

35
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

DESARROLLO DE DOS METODOS ANALITICOS
PARA LA DETERMINACION DE ASPIRINA EN
PRUEBAS DE DISOLUCION Y ESTABILIDAD
ACELERADA EN DOS POLIFARMACOS DE
USO ORAL

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

ESTEBAN QUINTANAR GARCIA



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1991



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.

C O N T E N I D O

	Página
INTRODUCCION	1
I.- FUNDAMENTACION DEL TEMA	2
II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
III.- OBJETIVOS	4
IV.- HIPOTESIS DE TRABAJO	5
V.- GENERALIDADES	
1. Disolución	6
2. Espectrofotometría ultra-violeta	9
3. Cromatografía de Gases	15
4. Validación	31
5. Especificidad en Estabilidad	31
6. Monografía del Acido Acetil Salicílico	32
VI.- PARTE EXPERIMENTAL	
1. Desarrollo y Validación del Método Analítico por Espectrofotometría	38
2. Desarrollo y Validación del Método Analítico por Cromatografía de Gases	44
VII.- RESULTADOS	48
VIII.- DISCUSION DE RESULTADOS	77
IX.- CONCLUSIONES	80
X.- BIBLIOGRAFIA	81
XI.- ANEXOS	85

INTRODUCCION.

La forma farmacéutica en la cual el producto se presenta puede afectar la acción farmacológica del mismo; el comienzo, la intensidad y la duración de la respuesta terapéutica están sujetos a grandes variaciones dependiendo de muchos factores, siendo uno de los principales la formulación. Dicha formulación puede ser una mezcla heterogénea compleja conteniendo una selección de derivados químicos semejantes en forma física al fármaco de manera que garantice la seguridad clínica, eficacia terapéutica, estabilidad y elegancia. Los estudios farmacéuticos van dirigidos al aseguramiento de la estabilidad y biodisponibilidad del fármaco para lo cual es necesario contar con una medida analítica cuantitativa confiable que nos indique la degradación y la liberación alcanzada de los principios activos. Para que estos métodos sean confiables, deben cumplir con los requisitos de linealidad, precisión, exactitud y especificidad.

I.- Fundamentación del Tema.

En la práctica es raro que el ácido acetil salicílico sea administrado como un compuesto puro. El ácido acetil salicílico es administrado en algunas clases de formulaciones, tales como soluciones o mezclas heterogéneas complejas, conteniendo una selección de derivados químicos semejantes en forma física al fármaco al mismo tiempo con excipientes, disolventes estabilizantes, preservativos y/o una unidad de otros componentes. Estas mezclas son determinadas por la composición y naturaleza de la forma de dosificación así como de las propiedades del fármaco esto ha venido a dar un impulso en la industria Farmacéutica para el desarrollo de métodos y técnicas analíticas, que nos permiten establecer la cuantificación del ácido acetil salicílico, sin la interferencia de los demás componentes de la forma farmacéutica. Dentro de estos métodos se deben considerar aquellos que nos indiquen, como se va a comportar el ácido acetil salicílico a través del tiempo ya sea a corto o a largo plazo.

Algunos años atrás se pensaba que si el fármaco se encontraba presente en la cantidad correcta y en forma pura, la preparación resultante debería de ser efectiva. Sin embargo se ha ido acumulando mucha evidencia, que demuestra que la forma farmacéutica en la cual el principio activo se presenta, puede afectar la acción farmacológica del mismo.

De lo anterior se deriva la necesidad de contar con un método indicador de estabilidad para la cuantificación del ácido acetil salicílico, así como su determinación en pruebas de disolución de manera precisa, exacta y confiable.

II.- Planteamiento del problema.

El ester aromático del ácido acetil salicílico es un buen grupo donador relativamente inestable bajo hidrólisis y otras influencias acíclicas. Estas especies sufren por lo regular de catálisis intramolecular. Siendo este fenómeno el responsable de la inestabilidad hidrofílica del ácido acetil salicílico en formulaciones farmacéuticas.

En general el ácido acetil salicílico se altera por contacto con agua, sustancias básicas y nucleofílicas. Existen varios métodos en la bibliografía para la determinación del ácido acetil salicílico, sin embargo no cualquier método se ajusta a las necesidades de los laboratorios farmacéuticos y sus formulaciones, tomando en consideración esto se tienen que buscar los métodos que satisfagan estas necesidades.

Nos encontramos que hoy en día la técnica específica de mayor uso es la cromatografía de líquidos de alta resolución ya que la mayoría de los métodos oficiales que marca la Farmacopea Nacional, son por esta técnica así como la determinación específica del ácido acetil salicílico en preparados farmacéuticos, dada la gran demanda de éste tipo de equipos existe la necesidad de buscar y desarrollar métodos específicos alternativos para la determinación del ácido acetil salicílico en pruebas de estabilidad a corto y largo plazo por lo que se piensa en un método por cromatografía de gases dadas las bondades del principio cromatográfico.

Bien por otro lado para las pruebas de disolución, dado que son pruebas de rutina se requiere de un método analítico en base acuosa, rápido y práctico por lo que se tomó el método oficial de la Farmacopea U.S.P., desarrollándolo para las necesidades de las formulaciones problema.

Siendo éste un método Espectrofotométrico en el cual se aprovecha el punto de inflexión* (isobéptico), siendo de esta manera factible cuantificar el % liberado del activo a pesar de la interferencia del ácido salicílico generado por hidrólisis acuosa.

* (Es el punto donde coexisten las curvas tanto del ácido acetil salicílico como la del ácido salicílico a $265 \text{ nm} \pm 2$).

III.- Objetivos.

1. Desarrollar los métodos espectrofotométrico-UV y cromatográfico de gases, para cuantificar el ácido acetil salicílico en dos formulaciones que contienen codeína y oxicodona respectivamente para pruebas de disolución y estabilidad a corto y largo plazo.

2. Evaluar la linealidad, precisión, exactitud y reproducibilidad de los métodos, así como la especificidad del método por cromatografía de gases.

IV.- Hipótesis de trabajo.

Se espera obtener dos métodos para la cuantificación del ácido acetil salicílico en pruebas de diolución y estabilidad, esperando que los dos métodos sean lineales, precisos, exactos y reproducibles, además que el método por cromatografía de gases sea específico.

V. GENERALIDADES

1. Disolución.

Las formas farmacéuticas sólidas siguen teniendo una gran aceptación gracias a su facilidad de manejo y dosificación. Como parte integral de un programa de desarrollo de formas sólidas se debe de introducir la prueba de disolución " in vitro"; ya que la disolución es la etapa que antecede a la absorción, podemos decir que la disolución afecta el inicio, la intensidad, y duración de la respuesta terapéutica. (2)

En la figura 1 se muestra la secuencia de eventos involucrados en la disolución y absorción de un fármaco contenido en una forma sólida de dosificación.

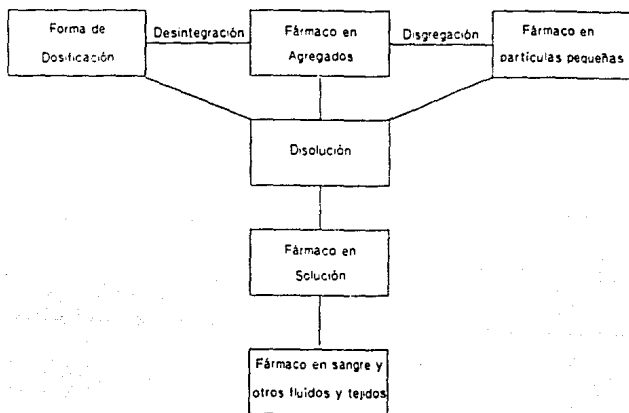


FIGURA 1

Disolución es el paso de un sólido a solución, lo cual involucra como factor principal la velocidad de disolución del fármaco.

La velocidad de disolución se expresa por medio de la relación dada por Noyes-Withney: (2), (3), (27), (28)

$$\frac{dc}{dt} = KS (C_s - C)$$

en donde:

$\frac{dc}{dt}$ = Velocidad de disolución
K = $\frac{D}{H}$ = constante
D = Coeficiente de difusión del fármaco
C_s = Solubilidad del Fármaco en el medio.
H = Grosor de la capa de difusión.
C = Concentración del fármaco al tiempo t.

Además de la velocidad de disolución los factores que pueden afectar la disolución son:

1. Factores inherentes al método y medio de disolución: (3), (8)

Intensidad de agitación
Velocidad y tipo de flujo
Factores geométricos del equipo de disolución
Gradiente de concentración
Composición del medio de disolución, pH, fuerza iónica, viscosidad, tensión superficial, etc.

2. Factores relacionados a las propiedades fisicoquímicas del fármaco: (2), (3), (8), (29)

Polimorfismo
Estado amorfo
Solvatación
Forma libre (ácido, sal o base)
Tamaño y forma de partícula
pK (grado de ionización)

3. Factores que afectan el área superficial disponible para la disolución: (30)

Variables de manufactura de materia prima. (2), (3)

4. Factores relacionados a la formulación y al proceso de manufactura : (1), (5), (6), (8)

Cantidad y tipo de excipientes empleados (diluentes, desintegrantes, aglutinantes, lubricantes, tensoactivos, etc.) (2), (3), (.6)
Método de incorporación del fármaco y los excipientes
Formación de complejos
Tipo y velocidad de compresión
Tamaño de partícula o del gránulo y su distribución

5. Factores del medio ambiente involucrados con la forma farmacéutica:

Humedad durante la manufactura
Condiciones de almacenamiento (temperatura, humedad, luz, contenedores primarios, edad de la forma farmacéutica)

Cabe aclarar que la prueba de disolución provee únicamente de información sobre la liberación del fármaco sólo bajo condiciones fisiológicas donde la absorción del fármaco "in vivo" es cinéticamente controlada por la disolución, de otra manera esta información no es válida.

El ácido acetyl salicílico se absorbe más rápidamente en el estómago que en el intestino, sin embargo en la práctica no sucede así, puesto que dada la permanencia relativamente corta en el estómago y la gran superficie del intestino delgado, la absorción del ácido acetyl salicílico se produce - mayoritariamente a nivel de intestino (Fig.2). (24)



FIGURA 2

2. Espectrofotometría ultra-violeta.

La región ultravioleta visible comprende radiaciones que van desde 100 a 800 nm, dividiéndose en ultravioleta lejano o al vacío, de 100 a 200 nm, ultravioleta cercano de 200 a 400 nm y el visible entre 400 y 800 nm. (13)

La cantidad de energía entre niveles electrónicos es grande, lo que provoca transiciones del nivel basal electrónico al primer nivel excitado electrónico, ésto da lugar a la aparición de bandas de absorción. (12), (13)

Los espectros de absorción en el ultravioleta-visible se presentan como curvas de absorción (unidades de absorción $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ vs unidades de longitud de onda nm ó Å). Por lo general se reporta en base a la longitud de onda donde ocurre la máxima absorción (γ máxima) y el coeficiente de máxima extinción (E máxima).

Beer postuló que la reducción de energía radiante de un haz de radiación monocromática era proporcional a la intensidad o potencial del haz y a la cantidad de sustancia absorbente situada en su trayectoria; sus hipótesis condujeron directamente a la formulación de la Ley de Beer.

$$A = Ebc$$

Esta ecuación es la ley fundamental que rige la absorción de todos los tipos de radiación electromagnética; se aplica a soluciones, gases y sólidos. Se conoce también como la Ley de Lambert y Beer donde:

- A = Absorbancia
- E = Absortividad molar
- b = Longitud de la celda
- c = Concentración

Esta ecuación también indica que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración de especies absorbente cuando la longitud de la trayectoria luminosa es fija. (12)

Si tenemos una mezcla de compuestos que absorben a diferentes longitudes de onda, puede ser analizada midiendo la absorción de la mezcla a diferentes longitudes de onda.

Suponiendo que los compuestos absorben de manera independiente y que se conoce el coeficiente de extinción "E" del componente puro a longitud de onda medida, la absorbancia de cada λ estará dada por:

$$A = (E_1 C_1 + E_2 C_2 + \dots)l$$

- E = Coeficiente de extinción de la longitud de onda máxima.
- C = Concentraciones correspondientes.

Cuando se toma en cuenta el punto*isobéstico de una mezcla binaria, de tal manera que se pueda medir la "E".

$$A' = E C + E C \dots\dots a' \dots\dots (1)$$

$$A'' = E C + E C \dots\dots a'' \dots\dots (2)$$

$$A' = E C + E C \dots\dots (3)$$

$$A'' = E C + E C$$

Si la γ se escoge de tal manera que sea el punto isobéstico se tiene que:

$$E' = E'' = E \text{ la cual reduce a:}$$

$$A' = E' C + E' C$$

$$A'' = E'' C + E'' C$$

Tenemos una mezcla de 2 sustancias (en un solvente transparente), el espectro de los cuales absorbe la luz, el espectro de absorción de los dos componentes es diferente a longitudes de onda en las cuales cada sustancia absorbe luz con interferencia de la otra. En el caso más general, las sustancias que absorben a la misma longitud de onda pero que sus espectros de absorción son marcadamente diferentes, se pueden analizar en una mezcla.

Es necesario primordialmente, determinar el espectro de absorción de los componentes puros, Estos espectros son comparados por conversión de los valores de absorción a una base común como absorptividad molar y superposición del espectro. Dos longitudes de onda analíticas son seleccionadas para cada uno de ellos como máxima en su diferencia de absorción. El siguiente paso en el análisis es llevar a las gráficas la Ley de Beer, usando soluciones de compuestos puros para cada componente a cada una de las longitudes de onda. Estos dan cuatro gráficas que siguen a la Ley de Beer de las cuales calcularemos cuatro absorptividades simbolizadas por

P	P	Q	Q	A = Absorbancias
A ₁	A ₂	A ₁	A ₂	donde Q, P = Compuestos
1	2	1	2	1, 2 = longitud de onda

* (Es el punto donde coexisten las curvas de absorción de dos compuestos a una longitud de onda determinada)

La absorbancia de la solución es leída a la longitud de onda 1 y 2. Esto asume que la absorbancia de una mezcla es igual a la suma de las absorbancias de los componentes de la misma. Por lo tanto, A_1 y A_2 son las absorbancias de la longitud de onda 1 y 2

por lo tanto:

$$A_1 = A_{1P} + A_{1Q} \dots (1)$$

$$A_2 = A_{2P} bc + A_{2Q} bc \dots (3)$$

$$A_2 = A_{2P} bc + A_{2Q} bc \dots (4)$$

Las dos relaciones anteriores son independientes para C_P y C_Q por lo que las ecuaciones pueden ser resueltas para C_P y C_Q así:

$$C_P = \frac{A_{2Q} A_{1P} - A_{1Q} A_{2P}}{b (A'_{1P} A'_{2Q} - A'_{2P} A'_{1Q})}$$

$$C_Q = \frac{A_{1P} A_{2Q} - A_{2P} A_{1Q}}{b (A'_{1P} A'_{2Q} - A'_{2P} A'_{1Q})}$$

Cuando se trata de un sistema no ideal, no sigue la Ley de Beer, entonces es más conveniente hacer gráficas y medir las absorbancias de igual forma a la anterior y calcular las concentraciones por las gráficas, ya que matemáticamente se complica demasiado o se puede tratar de resolver el problema en un margen de concentración donde se cumpla la Ley de Beer. (16)

Los errores más comunes que se pueden presentar son:

- El uso de solventes que absorban en una amplia región del espectro, como el benceno.
- Usar soluciones concentradas, el error por grosor de celda en este caso disminuye a bajas concentraciones.
- El mal manejo de la presión cuando se usan gases, así como el manejo de la ventana por donde pasa la luz (SLIT).
- Leer absorbancias fuera del pico de absorbancia recomendado.
- Los errores por la muestra recaen en que no cumpla con la Ley de Beer y no haya relación entre E y C.
- Los errores por el equipo son por pérdida de luz, que se tiene en aparatos con doble monocromador y es mayor a mayor absorbancia de la muestra. Esta pérdida de luz se incrementa por dispersiones en cualquier superficie por partículas de polvo o rayado, las soluciones turbias también pueden producir dispersiones siendo muy notables a longitudes de onda pequeñas. (12), (13)

EQUIPO: (13)

Los instrumentos que miden absorbancias de soluciones contienen 5 componentes básicos: (Fig. 3).

- 1) Fuente estable de energía radiante que puede variar de intensidad.
- 2) Control de longitud de onda.
- 3) Recipientes para muestras y disolventes.
- 4) Detector de radiación o transductor que convierte la energía radiante en señal medible.
- 5) Graficador o indicador de señal.



Figura 3

1) Fuentes de radiación : Deben cumplir ciertos requisitos: Primero, deben generar un haz con la suficiente potencia para fácil detección y medición. Segundo, la fuente debe proporcionar radiación continua; es decir, su espectro debe contener todas las longitudes de onda de la región en que va a ser usada. Finalmente, la fuente debe ser estable, a variaciones de radiación.

Fuentes de radiación visible: Lámparas de Tungsteno.

Fuentes de radiación ultravioleta: Lámparas de hidrógeno, lámparas de deuterio.

2) Control de longitud de onda: Para esta tenemos que la radiación que se restringe a una región limitada de longitud de onda se emplea en técnicas cuantitativas por tres razones:

- La probabilidad de adhesión del sistema absorbente a la Ley de Beer.
- Se asegura una mayor selectividad porque las sustancias que absorben en otras regiones a longitudes de onda es menos probable que interfieran.
- Se observará un mayor cambio en la absorbancia por incremento de concentración si sólo se emplean longitudes de onda que son fuertemente absorbidas.

De los distintos aparatos que producen bandas limitadas de radiación, los filtros son los más sensibles y menos costosos y son:

- Filtros de absorción
- Filtros de interferencia (13)

Los monocromadores son aparatos que descomponen la radiación en sus longitudes de onda componentes y permiten el aislamiento de cualquier porción deseada del resto del espectro y son:

- Prismas
- Rejillas

3) Recipientes para muestra: En común los elementos ópticos de los monocromadores, las celdas o cubetas que contienen las muestras deben ser de materiales que dejen pasar radiación en la región espectral que interesa. Así se requieren celdas de cuarzo o sílice fundido, se ha encontrado también aplicación a recipientes de plástico en la región visible.

- 4) Detectores: Para que éstos sean útiles deben responder
- Energía radiante en una amplia longitud de onda
 - Sensibles a bajos niveles de potencia radiante
 - Responder rápidamente a la radiación
 - Producir una señal eléctrica que pueda ser ampliificada fácilmente y tener un nivel de ruido relativamente bajo.
 - La señal producida debe ser a la potencia del haz
- 5) Graficador: Estos pueden ser de lectura directa o de indicador nulo. (13)

3. Cromatografía de Gases.

La Cromatografía de Gases fué desarrollada por James Martin en 1952, en ella la fase móvil es un gas y la fase estacionaria puede ser un sólido (Cromatografía gas-sólido) ó un líquido (Cromatografía gas-líquido). La primera es una cromatografía de adsorción de uso poco común y se limita a sustancias poco volátiles de bajo peso molecular, la cual ha tenido limitantes debido a picos toleados, dificultad en la reproducibilidad de área superficial y retención semipermanente de los gases activos sobre la superficie sólida. La Cromatografía gas-líquido se basa en una separación por partición, de una muestra entre una fase gaseosa móvil y una capa delgada de un líquido no volátil, sostenido sobre un soporte sólido; ésta es una de las técnicas más aceptadas para análisis cuantitativos. Los tipos de cromatografía se muestran en la Fig.4.

La cromatografía de gases, se utiliza como criterio de pureza para componentes orgánicos. Si hay contaminantes presentes, serán revelados por la aparición de más picos y el área de éstos dará una idea de su concentración. El análisis cuantitativo puede basarse en las alturas ó en las áreas de los picos de los cromatogramas, siendo las alturas menos satisfactorias por lo general, ya que dependen de un mayor número de variables experimentales.

La velocidad de flujo es particularmente crítica, por lo que los picos tienden a ensancharse y a hacerse más pequeños al aumentar el tiempo de residencia del soluto en la columna. Además, la altura de los picos se ve afectada por la temperatura de la columna, la porosidad del empaque y la longitud de la columna. Pese a esto, la altura del pico es a menudo mejor parámetro analítico que las áreas solo para solutos con bajos tiempos de retención; para tales solutos, los picos son estrechos y altos siendo difícil la determinación precisa de sus áreas. (14)

Las áreas de los picos aumentan linealmente con el recíproco de la velocidad de flujo, una valiosa característica que permitió el uso de estandarización interna. El efecto de variación en la temperatura de la columna y en la velocidad de flujo es minimizado por la incorporación del estándar interno. (14)

*Esta es una deformación en la detección de la señal por el lento arrastre de la muestra a la salida de la columna que una vez registrada se conoce como coleamiento del pico.

TIPOS DE CROMATOGRAFIA

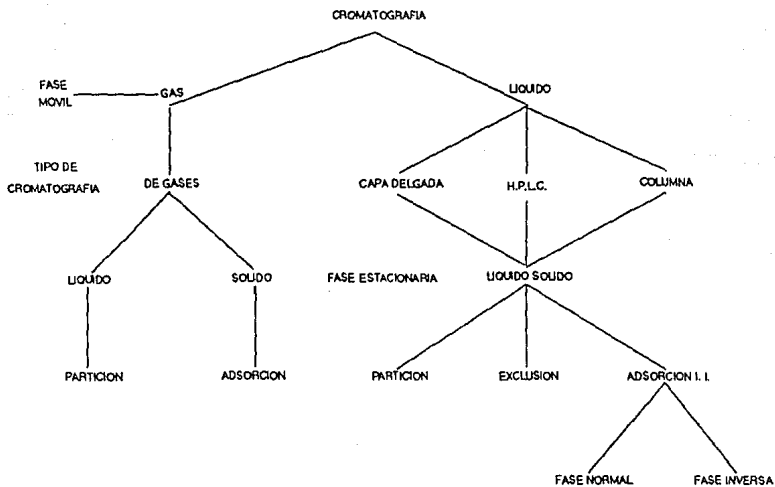


FIGURA 4

En general para la evaluación cuantitativa por cromatografía de gases deben prevalecer tres condiciones:

1. La señal del sistema detector y registrador debe ser lineal con respecto a la concentración.
2. El flujo de gas debe ser constante.
3. La respuesta de la plumilla del registrador debe ser proporcional a la velocidad de respuesta del detector.

Hoy en día, la Cromatografía de Gases juega un papel muy importante en la determinación de metabolitos en fluidos biológicos. Su importancia ha sido reconocida a través de los años por su aplicación a complejos sistemas orgánicos y bioquímicos. En 1960 Hoyd y colaboradores demostraron la aplicación de la Cromatografía de Gases a través de la separación e identificación de alcaloides y en los años siguientes su aplicación en toxicología forense. (14), (15)

FUNDAMENTOS TEORICOS:

La identificación cualitativa de los componentes de una muestra por Cromatografía de gases, se basa en el tiempo requerido para que aparezca el pico en el extremo de la columna. Aunque pueden aplicarse métodos frontales y de desplazamiento, sólo el método de elución es importante en la Cromatografía de Gases (C.G.). El tiempo requerido para eluir la zona de migración al máximo de un pico de soluto y llegue al detector será el tiempo de retención (T). (14), (16)

En la figura No. 5 se muestra el cromatograma de dos componentes en donde se ve que T será la distancia desde el pico del aire al pico de cada componente. Si la muestra contiene un componente cuya solubilidad en la fase líquida es muy baja, su velocidad se aproxima a la velocidad de flujo del gas portador y su tiempo de retención será menor que el tiempo de retención de un componente de partición (K) moderado. (14), (16)

El volumen del gas requerido para llevar un máximo del componente a través de la columna es el volumen de retención, (V_r). (14)

La velocidad de flujo por volumen de gas a la salida de la columna a su temperatura y presión, se denomina F_c . Por lo tanto, tenemos la ecuación: $V_r = (T_r) (F_c) \dots (1)$. El volumen de retención es a veces usado como criterio de identificación sin embargo, volúmenes de retención idénticos de dos muestras no significa que sean el mismo componente. (14)

El volumen de retención está relacionado con el coeficiente de partición (K), siendo favorable para establecer una relación entre V_r y la estructura molecular del compuesto. (14)

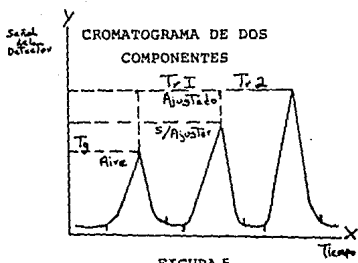


FIGURA 5

Para un componente que no se divide apreciablemente en la fase líquida:

$$V_g = (T_g)(F_c)$$

donde:

V_g = Volumen de retención del gas portador solo.

T_g = Tiempo de retención del gas portador solo.

CROMATOGRAFIA DE DOS COMPONENTES:

Un término más útil es el volumen de retención ajustado V_r' que incluye la corrección del cambio de presión por espacio muerto.

Como la fase móvil es comprensible, y puesto que el gas se mueve más lentamente a la entrada que a la salida de la columna, se aplica el factor de ajuste de comprensibilidad (j) para obtener el volumen de retención real (V_n).

Por tanto:

$$V_r' = (j)(T_r)(F_c) = V_r - V_m \quad V_m = \text{Volumen muerto}$$

$$V_n = (j)(V_r')$$

$$j = \frac{3}{4} \frac{(P_i/P_o)^2}{(P_i/P_o)^3 - 1}$$

Donde:

P_i = Presión del gas a la entrada de la columna.

P_o = Presión del gas a la salida de la columna.

Cuando el soluto entra a la columna, inmediatamente se equilibra entre la fase disolvente estacionaria y la fase gaseosa móvil. La concentración en cada fase está dada por el coeficiente de partición.

$$K_d = \frac{C_s}{C_m} \dots \dots \dots (1)$$

Donde:

C_s = Concentración del soluto en la fase estacionaria

C_m = Concentración del soluto en la fase móvil.

$$V_r C_m = V_m C_m + V_s C_s \dots \dots \dots (2)$$

$$V_r = V_m = K_d V_s \quad \text{ó} \quad V_r - V_m = (K_d)(V_s) \dots \dots \dots (3)$$

El factor de retardo R_f , representa la rapidez de movimiento de la muestra con respecto al gas portador. Si la columna tiene una longitud l , tenemos:

$$\text{Velocidad del componente} = \frac{l}{T_r} \dots\dots\dots (4)$$

Análogamente: Velocidad del gas portador = $\frac{l}{T_g} \dots\dots\dots (5)$

Así: $R_f = \frac{l/T_r}{l/T_g} = \frac{T_g}{T_r} = \frac{V_g'}{V_r'}$

Empleando la ecuación (4) de K_d y combinándola con la Ec. (5) tenemos

$$R_f = \frac{A_m}{A_m + K_d A_s} \dots\dots\dots (6)$$

Donde:

- A_m = Area transversal de la fase gaseosa
- A_s = Area transversal de la fase líquida
- $V_g' = A_m(1)$ = Volumen corregido de la fase gaseosa
- $V_l = A_s(1)$ = Volumen total del líquido contenido en la columna.

Por lo tanto: $V_r' = V_g' + K_d V_l$ sustituyendo

$$R_f = \frac{V_g'}{V_g' + K_d V_l} \text{ sustituyendo} \dots\dots\dots (7)$$

$$T_r = \frac{V_g' + K_d V_l}{j F_c} \dots\dots\dots (8)$$

Así tenemos que los procesos principales que contribuyen a la resolución de los picos son:

- Difusión en remolino, ésto es la trayectoria que el solvente sigue entre las partículas dentro de la columna.
- Transferencia de masa en la fase móvil. La corriente de la fase móvil no tiene la misma velocidad a los lados que en el centro.
- Transferencia de masa en la fase móvil contenido en las partículas. Las moléculas de la muestra se mueven hacia dentro y hacia fuera de éstas partículas por difusión, la difusión de estas moléculas depende del tamaño de la partícula donde se encuentre. (12), (13)

- Transferencia de masa en la fase estacionaria. Las moléculas de la muestra viajan hacia la fase estacionaria y dependiendo del tiempo que permanezcan en ellas, se retrasarán o avanzarán.
- Difusión longitudinal. Las moléculas de la muestra tienden a difundirse al azar en todas direcciones.

Ahora bien, para saber si se ha alcanzado el parámetro de resolución se cuenta con que la resolución es la distancia entre los centros de las dos bandas dividida entre el promedio de la amplitud de sus bases: Ver Fig. 6 Resolución de componentes.

$$R_s = \frac{(Tr_2 - Tr_1)}{\frac{W_2 + W_1}{2}}$$

Donde: R_s = Resolución

Tr_1 y Tr_2 = Tiempo de retención de las bandas 1 y 2, respectivamente.

W_1 y W_2 = Amplitud de la base de las bandas 1 y 2, respectivamente.

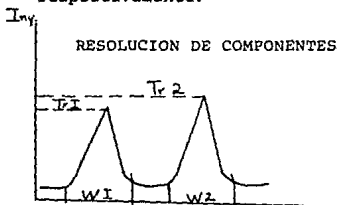


FIGURA 6

Si la resolución tiene un valor igual a 1, eso indica una buena separación, valores mayores indican mayor separación y valores menores indican separación deficiente.

Es de gran importancia el conocer cómo varía la resolución con los parámetros fundamentales de la separación cromatográfica: eficiencia, selectividad y capacidad. (13), (15), (16)

Eficiencia: Es una medida de la habilidad de una columna para dar bandas estrechas y puede medirse cuantitativamente por el número de platos teóricos (N):

$$N = 16 \frac{(Tr)}{(W)}$$

Donde: Tr = Tiempo de retención
W = Amplitud de la base del pico.

El número de platos teóricos es proporcional a la longitud de la columna. Por otro lado, tenemos el concepto de altura equivalente de un plato teórico (AEPT):

$$AEPT = \frac{L}{N}$$

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

Selectividad: La selectividad de la columna (S) es medida por la separación relativa de los picos de los compuestos y está en función de los coeficientes de distribución (K):

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

donde K₁ y K₂ son los coeficientes de distribución de los compuestos 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 de temperatura y/o cambiando la naturaleza química del soluto. (13), (16)

Factor de Capacidad: Está dado por la relación entre el coeficiente de distribución de la sustancia y algunos parámetros de las fases estacionaria 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 por la fase estacionaria, por lo que se obtienen separaciones deficientes; valores grandes de K' mejoran la separación pero llevan a análisis prolongados.

La siguiente ecuación nos presenta los parámetros que pueden variar para modificar la resolución: R_s .

$$R_s = \frac{1}{4} \left[\sqrt{N} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{K'}{K' + 1} \right]$$

RESOLUCION \propto VELOCIDAD \propto CAPACIDAD

EQUIPO:

Básicamente, un cromatógrafo de gases consta de 6 partes:

1. Gas acarreador.- Una fuente de suministro del gas portador, de un tanque de alta presión con regulador de presión y medidores de flujo.

El gas acarreador de preferencia es de Helio, usando alternativamente el Nitrógeno. Para obtener una máxima eficiencia se requiere que el gas acarreador sea inerte, eficiente y de costo accesible, por esto último a veces la elección es el Nitrógeno.* La única excepción es cuando se usan detectores de conductividad térmica en los que debe usarse Helio o CO. (13), (15)

Gas	Peso Molecular	Capacidad Específica	Viscosidad	Conductividad Térmica	
				a 0 °C	a 100 °C
Aire	28.98	7.0	0.71	5.8	7.5
H ₂	2.02	6.8	0.84	41.6	53.4
He	4.00	5.1	1.81	34.8	41.6
N ₂	28.02	6.9	1.66	5.8	7.5
O ₂	32.00	7.0	2.04	5.9	7.6
Ar	39.95	5.0	2.1	4.0	5.2
CO ₂	44.01	8.8	1.37	3.5	5.3
CO	28.01	6.9	1.66	5.6	7.2
CH ₄	16.04	8.5	1.02	7.2	10.9

Tabla característica de posibles acarreadores usados en C.G.

2. Sistema de inyección: Conocido como puerta de inyección donde la muestra debe ser inyectada rápidamente y el volumen de la misma debe ser del orden de 20 mcl. Normalmente el puerto de inyección es calentado a una temperatura muy superior a la del punto de ebullición de la muestra para lograr una separación rápida.

3. Columnas:

I) Tubulares o capilares: En éstas, el trayecto del gas a través de la columna es un orificio sin restricciones y el medio separador está en forma de película revistiendo las paredes de la columna, siendo la caída de presión tan baja que permite usar columnas con miles de platos teóricos, ya que su longitud va de 3 a 300 m. El inconveniente es que la capacidad de la muestra es muy baja, así como el volumen de la fase líquida que pueda depositarse sobre la pared.

Esta limitación puede eliminarse aumentando el área superficial de la columna, sin aumentar el espesor de la misma; esto es, aumentando el soporte tubular con soporte de recubrimiento. (12), (13)

II) Empacadas: Son tubos rellenos de un soporte inerte recubierto con una fase líquida o rellenas de un adsorbente. Los tipos de soporte son partículas esféricas de 20 a 40 micras inertes a temperaturas elevadas.

Los soportes más comunes son: cuentas de vidrio, polímeros y teflón. Las fases líquidas siguen la regla: "lo polar disuelve lo polar y lo no polar disuelve lo no polar". Esto es útil para seleccionar las fases líquidas, por ejemplo, el escualeno para hidrocarburos, el carbowax para alcoholes, los poliestirenos para ésteres metálicos de ácidos grasos. Las características que debe tener una fase líquida son:

- a) Baja volatilidad, siendo su punto de ebullición inferior a la temperatura límite de la columna.
- b) Tener estabilidad térmica.
- c) Tener inercia química
- d) Presentar características de disolventes con valores aceptables de K.

Ninguna fase líquida cumple todas estas características y en especial esta última, ya que si los valores de K son demasiado pequeños, los solutos atraviesan la columna tan rápidamente que no producen separación importante. Si el valor de K es grande, el tiempo para eliminar el soluto es grande. (12), (13)

4. Detectores:

Se encuentran situados a la salida de la columna de separación y registran el arribo de los componentes separados a medida que salen de la columna produciendo la correspondiente señal eléctrica. Ver Figura No. 7. Su temperatura deberá ser lo suficientemente alta para evitar la condensación de los vapores de la muestra, pero sin llegar a causar descomposición, debe responder rápida y reproduciblemente a las concentraciones trabajadas, debe dar una respuesta lineal, tener estabilidad en periodos largos de uso y respuesta uniforme a una gran variedad de compuestos. Los detectores más frecuentemente utilizados son:

a) Conductividad Térmica (DCT): Está formado por un circuito de de cuatro filamentos de los cuales dos están rodeados por el gas portador y los otros dos por el gas efluente. A medida que los componentes salen de la columna, la composición del gas varía, el cambio resultante que esto causa en la conductividad térmica, produce una variación en la temperatura del filamento y a la vez un cambio en la resistencia del mismo, lo que resulta en una señal eléctrica del circuito. El límite de detección es de aproximadamente 5 mcg/ml de muestra gaseosa o 10 mg de peso de muestra.

b) Ionización de Flama (DIF): Muchos compuestos, cuando son piro-
lizados a la temperatura de una llama de hidrógeno y aire producen iones que proporcionan un mecanismo por el cual la corriente puede atravesar la llama, por lo que los iones pueden medirse por el cambio que éstos originan en la corriente inicial

La resistencia eléctrica de una llama es muy alta, quizás de 10¹² ohms y las corrientes resultantes son mínimas. La llama está entre dos electrodos y la diferencia de potencial entre éstos es proporcional a la concentración. Este detector en la actualidad es más popular debido a su alta sensibilidad y gran confiabilidad. El mecanismo con que trabaja es: el efluente de la columna entra a la base del quemador a través de un filtro, mezclándose con el hidrógeno y el aire; durante la combustión se forman iones y electrones libres, éstos se colectan produciendo una corriente eléctrica proporcional a la velocidad de entrada de la muestra a la flama.

Este detector sólo responde a átomos de carbono oxidables y la respuesta es proporcional al número de átomos de carbono oxidables en el componente de la muestra.

No se produce respuesta con átomos de carbono oxidados completamente, como grupos carbonilo o carboxilo. La respuesta disminuye al aumentar la sustitución con halógenos, aminas y grupos oxhidrilo; no responde a compuestos inorgánicos, excepto a los fácilmente ionizables. (12), (13)

La detección es de aproximadamente 5 mcg/ml de gas y el intervalo lineal de respuesta es de 10^7 .

FIGURA ESQUEMATICA DE UN DETECTOR DE IONIZACION

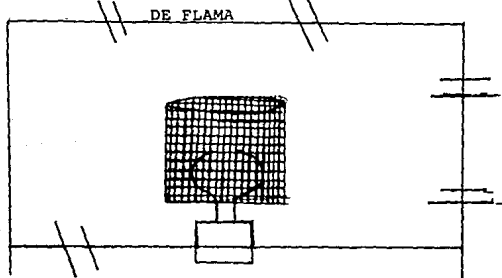


FIGURA 7

C) Captura de Electrones: Está basado en la absorción de electrones por parte de compuestos que tienen un elemento o un grupo de electronegativo. Al ser expuesto a una fuente de electrones de baja energía, estos compuestos tienden a unirse a electrones o a capturarlos para formar iones negativos. A medida que el nitrógeno portador fluye a través del detector, las partículas de la fuente de tritio o níquel ionizan las moléculas de nitrógeno y forman electrones "lentos" que emigran al ánodo bajo un potencial fijo de 2 a 100 volts. La detección que puede tener a concentraciones mínimas es alta. Es selectivo a trazas de compuestos que contienen halógenos, anhídridos, peróxidos, carbonilos conjugados nitrilos, nitritos, ozono, oxígeno, compuestos organometálicos y compuestos de azufre; mientras que es insensible a hidrocarburos, aminas, cetonas, etc.

Otros detectores menos comunes son: de Helio, de Flama Alcalina, Cruzado, Fotométrico, Dual, de Rayos β , y Selectivos.

5. Electrómetro, Registrador ó Integrador: Estos pueden ser de uso convencional, siempre y cuando sean sensibles a la respuesta del detector o bien los modernos integradores que dan toda la información ya condensada, por lo que se facilitan los cálculos de áreas y los errores de cálculo se reducen.

6. Compartimentos: Los compartimentos son para alojar la columna, el puerto de inyección y el detector, los cuales están separados por termostatos para controlar la temperatura de cada uno.

FORMACION DE DERIVADOS:

Para un gran número de productos farmacéuticos, la separación por *C.G. directa se dificulta y algunas veces es imposible para compuestos de alto peso molecular, no volátiles o inestables a altas temperaturas, además de que ciertos grupos funcionales pueden interactuar con materiales de la columna causando adsorción y coleo del pico, por lo que se hace necesario la conversión a derivados volátiles.

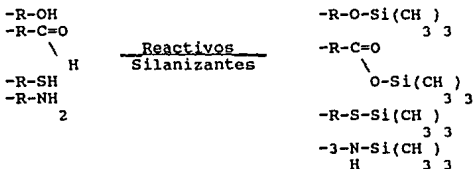
La formación de derivados químicos para la *C.G. tiene la siguiente utilidad:

- Para incrementar la volatilidad y estabilidad térmica del soluto.
- Para mejorar la detección.
- Para promover la separación.

La silanización es la técnica más comúnmente utilizada en la derivación por Trimetilsilano. Siendo estos derivados poco polares, más volátiles y más estables a temperaturas elevadas.

Dependiendo del grupo funcional y del impedimento estérico puede formarse un gran número de derivados. La más importante consideración se basa en el intercambio de un protón de uno o más grupos funcionales: (11)

Ejemplo: (T.M.S.) = Trimetil, silis, éter-derivados:



*Cromatografía de gases.

DIAGRAMA PARA LA ELECCION DEL
METODO DE SEPARACION EN FUNCION

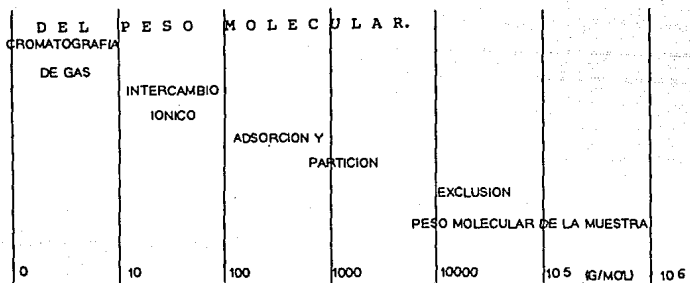


DIAGRAMA I

DIAGRAMA PARA LA ELECCION DE PROCESO CROMATOGRAFICO EN FUNCION DE LA POLARIDAD Y EL NUMERO DE GRUPOS FUNCIONALES

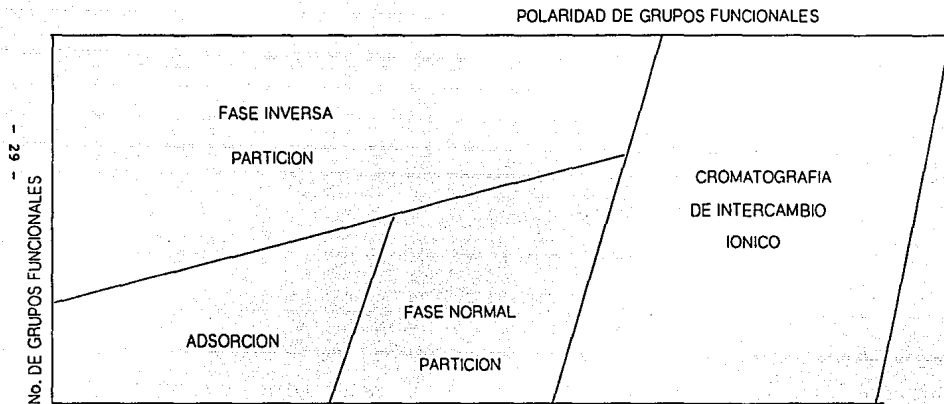


DIAGRAMA 2

DIAGRAMA COMO CRITERIO DE ELECCION
DEL TIPO DE CROMATOGRAFIA.

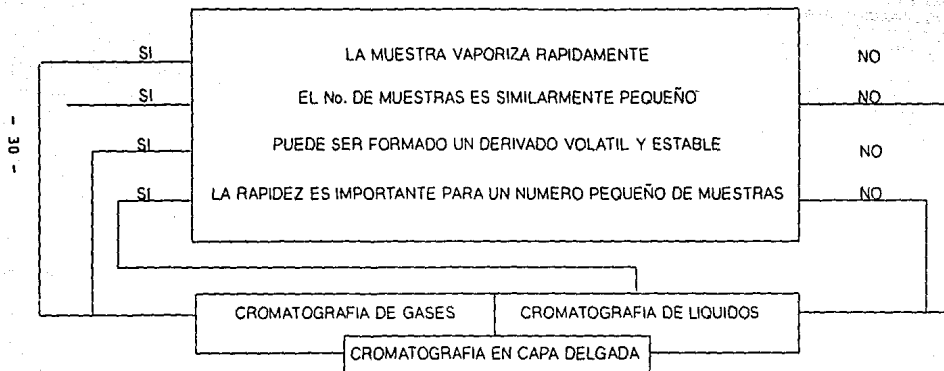


DIAGRAMA 3

4. Validación.

El desarrollo de métodos analíticos involucra una secuencia de situaciones entre las cuales tenemos:

- Planteamiento del problema.
- Revisión bibliográfica.
- Definición del alcance del trabajo de desarrollo, su grado de especificidad, precisión y exactitud.
- Desarrollo del procedimiento analítico.
- Determinación de la influencia de las variables que intervienen en el análisis.
- Determinación de la precisión, exactitud, especificidad y reproducibilidad del procedimiento analítico. (17), (18)

Validación es la comprobación de que un sistema particular puede producir un medicamento con una misma calidad: Una guía para la validación de métodos analíticos podría resumirse de la siguiente manera:

- Linealidad: Rango de concentración en el cual la respuesta analítica es constante.
- Límite de detección: Mínima concentración detectable.
- Exactitud del método: Concordancia entre los valores reales y los experimentales.
- Precisión: Concordancia entre los valores obtenidos. Se expresa como Desviación Estándar.

$$S = \frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1}$$

- Reproducibilidad: Concordancia entre las determinaciones realizadas en diferentes días por diferentes analistas o equipos.
- Especificidad: Es el grado en el cual la medición se debe solamente a la sustancia que se desea determinar.
- Estabilidad de la muestra: Grado en el cual la muestra preparada para el análisis permanece sin cambio. (17), (19), (20)

5. Especificidad en Estabilidad.

La especificidad en estabilidad es un aspecto muy importante de los métodos analíticos usados para evaluar la estabilidad química de un fármaco en sus formas de dosificación, siendo esta especificidad tal, que otras sustancias presentes como los excipientes y sustancias que se producen durante el almacenamiento en condiciones normales o aceleradas de temperatura, luz, hidrólisis u oxidación, no interfieran en la cuantificación del fármaco.

Para demostrar que un método analítico es específico en estabilidad para una sustancia es necesario que ninguna otra sustancia presente en la formulación interfiera en la respuesta analítica producida por tal sustancia. (19)

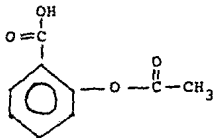
Las formas farmacéuticas se diseñan en base a las propiedades físico-químicas del fármaco y su compatibilidad con los excipientes, por lo que el profesional del área farmacéutica está involucrado con el desarrollo de métodos específicos. Si los productos de degradación son conocidos y están disponibles, deben agregarse al placebo del producto y demostrar que no interfieren con la respuesta analítica del activo.

6. Monografía del Acido Acetil Salicílico.

NOMBRES QUIMICOS Y SINONIMOS:

2-Acetoxi, Acido Benzoico; Acido 2-acetoxibenzoico; Acetato del ácido Salicílico; Acido aceto Salicílico.

FORMULA DESARROLLADA:



FORMULA CONDENSADA:



PESO MOLECULAR:

180.16

CONSERVACION:

Almacenar en contenedores perfectamente cerrados, sobre sílica gel.

METALES PESADOS: No más de 0.001%

pH: De 2 a 4 (Máxima estabilidad).

POLIMORFISMO:

Se han encontrado tres formas polimórficas, resaltando la monoclinica y la amorfa, siendo estable solo la primera. (4), (7), (9)

DESCRIPCION:

Agujas monoclinicas cristalinas con ligero olor a ácido acético al aire seco.

SOLUBILIDAD:

Un gramo se disuelve en 300 ml de agua a 25°C, en 100 ml de agua a 37°C, en 33 ml de agua a 100°C, en 5 ml de alcohol, en 17 ml de cloroformo, en 13 ml de éter, en 2500 ml de tetracloruro de carbono, en 303 ml de benceno; es insoluble en éter de petróleo. Se descompone en agua caliente y en soluciones alcalinas.

HUMEDAD:

Secar sobre sílica gel por 5.0 horas; no debe perder más del 0.5% de su peso.

CLARIDAD DE LA SOLUCION:

No debe presentar turbidez. (4), (7)

RESIDUO DE IGNICION:

No más de 0.05%

VALORACION:

Contiene no menos del 99.5% y no más del 100.5% de $C_9H_8O_4$ calculado en base seca. (Valoración volumétrica, cada ml de NaOH 0.5N equivale a 45.05 mg de aspirina).

ENSAYOS DE IDENTIDAD:**A. Espectrofotometría de Infrarrojo: (9), (10)**

El espectro de una dispersión de Aspirina en Bromuro de Potasio, presenta los siguientes máximos: Ver Fig. 8

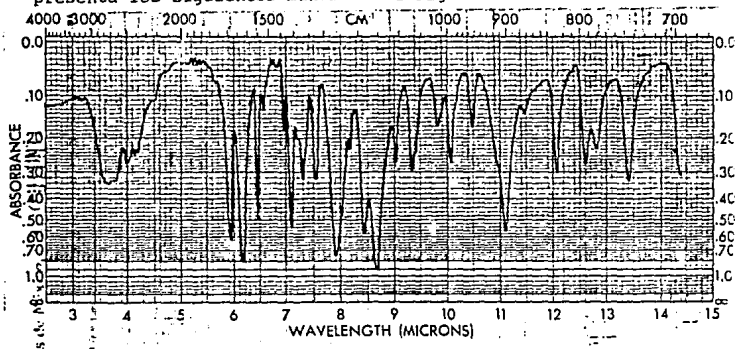


FIGURA 8

B. Espectrofotometría Ultravioleta:

Una solución de Aspirina en cloroformo exhibe un máximo de absorción a 265 nm.

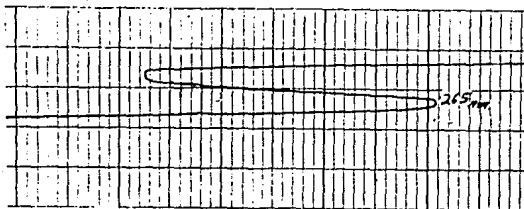


FIGURA 9

C. Fluorescencia - Fosforescencia:

La longitud de onda de excitación máxima es a 280 nm y el máximo de emisión a 335 nm.

D. Punto de Fusión:

142 °C para la forma monoclinica.

E. Constante de Disociación:

A 25 °C: $2.8 \times 10^4 = PKa = 3.55$

FARMACOCINETICA:

La aspirina se absorbe rápidamente en la parte superior del intestino delgado y la concentración máxima en sangre se encuentra después de los 30 minutos de su ingestión. Una vez que la aspirina ha sido absorbida, se convierte rápidamente en ácido salicílico para dar lugar al ácido salicílico que es el metabolito formado en mayor cantidad, siendo estos metabolitos, productos de la hidrólisis "in vivo" de la aspirina en hígado y en menor proporción en sangre.

El camino que sigue el ácido acético después de la hidrólisis "in vivo" es significativo. Una porción es usada para la transmetilación de ciertos factores, los cuales juegan un papel muy importante en la inhibición de agregados de plaquetas (esto sólo se observa en la administración de aspirina y no así en la de ácido salicílico). La actividad de la aspirina depende de la edad y sexo del paciente. (9)

REACCIONES SECUNDARIAS:

Los efectos adversos más comunes que pueden ocurrir a dosis terapéuticas son: disturbios gastrointestinales como náuseas, dispepsia y vómito con irritación de la mucosa gástrica, erosión, ulceración, hematomesis, etc. Esto ocurre a menudo en un 70% en pacientes tratados con preparados de aspirina.

La aspirina aumenta el tiempo de sangrado y disminuye la adhesividad plaquetaria y en grandes dosis puede causar hipoprotrombinemia.

La intoxicación por salicilatos se manifiesta como salicilismo levemente crónico, ya que suele ocurrir sólo después de repetidas administraciones de grandes dosis. Los síntomas incluyen: Hiper ventilación, fiebre, inquietud, cetosis, acidosis, alcalosis respiratoria, depresión del sistema nervioso central, coma, colapso cardiovascular y paro respiratorio. En niños, produce a dosis normales: somnolencia y acidosis metabólica, comúnmente hipoglucemia severa.(10)

La dosis letal para adulto es de 25 a 30 g diarios. (9)

CONTRAINDICACIONES:

No se debe administrar a pacientes que presenten úlcera péptica activa, gastritis, insuficiencia hepática y/o renal ni a pacientes hipersensibles.

No se debe utilizar en influenza ni varicela, ya que su uso se ha asociado al síndrome de Reye en niños menores de 14 años.

DOSIS TERAPEUTICA:

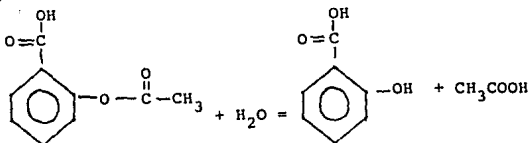
De 0.25 a 1.00 g diarios, aunque las personas sensibles no lo toleran.

USOS:

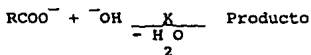
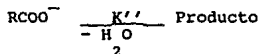
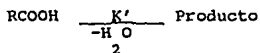
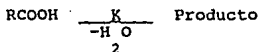
Analgésico, antipirético, antiinflamatorio, antireumático, anticoagulante, en la poliartritis crónica progresiva.(9), (10)

ESTABILIDAD:

La aspirina en sustitución de fenil-éster, como éster aromático es un buen grupo donador. Es relativamente inestable bajo hidrólisis y en contacto con sustancias básicas y en formulaciones como suspensiones se descompone apreciablemente después de 5 días; en tabletas, los esteéricos usados como lubricantes incrementan su degradación. La reacción más importante que contribuye a la inestabilidad de la aspirina es la hidrólisis que da como productos de degradación ácido salicílico y ácido acético. La reacción es la siguiente:



La cinética y el mecanismo de hidrólisis son afectados por la ionización del ácido carboxílico de la aspirina (pKa = 3.6), dejando al grupo RCOOH como el más importante, la reacción puede ser escrita así:



Velocidad = K = Constante específica de segundo orden para la catálisis ácida.

K = Constante específica de segundo orden para la catálisis básica.

K' y K'' = Constante de primer orden para la reacción de ionización. (9)

ENERGIA DE ACTIVACION:

Constante de Velocidad	E (Kcal/mol)
K	16.7
K'	16.4
K''	17.6
K	12.5

Siendo las constantes de velocidad de la hidrólisis;

- 1) 3.3×10^{-4} a 37 °C en medio ácido.
- 2) 2.5×10^{-2} a temperatura ambiente en medio alcalino.(21)

VI. PARTE EXPERIMENTAL.

Materiales y métodos.

Equipo:

- Disolutor E.L.E.C.S.A.
- Espectrofotómetro Perkin Elmer Coleman 124 doble haz.
- Celdas de cuarzo.
- Unidad de poder para lámpara U.V.
- Registrador Perkin Elmer 165.
- Potenciómetro Corning 125.
- Balanza Mettler H35AR.
- Cromatógrafo de gases Hewlett Packard con detector de Ionización de flama.
- Columna OV-17 de vidrio, al 3.8% sobre Chromosorb, 100-120 mallas, Long.= 1 m; Diámetro =0.5 cm.
- Integrador Hewlett Packard 3390.
- Jeringas Hamilton Co. de 10 mcl.
- Supermixer Lab-line.
- Estufa de temperatura controlada de 60°C.

Materiales:

- Gradillas para tubo de ensaye.
- Papel filtro Whatman No. 1.
- Termómetros clínicos calibrados.
- Probetas de 1l, Pyrex.
- Vasos de precipitados de 1l, Pyrex.
- Matraces volumétricos de 25,50 y 100 ml, Pyrex.
- Jeringas de plástico, Plastipak.
- Pipetas volumétricas de 1,2 10,15,20 y 25 ml, Pyrex.
- Tubos de ensayo (19.5 X 2.5 cm), Pyrex.
- Embudos de vidrio de tallo corto (14 X7.5 cm), Pyrex.
- Pipetas graduadas de 10 ml, Pyrex.
- Viales de reacción de 3 ml, Supelco.
- Gradilla para viales de reacción.
- Agitadores magnéticos para viales de reacción.
- Septum para viales de reacción.

Reactivos:

- Acetato de Sodio (R.A), Merck.
- Ácido acético glacial (R.A), Merck.
- Agua destilada U.S.P.
- Ácido acético salicílico U.S.P
- Alcohol etílico (R.A), Merck.
- Reactivo de derivación: N-O (bis-Trimetil fluoro Acetamoda con 1% de Trimetil cloro Silano (BTSFA).
- Cloroformo (R.A), Merck.
- Xanteno (R.A), Merck.
- Clorhidrato de Codeína (Estándar de referencia secundario).
- Clorhidrato de Oxícodona (Estándar de referencia secundario).
- Ácido Salicílico (Estándar de referencia secundario).

A. Método Espectrofotométrico.

El trabajo consiste en la determinación del ácido acetil salicílico y ácido salicílico en el punto 'Isobéptico de estos, a una longitud de onda de 265 nm.

Esta prueba se realizó en tabletas de 500 mg; en *dos formulaciones que contienen codeína y oxicodona más el ácido acetil salicílico respectivamente (Polifármacos).

Para la determinación se utilizó un espectrofotómetro de doble haz calibrado con medio de disolución.

El ácido acetil salicílico se cuantificó con la relación de absorbancias obtenidas para el estándar y la muestra, restando a esta última la absorbancia del placebo de ácido acetil salicílico, según análisis de multicomponentes, aunque la absorbancia de cada uno de los placebos es mínima (aprox. 0.02) , y podríamos considerarla como despreciable o achacársela al ruido del equipo por cambios en el voltaje. Esta absorbancia se estandarizo haciendo 20 lecturas del placebo a 265 nm y se observo que la absorbancia siempre era la misma por lo que se considero para hacer el método mas confiable. (Ver fig. 10)

Procedimiento:

El procedimiento es el que marca la Farmacopea Nacional como el No.1 de canastillas.

Medio de Disolución:

Pesar aproximadamente 18 g de acetato de sodio (para preparar 6 l de medio de disolución) y transferir a un matraz volumétrico de 1 l; adicionar 10 ml de ácido acético glacial y aforar con agua recién destilada. Medir volumétricamente otros 5 l de agua destilada y mezclar los 6 l resultantes en dos vasos de precipitados de 5 l cada uno. Ajustar el pH de la solución resultante a 4.5 ± 0.05 .

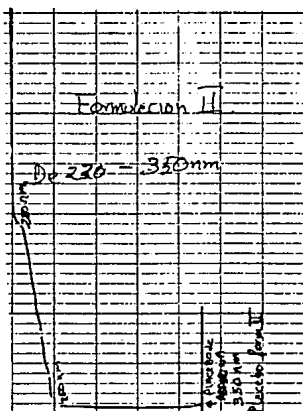
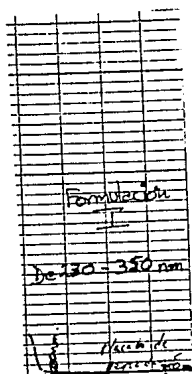
Encender el disolutor y ajustar la velocidad de agitación a 50 rpm. Adicionar 900 ml de medio de disolución a cada vaso y ajustar la temperatura a $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, usando para ello termómetros calibrados.

Colocar cada una de las 6 tabletas seleccionadas al azar en las canastillas. Introducir la muestra en su vaso correspondiente, dejando 2 minutos entre tableta y tableta.

Cronometrar muy bien el tiempo y dejar transcurrir 30 minutos, que es el tiempo que dura la prueba. Proceder a tomar inmediatamente 50ml de muestra. Filtrar a travez de papel filtro Whatman No. 1 desechando los primeros 15 ml del filtrado. Tomar cuantitativamente del filtrado una alícuota 25 ml y transferir a un matraz volumétrico de 50 ml llevar a volumen con medio de disolución y mezclar, llegando a una concentración final de 0.180 mg/ml

Preparación del estándar:

Pesar exactamente alrededor de 36.1 mg exactamente pesados de ácido acetil salicílico estándar de referencia y transferir a un matraz volumétrico de 100 ml; disolver con 1 ml de alcohol y llevar al aforo



ESPECTROS OBTENIDOS PARA LOS PLACEBOS DE
ASPIRINA DE LA FORMULACION I Y II

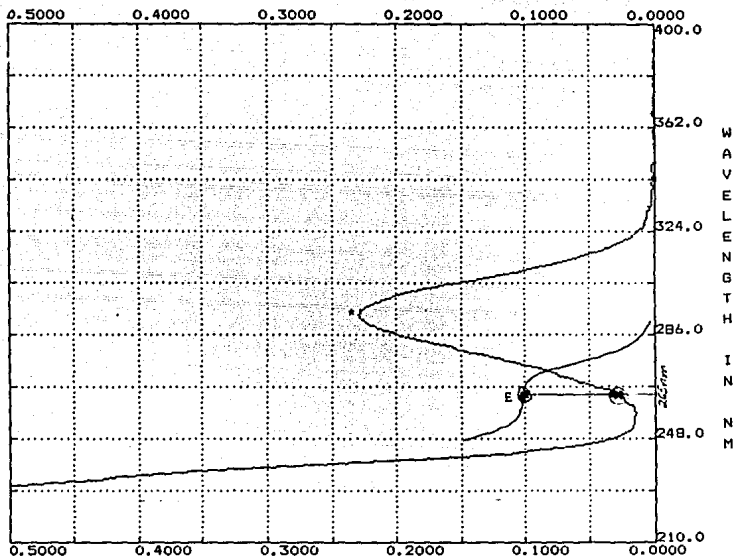
FIGURA 10

con medio de disolución. Tomar volumétricamente 25 ml y transferir a un matraz volumétrico de 50 ml y llevar a volumen con medio de disolución y mezclar, llegando a una concentración final de 0.180 mg por ml.

Determinar las absorbancias de las muestras y estándares en un espectrofotómetro adecuado a una longitud de onda de $265 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$ usando como blanco el mismo medio de disolución. (Ver fig.11)

Calculos;

$$\frac{\text{Abs. mta} - \text{Abs. placebo}}{\text{Abs. st.}} \times \text{mg st.} \times \text{pureza st.} \times \text{factor dil.} \times 100 = \% \text{Liberado de aspirina.}$$



Scan Speed: 750 nm/min

*= Espéctro del Acido Salicflico
 E= Espéctro del Acido Acetil Salicflico

Espéctro donde se muestra el punto Isobéstico del Acido Salicflico
 y el Acido Acetil Salicflico a 265 nm de longitud de onda.

FIGURA 11

A. Método Cromatográfico:

El trabajo experimental consiste en la determinación por cromatografía de gases y derivación del ácido acetil salicílico contenido en tabletas de 500 mg (325 mg de ácido acetil salicílico por tableta). *La formulación 1 contiene además; clorhidrato de codeína y la formulación 11 clorhidrato de oxícodona. Se analizaron muestras recién preparadas y otras almacenadas a temperatura ambiente(°C) por un año, y temperatura controlada a 60°C por cuatro semanas.

Para esta determinación se utilizó una columna OV-17 al 3.8% y nitrógeno como gas acarreador. El fármaco se cuantificó por relación de áreas obtenidas en los cromatogramas del ácido acetil salicílico y las obtenidas para el xanteno(estándar interno), tanto para los problemas como para la solución de referencia.

Procedimiento:

Preparación del Estándar Interno:

Preparar una solución de Xanteno en cloroformo a una concentración de 1.35 mg/ml.

Preparación del Estándar de Acido Acetil Salicílico:

Pesar aproximadamente 325 mg de ácido acetil salicílico y transferirlos a un matraz volumétrico de 50 ml. Agregar cuantitativamente 15 ml de la solución del estándar interno, disolver y llevar a volumen con cloroformo.

Preparación de la muestra:

Moler 20 tabletas y pesar el equivalente a una tableta en un matraz volumétrico de 50 ml, agregar cuantitativamente 15 ml de la solución de estándar interno y colocarlo por 15 minutos en un baño ultrasónico. Dejar enfriar y llevar a volumen con cloroformo, evitando la evaporación y filtrar a través de papel filtro Whatman No.1 desechando los primeros 10 ml del filtrado.

Reacción de Derivación:

En vasos de reacción, colocar 1 ml de reactivo BTSFA e inmediatamente agregar 1 ml de estándar de ácido acetil salicílico o 1 ml de la solución de la muestra. Agitar por 1 minuto y colocar en una estufa a 60°C por 20 horas.

Preparar por duplicado la reacción del estándar y la de cada una de las muestras.

Inyectar el derivado del estándar por duplicado hasta que la relación de áreas entre dos inyecciones consecutivas no presente una variación mayor del 2%, continuar de la misma manera con los derivados de las muestras. Inyectar el estándar cada 4 inyecciones de la muestra.

Condiciones del cromatógrafo de gases:

- Temperatura del Detector: 250 °C
- Temperatura del puerto de Inyección: 200 °C
- Temperatura de la Columna: 175 °C
- Rango x Att.: 10 X 16

Condiciones para el integrador:

- Cero (Zero): 0.0
- Atenuación: 4.0
- Velocidad de la carta: 0.5
- Amplitud del pico: 0.16
- Umbral de integración: 4
- Área de rechazo: 0.0
- Atenuación al tiempo 5.5: 6.0
- Atenuación al tiempo 11.0: 2.0

Cálculos:

Determinar la relación del área de los picos del ácido acetil salicílico y xanteno para cada inyección y calcular la relación promedio para el estándar y la muestra:

$$X = \frac{\text{Relación del Área de la muestra} = \text{Área del Ac. Acetil Salicílico}}{\text{Área del Xanteno}}$$

$$Y = \frac{\text{Relación del área del estándar} = \text{Área del Ac. Acetil Salicílico}}{\text{Área del Xanteno}}$$

Calcular el contenido de Acido Acetil Salicílico de la siguiente forma:

Acido Acetil Salicílico mg/tab =

$$\frac{X_{\text{promedio}} \times \text{mg del Estándar} \times \text{Pureza del Estándar}}{Y_{\text{promedio}} \times \text{Pesos de muestra(g)} \times \text{Peso Prom. por tab.}} \times 1$$

EVALUACION ESTADISTICA

Para la validación de los métodos tanto espectrofotométrico como cromatográfico se determinó: Linealidad, precisión, exactitud, reproducibilidad y solo para el método cromatográfico especificidad.

Para todas las determinaciones se manejo placebo cargado con las concentraciones requeridas. Para la linealidad de ambos métodos se analizaron 5 niveles de concentración por duplicado. Para la precisión y exactitud se hicieron 5 determinaciones de tres niveles de concentración por duplicado (80, 100, y 120%). Para la reproducibilidad se analizaron 8 muestras por triplicado por 2 químicos diferentes en 2 días diferentes. Para la especificidad del método cromatográfico se analizaron muestras a temperatura ambiente (22°C) de un año y a temperatura controlada a 60°C por 4 semanas.

La evaluación estadística se llevo a cabo con las siguientes fórmulas:

- Media

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

Donde n= número de repeticiones.

- Desviación estándar

$$S = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}$$

- Error Estándar

$$ES = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

- Intervalo de confianza para "T" al 95% de probabilidad

$$I.C \ 95\% = \pm T (0.05\%) \ ES$$

Donde $\sqrt{\quad}$ = n-1 grados de libertad.

- Coeficiente de variación

$$C.V \ \% = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

- Pendiente

$$m = \frac{\sum XY - \bar{Y}\sum X}{\sum X^2 - \bar{X}\sum X}$$

- Ordenada al origen

$$b = \bar{y} - m\bar{x}$$

- Coeficiente de Correlación

$$r = \frac{S_{xy}}{S_x S_y} = m$$

$$\text{Donde } S_x = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}$$

- Reproducibilidad

La prueba de "F" de la tabla de ANADEV. (Ver tabla anexa)

$$F = \frac{M_{C\alpha}}{M_{C\beta}}$$

Donde $\alpha = i, j$ ó ij

- Exactitud

La prueba de "T" de Student

$$T = \frac{\bar{x} - \mu}{s/\sqrt{n}}$$

Donde $\mu = 100\%$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n(n-1)}}$$

- Precisión

La prueba de χ^2_1

$$\chi^2_1 = \frac{(n-1)(DE)^2}{(s)^2}$$

- Criterios de Aceptación

	Linealidad	Precisión	Exactitud	Reproducibilidad.
Método Espectrofotométrico	$r \approx 1$ $m \approx 1$ $b \approx 0$	$\chi^2_{i_c} \leq \chi^2_{i_t}$ $S \leq 2$ $E_{st} \approx 0$	$t_c \leq t_t$ $S \leq 2$ $E_{st} \approx 0$	$f_c \leq f_t$ $S \leq 2$
			$\bar{X} \approx 100\%$ $I.C. \approx 100\%$	
Método Cromatográfico	$r \approx 1$ $m \approx 1$ $b \approx 0$	$\chi^2_{i_c} \leq \chi^2_{i_t}$ $S \leq 2$ $E_{st} \approx 0$	$t_c \leq t_t$ $S \leq 2$ $E_{st} \approx 0$	$f_c \leq f_t$ $S \leq 2$
			$\bar{X} \approx 100\%$ $I.C. \approx 100\%$	

Fuente de Error (F V)	Grados de libertad (g.l.)	Suma de Cuadrados (SC)	Media de cuadrados (MC)	F calc	F tabl = 0.05 F 0.095	Criterio de Aceptación
Analista A filas _i	a - 1	$SC_A = \frac{\sum y_i^2}{bc} - \frac{y^2}{abc}$	$MC_A = \frac{SC_A}{a - 1}$	$\frac{MC_A}{MC_{AD}}$	$\frac{g.l._A}{g.l._{AD}}$	$F_A \leq F_{0.95_A}$
Día D columnas _j	b - 1	$SC_D = \frac{\sum y_j^2}{ac} - \frac{y^2}{abc}$	$MC_D = \frac{SC_D}{b - 1}$	$\frac{MC_D}{MC_{AD}}$	$\frac{g.l._D}{g.l._{AD}}$	$F_D \leq F_{0.95_D}$
Interacción AD anal/día ij	(a-1)(b-1)	$SC_{AD} = \frac{\sum y_{ij}^2}{c} - \frac{\sum y_i^2}{bc} - \frac{y^2}{abc} - \frac{\sum y_j^2}{ac}$	$MC_{AD} = \frac{SC_{AD}}{(a-1)(b-1)}$	$\frac{MC_{AD}}{MC_E}$	$\frac{g.l._{AD}}{g.l._E}$	$F_{AD} \leq F_{0.95_{AD}}$
Error k experimental	ab(c - 1)	$SC_E = \sum y_{ijk}^2 - \frac{\sum y_{ij}^2}{c}$	$MC_E = \frac{SC_E}{ab(c-1)}$			

Dónde: $i = 1 \dots a$, $j = 1 \dots b$, $k = 1 \dots c$.

Tabla de analisis de varianza (ANADEVA) para factores aleatorios.

VII RESULTADOS

METODO ESPECTROFOTOMETRICO

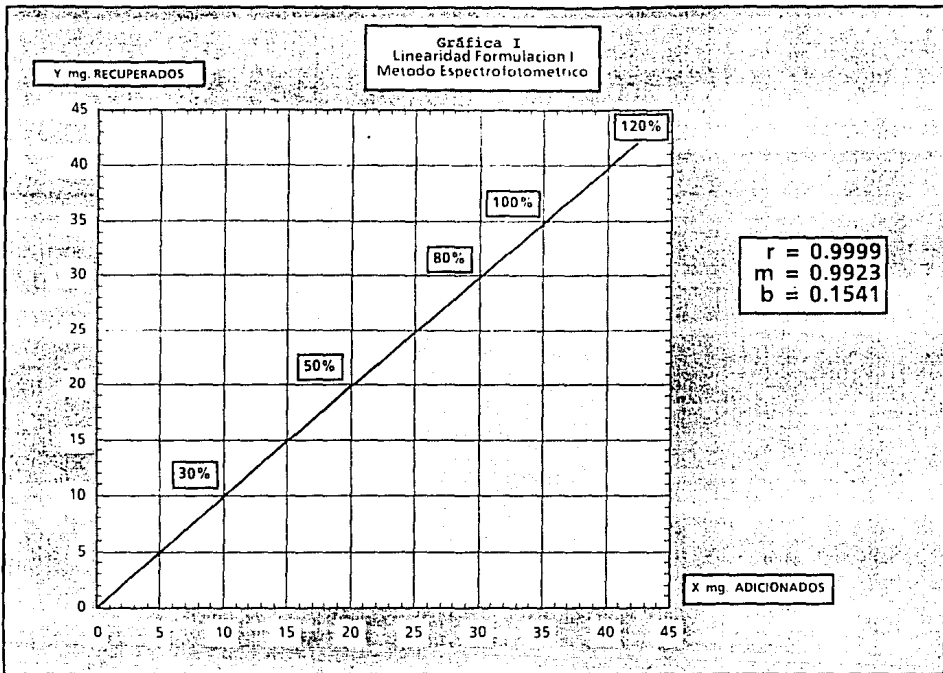
FORMULACION I

RESULTADOS 1:

$\%$	X ADICIONADOS mg	Y RECUPERADOS mg	$\%$
30	10.83	11.19	103.32
50	18.05	18.41	101.99
80	28.83	29.59	102.49
100	36.09	32.17	102.99
120	43.34	44.78	103.33

$r = 0.9999$
 $m = 0.9923$
 $b = 0.1541$
 $\bar{X} = 102.82\%$
 $S = 0.5733$

TABLA I
LINEARIDAD
(Ver Gráfica I)



FORMULACION II

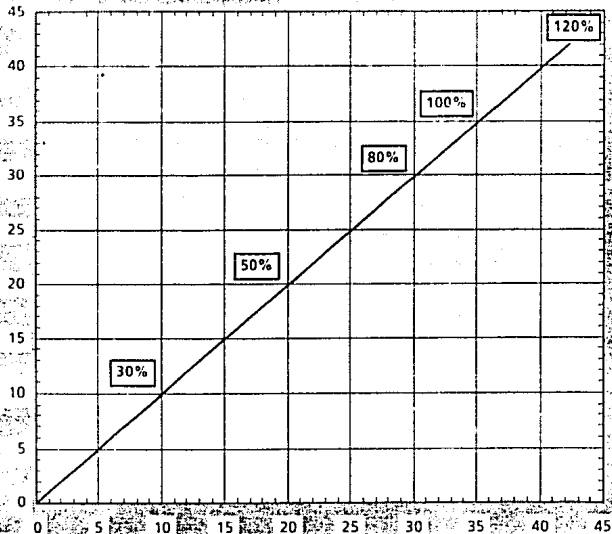
%	X ADICIONADOS mg	Y RECUPERADOS mg	%
30	10.83	11.55	106.65
50	18.05	18.05	100.00
80	28.87	29.59	102.49
100	36.09	37.17	102.59
120	43.34	44.78	103.33

$r = 0.9996$
 $m = 0.9924$
 $b = 0.051$
 $\bar{X} = 103.09\%$
 $S = 2.3788$

TABLA II
LINEARIDAD
(Ver Gráfica II)

Gráfica II
Linealidad Formulación II
Metodo Espectrofotometrico

Y mg. RECUPERADOS



$r = 0.9999$
 $m = 0.9924$
 $b = 0.051$

X mg. ADICIONADOS

RESULTADOS 2: METODO ESPECTROFOTOMETRICO

%	X ADICIONADOS	FORMULACION I RECUPERADOS		FORMULACION II RECUPERADOS	
	mg	mg	%	mg	%
80	28.87	28.51	98.75	28.15	97.50
80	28.87	28.51	98.75	28.15	97.50
80	28.87	28.51	98.75	28.15	97.50
80	28.87	28.15	97.50	28.51	98.75
80	28.87	28.15	97.50	28.87	100.00
100	36.09	35.37	98.00	35.37	98.00
100	36.09	35.37	98.00	35.37	98.00
100	36.09	35.37	98.00	35.37	98.00
100	36.09	35.37	98.00	35.37	98.00
100	36.39	35.57	98.00	35.37	98.00
120	43.34	42.26	97.50	41.89	96.67
120	43.34	42.62	98.33	42.26	97.50
120	43.34	42.62	98.33	42.26	97.50
120	43.34	42.62	98.33	42.26	97.50
120	43.34	42.62	98.33	42.62	98.33

\bar{X} = 98.14%	\bar{X} = 97.92%
S = 0.4299	S = 0.9116
%Cv = 0.4380	%Cv = 0.9310
E st = 0.1110	E st = 0.1931
I.C = 98.14 ± 0.1954	I.C = 97.92 ± 0.3398

TABLA III
PRECISION Y EXACTITUD

Precisión: Método Espectrofotométrico para la formulación I.

$$H_0 = \sqrt{v_1} = \sqrt{v_2}$$

$$H_1 = \sqrt{v_1} \neq \sqrt{v_2}$$

$$\sqrt{v} = 2$$

$$D.E = 0.4299$$

$$g.l = n-1 = 14$$

$$\alpha = 0.05, 1-\alpha/2 = 0.975, \alpha/2 = 0.025, \chi_{14}^2 = 26.12$$

tablas

$$\chi_{14}^2 = 0.6468$$

calculada

Por lo tanto: χ_{14}^2 calculada es menor que χ_{14}^2 tablas, con lo

se cumple la hipótesis nula donde $\sqrt{v_1} = \sqrt{v_2}$, siendo éste método

preciso.

Precisión: Método Espectrofotométrico para la formulación II.

$$H_0 = \sqrt{v_1} = \sqrt{v_2}$$

$$H_1 = \sqrt{v_1} \neq \sqrt{v_2}$$

$$\sqrt{v} = 2$$

$$D.E = 0.9116$$

$$g.l = n-1 = 14$$

$$\alpha = 0.05, 1-\alpha/2 = 0.975, \alpha/2 = 0.025, \chi_{14}^2 = 26.12$$

tablas

$$\chi_{14}^2 = 2.9100$$

calculada

Por lo tanto: χ_{14}^2 calculada, es menor que χ_{14}^2 tablas, con lo

que se cumple la hipótesis nula donde $\sqrt{v_1} = \sqrt{v_2}$, siendo éste método preciso.

Exactitud: Método Espectrofotométrico para la Formulación I.

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = 100\%$$

$$H_1 = \mu_1 = \mu_2 = 100\%$$

$$D.E = 0.4299$$

$$\bar{x} = 98.14\%$$

$$g.l = n-1 = 14$$

$$n = 15$$

$$\alpha/2 = 0.025, t_{\text{tablas}}^{\dagger} 2.51$$

$$t_{\text{calculada}} = 16.82$$

Por lo tanto: $t_{\text{calculada}}$, es mayor que t_{tablas} , con lo que se rechaza la hipótesis nula donde $\mu_1 = \mu_2$, cumpliéndose la hipótesis alternativa donde $\mu_1 = \mu_2$, siendo éste un método inexacto.

Exactitud: Método Espectrofotométrico para la formulación II.

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = 100\%$$

$$H_1 = \mu_1 = \mu_2 = 100\%$$

$$D.E = 0.9116$$

$$\bar{x} = 97.77\%$$

$$g.l = n-1 = 14$$

$$n = 15$$

$$\alpha/2 = 0.025, t_{\text{tablas}}^{\dagger} 2.51$$

$$t_{\text{calculada}} = 9.46$$

Por lo tanto: $t_{\text{calculada}}$, es mayor que t_{tablas} , con lo que se rechaza la hipótesis nula donde $\mu_1 = \mu_2$, cumpliéndose la hipótesis alternativa donde $\mu_1 = \mu_2$, siendo éste un método inexacto.

Reproducibilidad: Método Espectrofotométrico Formulación I

Fuente de Error (F V)	Grados de libertad (g.l.)	Suma de Cuadrados (SC)	Media de cuadrados (MC)	F calc	F tabl =0.05 F 0.095	Criterio de Aceptación
Analista A filas _i	(2-1) 1	14.08	14.08	0.9992	161.4	$F_{calc} \leq F_{tabl}$
Día D columnas _j	(2-1) 1	18.75	18.75	1.3307	161.4	$F_{calc} \leq F_{tabl}$
Interacción AD anal/día ij	(2-1)(2-1) 1	14.09	14.09	4.6967	5.3177	$F_{calc} \leq F_{tabl}$
Error k experimental	(2)(2)(3-1) 8	24.00	3.00	-	-	-

Tabla de analisis de varianza (ANAEVA) para factores aleatorios.

TABLA IV

Reproducibilidad: Método Espectrofotométrico Form. II.

A N A L I S T A

		i				
		I		2		
		103%		99%		
	$Y_{11.}$	103%		98%		$Y_{21.}$
D	I	100%		100%		$Y_{.1.}$
I	J	99%		97%		
A	2	102%		103%		$Y_{22.}$
	$Y_{12.}$	101%		99%		$Y_{.2.}$
		$Y_{1..}$		$Y_{2..}$		$Y = 1204$

Reproducibilidad: Método Espectrofotométrico formulación II.

Fuente de Error (F V)	Grados de libertad (g.l.)	Suma de Cuadrados (SC)	Media de cuadrados (MC)	F calc	F tabl =0.05 F 0.095	Criterio de Aceptación
Analista A filas _i	(2-1) 1	12.00	12.00	4.00	161.4	F _{calc} F _{tabl}
Día D columnas _j	(2-1) 1	1.00	1.00	0.33	161.4	F _{calc} F _{tabl}
Interacción AD anal/día ij	(2-1)(2-1) 1	3.00	3.00	0.77	5.3177	F _{calc} F _{tabl}
Error k experimental	(2)(2)(3-1) 8	31.00	3.90	-	-	- -

Tabla de analisis de varianza (ANAVEVA) para factores aleatorios.

TABLA V

RESULTADOS METODO POR CROMATOGRAFIA DE GASES

%	MG ADICIONADOS	FORMULACION I		FORMULACION II	
		MG RECUPERADOS	%	MG RECUPERADOS	%
20	64.58	61.96	- 95.94	62.53	- 96.83
60	193.74	191.92	- 99.06	189.93	- 98.02
80	258.32	254.45	- 98.50	253.29	- 98.05
100	322.90	325.45	- 100.79	323.88	- 100.30
120	387.48	391.21	- 100.96	394.50	- 101.81

$$r = 0.9998$$

$$m = 0.9799$$

$$b = 5.32$$

$$r = 0.9996$$

$$m = 0.9743$$

$$b = 6.87$$

TABLA VI- LINEARIDAD

2. Precisión y Exactitud: La precisión se determina como repetición y reproducibilidad. Para determinar la repetibilidad y exactitud se efectuó el análisis estadístico de los resultados obtenidos de 15 muestras y de 8 muestras para la determinación de la reproducibilidad en días y analistas diferentes.

%	MG ADICIONADOS	FORMULACION I		FORMULACION II	
		MG RECUPERADOS	%	MG RECUPERADOS	%
80	258.32	254.36	- 98.47	259.79	- 100.57
80	258.32	257.91	- 99.84	260.97	- 100.03
80	258.32	268.26	- 103.85	252.46	- 97.73
80	258.32	254.73	- 98.61	258.31	- 100.00
80	258.32	258.32	- 100.24	258.51	- 100.07
100	322.90	321.26	- 102.59	325.46	- 100.79
100	322.90	325.10	- 100.68	320.02	- 99.11
100	322.90	319.99	- 99.10	330.18	- 102.25
100	322.90	323.47	- 100.18	319.26	- 98.87
100	322.90	327.00	- 101.27	318.44	- 98.62
120	387.48	385.98	- 99.61	384.27	- 99.17
120	387.48	395.94	- 102.18	376.28	- 97.11
120	387.48	386.81	- 99.83	385.62	- 99.52
120	387.48	381.74	- 98.52	390.88	- 100.88
120	387.48	392.37	- 101.26	372.88	- 96.23

$$\bar{X} = 100.42\%$$

$$S = 1.5796$$

$$\text{Est.} = 0.41$$

$$\text{I.C.} = 100.42 \pm 0.72$$

$$\%C.V. = 1.5730$$

$$99.46\%$$

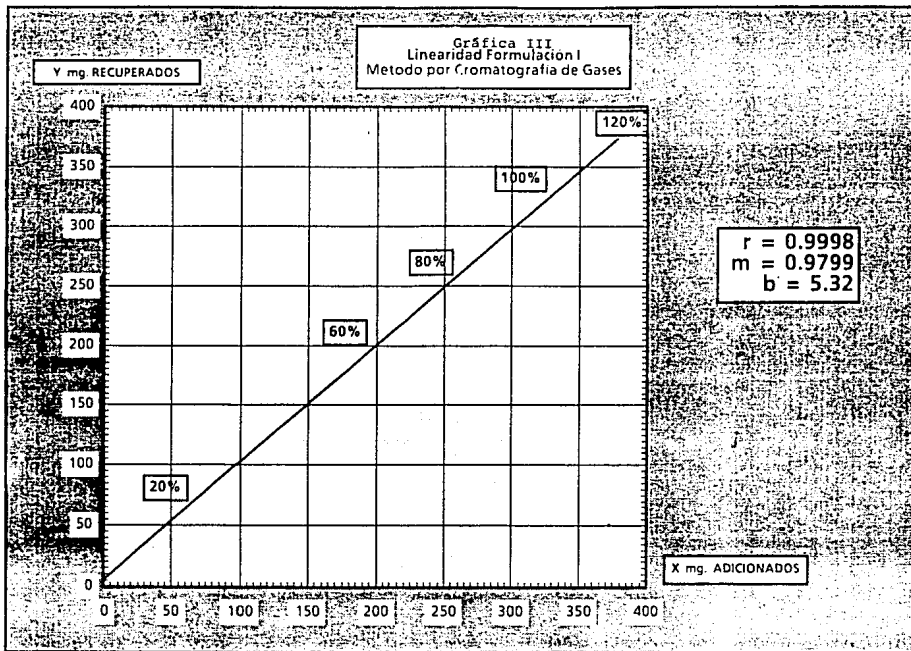
$$1.5562$$

$$0.42$$

$$99.46 \pm 0.74$$

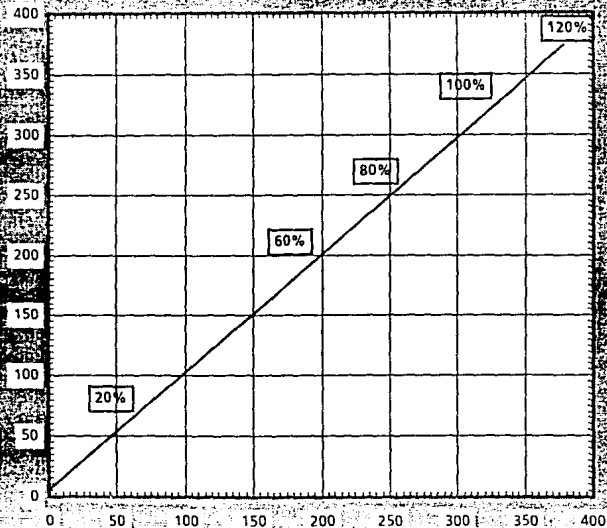
$$1.5646\%$$

TABLA VII



Gráfica IV
Linealidad Formulación II
Metodo por Cromatografía de Gases

Y mg. RECUPERADOS



$$r = 0.9996$$
$$m = 0.9743$$
$$b = 6.87$$

X mg. ADICIONADOS

Precisión: Método Cromatográfico para la Formulación I.

$$H_0 = \sqrt{V_1} = \sqrt{V_2}$$

$$H_1 = \sqrt{V_1} \neq \sqrt{V_2}$$

$$\sqrt{V} = 2$$

$$D.E = 1.5796$$

$$g.l = n-1 = 14$$

$$\alpha = 0.05, 1 - \alpha/2 = 0.975, \alpha/2 = 0.025, X_{i=26.12}^2_{\text{tablas}}$$

$$X_{i=5.52}^2_{\text{calculada}}$$

Por lo tanto $X_{i=5.52}^2_{\text{calculada}}$ es menor que $X_{i=26.12}^2_{\text{tablas}}$, con lo que se cumple la hipótesis nula donde $\sqrt{V_1} = \sqrt{V_2}$, siendo éste método preciso.

Precisión: Método Cromatográfico para la Formulación II.

$$H_0 = \sqrt{V_1} = \sqrt{V_2}$$

$$H_1 = \sqrt{V_1} \neq \sqrt{V_2}$$

$$D.E = 1.5562$$

$$g.l = n-1 = 14$$

$$\alpha = 0.05, 1 - \alpha/2 = 0.975, \alpha/2 = 0.025, X_{i=26.12}^2_{\text{tablas}}$$

$$X_{i=5.45}^2_{\text{calculada}}$$

Por lo tanto $X_{i=5.45}^2_{\text{calculada}}$, es menor que $X_{i=26.12}^2_{\text{tablas}}$, con lo que se cumple la hipótesis nula donde $\sqrt{V_1} = \sqrt{V_2}$, siendo éste método preciso.

Exactitud: Método Cromatográfico para la Formulación I.

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = 100\%$$

$$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2 = 100\%$$

$$D.E = 1.5796$$

$$\bar{X} = 100.42\%$$

$$g.l = n-1 = 14$$

$$n = 15$$

$$\alpha/2 = 0.025, t_{\text{tablas}}^+ 2.51$$

$$t_{\text{calculada}}^{+1.03}$$

Por lo tanto: $t_{\text{calculada}}$, es menor que t_{tablas} , con lo que se acepta: la hipótesis nula donde $\mu_1 = \mu_2$, y se rechaza la hipótesis alternativa donde $\mu_1 \neq \mu_2$, siendo éste un método exacto.

$$H_0 = u = u = 100\%$$

$$H_1 = u = u = 100\%$$

$$D.E = 1.5562$$

$$\bar{X} = 99.40\%$$

$$g.l = n-1 = 14$$

$$n=15$$

$$\alpha/2 = 0.025, t_{\text{tablas}}^+ 2.51$$

$$t_{\text{calculada}}^{-1.49}$$

Por lo tanto: $t_{\text{calculada}}$, es menor que t_{tablas} , con lo que se cumple la hipótesis nula donde $\mu_1 = \mu_2$, y rechazando la hipótesis alternativa donde $\mu_1 \neq \mu_2$, siendo éste un método exacto.

Reproducibilidad: Método Cromatográfico Form. I.

A N A L I S T A

1

I

2

	100%	100%
Y _{11.}	99%	101%
D I	99%	101%
I j	99%	100%
A 2	100%	101%
Y _{12.}	99%	99%

Y_{21.}

Y_{.1.}

Y_{22.}

Y_{.2.}

Y_{1..}

Y_{2..}

Y = 1198

Reproducibilidad: Método Cromatográfico Formulación I

Fuente de Error (F V)	Grados de libertad (g.l.)	Suma de Cuadrados (SC)	Media de cuadrados (MC)	F calc	F tabl =0.05 F 0.095	Criterio de Aceptación
Analista A filas _i	(2-1) 1	3.00	3.00	3.00	161.4	$F_{calc} \ll F_{tabl}$
Día D columnas _j	(2-1) 1	1.00	1.00	1.00	161.4	$F_{calc} \ll F_{tabl}$
Interacción AD anal/día _{ij}	(2-1)(2-1) 1	1.00	1.00	2.00	5.3177	$F_{calc} \ll F_{tabl}$
Error k experimental	(2)(2)(3-1) 8	4.00	0.50	-	-	-

Tabla de analisis de varianza (ANADEVA) para factores aleatorios.

Reproducibilidad: Método Cromatográfico Form. II.

A N A L I S T A

		I		2	
		1		2	
		I		I	
	$y_{11.}$	104%		101%	$y_{21.}$
		102%		99%	
D	I	98%		101%	$y_{.1.}$
I	j	100%		99%	
A	2	99%		99%	$y_{22.}$
	$y_{12.}$				
		100%		102%	$y_{.2.}$
		$y_{1..}$		$y_{2..}$	$y = 1204$

- 99 -

Reproducibilidad: Método Cromatográfico Formulaci3n II.

Fuente de Error (F V)	Grados de libertad (g.l.)	Suma de Cuadrados (SC)	Media de cuadrados (MC)	F calc	F tabl =0.05 F 0.095	Criterio de Aceptaci3n
Analista A filas _i	(2-1) 1	1.00	1.00	1.00	161.4	$F_{calc} \leq F_{tabl}$
Dia D columnas _j	(2-1) 1	3.00	3.00	3.00	161.4	$F_{calc} \leq F_{tabl}$
Interacci3n AD anal/dia ij	(2-1)(2-1) 1	1.00	1.00	0.29	5.3177	$F_{calc} \leq F_{tabl}$
Error k experimental	(2)(2)(3-1) 8	28.00	3.50	-	-	-

- 67 -

Tabla de analisis de varianza (ANAEVA) para factores aleatorios.

TABLA IX

Especificidad: Método Cromatográfico Form. I y II.

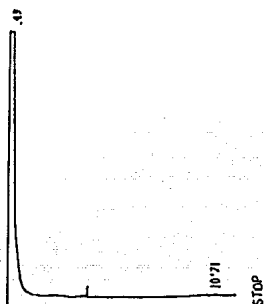


Fig. 12.- Cromatograma obtenido para el disolvente (Cloroformo) más reactivo de derivación.

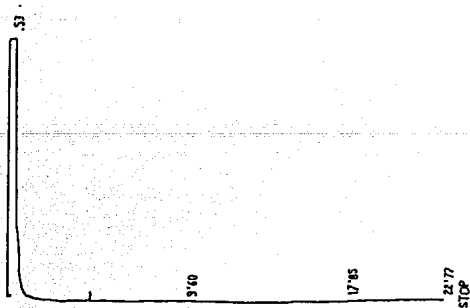


Fig. 13.- Cromatograma obtenido para el clorhidrato de oxicodona y clorhidrato de codeína más reactivo de derivación.

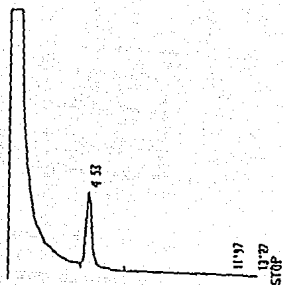


Fig. 14 .- Cromatograma obtenido para el ácido salicílico como producto de degradación.

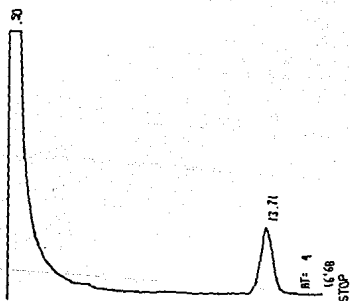


Fig. 15 .- Cromatograma obtenido para el Xanteno como estándar interno

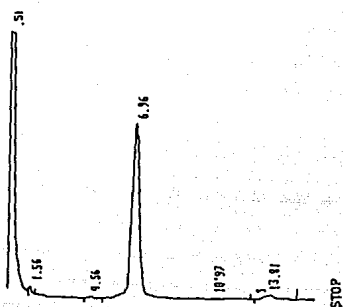


Fig. 16.- Cromatograma obtenido para la aspirina.

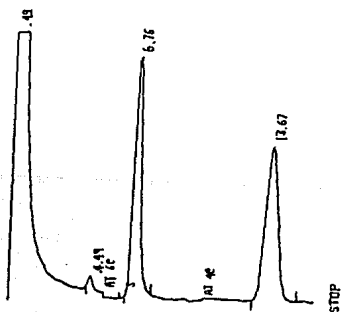


Fig. 17.- Cromatograma obtenido para la formulación completa más estándar interno.

T.R. = 4.49 = Ac. Salicílico

T.R. = 6.76 = Aspirina

T.R. = 13.67 = St. Interno (Xanteno)

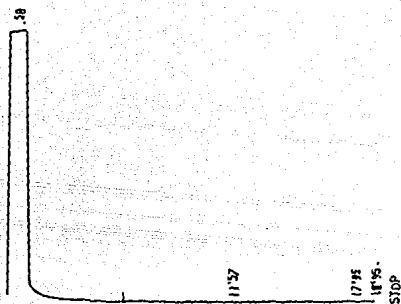


Fig. 18.- Cromatograma obtenido para el placebo de la Formulación I.

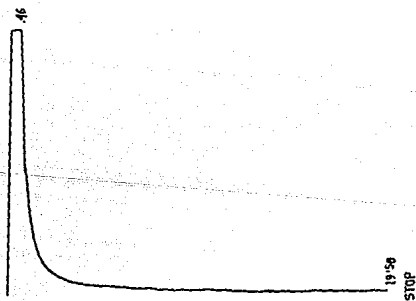


Fig. 19. - Cromatograma obtenido para el placebo de la Formulación II

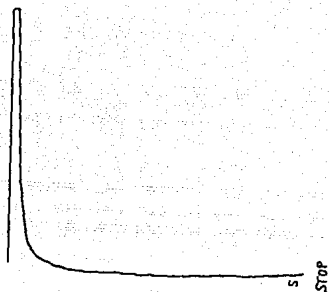


Fig.20.- Cromatograma obtenido para el placebo de aspirina, almacenado durante cuatro semanas a 60°C, para la formulación I.

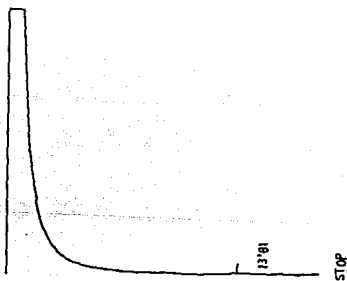


Fig21.- Cromatograma obtenido para el placebo de aspirina, almacenado durante cuatro semanas a 60°C, para la formulación II.

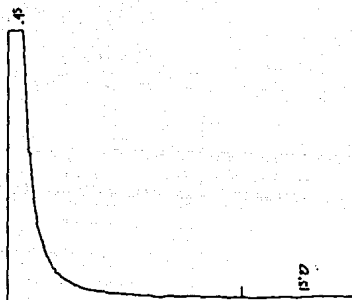


Fig.22.- Cromatograma obtenido para el placebo de aspirina almacenada en condiciones normales por un año. Formulación I.

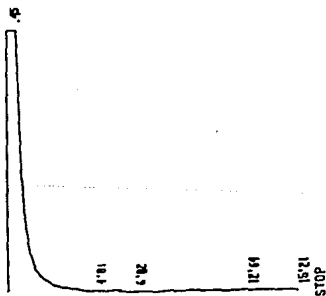


Fig.23.- Cromatograma obtenido para el placebo de aspirina, almacenado en condiciones normales por un año. Formulación II.

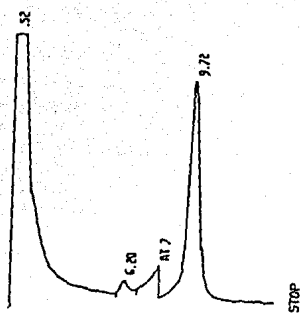


Fig. 24.-Cromatograma obtenido para aspirina almacenada durante un año en condiciones normales.
 T.R. = 6.28: Ac. Salicílico (Producto de degradación)
 T.R. = 9.72: Aspirina

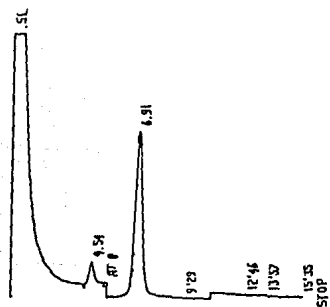


Fig. 25.-Cromatograma obtenido para aspirina almacenada durante cuatro semanas a 60°C.
 T.R. = 4.54: Ac. Salicílico (Producto de degradación)
 T.R. = 6.91: Aspirina

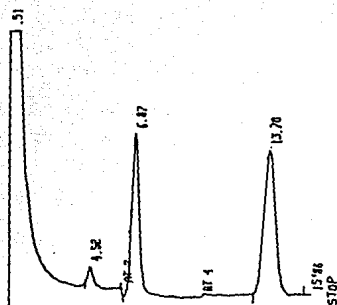


Fig. 26 -Cromatograma obtenido para la Formulación I, completa almacenada durante 1 año.

T.R. = 4.52: Ac. Salicílico (Producto de degradación)

T.R. = 6.87: Aspirina

T.R. =13.78: St. Interno (Xanteno)

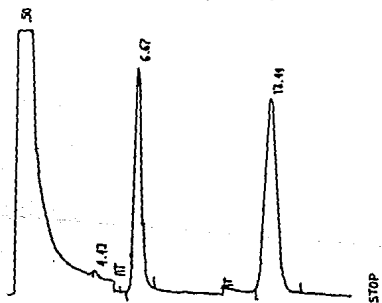


Fig.27 -Cromatograma obtenido para la Formulación II, completa almacenada durante un año.

T.R. = 4.43: Ac. Salicílico (Producto de degradación)

T.R. = 6.67: Aspirina

T.R. =13.44: St. Interno (Xanteno)

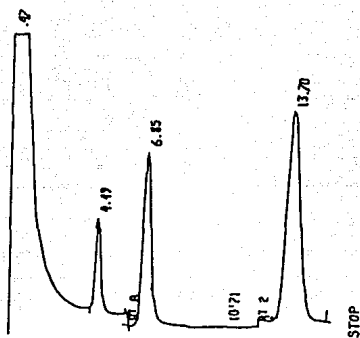


Fig. 28 --Cromatograma obtenido para la Formulación I, completa almacenada durante cuatro semanas a 60°C.

T.R. = 4.49: Ac. Salicílico (Producto de degradación)

T.R. = 6.85: Aspirina

T.R. = 13.70: St. Interno (Xanteno)

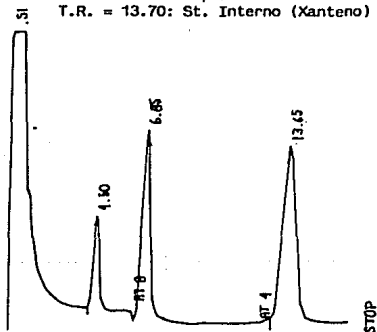


Fig. 29 --Cromatograma obtenido para la Formulación II, completa almacenada durante cuatro semanas a 60°C

T.R. = 4.50: Ac. Salicílico (Producto de degradación)

T.R. = 6.85: Aspirina

T.R. = 13.65: St. Interno (Xanteno)

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

Método Espectrofotométrico: Formulación I y II.

Se desarrolló un método analítico por Espectrofotometría-UV, para la determinación de ácido acetil salicílico en pruebas de disolución, para dos formulaciones (I y II), la formulación I contiene clorhidrato de codeína y la formulación II contiene clorhidrato de oxicodona además del ácido acetil salicílico como activos, éste método se validó para saber si son confiables, por lo que se evaluó: Linealidad, Precisión, Exactitud y Reproducibilidad.

Linealidad: La evaluación de esta mostró una tendencia lineal, ya que los valores encontrados para la pendiente (m), de las dos formulaciones I y II es de 0.9923 y 0.9924 respectivamente, así como el coeficiente de correlación (r), es de 0.9999 y 0.9996 respectivamente, siendo estos valores cercanos a 1, como criterio de aceptación para la linealidad, así también se encontró una ordenada al origen (b), de 0.1541 y 0.1510 respectivamente para las formulaciones I y II, lo que nos indica que la curva pasa cerca del origen, siempre a concentraciones mayores del 30% de lo etiquetado.

Precisión: De acuerdo a los resultados encontrados para la precisión (Repetibilidad), donde la $X^2_{\text{calculada}}$, como estadígrafo de contraste es de 0.6468 y 2.9100, para las formulaciones I y II respectivamente, siendo menor que la X^2_{tablas} , que es de 26.10, lo que demuestra que la hipótesis nula ($H_0 = 2$) se cumple con un coeficiente de variación de 0.4380 y 0.9310, con lo que se deduce que el método es preciso para ambas formulaciones.

Exactitud: Según los resultados obtenidos para la "t" de Student como estadígrafo de contraste para evaluar la exactitud del método para las formulaciones I y II, demuestra que la hipótesis nula ($H_0: \mu=100\%$), se rechaza, ya que el valor obtenido para la $t_{\text{calculada}}$, es de -16.82 y -9.46 respectivamente, siendo éste valor mayor que el establecido para t_{tablas} , que es ± 2.51 , por lo tanto el método es inexacto para las dos formulaciones.

Reproducibilidad: En cuanto a la realización del ensayo para el análisis de la reproducibilidad, por diferentes analistas, diferentes días, o un analista en diferentes días, es evaluado mediante la prueba de Fisher, que establece que la F_{tablas} , debe ser mayor que la obtenida de cálculo, por lo que se deduce? No existe interacción significativa entre analistas ya que la $F_{\text{calculada}}$, a partir de los datos experimentales es de 0.9992 y 4.0000 respectivamente para las formulaciones I y II, que son menores a la F_{tablas} , establecida con 1/1 grados de libertad que es de 161.4. No existe interacción significativa entre días diferentes ya que la $F_{\text{calculada}}$, es de 1.3307 y 0.3300 para las formulaciones I y II respectivamente que son menor al valor de F_{tablas} , establecido que es de 161.4 con 1/1 grados de libertad. Tampoco existe interacción significativa si el análisis se realiza por un analista en días diferentes ya que la $F_{\text{calculada}}$ es de.....

4.6967 y 0.7700, para las formulaciones I y II, siendo menor que la F_{tablas} , establecida con 1/8 grados de libertad que es de 5.3177.

Por lo tanto los resultados indican que el método es reproducible.

Método Cromatográfico: Formulación I y II

El método analítico desarrollado por cromatografía de gases es para la cuantificación del ácido acetil salicílico en pruebas de estabilidad, para dos formulaciones que contienen además como activos Formulación I, clorhidrato de codeína y la Formulación II, clorhidrato de oxycodona. Este método se valida para saber si es confiable para las dos formulaciones, por lo que se evalúa en el: Linealidad, Precisión, Exactitud, Reproducibilidad y Especificidad.

Linealidad: El análisis de resultados para evaluar la linealidad, demuestra que el método se comporta siguiendo una línea recta, ya que la pendiente (m), y el coeficiente de correlación (r), para las formulaciones I y II es de 0.9799 y 0.9743 para (m) respectivamente y para (r) es de 0.9998 y 0.9996 respectivamente para ambas formulaciones, estando estos valores cercanos a la unidad (1), con lo que se cumple el criterio de línea recta, aunado a esto tenemos que la ordenada al origen (b), tiene un valor de 5.32 y 6.87 respectivamente para las formulaciones I y II, lo que indica que la recta pasa cerca del origen, por lo tanto se concluye que el método para ambas formulaciones sigue una función lineal siempre bajo las condiciones en que fué desarrollado y a concentraciones entre el 20% y el 120% de lo etiquetado en el marbete.

Precisión: Los resultados obtenidos para la precisión (repetibilidad) donde X_1 es el estadígrafo de contraste, se tiene un resultado de 5.52 y 5.45 respectivamente para las formulaciones I y II, siendo menor que la X_{tablas} , establecida que es de 26.12, por lo que se acepta la hipótesis nula ($H_0 = 2$), con un coeficiente de variación de 1.5730 y 1.5646 respectivamente para la formulación I y II, por lo que se deduce que el método es preciso para las formulaciones I y II.

Exactitud: La prueba de t de Student como estadígrafo para determinar la exactitud del método para la formulación I y II, demuestra que la hipótesis nula ($H_0: u=100\%$), se acepta ya que el valor obtenido para $t_{\text{calculada}}$ es de 1.03 y -1.49, para la formulación I y II respectivamente, teniendo para la t_{tablas} , establecida un valor de -2.51 con un intervalo de confianza de 100.42 ± 0.72 y 99.46 ± 0.74 , para la formulación I y II respectivamente, por lo tanto el método se considera exacto, para ambas formulaciones.

Reproducibilidad: Para la realización de reproducibilidad del ensayo por diferentes analistas, diferentes días o un analista en diferentes días, evaluado mediante la prueba de F de Fisher, establece que esta debe ser mayor que la obtenida de cálculo, por lo que se deduce:

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

No existe interacción significativa entre analistas ya que la $F_{calculada}$, a partir de datos experimentales es de 3.00 y 1.00 para la formulación I y II, respectivamente que es menor que F_{tablas} , establecida de 161.4, con 1/1 grados de libertad.

No existe interacción significativa entre días diferentes ya que la $F_{calculada}$, es igual a 1.00 y 3.00, para la formulación I y II respectivamente, siendo menor que la F_{tablas} , establecida de 161.4, con 1/1 grados de libertad.

Tampoco existe interacción significativa si el análisis se realiza por un analista en días diferentes ya que la $F_{calculada}$, es de 2.00 y 0.29, para la formulación I y II, respectivamente, siendo menor que la F_{tablas} , establecida de 5.3177, con 1/8 grados de libertad. Por lo tanto los resultados demuestran que el método es reproducible.

Especificidad: El análisis realizado para evaluar la especificidad del método, para la formulación I y II, muestran en los cromatogramas (Ver fig. 20-23, pag.68,69) que no existe interferencia alguna por parte de los placebos de aspirina de la formulación I y II, sometidos durante 4 semanas a 60°C y a un año a temperatura ambiente (De 15° a 30°C). El ácido acetil salicílico como materia prima almacenado por un año a temperatura ambiente (De 15° a 30°C) y durante 4 semanas a 60°C, se observa en los cromatogramas (Ver fig. 24 y 25, pag.70) un pico pequeño correspondiente al ácido salicílico como producto de degradación, apareciendo este a un tiempo de retención menor que el del pico principal que es del ácido acetil salicílico, sin que estos se superpongan.

Al analizar las formulaciones completas I y II almacenadas a temperatura ambiente (De 15° a 30°C) los cromatogramas obtenidos muestran (Ver fig. 26 y 27, pag.71) que el tamaño del pico del ácido salicílico no es mayor que el de la formulación I y II, almacenadas a 60°C por 4 semanas (Ver fig. 28 y 29, pag.72), por lo que se deduce que este método puede servir como indicador de estabilidad, ya que el producto de degradación principal no interfiere con el pico del ácido acetil salicílico y es cuantificable.

Por lo tanto se deduce que el método para la formulación I y II es específico como método indicadur de estabilidad.

IX. CONCLUSIONES

Se desarrollaron dos métodos analíticos para la determinación cuantitativa de ácido acetil salicílico, uno por Espectrofotometría-UV y uno por Cromatografía de gases para dos formulaciones diferentes, estos dos métodos se validaron para cada una de las formulaciones (4 validaciones), con el objeto de evaluar si eran lineales, precisos (repetibles), exactos, reproducibles y solo para el de cromatografía específico.

Para el método Espectrofotométrico se encontró que es Lineal, Preciso, "inexacto", y Reproducible, en las condiciones en que fué desarrollado para las dos formulaciones, aquí cabe hacer notar que la exactitud se podría estar viendo afectada por la falta de linealidad del sistema, ya que durante el desarrollo y validación del método se presentaron algunos problemas de tipo técnico con el equipo, el cual puede ser la fuente de error principal para la exactitud del método, ya que otras fuentes pudieran ser, la agitación de las muestras, el material usado, la falta de exactitud en las medidas volumétricas etc.

Para el método desarrollado por cromatografía de gases para las dos formulaciones, cada una de las pruebas evaluadas para la validación del método analítico resultaron ser satisfactorias. Por lo que se concluye que el método analítico para cuantificar ácido acetil salicílico por cromatografía de gases para pruebas de estabilidad es válido bajo las condiciones en que se desarrolló y válido.

Si se quisiera utilizar el método Espectrofotométrico en un trabajo posterior, se recomienda se valide el sistema y se repita la exactitud del método o se valide nuevamente ya que el método deja entrever que puede ser inexacto por problemas con el sistema con que fué evaluada la validación, además es un método que se antoja práctico, muy sencillo de llevar a cabo.

X. BIBLIOGRAFIA

1. Hellman, J., "Enciclopedia Teórica y Práctica", primera edición, Editorial Continental, México 1980, pp. 347,348,1687-1761,2360.
2. Hanson, A. W., "Handbook of Dissolution Testing", primera edición, Editorial Pharmaceutical Technology Publications, Springfield, Oregon 1981.
3. Carstensen, J.; Lesson, L., "Dissolution Technology", primera edición, Editorial Whitlock Press, Inc., Washington, U.S.A. 1974.
4. "The United States Pharmacopeia" U.S.A XX, NF XV., Editorial United States Pharmacopeia Convention, Inc., U.S.A. 1980, pp. 57,58,958-960.
5. Columbo, M. B., "Control of Physical Properties in Pharmaceutical Forms", primera edición, Editorial Organizzazione Editoriale Médico Farmacéutica, Milan, Italia 1976, pp. 154-159.
6. Lachman, L. H., et. al., "The theory and Practice of Industrial Pharmacy", segunda edición, Editorial Lea & Febiger, Philadelphia 1976.
7. Remingtons., et. al., " Pharmaceutical Science", primera edición Editorial Mack Publishing Co. Pennsylvania 1970, pp. 1463-1477.
8. Kaning, L. J.; Rudnic, M. E., "The Mechanisms of Desintegrant Action", Pharmaceutical Technology, Apr. 1984, pp. 50-58. Vol.8 No. 4.
9. Klaus, F., et. al., "Analytical Profiles of Drugs Substances", primera edición, Editorial Academic Press, New York, San Francisco, London 1979, pp. 1-4.
10. "The Merck Index", decima edición, Editorial Published Merck U.S.A. 1983, pp. 123.
11. Bonelly, J. E., "Basic Gas Chromatography", primera edición, Editorial Varian Instrument, U.S.A., Canada, Australia, Japón 1968.
12. Willard, A. H., "Métodos Instrumentales de Análisis", primera edición, Editorial Continental, México, España, Brazil, Ecuador, Uruguay, Venezuela 1983, pp. 562-600.
13. Skoog, A. D.; West, M. D., "Análisis Instrumental", primera edición, Editorial Interamericana, México, España, Brazil, Ecuador, Uruguay, Venezuela 1983.

14. Csaba, H., et. al., "High Performance Liquid Chromatography Advances and Perspectives", Editorial Academic Press, New York, London, Toronto, San Francisco 1980, Vol. I, II y III.
15. Chemical, R., et. al., "Auser's Guide Chromatography, Gas, Liquid, TLC, Inovative Products and Technical Support", primera edición Editorial Regis Chemical Co., Austin Mouton Grove 1976.
16. Kenneth, A.; Connors, A., "Texbook of Pharmaceutical Analysis" primera edición, Editorial John Wiley & Sons, Inc., New York, London, Sydney 1967, pp. 308-366.
17. Zuno Pérez Martha., " Desarrollo y Validación de Métodos Analíticos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para la determinación cuantitativa de Dipirona magnesica contenida en diferentes formas Farmacéuticas", Tesis Profesional, U.A.G., Ciencias Químicas, México 1983.
18. Loftus, B. T.; Nesh, R. A., "Pharmaceutical Process Validation", primera edición, Editorial Marcel Dekker, Inc., New York, 1983, pp. 35-59, 110-208.
19. Wayne, W. D., "Bioestadística", cuarta reimpresión, Editorial Limusa, México 1983, pp. 155-289.
20. Fraser, D. A. S., "Fundamentos y Técnicas de la Inferencia Estadística" primera edición, Editorial Limusa, México 1976.
21. Clark, A. K., "Determination of the Descomposition of Aspirin", Journal Pharmaceutical Science, August 1970, pp. 1053-1055, Vol.59, No. 8.
22. Truitt, E. B.; Morgan, A. M., "Gastrointestinal Factors in Aspirin Absorption", Journal of Pharmaceutical Sciences, 1964, Vol. 53, pp. 129-134.
23. Levy, G., "Clinical Pharmacokinetics of Aspirin", Pediatrics, 1978, Vol. 62, pp. 867-872.
24. Rowland, M.; Riegelman, S.; Harris, Ph. A., "Absortion Kinetics of Aspirin in man Following oral Administration of an aqueous Solution", Journal of Pharmaceutical Science, 1972, Vol. 61, pp. 379-385.
25. Material de Apoyo al curso, "Validación de Métodos Analíticos", impartido por: Q.F.B. Alejandro Alcantara P. y Q.F.B Juan F. Sánchez R. Asociación Farmacéutica Mexicana A.C., México D.F. Julio 1987.
26. Román, G. F., "Validación de Procesos para Productos Farmacéuticos no estériles", Rev. Méx. Ciencias Farmacéuticas., 18 (3), 1987, pp. 2-12.

27.- Cartensen, J. T.; Kathari, R., "Dependent of time and Temperature in the desintegration and Correlation between the constant of rate of Dissolution and Desintegration", Journal Pharmaceutical Science, March. 1980, pp. 290-293, Vol. 69, No. 3.

28.- Cartensen, J. T.; Zoglio, A. M., "Correlation between Dissolution and Desintegration", Journal Pharmaceutical Science, February 1983, pp. 208, 209, Vol 72, No 2.

29.- Shapiro Lilian., "Estudio Comparativo del efecto de diversos materiales de recubrimiento sobre la velocidad de cristales de Aspirina en Capsulas", Tesis Profesional, U.N.A.M. Ciencias Químicas, México 1974, pp. 128.

30.- Wagner, J. G., "Biopharmaceutics Absorption Aspects", Journal Pharmaceutical Science, May. 1961, pp.359-387, Vol. 50, No. 5.

XI. ANEXOS

I N D I C E D E F I G U R A S

Figura	Nombre	Página
1	Eventos involucrados en la disolución y absorción de un fármaco contenido en una forma de dosificación sólida.	3
2	Representación esquemática del proceso de disolución y absorción "in vivo" del ácido acetil salicílico en tabletas.	5
3	Representación esquemática de los componentes básicos de un Espectrofotómetro.	9
4	Tipos de Cromatografía.	12
5	Cromatograma de dos componentes.	14
6	Resolución de dos componentes.	16
7	Figura esquemática de un detector de Ionización de flama.	21
8	Espectro de una dispersión de Aspirina en Bromuro de Potasio.	29
9	Espectro de una solución de Aspirina en Cloroformo	30
10	Espectros obtenidos para los placebos de Aspirina de la formulación I y II.	36
11	Espectro correspondiente a la Aspirina y al Acido Salicílico, donde se muestra el punto Isobéctico a 265 nm.	38
12	Cromatograma obtenido para el Cloroformo como disolvente más reactivo de derivación.	64
13	Cromatograma obtenido para el Clorhidrato de Oxidona y Clorhidrato de Codefina más reactivo de derivación.	64
14	Cromatograma obtenido para el Acido Salicílico.	65
15	Cromatograma obtenido para el Xanteno.	65
16	Cromatograma obtenido para la Aspirina.	66

Figura	Nombre	Página
17	Cromatograma obtenido para la formulación completa más estándar interno.	66
18	Cromatograma obtenido para el placebo de la formulación I.	67
19	Cromatograma obtenido para el placebo de la formulación II.	67
20	Cromatograma obtenido para el placebo sometido a 60°C por cuatro semanas de la formulación I.	68
21	Cromatograma obtenido para el placebo sometido a 60°C por cuatro semanas de la formulación II.	68
22	Cromatograma obtenido para el placebo sometido a temperatura ambiente (De 15 a 30°C) por un año de la formulación I.	69
23	Cromatograma obtenido para el placebo sometido a temperatura ambiente (De 15 a 30°C) por un año de la formulación II.	69
24	Cromatograma obtenido para Aspirina almacenada durante un año a temperatura ambiente (De 15 a 30°C).	70
25	Cromatograma obtenido para Aspirina sometida durante cuatro semanas a 60°C.	70
26	Cromatograma obtenido para la formulación I completa almacenada por un año a temperatura ambiente (De 15 a 30°C).	71
27	Cromatograma obtenido para la formulación II completa almacenada por un año a temperatura ambiente (De 15 a 30°C).	71
28	Cromatograma obtenido para la formulación I completa sometida por cuatro semanas a 60°C.	72
29	Cromatograma obtenido para la formulación II completa sometida por cuatro semanas a 60°C.	72

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica	Nombre	Página
I	Linealidad de la Formulación I por el Método Espectrofotométrico.	45
II	Linealidad de la Formulación II por el Método Espectrofotométrico.	47
III	Linealidad de la Formulación I por el Método Cromatográfico.	56
IV	Linealidad de la Formulación II por el Método Cromatográfico.	57

INDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama	Nombre	Página
1	Diagrama para la elección del Método de Separación en función del peso Molecular	24
2	Diagrama para la elección de proceso Cromatográfico en función de la polaridad y el número de grupos funcionales.	25
3	Diagrama como Criterio de elección del tipo de Cromatografía.	26

INDICE DE TABLAS

Tabla	Nombre	Página
I	Resultados de la Linearidad de la Formulación I por el Método Espectrofotométrico.	44
II	Resultados de la linearidad de la Formulación II por el Método Espectrofotométrico.	46
III	Resultados de la Precisión y Exactitud de la Formulación I y II por el Método Espectrofotométrico.	48
IV	Resultados de Reproducibilidad de la Formulación I por el Método Espectrofotométrico.	52
V	Resultados de la Reproducibilidad de la Formulación II por el Método Espectrofotométrico.	54
VI	Resultados de Linearidad de la Formulación I y II por el Método Cromatográfico.	55
VII	Resultados de Precisión y Exactitud de la Formulación I y II por el Método Cromatográfico.	55
VIII	Resultados de Reproducibilidad de la Formulación I por el Método Cromatográfico.	61
IX	Resultados de la Reproducibilidad de la Formulación II por el Método Cromatográfico.	63