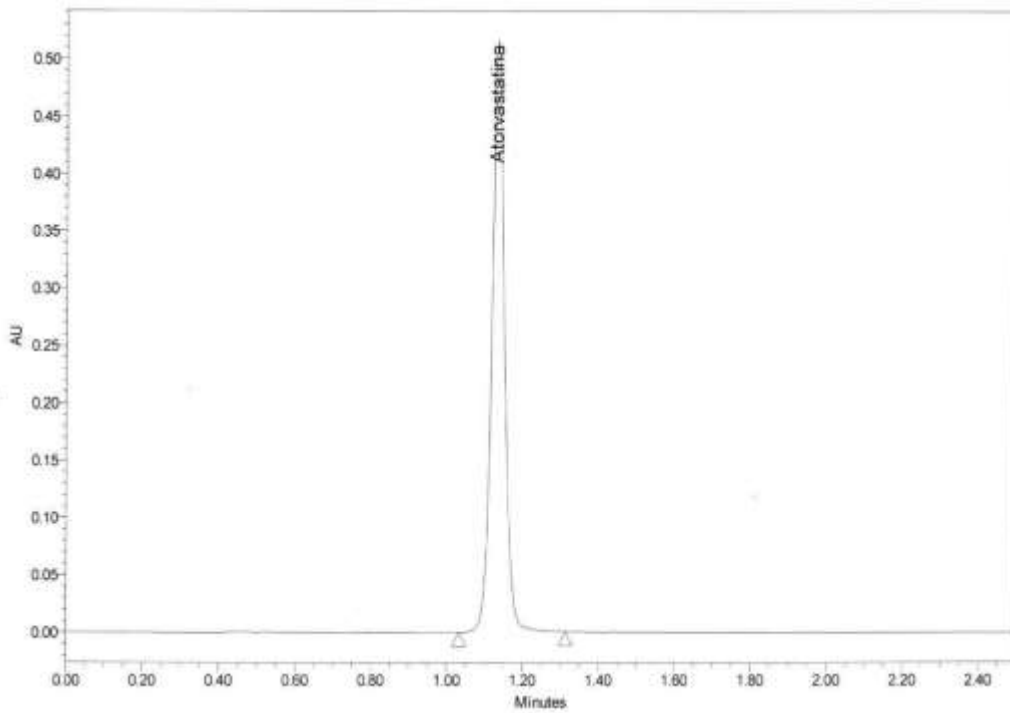


-Estándar; Vial 1; inyccion 3; Date Acquired 10/02/2021 11:18:33 ECT

## Sample type: Estándar

**Tabla 18** - Sample Type: Estándar, UPLC, Vial 1, Inyestion 3

	Sample name	Name	Sampletype	RT	Area	Height	Amount	Porcentaje	USP Pate Count	USP Tailing
1	Estandar	Atorvastatina	Muestra	1.130	1181702.376	514073.728	0.1985	0.25	6030.19	1.101
Mean				1.130	1181702.38	514073.73	0.20	0.25		
Std. Dev.										
% RSD										

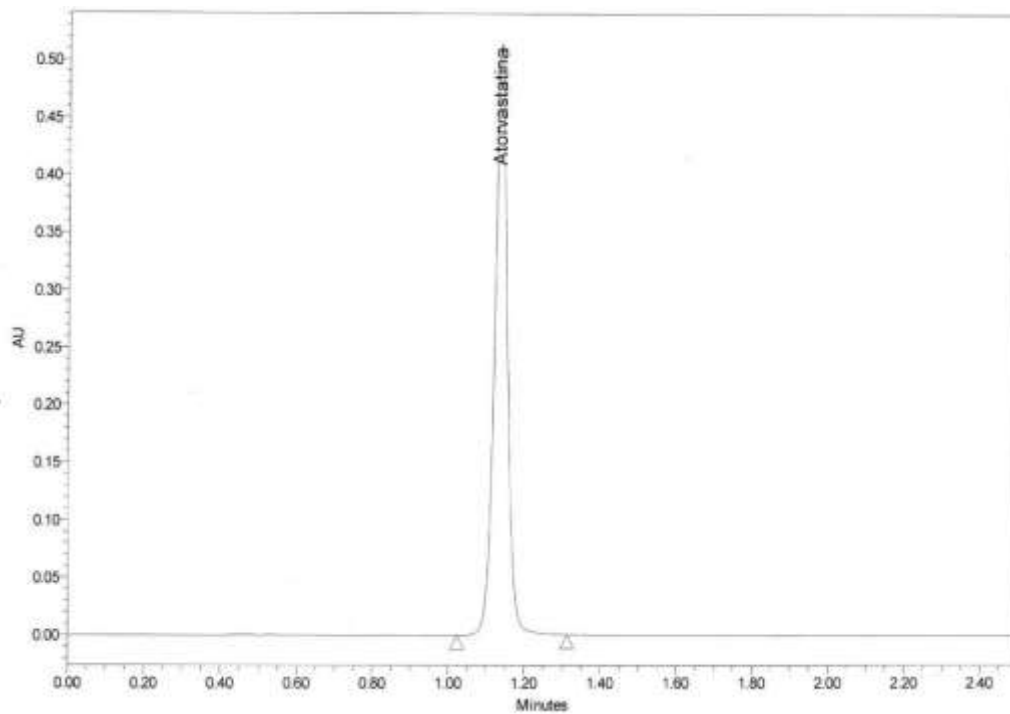


-Estándar; Vial 1; inyestion 4; Date Acquired 10/02/2021 11:21:34 ECT

## Sample type: Estándar

**Gráfico 15** - Sample Type: Estándar; UPLC, Vial 1; Inyexion 4

	Sample name	Name	Sample type	RT	Area	Height	Amount	Porcentaje	USP Pate Count	USP Tailing
1	Estandar	Atorvastatina	Muestra	1.133	1185564.128	515927.549	0.1985	0.25	6062.55	1.101
Mean				1.133	1185564.13	515927.55	0.20	0.25		
Std. Dev.										
% RSD										



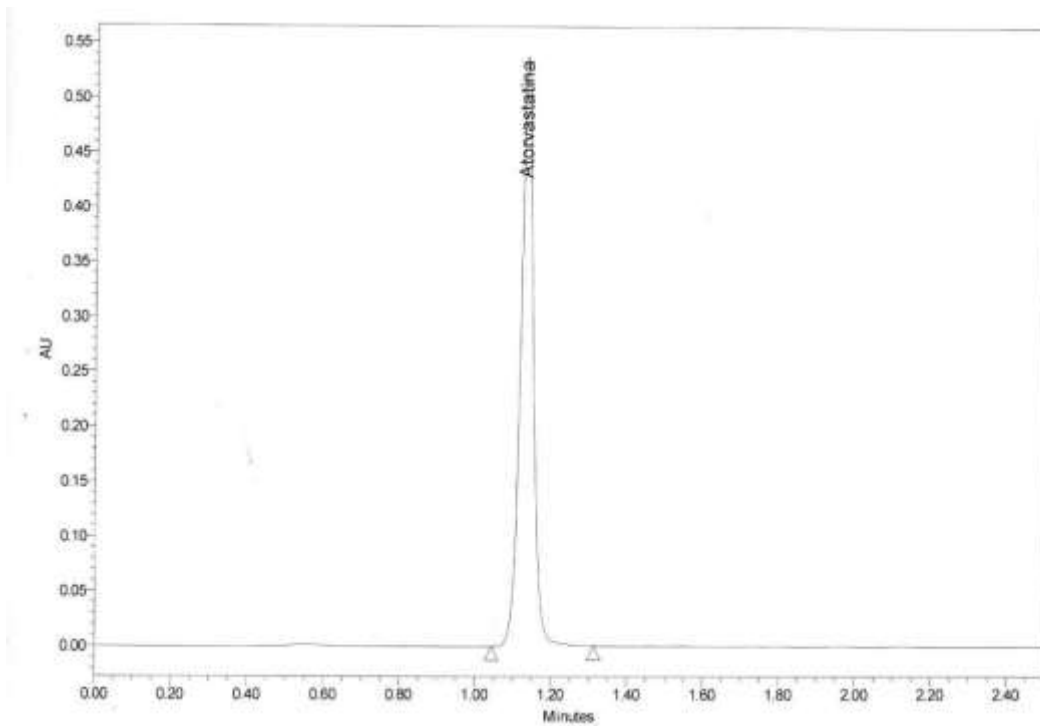
-Estándar; Vial 1; inyexion; Date Acquired 10/02/2021 11:24:36 ECT



## Sample type: Estándar

**Tabla 19** - Sample Type: Estándar, UPLC; Vial 1, Inyexion 5

	Sample name	Name	Sample type	RT	Area	Height	Amount	Porcentaje	USP Pate Count	USP Tailing
I	Estandar	Atorvastatina	Muestra	1.134	1188056.487	514918.858	0.1985	0.25	6023.95	1.100
Mean				1.134	1188056.49	514918.86	0.20	0.25		
Std. Dev.										
% RSD										

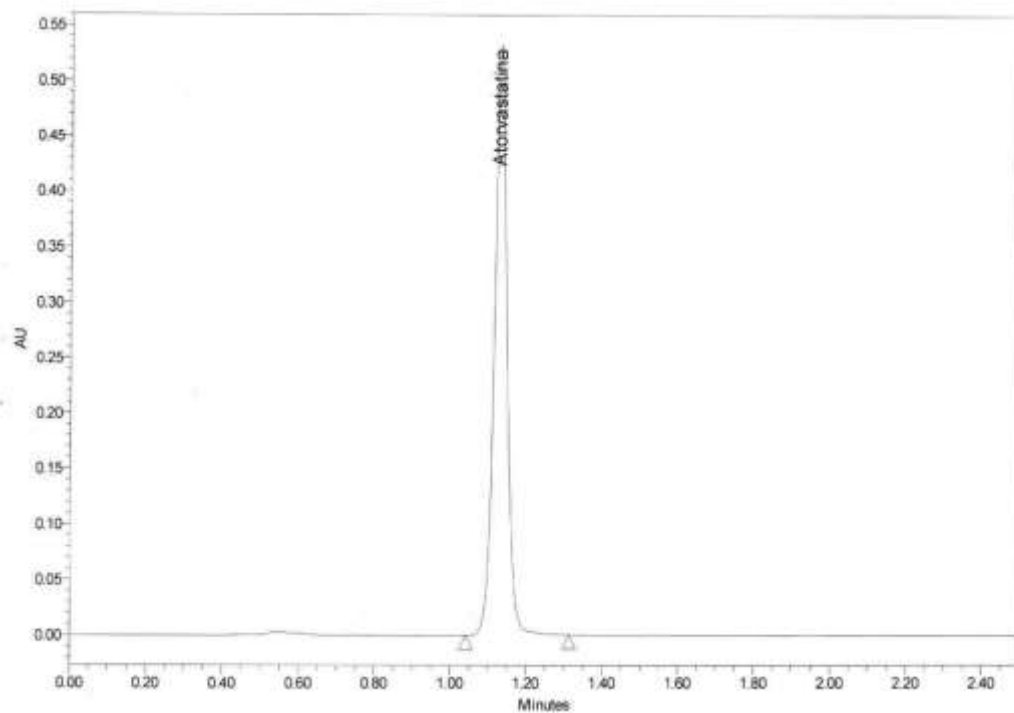


-Muestra; Vial 2; inyexion; Date Acquired 10/02/2021 11:30:45 ECT

## Sample type: Muestra

**Tabla 20** - Sample Type: Muestra, UPLC, Vial 2; Inyction 1

	Sample name	Name	Sample type	RT	Area	Height	Amount	Porcentaje	USP Pate Count	USP Tailing
1	Estandar	Atorvastatina	Muestra	1.131	1239538.046	538602.796	82.993	103.7	6019.00	1.104
Mean				1.131	1239538.05	538602.80	82.99	103.7		
Std. Dev.										
% RSD										



-Muestra; Vial 3; inyction; Date Acquired 10/02/2021 11:33:47 ECT

## Sample type: Muestra

**Tabla 21** - Sample Type: Muestra, UPLC; Vial 3; Inyention 1

	Sample name	Name	Sample type	RT	Area	Height	Amount	Porcentaje	USP Pate Count	USP Tailing
1	Estandar	Atorvastatina	Muestra	1.128	1224271.108	533297.942	81.9710	102.46	6019.33	1.105
Mean				1.128	1224271.11	5332797.94	81.97	102.46		
Std. Dev.										
% RSD										

### Prueba de comparación de métodos

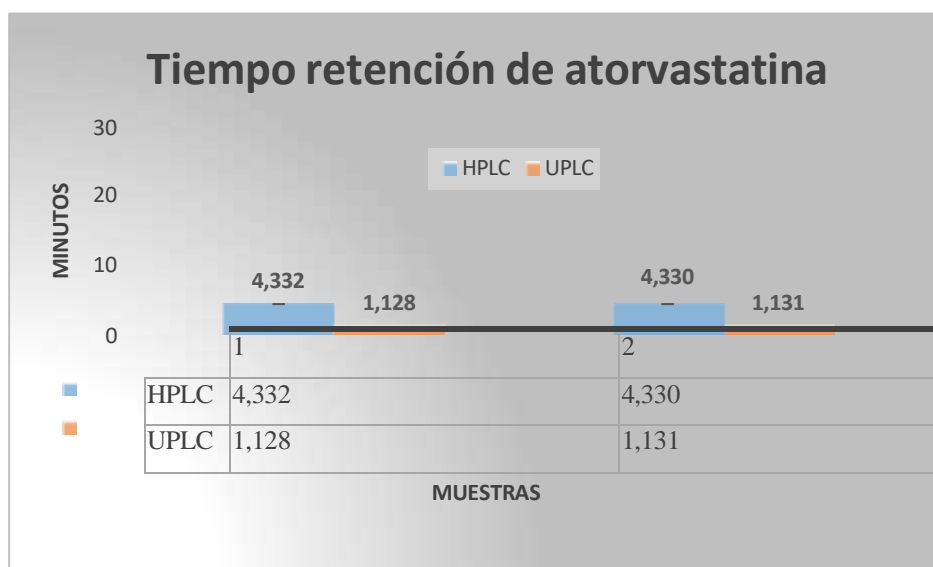
Para la comparación se realiza la prueba estadística t de Student pareada. Evaluando los métodos a través del coeficiente de correlación de concordancia. Los datos obtenidos son los resultados de la concordancia según los valores de coeficiente de correlación intraclass (CCI)

*Tabla 22 - Valoración del coeficiente de Correlación Intraclass (CCI)*

Valor del CCI	Fuerza de concordancia
>0.90	Muy buena
0.71 – 0.90	Buena
0.51 – 0.70	Moderada
0.31 – 0.50	Mediocre
<0.30	Mala o nula

## Tiempo de retención HPLC y UPLC

Gráfico 19 - Comparación del tiempo de retención de la atorvastatina



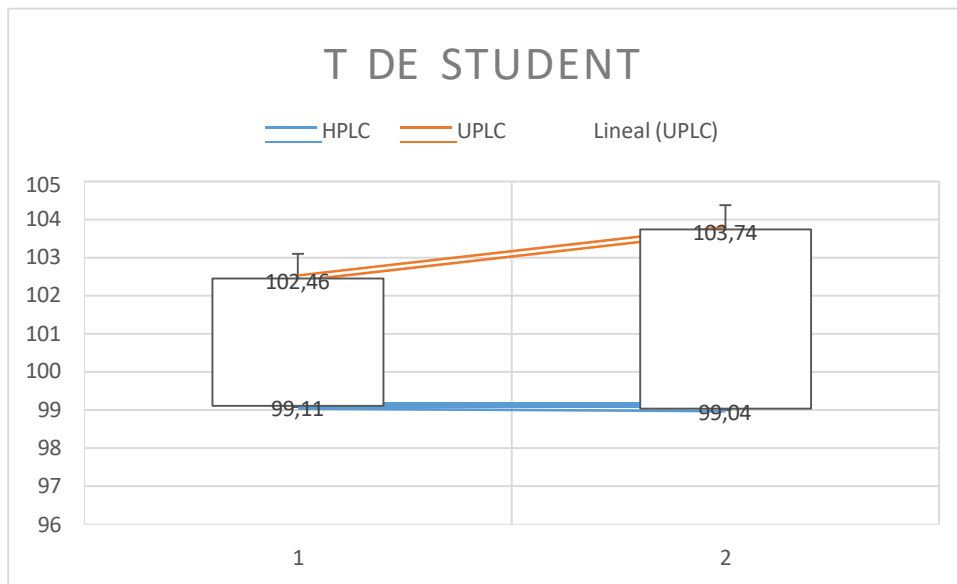
### Resultados obtenidos del análisis del coeficiente de correlación intraclase

Al hacer el estudio del coeficiente de correlación intraclase se localizó que la concentración de la atorvastatina fue de 0.810 con un intervalo de confianza del 95%. Se establece que da una fuerza de concordancia buena, esto se calculó con base a las medidas promedio de los resultados de los dos procedimientos analíticos.

### Resultados del análisis de la prueba t de Student

Los resultados del análisis de la prueba t de Student, el valor de T para el estudio de dos colas que ha sido examinado en esta situación fue de 0,1047217 por lo cual se acepta la hipótesis nula que plantea que los procedimientos analíticos son equivalentes.

**Gráfico 20** prueba de t de Student

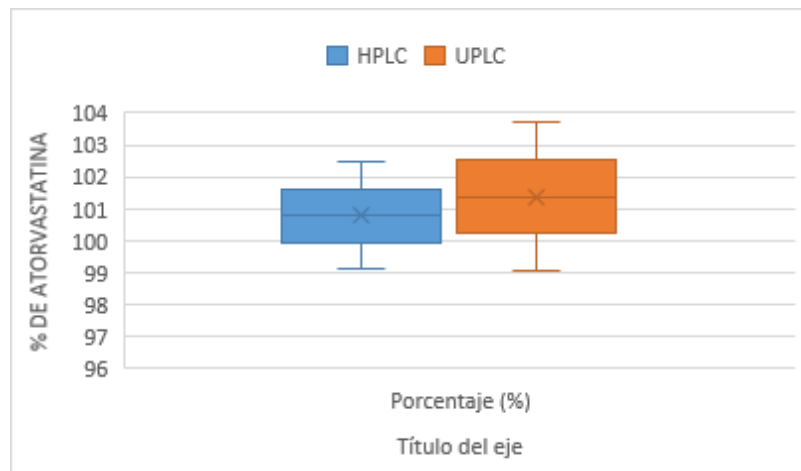


**Tabla 23** resultados de prueba t de Student

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	HPLC	UPLC
Media	99,075	103,1
Varianza	0,00245	0,8192
Observaciones	2	2
Coefficiente de correlación de Pearso	-1	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	-5,96296296	
P(T<=t) una cola	0,05288901	
Valor crítico de t (una cola)	6,31375151	
P(T<=t) dos colas	0,10577802	
Valor crítico de t (dos colas)	12,7062047	

**Gráfico 21** - Gráfica de turkey para comparar la variabilidad de métodos



### Valoración de atorvastatina por HPLC

$$(\text{ru/rs}) \times [(\text{Cs} \times \text{PPT} \times \text{FDM}) / \text{PM}]$$

$$(99.1\% / 99.2\%) \times [(0.2 \text{ mg/ml} \times 1.2815 \text{ g} \times 100) / 0.3204 \text{ g}] = 79.91 \text{ mg}$$

### Valoración de atorvastatina por UPLC

$$(\text{ru/rs}) \times [(\text{Cs} \times \text{PPT} \times \text{FDM}) / \text{PM}]$$

$$(103.1\% / 102\%) \times [(0.2 \text{ mg/ml} \times 1.2815 \text{ g} \times 100) / 0.3204 \text{ g}] = 80.85 \text{ mg}$$

## Discusión

Al analizar los dos métodos analíticos, (HPLC) cromatografía líquida de alta resolución y (UPLC) cromatografía líquida de alta velocidad en la cuantificación de atorvastatina en tabletas, dieron como resultado un ligero cambio en precisión, concordancia y tiempo de análisis, pero que estos no afectaban en la cuantificación.

El coeficiente de variación fue de 0.0378% para el método por HPLC y en el método por UPLC, el coeficiente de variación fue de 0.8729; está dentro de los rangos para que sea aceptable; ya que su coeficiente de variación es menor al 2%.

Se determinó que el método por HPLC y UPLC cumplen con los límites declarados entre 72.00 – 88.00 mg/tableta, implementando la misma metodología para cuantificar atorvastatina en tabletas de 80 mg. Los resultados de la valoración fueron de 79.91 mg/tableta para HPLC y para UPLC fue de 80.86mg/tableta.

Los resultados muestran rangos muy similares que van entre 99.075% a 103.10% de atorvastatina presente en tabletas en los dos métodos cromatográficos, lo que demuestra que la adecuabilidad y metodología implementada es eficiente para cuantificar este principio activo.

En el UPLC el promedio de corridas entre estándar y muestra fue de 10 minutos, 1.130 minutos por corrida; mientras que en el HPLC fue de 30 minutos, 4,234 minutos por corrida, demostrando que el método por UPLC es mucho más rápido para cuantificar atorvastatina en un menor tiempo.

El volumen de inyección con un flujo de 1 ml/min en el HPLC y un flujo de 0,21 ml/min en el UPLC; además el volumen de inyección en el UPLC fue de 0.5  $\mu$ L mientras que el volumen de inyección en el HPLC fue de 10  $\mu$ L en las muestras analizadas. Las consideraciones previas que se tomaron es que la fase estacionaria en UPLC fue que contiene partículas mucho menores que la fase estacionaria utilizada en HPLC, este es otro factor importante juntamente con la fase móvil para la preparación previa del sistema cromatográfico.

La herramienta estadística para comparar los métodos fue el coeficiente de correlación intraclass, relacionando los métodos entre las variables, comparandola fuerza de concordancia según la tabla XXII, el análisis dio como resultado 0.810 que al compararlos se logra que la concordancia entre los métodos es buena. Lo que significa que el mismo método se lo puede implementar para ambos métodos analíticos.

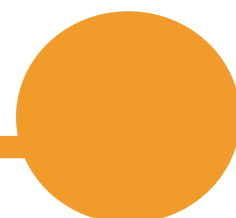
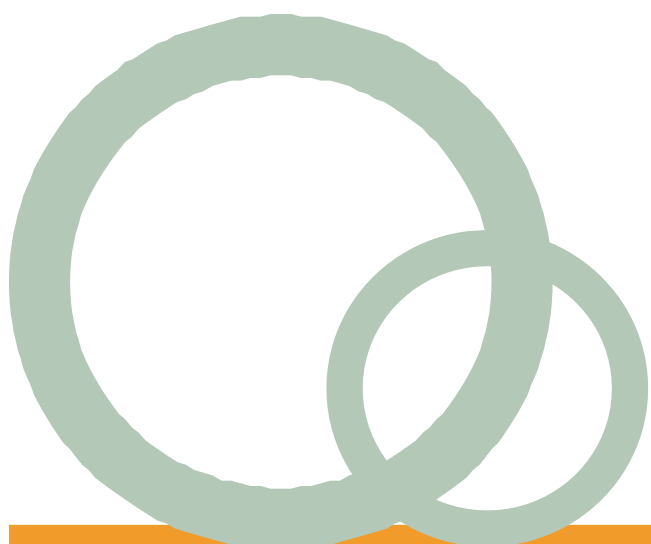
La cromatografía líquida de alta velocidad (UPLC) tiende a ser el método de cuantificación de atorvastatina con mejor eficiencia en menor tiempo comparándolo con la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que tiende a consumir más cantidad de reactivos y tiempo.

## Conclusiones

- Este estudio comparativo confirma que la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía líquida de alta velocidad (UPLC) son eficaces para la valoración de atorvastatina presente en tabletas de 80 mg.
- La concordancia entre los métodos cromatográficos fue buena, con una fuerza de concordancia de 0.810, un coeficiente de variación que no excedió el 2% y el t de Student para medias de dos muestras emparejadas de 0.1047217, demostraron que la metodología empleada para HPLC y UPLC son equivalentes entre sí.
- Se demostró que la cromatografía líquida de alta velocidad (UPLC) es más exacta que la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), ya que en la valoración de atorvastatina dio como resultado 80.86 mg/tableta, un tiempo de retención de 1.128 minutos y usando menor cantidad de reactivos, puedo concluir que el método por UPLC es adecuado para analizar atorvastatina ya que el factor tiempo es fundamental en una industria farmacéutica.

## Recomendaciones

- Implementar otras metodologías para cuantificar distintos principios activos, ya que esto ayudaría a la mejora de adecuabilidad entre equipos analíticos, garantizando alternativas sin afectar la calidad de los resultados.
- Cuando se preparan los equipos es muy importante el lavado de agujas, sellos, purgas de líneas, filtrados de reactivos, limpieza de columna y otros factores que pueden afectar en la cuantificación del principio activo. Para poder realizar un estudio eficaz, se debería ensayar concentraciones diferentes de atorvastatina y usar lotes de marcas diferentes.





## BIBLIOGRAFÍA

- Alfonso, M. d. (2008). *Desarrollo de Métodos para el aislamiento y la detección de toxinas marinas en productos de la pesca y la acuicultura*. España. Obtenido de [https://books.google.com.ec/books?id=x1Eg\\_Cc\\_jXoC&pg=PA44&dq=COMPONENTES+DEL+SISTEMA+DE+HPLC&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwi4267SiqnuAhVFrVkKHeIRCU0Q6AEwAHoECAUQA#v=onepage&q=COMPONENTES%20DEL%20SISTEMA%20DE%20HPLC&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=x1Eg_Cc_jXoC&pg=PA44&dq=COMPONENTES+DEL+SISTEMA+DE+HPLC&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwi4267SiqnuAhVFrVkKHeIRCU0Q6AEwAHoECAUQA#v=onepage&q=COMPONENTES%20DEL%20SISTEMA%20DE%20HPLC&f=false)
- Arquieta, J. (Junio de 2018). *UAEM*. Obtenido de <http://riaa.uaem.mx/xmlui/bitstream/handle/20.500.12055/386/AUFJLS03T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Carretero, C. M. (Noviembre de 2018). Atorvastatina. *ELSEVIER*, 27(10). Obtenido de <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-atorvastatina-13128913>
- Colome, M. C. (Noviembre de 2008). Atorvastatina. *ELSEVIER*, 27(10), 112-113. Obtenido de <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-atorvastatina-13128913>
- DoTmed Corporation . (30 de diciembre de 2020). *DoTmed Corporation* .Obtenido de <https://es.dotmed.com/listing/liquid-chromatograph-hplc/waters/alliance-2695-separations-module/2713967>
- Elkady, E. F., Tammam, M. H., & maaty, A. A. (11 de diciembre de 2017). Indicador de estabilidad HPLC-UV frente a UPLC-DAD para la estimación de atorvastatina simultáneamente con aspirina, clopidogrel y sus impurezas relacionadas a granel y cápsulas. *letras de química analítica* , doi:<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/22297928.2017.138541>
- Funes, J., Meza, M., & Ponce, H. (9 de Diciembre de 2015). Desarrollo y validación de un método para la cuantificación de atorvastatina en tabletas mediante HPLC-DAD. *Revista Portal de la Ciencia*.
- García, A., & Yusá Marco, D. (2008). *HPLC FUNDAMENTAL*. VALENCIA, ESPAÑA: EDITORIAL DE LA UPV.
- HPLC Química. (2021). *HPLC Química*. Obtenido de <https://www.cromatografia.com.mx/>
- Mendez, N. (27 de octubre de 2010). Desenvolvimento e validação da metodologia analítica do teor de atorvastatina cálcica em insumo farmacêutico ativo e em comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência. *arca*. Obtenido de <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/9562>

- MSP. (Noviembre de 2020). ministerio de salud publica . Obtenido de <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2020/12/Consenso-Multidisciplinario-COVID19-Version-10.pdf>
- Rajasekaran, A., Sasikumar, R., & Dharuman, J. (2011). Simultaneous RP- HPLC method for the stress degradation studies of atorvastatin calcium and ezetimibe in multicomponent dosage form. *Ars Pharmaceutica*. Obtenido de <https://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/4739>
- Rodriguez, H. G. (03 de Junio de 2013). UNAM. Obtenido de UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO: [https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis\\_rodriguez\\_gaspar.pdf](https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis_rodriguez_gaspar.pdf)
- SAE. (5 de enero de 2018). *Servicio de Acreditación Ecuatoriano*. Obtenido de <https://www.acreditacion.gob.ec/control-de-calidad-medicamentos>
- SEACE. (2011). *seace*. Obtenido de <http://zonasegura.seace.gob.pe/documentos/documentos/FichaSubInv/ATORVASTATINA20mgTAB.pdf>
- Simionato, L. D., Ferello, L., Stamer, S., Repetto, M., Zubata, P., & Segall, a.(septiembre de 2014). A Validated Reversed-Phase HPLC Method for the Determination of Atorvastatin Calcium in Tablets. *Austin Chromatography*.
- Suarez, D., & Morales, Y. (07 de septiembre de 2018). PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO. *Revista Semilleros*. Obtenido de [https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7731/1/61319\\_78-2018-1-IQ.pdf](https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7731/1/61319_78-2018-1-IQ.pdf)
- USP. (2019). Atorvastatin Calcium. *SAFETY DATA SHEET*. Obtenido de <https://static.usp.org/pdf/EN/referenceStandards/msds/1044516.pdf>
- Vidal Vademecum Spain. (6 de marzo de 2020). Obtenido de [https://www.vademecum.es/equivalencia-lista-act+atorvastatin+tablet+80+mg-canada-c10aa05-15000417-ca\\_1](https://www.vademecum.es/equivalencia-lista-act+atorvastatin+tablet+80+mg-canada-c10aa05-15000417-ca_1)
- Waters.(s.f.). *Waters*. Obtenido de [https://www.waters.com/waters/es\\_ES/Sistema-ACQUITY-UPLC/nav.htm?cid=514207&locale=es\\_ES](https://www.waters.com/waters/es_ES/Sistema-ACQUITY-UPLC/nav.htm?cid=514207&locale=es_ES)
- Zapata, F. S. (2016). DETERMINACIÓN DE SULFONAMIDAS EN LECHE BOVINA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ULTRA-ALTARESOLUCIÓN (UPLC). Quito, Ecuador. Obtenido de <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/6397/1/UDLA-EC-TIB-2016-29.pdf>

### **MSc. PILAR ASUNCIÓN SOLEDISPA CAÑARTE**



Química Farmacéutica, Doctor en Bioquímica y Farmacia, Máster en Química Farmacéutica en la universidad de la Habana - Cuba, Actualmente terminando un Doctorado en Ciencias Farmacéuticas. trabajó como analista de medicamentos en el Instituto Nacional de Higiene Leopoldo Izquieta Pérez por más de 20 años, presto servicios para la realización del pre y post registro sanitario, fue jefa de control y aseguramiento de la calidad en Industria Farmacéutica - Indunidas, comenzó su labor educativa en el 2014 en la Universidad de Guayaquil.

### **MSc. GLENDA MARCELA SARMIENTO TOMALÁ**



Estudios obtenidos por la Universidad de Guayaquil (UG), Ecuador como: Diplomado Superior en Evaluación y Acreditación de Educación Superior". Magister en Planificación, Evaluación y Acreditación de Educación Superior. En la Universidad de la Habana-Cuba realizó los siguientes estudios: Maestría en Farmacología, y actualmente se encuentra cursando, Doctorado en Ciencias Farmacéuticas. Su trayectoria laboral y cargos en la UG como: Analista de Gestión de Calidad en Programa Progeca-Bioterio, Coordinadora de la Unidad de Titulación.

### **Mag. ZORAIDA DEL CARMEN BURBANO GÓMEZ**



Zoraida Burbano Gómez, es docente de la centenaria universidad de guayaquil, terminados mis estudios de tercer nivel (1987), tuve la suerte de ingresar a trabajar como ayudante de catedra en la facultad de ciencias químicas (1988), posteriormente realicé estudios en la universidad particular de Loja, 1994 profesor en educación media, doctorado en química y farmacia (2000), los estudios de cuarto nivel empezaron con el diplomado en docencia superior (1997), especialista en proyectos educativos (2005) y magister en educación superior (2006).

### **Mag. FRANCISCA PATRICIA JIMÉNEZ GRANIZO**



Química y Farmacéutica. Magister en Bioquímica Clínica. Docente, Investigadora Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Químicas - Guayaquil - Ecuador. Analista de Laboratorio.

### **Mag. GIOMARA MARGARITA QUIZHPE MONAR**



Magister en Procesamientos de Alimentos, Universidad de Agraria del Ecuador, Máster en Gestión de Proyectos por la Universidad Espíritu Santo, Diplomado en Innovación Educativa y Metacognición para el Aprendizaje, título Universidad de la Américas, Química y Farmacéutica graduada en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil. Inicia su vida profesional en el terreno de la Bioquímica Clínica, Hematología y Bacteriología.

### **MSc. ALEXANDRA JENNY LÓPEZ BARRERA**



Química y Farmacéutica. Docente de la Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Químicas. Máster en Química Farmacéutica en la Universidad de la Habana - Cuba. Actualmente terminando un Doctorado en Ciencias Farmacéuticas. Trabajo en la implementación de la norma ISO 17025 en la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria ARCSA, jefe de producción en el Laboratorio Máster Plant. Analista de control de calidad en el laboratorio Bristol Meyers Squibb.