



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores
"CUAUTITLAN"

CUANTIFICACION SIMULTANEA DE ACIDO ACETIL
SALICILICO Y ACIDO SALICILICO LIBRE EN
FARMACOS POR CROMATOGRAFIA DE
LIQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA

TESIS

Que para obtener el titulo de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
CLEMENTE VELEZ MAGAÑA
D I R E C T O R
QFB. HILDA GARCIA MARISCAL



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

CAPITULO I	INTRODUCCION Y OBJETIVOS
	1.1.- MONOGRAFIA DE ACIDO ACETIL SALICILICO
	1.2.- VALIDACION DE METODOS ANALITICOS
	1.3.- CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA
CAPITULO II	PARTE EXPERIMENTAL
	2.1.- APARATOS Y MATERIAL
	2.2.- METODO PARA CUANTIFICAR SIMULTANEAMENTE - EL ACIDO ACETIL SALICILICO Y EL ACIDO SA- LILICILICO LIBRE EN FARMACOS POR CROMATOGRA- FIA DE LIQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA.
CAPITULO III	RESULTADOS
	3.1.- PRECISION Y EXACTITUD DEL METODO
	3.2.- LINEARIDAD " "
	3.3.- REPRODUCIBILIDAD " "
	3.4.- LIMITE DE DETECCION " "
	3.5.- ESPECIFICIDAD " "
CAPITULO IV	DISCUSION DE RESULTADOS
CAPITULO V	CONCLUSIONES
CAPITULO VI	BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION Y OBJETIVOS

El incesante desarrollo de las investigaciones destinadas a la búsqueda de nuevos métodos analíticos o al perfeccionamiento de los existentes para el control de calidad de los medicamentos, ha generado la aparición de nuevas técnicas que permiten la separación, purificación, identificación y cuantificación de fármacos utilizados en la terapéutica moderna, de una manera mas agil y exacta.

Una precondition para delinear una nueva técnica analítica, es que el procedimiento, permita analizar en términos cuantitativos una sustancia.

La finalidad del presente trabajo es el establecer un método analítico que sea rápido, eficaz y confiable, para cuantificar simultaneamente el ácido acetyl salicílico y el ácido salicílico libre en farmacos por cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

En años anteriores, ya se habían desarrollado métodos analíticos para el mismo fin, así en 1979 Ross A. Kirchhoefer y William E. Juhl, determinaron ácido salicílico y aspirina en materia prima por cromatografía de líquidos de alta eficiencia utilizando un detector de fluorescencia, en ese mismo año Ross D. Kirchhoefer, utilizando el mismo método determina simultaneamente aspirina y ácido salicílico, en materia prima y tabletas con capa enterica.

Tomando en cuenta los estudios antes realizados, se optó por desarrollar el método analítico en cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase reversa, debido a que ofrece grandes ventajas con respecto a las técnicas oficiales USP XX, como son : separación, identificación, cuantificación y especificidad.

Ahora bien para comprobar la efectividad del método analítico desarrollado recurrimos a la validación estadística, la cual nos va a dar la confiabilidad de que la técnica es aplicable al control analítico de fármacos y preparados farmacéuticos.

En cualquiera de estos casos es recomendable contar con parámetros estadísticos que nos indiquen la precisión, exactitud, linealidad, especificidad y límite de detección del método que se esté evaluando.

1.1. MONOGRAFIA DEL ACIDO ACETIL SALICILICO

Antecedentes :

La corteza del Sauce (*Salix alba*) cuya virtud antipirética conocían en la antigüedad, contiene un glucósido llamado Salicina descubierto por Leróuz en 1827. Por hidrólisis, la Salicina libera glucosa y alcohol salicílico. Piria en 1838 elaboró ácido salicílico de la Salicina, seis años después Cahours obtuvo ácido salicílico de aceite volátil de Gualteria. En 1860 Kolb y Louteman realizaron la síntesis de este ácido partiendo de fenol.

El salicilato de sodio fue usado por primera vez como antipirético en la fiebre reumática por Rues en 1875 y en el año siguiente Stricker y MacLagan, cada uno por su parte, descubrieron el valor de esta sustancia en la enfermedad mencionada. En 1878, See observó que los salicilatos aumentaban la excreción urinaria de ácido urico y Campbell utilizó en 1889 esta propiedad en el tratamiento de la gota. En 1886 Mencki introdujo el salicilato de fenilo y Dreser en 1889 hizo lo mismo con la Aspirina (Ácido acetil salicílico). Los salicilatos sintéticos pronto desplazaron totalmente a los compuestos más caros que se obtenían de las fuentes naturales

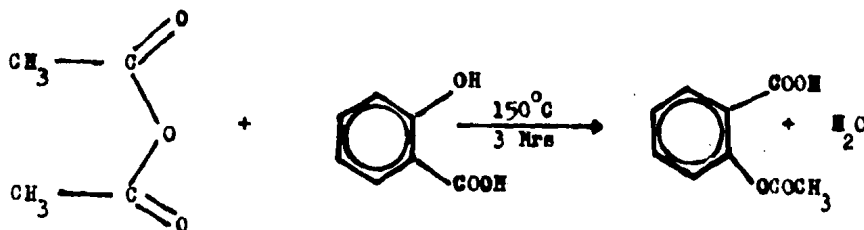
El ácido salicílico (Ácido ortohidroxibenzoico) es tan irritante que solo puede usarse externamente y por ello se han sintetizado varios derivados para uso general. En base al grupo donde se hace la sustitución, se les ha clasificado de la siguiente manera :

- 1.- Esteres del Ácido salicílico (sustitución en el grupo carbonilo).
- 2.- Esteres salicílicos de ácido orgánico (sustitución en el grupo fenólico).

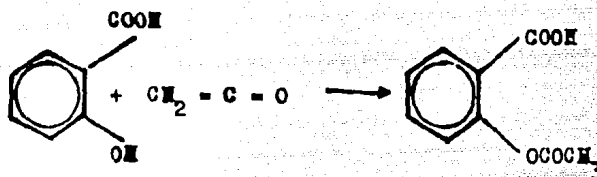
Las sustituciones en el grupo carboxílico e hidroxílico sólo modifican su potencia o toxicidad. El grupo OH en posición orto es muy importante para su acción. Se han estudiado los efectos de las sustituciones en el anillo benzénico con diversos grupos funcionales, pero no se ha observado ningún medicamento activo. (19) (3)

Preparación :

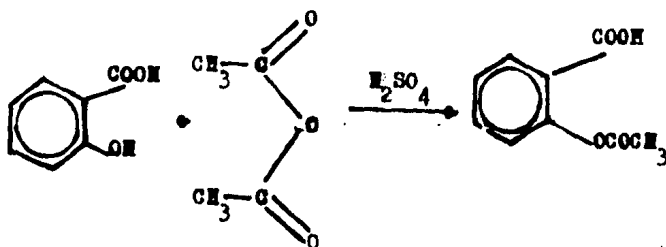
- a) Se hace reaccionar el ácido salicílico con anhídrido acético o cloruro de acetilo.



- b) El ácido salicílico se disuelve en un solvente inerte (éter etílico anhidro) y se pasa ceteno a través de esta solución hasta saturarla; al evaporar el solvente se obtienen las agujas de ácido acetil salicílico.

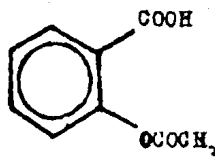


- c) Se hace reaccionar el ácido salicílico cuantitativamente con anhídrido acético en presencia de ácido sulfúrico. (3)



Propiedades Fisicoquímicas

Fórmula estructural :



Fórmula condensada : $C_9H_8O_4$

Nombre químico : Acido 2- acetil-oxibenzoico

Sinónimos : Acido acetil salicílico, Aspirina y Acetofen.

Peso molecular : 180.2

Descripción : Cristales blancos o ligeramente coloridos, o polvo blanco cristalino.

Solubilidad : A 20°C es soluble en 300 partes de agua, 7 partes de alcohol, 20 partes de éter y 17 partes de cloroformo; se solubiliza con descomposición de ácido salicílico, en soluciones de álcalis (hidroxidos y carbonatos).

Olor : Casi inodoro pero es irritable a la nariz.

pKa : 3.5

Forma del cristal : Monoclinico generalmente alargado.

Constante dieléctrica : 2.35

Momento dipolo : 2.09

Coefficiente de partición (K): En buffer octanol/agua

pH	K
1	17.7
7	1.81

Ensayos de identidad

Intervalo de fusión : 135 - 138°C

Espectrofotometría de infrarrojo. (fig. No. 1)

El espectro de absorción infrarrojo en bromuro de potasio (1:400) exhibe los siguientes máximos.

Longitud de onda	Asignación
2300-2500	Grupos carbonilos
1760	Ester vinílico
1690	Acido aromático
1490-1610	Dobles ligaduras aromáticas.

Espectrofotometría de ultravioleta :

Una solución de Aspirina fue diluida en ácido sulfúrico-0.1 N, exhibe los siguientes picos de longitud de onda máxima a : 229, 276 y 277 nm.

Ensayos de pureza :

Metales pesados : No más de 10 ppm.

Pérdida al secado : Secado en sílica gel durante 5 horas pierda no más de 0.5 % de su peso.

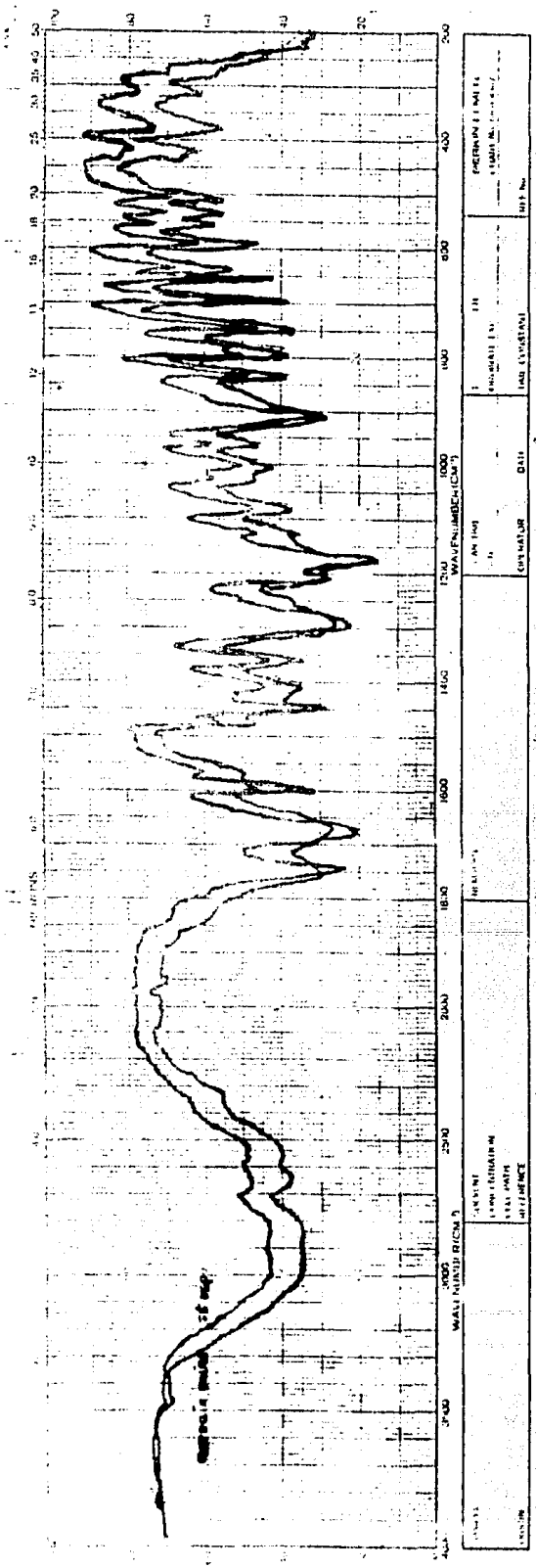


Figura No. 1
 Espectro de absorción infra
 rojo del ácido acetil sali
 cílico (USP) y materia pri
 ma en pastilla de bromuro -
 potasio.

Residuos de la ignición : Cuando más el 0.05 %.

Cloruros : No más de 140 ppm.

Sulfatos : No más de 400 ppm.

Sustancias relacionadas : Acido salicílico libre
no más de 0.3 %.

Ensayo : Contiene entre el 99.5 % y el 100.5 % de $C_9H_8O_4$ calculado sobre la base anhidra.

Estabilidad :

Se hidroliza a ácido salicílico libre en contacto con la humedad; en solución acuosa su pH de máxima estabilidad es de 2 a 3. En suspensiones acuosas se descompone apreciablemente después de 5 días.

Además de lo anterior hay otras sustancias con las que el ácido acil salicílico es incompatible como son Fenildimetilpirazolona, Etoxi-p-acetanilida, Dimetilaminofenildimetilpirazolona, Hexametilentetramina, Sales de quinina, Magnesio-Perborato sódico, Goma arábiga y Sulfamidas. (8), (17), (4), (1) y (12).

Usos :

Por su acción queratolítica, el ácido salicílico libre se emplea para tratamientos locales de verrugas, callos, infecciones micóticas y algunas dermatitis excematosas. Los salicilatos disminuyen la temperatura corporal; su acción antipirética es rápida y eficaz en pacientes febriles.

Los salicilatos alivian ciertos dolores por su acción sobre el Sistema Nervioso Central, cuyo mecanismo de acción no se ha elucidado, los salicilatos producen un efecto analgésico y antiinflamatorio. Los dolores que pueden aliviarse con los salicilatos son de poca intensidad (como dolor de cabeza, mialgias, artrialgias, etc. (20))

Efectos colaterales : En algunas ocasiones puede causar úlceras gástricas y aun hemorragias en los animales de experimentación, en el hombre esto generalmente sucede a dosis altas, manifestándose por pérdida de sangre en las heces.

Cuando se administra una dosis de 3 a 4 gramos diarios durante varias semanas, puede disminuir la vida del eritrocito e interfiere en el metabolismo del hierro.

Se ha observado que el ácido acetil salicílico aumenta el tiempo de coagulación de la sangre. (19).

Farmacocinética : Los salicilatos administrados oralmente se absorben rápidamente en la parte superior del intestino delgado. Las concentraciones máximas en el plasma se encuentran a los 30 minutos después de la administración oral.

La aspirina se absorbe en gran parte inalterada y se hidroliza rápidamente a ácido salicílico en hígado, plasma y eritrocitos.

A concentraciones terapéuticas el 50 % a 80 % se encuentra unido a proteínas plasmáticas, especialmente la albúmina (12).

La vía de eliminación es por el riñón, la vida media se incrementa hasta 15 a 30 horas. (19).

Intoxicación : Los niños con fiebre y deshidratación están predispuestos a la intoxicación aunque la dosis de salicilatos sea relativamente pequeña.

La dosis letal estimada en el hombre es considerada en el intervalo de 5 a 15 gramos por algunos autores (5) y en el de 10 a 30 gramos por otros (24)

La mayor frecuencia de intoxicaciones corresponde a los pacientes de fiebre reumática que reciben dosis elevadas del fármaco y ello ha causado fallecimientos . El síndrome completo consiste en cefalea, mareos, subido de oídos, somnolencia, náuseas, vómito y diarreas. (1)

1.2 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

El empleo de una técnica analítica implica un riesgo si no se ha demostrado que dicha técnica es confiable. En muchas ocasiones se presenta el problema de seleccionar el método analítico más apropiado para la determinación de un compuesto.

Consecuentemente, el desarrollo de procedimientos analíticos tiene que ser validado para seleccionar el más adecuado, esta evaluación se representa por medio de parámetros indicadores como; precisión, exactitud, linealidad, límite de detección y especificidad.

A continuación se presentan las definiciones correspondientes a los parámetros antes mencionados.

Exactitud : Una técnica analítica es más exacta a mayor concordancia exista entre un valor determinado experimentalmente y un valor de referencia.

Precisión : Es la medida del grado de concordancia de mediciones repetidas de una misma propiedad; derivado de la desviación estándar estimada de una serie de mediciones y expresada en términos de repetición y/o reproducibilidad.

Repetición : Precisión de un método expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes desarrolladas por un mismo analista usando el mismo aparato y la misma técnica.

Reproducibilidad : Precisión de un método expresado como la concordancia obtenida entre mediciones repetidas con variaciones en la operación como por ejemplo determinaciones hechas por distintos analistas, diferentes aparatos o en distintos laboratorios.

Linearidad : Medición del grado de concordancia cuando la curva de calibración se aproxima a una línea recta o del grado en que la susceptibilidad es constante.

Susceptibilidad : Relación entre la pendiente de una curva de calibración y la variabilidad de los puntos experimentales.

Especificidad : Grado en que la medición se debe únicamente a la sustancia por determinar y no a otras sustancias que puedan estar presentes en el material por analizar.

Sensibilidad : (Límite de detección) Menor cantidad detectable del compuesto por analizar.

1.3 CROMATOGRAFIA

La cromatografía se practica en el laboratorio como una importante disciplina.

La cromatografía nos ayuda a separar, identificar y cuantificar compuestos.

La cromatografía tuvo sus inicios en el año de 1903 cuando el bioquímico Ruso Tswett ideó una nueva técnica de separación que obligaba a la muestra a atravesar una columna de adsorbente reducido a polvo fino. Parte de la mezcla se depositaba en la parte superior de la columna después se lavaba la columna con un solvente orgánico, a medida que se desarrollaba el proceso de lavado, los diversos componentes de la mezcla eran separados en la columna; finalmente cuando se separaban por completo se podían recobrar por lavado, eluyendo los fuera de la columna y recogiéndolos en fracciones separadas, o haciendo salir de la columna del tubo en donde está contenida y cortándola aparte entre las zonas de los componentes separados.

La mayoría de los compuestos de Tswett eran pigmentos de plantas, por lo que las bandas coloreadas que formaban los compuestos en la columna eran fácilmente visibles y de hecho estas bandas coloreadas justificaron el nombre dado de cromatografía a este método de separación. (22) y (15)

Tswett constató la separación y propuso que las moléculas de soluto eran adsorbidas en la superficie del material reducido a polvo de la columna. Estas sustancias, que el sólido adsorbía muy fuertemente, no las liberaba fácilmente el disolvente y estos compuestos descendían muy lentamente por la columna. Los solutos menos fuertemente adsorbidos eran transportados en la columna a mayores velocidades; así se lograba una separación a causa de las diferentes afinidades de los solutos por el disolvente y el sólido adsorbente.

La cromatografía abarca una gran variedad de técnicas de separación altamente efectivas. La característica común de todas ellas, es que los componentes de la muestra se distribuyen en dos fases, una de las cuales permanece estacionaria, mientras que la fase móvil se desplaza a través de los intersticios, sobre la superficie de la fase estacionaria. El desplazamiento de la fase móvil es uno de los factores de migración diferencial de los componentes de la muestra, la temperatura de la columna y la cantidad de la fase estacionaria. No hay restricción sobre la naturaleza de las dos fases, la fase estacionaria puede ser sólida o líquida, la fase móvil líquida o gaseosa. Si la fase estacionaria es un sólido, el proceso se llama cromatografía de adsorción y si la fase estacionaria es un líquido, el proceso se llama como cromatografía de partición. De acuerdo al proceso involucrado en la separación, la cromatografía se puede clasificar de la siguiente manera Fig. No. 2 . (11).

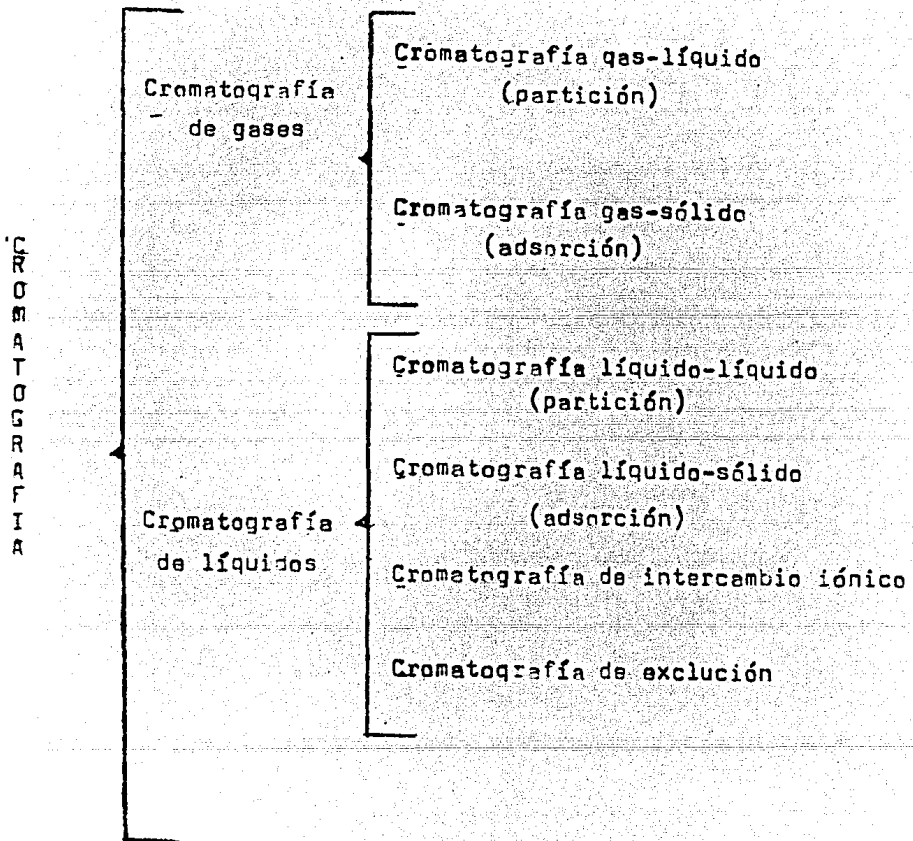


Figura No. 2. Tipos de Cromatografía

Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE)

A pesar de que el primer experimento sobre cromatografía fue una forma de cromatografía líquida, no fue sino hasta 1968 - que se produjo un avance considerable en esta técnica que - por tantos años había permanecido olvidada, este avance fue gradual y se debió a la introducción de altas presiones de operación y de sistemas de detección continua.

Durante muchos años se practicó la cromatografía líquida en una forma que llamaremos clásica y que consiste básicamente en lo siguiente: en una columna de vidrio, cuyo diámetro - varía entre 2 y 10 cm, rellena de algún material como sílica, alúmina, azúcar, etc, cuyas partículas son por lo general de un tamaño cercano a 200 micras, se introduce la muestra disuelta en la fase móvil o disolvente, y luego se agrega el disolvente, con el que se eluye la muestra a través de la columna. Los tamaños de muestra varían entre 0.1 y 1.0 g o más, el disolvente o fase móvil fluye a lo largo de la columna - por efecto de la gravedad, produciéndose apenas una débil - presión ejercida por el volumen de la fase móvil que se agrega a la columna.

El disolvente se recolecta en la base de la columna en fracciones de determinado volumen. Uno de los inconvenientes de esta técnica es el prolongado tiempo de análisis, que muchas veces puede ser de horas e incluso de días; otra desventaja es que el material de relleno se utiliza por lo general una sola vez debido a que parte, se adsorbe en forma irreversible, esto es de la muestra.

La cromatografía líquida de alta eficiencia utiliza instrumental muy distinto con ventajas significativas. En este método se usan columnas de diámetro muy reducido, por ejemplo 2 mm - rellenas de materiales cuyas partículas tienen un tamaño de - 10 micras o menos. Este tipo de columna es muy eficiente pero presenta una gran resistencia al flujo de la fase móvil por - lo que es necesario emplear sistemas de bombeo de alta presión (hasta 400 atm) que hagan fluir la fase móvil a una velocidad razonable a través de la columna.

La cantidad de fase estacionaria dentro de la columna - es pequeña, por lo que se requiere que la muestra también sea pequeña del orden de microgramos. Un detector, colocado a la salida de la columna, proporciona un registro continuo de la composición del líquido que eluye, lo que permite obtener un cromatograma que se utiliza para identificar y cuantificar - los componentes de la muestra.

A pesar de que la CLAE es una técnica relativamente nueva se cuenta ya con numerosas publicaciones en la literatura que describen muy diversas aplicaciones en los campos de bioquímica, farmacia y alimentos.

Varios nombres han sido usados para describir los principales atributos de esta nueva cromatografía de líquidos; - cromatografía de líquidos de alta velocidad (CLAV), cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE), cromatografía de líquidos de alta presión (CLAP) y cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

Las ventajas de la CLAE sobre otras formas de cromatografía de líquidos son :

- Las columnas se deterioran poco a pesar de su uso repetido
- La resolución lograda sobre tales columnas es buena.
- Es reproducible.
- Los tiempos de análisis son cortos.
- Es muy sensible.

El costo del equipo, de las columnas y de la fase móvil es alto, sin embargo la inversión es justificable cuando el número de análisis por realizar es elevado o cuando no se cuenta con técnicas específicas para un determinado compuesto.

Equipo

El instrumental propio de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia aún sigue perfeccionándose, sin embargo hay en el mercado una amplia gama de ellos en cuanto a costo- versatilidad y complejidad. La fig. No. (3). Muestra los componentes básicos de un cromatografo de líquidos de alta eficiencia.

Recipientes de almacenamiento de la fase móvil.

Se pueden utilizar recipientes de vidrio, de acero inoxidable o de plástico inerte, de una capacidad entre 1 y 3 litros, que en la mayoría de los casos es suficiente volumen para todo un día de operación.

Muchas veces, en especial con fases móviles polares, hay una marcada tendencia del oxígeno y otros gases a disolverse en el líquido.

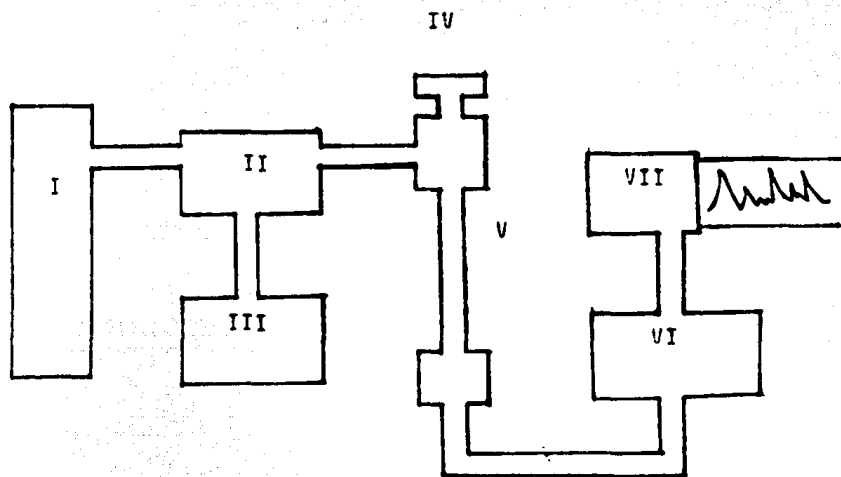


Figura No. 3. Representación básica de un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia.

- I .- Fase móvil
- II .- Bomba
- III.- Programador de fase móvil
- IV .- Cámara de inyección
- V .- Columna
- VI .- Detector
- VII.- Registrador

Si estos gases se liberan dentro del cromatógrafo pueden afectar seriamente el funcionamiento del detector y la eficiencia de la columna. Por este motivo es necesario remover los gases disueltos en la fase móvil. Una forma es aplicar vacío sobre el recipiente que contiene la fase móvil mientras se agita - el líquido moderadamente.

Fase móvil.

En cromatografía de líquidos la composición de la fase móvil es una variable que tiene gran influencia en la separación. Hay una gran variedad de solventes usados en CLAE, los cuales deben cumplir con ciertas características tales como :

- Ser puros
- No degradar o disolver la fase estacionaria
- Ser compatibles con el detector
- Disolver la muestra
- Tener baja viscosidad

Sistemas de bombeo

Las columnas utilizadas en cromatografía de líquidos moderna están rellenas de materiales con tamaño de partículas muy pequeño, lo cual hace que la resistencia al flujo de la fase móvil sea muy elevada. Por esta razón, se requiere un sistema de bombeo que haga fluir la fase móvil a un flujo razonable. De acuerdo con las características de funcionamiento y de diseño, se pueden considerar básicamente dos tipos de bombas :

- 1) Bombas mecánicas
- 2) Bombas neumáticas

Con respecto a las primeras las hay de dos tipos:

i) Bombas reciprocas.

Que desplazan flujos de volumen pulsante, la máxima presión que se puede obtener varía según el diseño, pero en general es aproximadamente de 200 atmósferas.

ii) Bombas de desplazamiento continuo.

Llamadas también bombas de émbolo o bombas tipo jeringa el flujo desplazado por ellas es uniforme y continuo, pero la capacidad de la bomba es limitada y para volver a llenar la cámara es necesario suspender momentáneamente su operación.

2) Bombas neumáticas.

En este sistema el líquido es desplazado mediante la presión ejercida por un gas inerte a alta presión. Los flujos obtenidos están libres de pulsaciones y son de presión constante. Las desventajas de estas bombas son la capacidad limitada en el volumen total que pueda bombear y la difusión que presente el gas en el líquido.

Camara de inyección.

Esta parte del cromatógrafo exige cuidadoso diseño puesto que debe resistir altas presiones, tener un volumen pequeño y sus cavidades deben ser bien eluidas por un volumen de fase móvil. En esta cámara es donde se introduce la muestra que luego es arrastrada a la columna, hay tres modalidades de introducir la muestra:

- Por medio de jeringas de alta presión.
- Por medio de válvulas inyectoras.
- Suspendiendo el flujo momentáneamente.

Columna

En todo sistema cromatográfico, ya sea en fase líquida o gaseosa, la columna es el "corazón" del sistema puesto que en ella se lleva a cabo la separación de los componentes de la mezcla.

La columna consiste en un segmento de tubo de algún material inerte, de diámetro uniforme y capaz de resistir altas presiones de entre todos los materiales, el acero inoxidable es el más usado en algunos casos también se ha empleado vidrio de paredes gruesas pero tiene el inconveniente de no permitir conexiones metal-vidrio herméticas a altas presiones. Respecto a la forma de la columna, por lo general se prefieren rectas.

Para obtener columnas eficientes son de gran importancia el tipo de empaque y la manera de empacar la columna. El tamaño de partícula del material de relleno debe ser pequeño - de 5 a 10 micras y debe empacarse por un procedimiento que - de una capa compacta y homogénea.

Empaques porosos.

Estos pueden ser de sílica, alúmina, materiales de intercambio iónico o fases químicamente unidas, recientemente se han manufacturado partículas porosas con diámetros de 5, 10 y 20 micras que tienen una gran área de superficie, entre 200 - y 300 $\frac{m^2}{g}$, por lo que pueden aceptar muestras de tamaño considerable sin que la columna pierda eficiencia.

El tamaño de partícula es importante porque controla el proceso de difusión de las moléculas de la muestra hacia adentro - y hacia afuera de los poros de la partícula. A medida que el tamaño de partícula aumenta, el proceso de difusión se hace más lento; conforme disminuye el tamaño de partícula, la profundidad de los poros también disminuye y el proceso de transferencia de masa se hace más rápido permitiendo obtener análisis rápidos sin pérdida en la resolución.

Lo anterior explica porqué sólo se utilizan materiales porosos cuyas partículas sean de tamaño menor de 50 micras. Detectores.

Durante mucho tiempo el desarrollo de la cromatografía líquida se vio obstaculizado por falta de detectores adecuados. Este problema de detección surgió por falta de un dispositivo que midiera en forma continua alguna propiedad fisicoquímica de los componentes de la muestra o de la solución que los contenía y que generara una señal proporcional a la muestra, a medida que esta salía de la columna. Un detector ideal para cromatografía de líquidos sería uno que cumpliera con las siguientes características:

- Tener alta sensibilidad
- Responder a todos los solutos
- Tener una respuesta que aumente linealmente con la cantidad de soluto.
- Ser estable, o sea, insensible a los cambios de temperatura y a la variación de flujo de la fase móvil.

- Exhibir bajo ruido
- No destruir al soluto
- Tener respuesta rápida

Desafortunadamente ninguno de los detectores posee todas estas propiedades.

Algunos tipos de detectores que se utilizan en CLAE.

1) Detectores generales. Son aquellos que miden un cambio en alguna propiedad física de la fase móvil con el soluto, por ejemplo el índice de refracción, la conductividad, la constante dieléctrica etc.

2) Los que miden una propiedad del soluto o detectores selectivos son sensibles a alguna propiedad del soluto, ejemplo - la absorción ultravioleta, la fluorescencia, propiedades polarográficas, etc.

El detector de luz ultravioleta es el de uso más generalizado en CLAE porque muchos compuestos de interés absorben intensamente en la región ultravioleta. Su funcionamiento se basa en la absorción de la luz por parte de la muestra al pasar a través de ella un haz de luz monocromática. Es uno de los detectores más sensibles, pues en condiciones óptimas puede dar sensibilidades de hasta 0.005 unidades de absorción.

Registadores

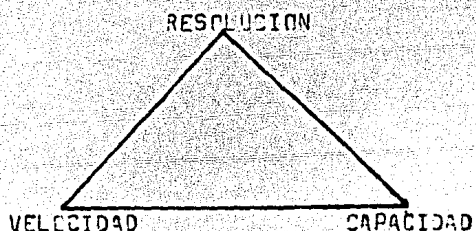
Su función es representar en un registro gráfico la señal dada por el detector, generalmente se utilizan registradores potenciométricos de 1 o 10 mV.

Los registradores deben tener una respuesta rápida de la pluma y la velocidad variable del papel.

Las señales obtenidas en el detector aparecen en el registrador como picos de forma aproximadamente gaussiana, cuya altura o área se utiliza como una medida de tipo cuantitativo.

Conceptos teóricos

Las características que se desean de un sistema cromatográfico pueden representarse por un triángulo, lo que nos indica que cualquier variación en alguna de ellas repercute en otras.



Resolución cromatográfica

El fin de la cromatografía es la separación adecuada de los componentes de una mezcla. Para saber que tan buena fue la separación se cuenta con un parámetro denominado Resolución (R_s).

La altura equivalente a un plato teórico se define como el largo necesario de la columna para lograr un equilibrio de reparto entre la fase estacionaria y la fase móvil.

La eficiencia de la columna es una función de los parámetros de la columna tales como velocidad de flujo de la fase móvil, tamaño de partícula del empaque y viscosidad del solvente.

Selectividad

La selectividad de la columna (α) es medida por la separación relativa de los picos de los compuestos y está en función de los coeficientes de distribución.

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1}$$

Donde; K_2 y K_1 = Coeficientes de distribución de los componentes 1 y 2, respectivamente.

La selectividad de la columna puede modificarse variando el pH de la fase móvil, modificando la superficie de la fase estacionaria, por cambios en la temperatura de separación y/o cambiando la naturaleza química del soluto.

Factor de capacidad.

El factor de capacidad está dado por la relación entre el coeficiente de distribución de la sustancia y algunos parámetros de las fases estacionarias y móvil.

$$K' = K \frac{V_s}{V_m}$$

Donde K' = Factor de capacidad
 V_s = Volumen de la fase estacionaria
 V_m = Volumen de la fase móvil en los intersticios
 K = Coeficiente de distribución

Pequeños valores de K' indican que los componentes son poco retenidos en la fase estacionaria, por lo que se obtienen separaciones deficientes; valores grandes de K' mejoran la separación pero llevan a análisis prolongados. (10), (17) (21) y (16).

Normalmente, una variación en el solvente cambiará el resultado de K' . Para controlar los valores de K' se varía el solvente hasta que la combinación ideal se encuentra. En caso de dudas, seleccionar un solvente de fuerza media usando fase normal. Si no se obtiene una separación buena; entonces usar fase reversa. Fig. No. (4).

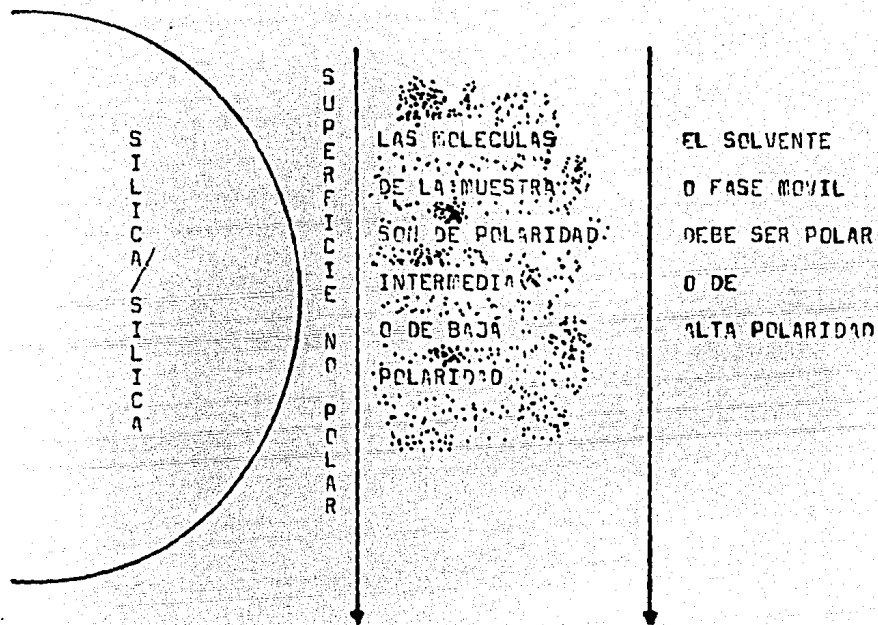


Figura No. 4.- La fase reversa tiene condiciones que requieren una fase estacionaria (empaques) no-polar y una fase móvil (solvente) que es polar

PARTE EXPERIMENTAL

El trabajo experimental consiste en cuantificar simultaneamente el ácido acetil salicílico y el ácido salicílico libre en materia prima.

El método propuesto para cuantificar ambos fármacos, es desarrollado en cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase reversa, utilizando una columna microbondapack C_{18} , una fase móvil de metanol-ácido acético-agua 40:3:57, para la cuantificación se hizo por relación de las alturas obtenidas de los picos de ácido acetil salicílico, ácido salicílico libre y del estándar interno de caféina anhidra tanto para la materia prima como para la solución de referencia estándar USP.

2.1 Aparatos y material

Aparatos

- Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (Waters Associates).
- Una columna de acero inoxidable de 3.9 mm x 30 cm y un tamaño de partícula de 10 micras. Microbondapack C_{18} (Waters Associates).
- Detector de longitud de onda variable modelo 441 (Waters Associates).
- Inyector modelo U6K (Waters Associates).

- . Bomba modelo 600A
- . Graficador Omni (Houston Instruments)
- . Equipo de filtración millipore
- . Balanza analítica

Material

- . Filtros de disco de membrana millipore de 0.45 micras y de diametro 25mm y 27 mm.
- . Embudo de 300 ml recubierto de teflon millipore.
- . Swinnex con un diametro de 25 mm millipore.
- . Matraz kitazato de 1000 ml.
- . Matraces erlenmeyers de 50 y 100 ml.
- . Probeta graduada de 100 ml.
- . Pipetas volumetricas de 5 y 10 ml.
- . Matraces volumetricos de 25, 50, 100 y 200 ml.
- . Vasos de precipitado de 100 ml.
- . Jeringa de vidrio de 10 ml.
- . Microjeringa de 25 microlitros.

Reactivos

- Metanol uvasol (Merck)
- Acido acetico (P.A)
- Agua tridestilada
- Acido fórmico (P.A)

Estandares de referencia

- Acido áctil salicflico (USP)
- Acido salicflico (USP)
- Caféina anhidra (USP)
- Acido áctil salicflico (Materia prima estandarizada)

2.2 Procedimiento

Preparación de la solución de ácido acetico al 3 %.

Medir con una probeta 30 ml de ácido acetico (P.A) y llevarlos a un matraz volumetrico de 1000 ml y aforar con agua tridestilada.

Preparación de la fase móvil.

Medir con una probeta 400 ml de metanol (Uvasol) y aforar en un matraz volumetrico de 1000 ml con solución de ácido acetico al 3 %, filtrar y degasificar con el equipo de filtración millipore.

Preparación de la solución de estándar interno.

Se pesó exactamente 100 mg de caféina anhidra USP y se colocó dentro de un matraz volumetrico de 50 ml se disolvió con 5 ml de metanol (uvasol), y afóro al volumen con solución de ácido acetico al 3%.

$$\frac{100 \text{ mg}}{50 \text{ ml}} \times \frac{5 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ mcg}}{1 \text{ mg}} = 100 \text{ mcg/ml}$$

Preparación de la solución de estándar de referencia de ácido acetil salicílico USP con estándar interno.

Se pesó exactamente 200 mg de ácido acetil salicílico - USP en un matraz volumetrico de 100 ml, se agregó 2 ml de metanol (uvasol) y se disolvió, enseguida se adicionó 1 ml de ácido fórmico y se disolvió, se agregaron 5 ml de solución de estándar interno (caféina anhidra) USP y se diluyo al volumen con solución de ácido acetico al 3% y se mezcló bien, se filtró y se degasificó con el equipo de filtración millipore.

$$\frac{200 \text{ mg}}{100 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ mcg}}{1 \text{ mg}} = 2000 \text{ mcg/ml}$$

Preparación de la solución estándar de referencia de ácido salicílico con estándar interno.

Se pesó exactamente 10 mg de ácido salicílico y se llevó a un matraz volumetrico de 100 ml, se agregó 2 ml de metanol (Uvasol) y se disolvió, se aforó con solución de ácido acético al 3 %, se tomó cuantitativamente 6 ml de la solución anterior y se llevó a un matraz volumetrico de 100 ml - se agregó 5 ml de la solución de estándar interno y se agitó, se aforó al volumen con solución de ácido acético al 3 % y - se mezcló bien, se filtró y se degasificó con el equipo millipore.

$$\frac{10 \text{ mg}}{100 \text{ ml}} \times \frac{6 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ mcg}}{1 \text{ mg}} = 6 \text{ mcg/ml}$$

Preparación de la muestra

- Se pesó exactamente una porción de muestra equivalente a 200 mg de ácido acetil salicílico y se transfirió cuantitativamente a un matraz volumetrico de 100 ml.
- Se agregó 2 ml de metanol (uvasol) y se agitó alrededor de 3 minutos hasta disolver el ácido acetil salicílico.
- Se adicionó 1 ml de ácido fósfórico.
- Se agregó 5 ml de la solución de estándar interno y se disolvió.
- Se aforó al volumen con solución de ácido acético al 3 % - y se mezcló bien.

- Se filtró y degasificó la solución muestra con el equipo de filtración millipore.
- Inyectar 20 microlitros de la solución problema y de las soluciones de estándares de ácido acetil salicílico y de ácido salicílico utilizando una microjeringa de 25 microlitros, en un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia bajo las siguientes condiciones :

Temperatura	:	Ambiente
Fase móvil	:	Metanol:Acido acetico: Agua 40:3:57
Velocidad de flujo	:	1.4 ml/minuto
Detector U.V.	:	313 nm
Presión	:	2400 psi
Sensibilidad	:	0.05 AUF
Vel. carta	:	0.25 cm/minuto

Calculos

Para calcular la cantidad de ácido acetil salicílico en materia prima utilizamos el siguiente sistema de ecuaciones:

$$R_m = \frac{A_p}{A_{x_1}} \qquad R_{st} = \frac{A_{se}}{A_{x_2}}$$

$$\frac{R_m}{R_{st}} \times C_{st} \times F_d = \text{Mg de ácido acetil salicílico}$$

Donde:

- A_p = Altura en cm del pico de ácido acetil salicílico.
- A_{x_1} = Altura en cm del pico del estandar interno 1.
- A_{se} = Altura en cm del pico del estandar externo.
- A_{x_2} = Altura en cm del pico del estandar interno 2.
- R_m = Relación de alturas en cms de los picos del ácido acetil salicílico y del estandar interno.
- R_{st} = Relación de alturas en cms de los picos del estandar externo y del estandar interno.
- C_{st} = Concentración en mg/ml de la solución estandar.
- F_d = Factor de dilución de la solución problema.

Para calcular la cantidad de ácido salicílico en materia prima utilizamos el siguiente sistema de ecuaciones:

$$C_{mp} = \frac{H_p}{H_{x_1}} \quad C_{se} = \frac{H_{se}}{H_{x_2}}$$

$$\frac{C_{mp}}{C_{se}} \times \frac{C_{st}}{W_m} \times F_d \times 100 = \% \text{ de ácido salicílico}$$

Donde:

H_p = Altura en cm del pico de ácido salicílico.

H_{x_1} = Altura en cm del pico del estándar interno-1.

H_{se} = Altura en cm del pico del estándar externo.

H_{x_2} = Altura en cm del pico del estándar interno-2.

C_{mp} = Relación de alturas en cms de los picos del ácido salicílico y del estándar interno.

C_{se} = Relación de alturas en cms de los picos del estándar externo y del estándar interno.

C_{st} = Concentración del estándar en mg/ml.

W_m = Peso de la muestra de ácido acetil salicílico en mg.

F_d = Factor de dilución.

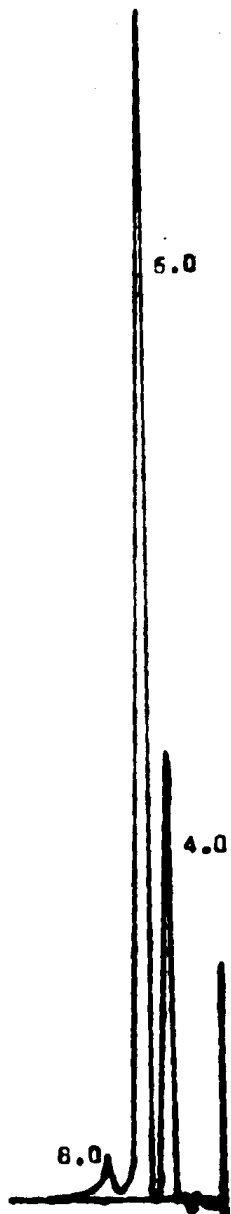


FIGURA No. 5

Cromatograma que muestra el pico obtenido -
para la solución de referencia USP de ácido
acetil salicílico

Compuesto	T_R
Acido acetil salicílico .	6.0 min
Acido salicílico libre	8.0 min
Estandar interno (caféina anhidra)	4.0 min

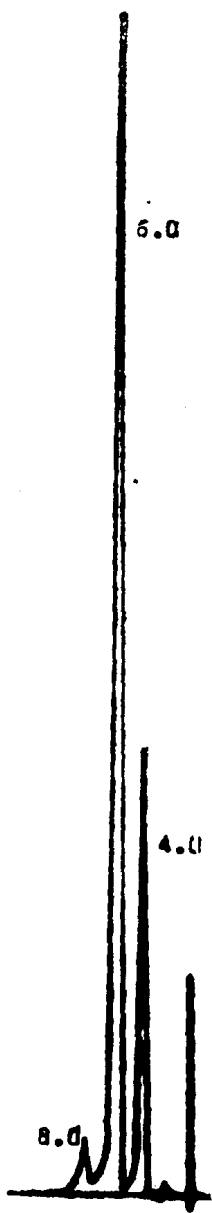


FIGURA No. 6

Cromatograma que muestra el pico obtenido -
para el ácido acetil salicílico materia prima

Compuesto	T_R
Acido acetil salicílico	6.0 min
Acido salicílico libre	8.0 min
Estandar interno (caféina anhidra)	4.0 min

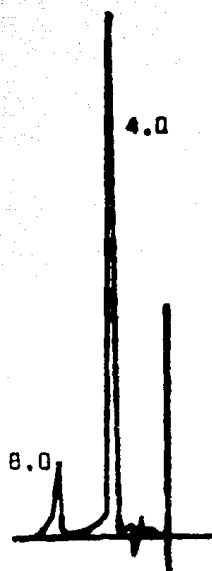


FIGURA No. 7

Cromatograma que muestra el pico obtenido para la solución de referencia de ácido salicílico

Compuesto	T_R
Acido salicílico	8.0 min

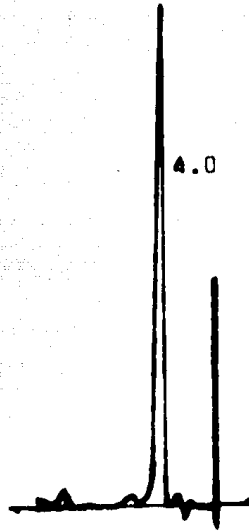


FIGURA No. 8

Cromatograma que muestra el pico obtenido para la solución de
estandar interno (caféina anhidra)

Compuesto	T_R
Estandar interno	4.0 min

CAPITULO III

Evaluación estadística del método para la cuantificación simultánea de ácido acetil salicílico y ácido salicílico libre, como materia prima por CLAE.

Exactitud y precisión del método:

La precisión se evalúa como repetibilidad y como reproducibilidad.

Exactitud:

En la tabla (No.1) se presentan los resultados obtenidos al efectuar 18 recobros del ácido acetil salicílico como materia prima a tres concentraciones diferentes, por el método de cromatografía de líquidos de alta eficiencia. Así mismo se muestran los resultados obtenidos del porcentaje encontrado de ácido salicílico libre en cada una de las concentraciones correspondientes.

Parámetros estadísticos obtenidos:

\bar{X}	= 99.812 %
S	= 1.0634
S \bar{X}	= 0.250
IC _{95%}	= 0.6477
LSC	= 100.460
LIC	= 99.165
CV	= 1.065 %

TABLA No. 1

Exactitud del método para la determinación de
ácido acetil salicílico en materia prima por-
CLAE.

mg adicionados	mg encontrados	% encontrado	% de Ac. salicílico
180	178.60	98.88	0.093
180	179.90	99.94	0.093
180	181.20	100.60	0.093
180	178.80	99.33	0.121
180	181.23	100.68	0.121
180	180.01	100.00	0.121
200	198.23	99.16	0.111
200	198.00	99.00	0.111
200	196.60	98.30	0.111
200	199.69	99.84	0.164
200	198.30	99.15	0.164
200	199.37	99.60	0.164
220	223.02	101.37	0.151
220	220.01	100.00	0.151
220	217.08	98.67	0.157
220	218.53	99.33	0.172
220	226.12	102.78	0.175
220	220.01	100.00	0.176

Reproducibilidad

A continuación en la tabla (No.2) se presentan los resultados obtenidos al efectuar 36 recobros del ácido acetyl salicílico como materia prima, en dos diferentes días, con dos analistas y a tres concentraciones diferentes, así mismo se presenta el porcentaje de ácido salicílico libre encontrado.

Parametros estadísticos obtenidos:

\bar{X}	= 99.870
S	= 0.9213
Sx	= 0.149
Lr.95%	= 0.302
LSC	= 100.173
LIC	= 99.568
CV	= 0.922 %

TABLA No. 2

Reproducibilidad del método para la
determinación de ácido acetil salic-
fílico y ácido salicílico libre en
materia prima por CLAE. *

mg adicionados	mg encontrados	% encontrado	% Ac. salicílico
180	180.01	100.00	0.120
180	177.61	98.67	0.123
180	179.96	99.94	0.125
180	182.47	101.37	0.132
180	181.44	100.80	0.138
180	177.61	98.67	0.140
200	198.33	99.86	0.135
200	198.00	99.00	0.136
200	200.71	100.35	0.138
200	196.99	98.50	0.162
200	199.35	99.67	0.164
200	199.47	99.73	0.168
220	222.08	101.30	0.146
220	220.01	100.03	0.149
220	223.02	101.37	0.151
220	220.01	100.00	0.163
220	217.07	98.67	0.166
220	220.01	100.00	0.188

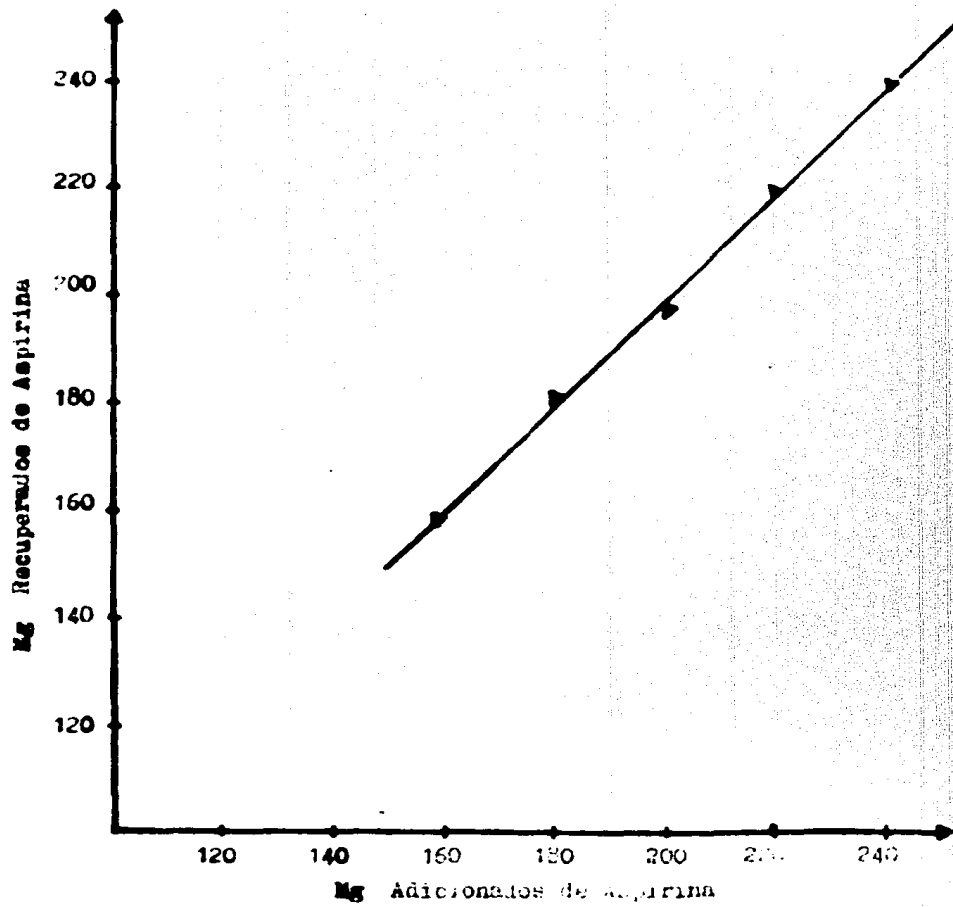
* Ofc 1

(anexo) TABLA No. 2

Reproducibilidad del método para la cuantificación de ácido acetil salicílico y-ácido salicílico libre en materia prima-
por CLAE.*

mg adicionados	mg encontrados	% encontrado	% Ac. salicílico
180	177.61	98.67	0.118
180	180.01	100.00	0.118
180	177.61	98.67	0.118
180	180.01	100.00	0.121
180	182.47	101.37	0.122
180	180.01	100.00	0.122
200	199.00	99.50	0.136
200	200.41	100.20	0.140
200	198.33	99.16	0.155
200	202.84	101.42	0.162
200	201.43	100.71	0.166
200	198.00	99.00	0.169
220	220.01	100.00	0.147
220	217.08	98.67	0.149
220	220.01	100.00	0.160
220	223.02	101.37	0.166
220	220.01	100.00	0.168
220	217.08	98.67	0.168

* Df = 2



Química, 2001, 1

Linearidad del método para la determinación simultánea de ácido acetil salicílico y ácido salicílico libre en materia prima por CLAE.

Con el objeto de determinar si la relación entre los mg agregados y los mg recuperados es lineal, se analizaron muestras de ácido acetil salicílico (materia prima) en un intervalo de concentraciones correspondientes a 80 %, 90 %, 100 %, 110% y 120 % respectivamente.

Los resultados se muestran en la tabla (No.3) y el gráfico (No.1).

Parametros estadísticos obtenidos:

(mg)	($\bar{m}g$)	(%)
adicionados	encontrados	encontrado
160	159.03	99.50
180	180.03	100.01
200	197.76	98.88
220	219.71	99.87
240	238.42	99.34

$$r = 0.999$$

$$m = 0.990$$

$$b = 0.215$$

$$S_{y/x} = 0.1077$$

TABLA No. 3
 Linealidad del método para la deter-
 minación de ácido acetil salicílico
 materia prima por CLAE.

mg adicionados	mg encontrados	% encontrado	% Ac.salicílico
160	157.78	98.61	0.135
160	162.20	101.37	0.138
160	160.01	100.00	0.140
160	156.83	98.02	0.144
180	180.01	100.00	0.152
180	180.03	100.02	0.155
180	177.61	98.67	0.156
180	182.47	101.32	0.158
200	196.02	98.01	0.148
200	198.00	99.00	0.152
200	200.71	100.35	0.154
200	196.32	98.32	0.154
220	223.02	101.00	0.152
220	220.01	100.00	0.155
220	218.76	99.45	0.166
220	217.08	98.07	0.169
240	240.01	100.00	0.176
240	236.81	98.67	0.178
240	240.01	100.00	0.180
240	236.88	98.70	0.192

Limite de detección

Con el objeto de cuantificar la mínima cantidad detectable de los compuestos, por el método propuesto en CLAE, se determinó haciendo análisis de cantidades de muestra, aumentando la concentración a intervalos pequeños, hasta llegar a un porcentaje donde el método es lineal. Las concentraciones fueron las siguientes; 0%, 1%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20% y 25% de ácido acetil salicílico y ácido salicílico libre respectivamente.

Los resultados se muestran en la tabla No. (4) y los graficos No. (2) y (3).

Cantidad mínima detectable de ácido acetil salicílico por el método propuesto		Cantidad mínima detectable de ácido salicílico libre- por el método propuesto	
---	--	---	--

mcg	%	mcg	%
50	2.5	1.3	0.075

TABLA No. 4
 limite de detección

concentración (mcg)*	respuesta (h)cm	concentración (mcg)**	respuesta (h)cm
1000	12.25	12.00	2.20
500	6.10	8.00	1.60
400	5.00	7.00	1.13
300	4.00	6.00	1.10
200	2.30	5.00	0.90
100	1.50	4.00	0.80
60	0.90	3.00	0.60
20	0.30	2.00	0.30
0	0.00	0.00	0.00

* Acido acetil salicilico

$$r = 0.999$$

$$m = 0.012$$

$$b = 0.140$$

$$S_{y/x} = 1.587$$

** Acido salicilico

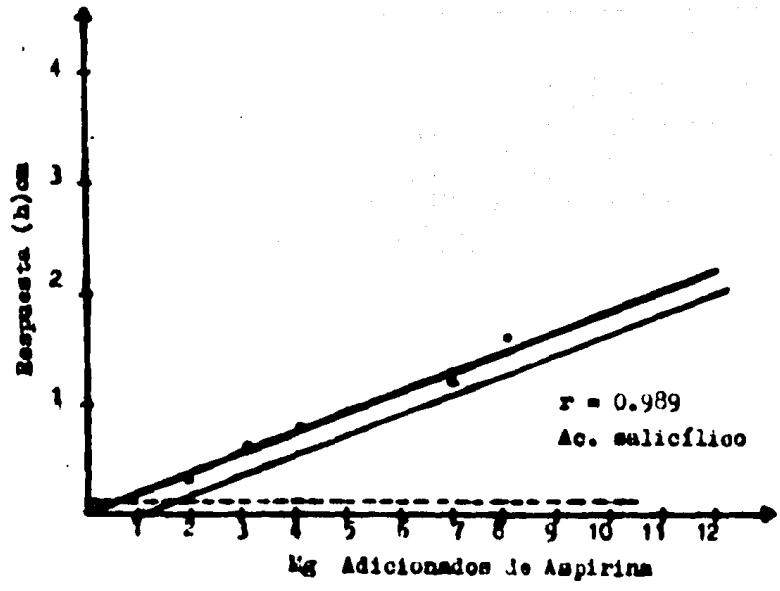
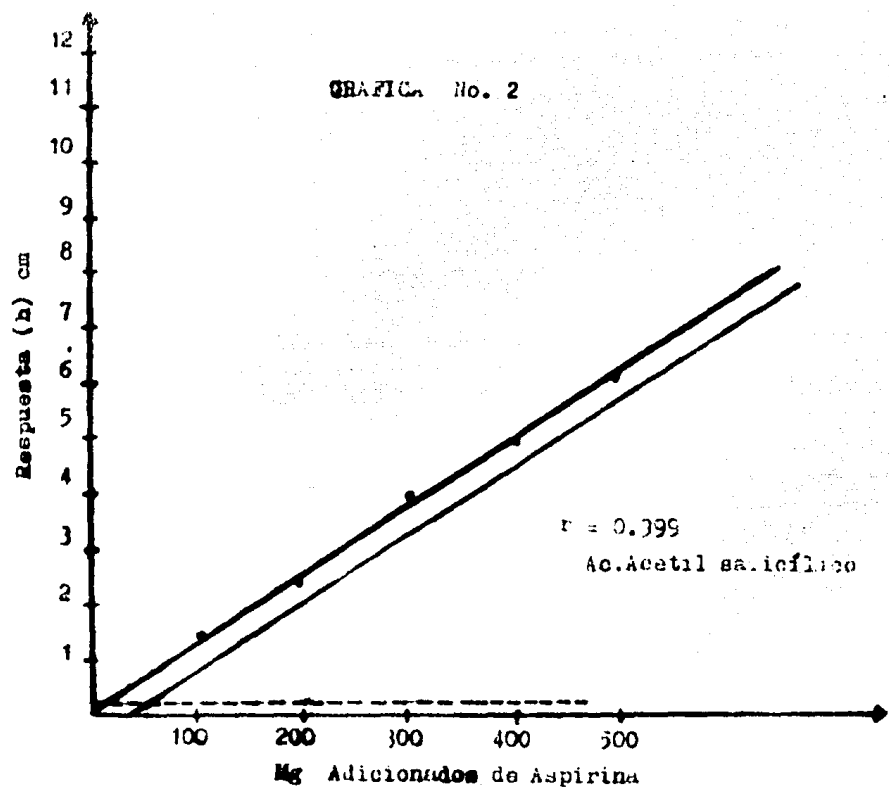
$$r = 0.989$$

$$m = 0.184$$

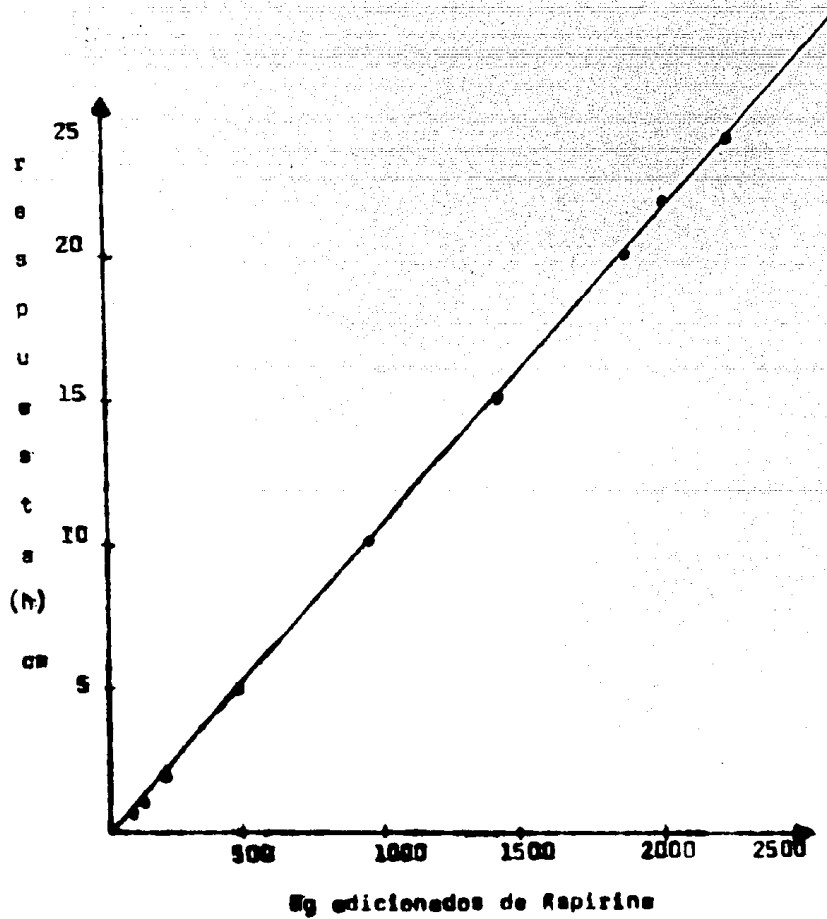
$$b = 0.007$$

$$S_{y/x} = 0.242$$

GRAFICO No. 2

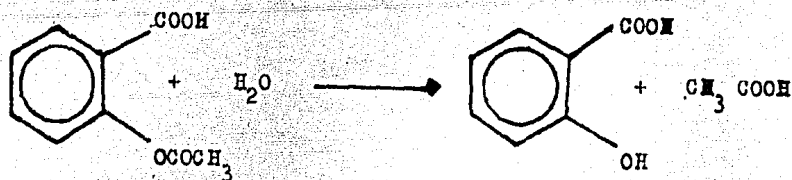


GRAFICA No. 3



Especificidad-Interferencias del método
para la determinación de ácido acetil -
salicílico como materia prima por CLAE.

La descomposición del ácido acetil salicílico es el resultado de la hidrólisis del grupo éster, siendo los productos resultantes el ácido acético y el ácido salicílico. La reacción - simplificada para representar la descomposición del ácido acetil salicílico es :



Estudios anteriores sobre el ácido acetil salicílico, han demostrado que es estable cuando se almacena en una atmósfera anhidra y a temperatura ambiente, pero se ha observado que a una atmósfera humedad y a temperaturas alrededor de los 100°C sufre degradaciones de tipo pirolítico o de hidrólisis siendo estas últimas las más frecuentes. (16).

Aquellos investigadores que han hecho un amplio estudio acerca de la hidrólisis de este fármaco, bajo condiciones establecidas, han reportado que la reacción es muy compleja.

Yamamoto y Takahashi reportaron que a una temperatura elevada y aun a baja humedad, la aspirina sufría hidrólisis (26).

Para demostrar la especificidad del método por cromatografía de líquidos de alta eficiencia, se expuso el ácido acético salicílico bajo condiciones que aceleraban la descomposición química y física de este. El procedimiento consistió en exponer muestras del principio activo en frascos cerrados y a una temperatura de 110°C durante 15 días, para así forzar la descomposición del ácido acético salicílico.

Las muestras degradadas se analizaron por el método propuesto, ahora bien para comprobar que bajo el principio activo no existiera ningún producto de degradación que interfiriera, se analizaron las muestras a tres longitudes de onda diferentes, ya que alguno de los productos de degradación, puede absorber a otra longitud de onda, así mismo se llevó a cabo una linealidad de tres puntos a las concentraciones de 80%, 100% y 120% en cada una de las longitudes de onda, calculando el coeficiente de correlación para cada una de ellas, y se graficó la cantidad adicionada contra la respuesta analítica medida.

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas No.5, No. 6 y No. 7 respectivamente.

Así mismo los cromatogramas obtenidos se muestran en las figuras No.9, No.10, No.11 y No.12.

TABLA No. 5

Esopecificidad del método para la determinación de ácido acetil salicílico por - CLAE a las longitudes de onda de 313 nm- 280nm y 254nm.

313nm

(mg)	respuesta (h)cm	respuesta (h) cm
adicionados	ácido acetil salicílico	ácido salicílico
160	8.70	0.70
200	11.4	1.00
240	12.00	1.40

280nm

160	5.10	6.80
200	6.20	7.50
240	6.90	8.50

254nm

160	5.20	4.20
200	6.20	7.00
240	6.80	9.30

TABELA No. 6

Acido acetil salicilico y ácido salicilico libre, encontrados en porciento por cromatografía de líquidos de alta eficiencia en la materia prima colocada en condiciones aceleradas de estabilidad.

313nm

(mq)	(mq)	(%)*	(%)**
adicionados	encontrados	encontrados	Ac. salicilico
160	5.70	3.56	3.01
200	9.00	4.50	3.12
240	13.44	5.60	2.77

280nm

160	41.00	25.62	2.32
200	65.33	32.66	2.05
240	106.36	44.32	2.05

254nm

160	42.36	26.49	1.45
200	62.31	31.15	1.91
240	83.13	34.62	2.15

TABLA No. 7

Coefficientes de correlación (r) obtenidos al graficar los mg adicionados contra la respuesta analítica medida del ácido acetyl salicílico como materia prima por el método propuesto en cromatografía de líquidos de alta eficiencia para la especificidad del método.

Longitud de onda (λ)	ácido acetyl salicílico (r)	ác. salicílico (r)
313 nm	1.00	0.996
280 nm	0.991	0.994
254 nm	0.989	0.998

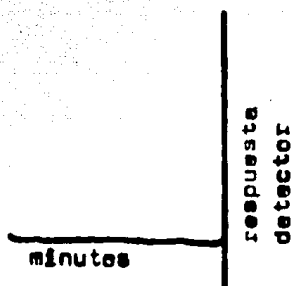


FIGURA No. 9

Blanco : Cromatograma que muestra el pico producido por el
alimento.

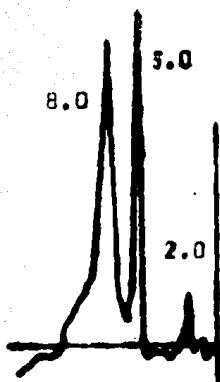


FIGURA No. 10

Cromatograma obtenido para la muestra de ácido acetil salicílico sometida a condiciones de estabilidad acelerada durante 15 días a 110°C , y analizada a una longitud de onda-

Compuesto	T_R (min)	Respuesta medida (h) (cm)
A Acido salicílico	8.0	7.8
B Acido acetil salicílico	6.0	6.2
C Compuesto (C)	2.0	0.9

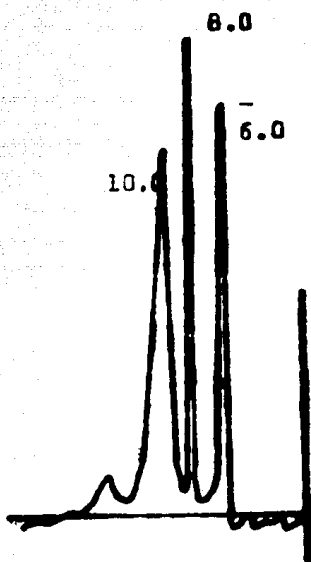


FIGURA No. 11

Cromatograma obtenido para una muestra de ácido acetil salicílico sometida a condiciones de estabilidad acelerada durante 15 días a 110°C, y analizada a una longitud de onda de 280 nm

Compuesto	T _R (min)	Respuesta medida (h) (cm)
A Acido salicílico	8.0	7.50
B Acido acetil salicílico	6.0	6.20
C Compuesto (C)	10.0	5.50

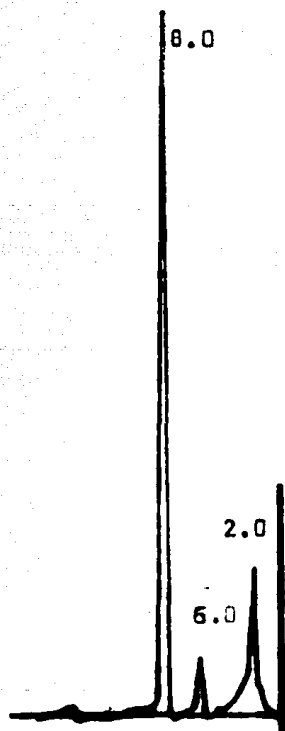


FIGURA No. 12

Cromatograma obtenido para una muestra de ácido acetil salicílico sometida a condiciones de estabilidad acelerada durante 15 días a 110°C, y analizada a una longitud de onda de 313 nm.

Compuesto	T _R (min)	Respuesta medida (h) (cm)
A Acido salicílico	8.0	11.40
B Acido acetil salicílico	6.0	1.00
C Compuesto (C)	2.0	2.40

CAPITULO IV

DISCUSION DE RESULTADOS

Se desarrollo un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase inversa, para la cuantificación simultanea de ácido acetil salicílico y ácido salicílico-libre en materia prima.

La técnica analítica desarrollada se validó estadísticamente con la finalidad de conocer su confiabilidad, evaluando así los parametros estadísticos; exactitud, precisión, linealidad; limite de detección y especificidad.

La precisión se evaluó como reproducibilidad, debido a que se trabajo el método con dos analistas y en dos días diferentes, los parametros estadísticos que se evaluarón fuerón; la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV%) y el intervalo de confianza al 95 % de probabilidad (IC_{95%}).

Los valores de los parametros estadísticos correspondientes a las tablas (I) y (II), nos indican el método desarrollado para cuantificar simultaneamente el ácido acetil salicílico y el ácido salicílico libre en materia prima, muestran resultados confiables a las concentraciones trabajadas, por lo que el método es exacto y preciso.

TABLA I

Comparación de los parámetros estadísticos obtenidos por cromatografía de líquidos de alta eficiencia, con respecto a criterios establecidos

Exactitud

Parámetros estadísticos	CLAE	Criterios
\bar{X}	99.812%	98%-102%
S	1.063	-
sx	0.250	-
LC _{95%}	99.812 ± 0.647	-
CV %	1.065 %	≤ 2 %

Reproducibilidad

Parámetros estadísticos	CLAE	Criterios
\bar{X}	99.870%	98%-102%
S	0.921	-
LC _{95%}	99.870 ± 0.302	-
CV%	00.922%	≤ 2%

TABLA II

Comparación estadística de la linealidad del método desarrollado en CLAE en la cuantificación simultánea de ácido acetil salicílico y ácido salicílico libre, con respecto a criterios establecidos.

Parámetros estadísticos	Linealidad	
	CLAE	Criterios
(m)	0.990	aprox = 1
(b)	0.215	aprox = 0
(r)	0.999	≥ 0.99

Para determinar la linealidad del método desarrollado en cromatografía de líquidos de alta eficiencia se evaluarán los siguientes parámetros estadísticos; pendiente (m), intercepto al origen (b), error estándar de regresión (Sy/x) y el coeficiente de correlación (r). Como se puede observar en la gráfica No. 1, y en la tabla No. 3, se obtiene una pendiente con un valor cercano a 1, el intercepto al origen con un valor cercano a 0 y un coeficiente de correlación cercano a 1, lo cual nos demuestra que la respuesta entre los mg adicionados y los mg encontrados es lineal en el intervalo de concentraciones trabajadas.

Para determinar la mínima cantidad detectable del compuesto por el método desarrollado, se determinarán los límites de confianza de la recta de regresión ($y = \bar{y} \pm 1.96 Sy/x$) y se trazo una recta paralela a la recta de regresión a una distancia de $-1.96 Sy/x$ con respecto al valor de \bar{y} , esta recta es el límite inferior de confianza cuyo intercepto con la señal dada por el ruido del aparato nos indica el límite inferior de detección, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4 y la gráfica No. 2.

Los resultados obtenidos para demostrar la especificidad en interferencias para el método desarrollado, se muestran en las tablas 5, 6 y 7, y en las graficas 9, 10, 11 y 12. Como se observa en la tabla No.6 la relación de porcentajes obtenidos y analizados a 313 nm, el porcentaje encontrado de ácido acetil salicílico fue de 4.5% y del ácido salicílico libre fue de 3.12%, en la figura No.12, se observa un producto de degradación que tiene un tiempo de retención de 2.0 minutos, lo cual indica que la aspirina bajo condiciones de estabilidad acelerada establecidas, se degrada casi por completo, dando un alto porcentaje de ácido salicílico libre y un producto de degradación "C", el cual no interfiere en los tiempos de retención de nuestro método desarrollado.

Para la longitud de onda de 280 nm, con respecto a la relación de porcentajes obtenidos, observamos que a esta longitud hay mayor absorbancia del ácido acetil salicílico con un porcentaje de 32.6% y un 2.05% de ácido salicílico libre, así mismo en la figura No.11 observamos un producto de degradación con un tiempo de retención de 10 minutos, pero no interfiere en los tiempos de retención de nuestro método propuesto.

Para la longitud de onda de 254 nm, aqui tambien se observa - que a esta longitud hay una mayor absorbancia del ácido acetil salicílico encontrando un porcentaje de 31.15% y un 1.91% de ácido salicílico, asi mismo en la grafica No.10 se observa un producto de degradación "C" con un tiempo de retención de 2.0 minutos el cual tampoco interfiere en los tiempos de retención de nuestro método desarrollado.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

- Al evaluar estadísticamente los resultados obtenidos para el método desarrollado, se demuestra que es; exacto, preciso y lineal en el intervalo de concentraciones trabajados.
- Se demostró que el método desarrollado es específico para cuantificar el ácido acetil salicílico y su producto de degradación (ácido salicílico libre).
- Se considera que el método desarrollado en cromatografía de líquidos de alta eficiencia no es válido a una concentración menor de 2.5 % para el ácido acetil salicílico y de 0.075 % para el ácido salicílico libre, bajo las condiciones de trabajo establecidas para este método.
- Se demuestra también que el trabajo desarrollado nos proporciona un método analítico rápido, efectivo y confiable para cuantificar simultáneamente el ácido acetil salicílico y el ácido salicílico libre, para ser utilizado en el control de preparados farmacéuticos y fármacos.

- Por otra parte se considerará que el método desarrollado en cromatografía de líquidos de alta eficiencia, es un método cromatográfico que nos ofrece grandes ventajas con respecto a las técnicas oficiales que marca la NSP XX, ya que se logró cuantificar simultáneamente el ácido acetil salicílico y el ácido salicílico libre en materia prima, así mismo otras ventajas importantes fueron las siguientes; El tiempo de análisis es muy corto (6 minutos para el ácido acetil salicílico) y (8 minutos para el ácido salicílico), el material de laboratorio y reactivos utilizados fueron mínimos.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Alan. K. Done. Tribuna Medica, Vol,I p-22-26 (1979)
- 2.- Asociación Farmacéutica Mexicana
Curso teórico práctico de espectroscopía y validación de técnicas, impartido por la AFM, 31 Agosto-11 Sep 1981
- 3.- Banes D.
Principles of regulatory drug analysis. A.O.A.C. (1966).
- 4.- British Pharmacopeia, 19 Ed, p-776,1085. (1980).
- 5.- Carrillo S.R.
Método práctico de espectroscopía y validación de métodos analíticos, impartido por el director de control de calidad de Sheramex.
- 6.- Clarke E.G.
Isolation and, identifications of drug. p-202 London 1969.
- 7.- Connors K.A.
Curso de analisis farmacéutico
Fdit. Reverté, Barcelona, 2ª Ed, p-403-460 (1980)
- 8.- F.N.E.U.M. 4a Ed, p-455-460 (1974)
- 9.- Gerhard Levy
Pharmacokinetics of salicylate elimination in man
Journal of pharmaceutical science
Vol,54, No. 7, July 1965 p-957-967

- 10.- Gold and Campbel
Solid state stability of aspirin the presence of
excipients. J. pharm. sci. 71.p-1096, (1982)
- 11.- Hamilton & Sewell
Introduction to high performance liquid chromatography
1^a Ed, Chapman and Hall. London. p-136. (1977)
- 12.- Harold M.
Cromatografía de líquidos de alta presión
Blacksburg, Virginia.USA. p-1-40 (1973)
- 13.- Index Merck 10^a Ed, N.J. USA
- 14.- ICS (SSA)
Repetibilidad y reproducibilidad de un método analítico
4259, (1979)
- 15.- Juhl W.E. & Kircheffer R.D.
Semiautomated determination of aspirin in bulk and tablet
formulations and salicylic in tablet formulations
J. pharm. sci. 69,p-548-550 (1980)
- 16.- Kirchnoffer Ross D.
Simultaneous determination of aspirin and salicylic acid
in bulk aspirin and plain, buffered and enteric-coated-
tablets by high pressure liquid chromatography with UV-
and fluorescence detections
J.pharm.sci. 69,p-1186-1190 (1980)

- 17.- Kircland J
Modern practice of liquid chromatography
Wiley-Interscience. N.York. p-363-371 (1971)
- 18.- Leeson L.S. and Matlocks A.M.
J. Am. pharm. assoc. sci. Ed 47, p-329 (1958)
- 19.- Louis S. Goodman. Alfred Gilman
Bases farmacológicas de la terapéutica
Ed, panamericana 6^a Ed, méx. D.F. p-256-257.
- 20.- Pharmacopelial Forum
Stimulate the process, Report of the PMA quality control
section committee on pressurized liquid chromatography
mar-apr.p-2789 (1963).
- 21.- Roberto Leon
Cromatografía de líquidos. Milton leon company st peter
burg Florida USA. 1^a Ed, p-1-99. (1982).
- 22.- Syntex S.A.
Método practico para la validación de métodos analíticos
- 23.- The Pharmaceutical Codex Medicin
London the pharmaceutical press p-65-66. 1979.
- 24.- USP XIX p-38-39. 1975 USA
- 25.- USP XX p-716,1005. 1980 USA
- 26.- Weber J.D. y Levine J.
Determination of free salicylic acid and aspirin in pro
duct. J. pharm.sci.55,p-78-81, (1966)