

18  
2ej-



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
ZARAGOZA**

**" IMPLEMENTACION Y VALIDACION DE UN METODO  
ANALITICO PARA LA CUANTIFICACION DE ACIDO  
ACETILSALICILICO EN TABLETAS SOLUBLES,  
POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE  
ALTA RESOLUCION "**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
**P R E S E N T A :**  
**TERESA ESCALANTE MORALES**

**MEXICO, D. F.**

**1992**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# I N D I C E

	No. pág.
INTRODUCCION.	
I. ACIDO ACETILSALICILICO.	
A. Nombres químicos.....	1
B. Formulas: Condensada y Desarrollada.....	1
C. Propiedades fisicoquímicas .....	1
D. Propiedades farmacológicas .....	1
1. Absorción, distribución, biotransformación y excreción .....	2
2. Toxicidad.....	3
3. Dosis y vías de administración .....	4
4. Presentaciones .....	5
II. CROMATOGRAFIA.	
A. Consideraciones generales .....	6
B. Antecedentes históricos .....	6
C. Clasificación .....	9
1. En base a la naturaleza de la fase móvil..	10
2. Considerando los procesos de separación ..	10
a. Cromatografía de adsorción .....	10
b. Cromatografía de partición .....	11
c. Cromatografía de intercambio iónico..	11
3. Según la polaridad relativa de las fases..	12

a.	Fase normal .....	12
b.	Fase reversa .....	13
D.	Cromatografía líquida .....	14
E.	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución...	16
F.	Términos más utilizados en CLAR .....	18
1.	Tiempo de retención (TR) .....	19
2.	Tiempo muerto (TM) .....	19
3.	Tiempo de retención corregido o relativo (TR') .....	19
4.	Factor de capacidad (k) .....	20
5.	Factor de selectividad ( $\alpha$ ) .....	20
6.	Número de platos teóricos (N) .....	22
7.	Altura equivalente a un plato teórico (HEPT) .....	23
8.	Eficiencia de la columna .....	24
9.	Ecuación de resolución .....	24
G.	Componentes de un cromatógrafo de líquidos ...	26
1.	Fase móvil .....	27
2.	Sistema de bombeo .....	28
a.	Bombas mecánicas .....	29
1)	Recíprocas .....	29
2)	De desplazamiento continuo .....	30
b.	Bombas neumáticas .....	31
3.	Dispositivos de inyección.....	32

4.	Precolumnas .....	33
5.	Columnas .....	33
	a. Fases estacionarias .....	34
6.	Detectores .....	36
	a. De índice de refracción .....	38
	b. De luz ultravioleta .....	38
	c. De fluorescencia .....	40
III.	VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.	
A.	Definiciones .....	42
1.	Validación .....	42
2.	Linealidad .....	44
3.	Precisión .....	45
	a. Repetibilidad.....	45
	b. Reproducibilidad .....	45
4.	Especificidad frente a excipientes .....	46
5.	Exactitud .....	46
6.	Estabilidad de la muestra .....	46
7.	Tolerancia del sistema .....	47
8.	Límite de detección .....	47
9.	Límite de cuantificación .....	47
10.	Placebo.....	48
11.	Placebo cargado .....	48
IV.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	49

V. OBJETIVOS .....	51
VI. HIPOTESIS .....	51
Material, reactivos y equipo .....	52
Método .....	53
VII . RESULTADOS .....	55
1. Evaluación de la linealidad del sistema .....	55
2. Evaluación de la precisión del sistema .....	59
3. Evaluación de la especificidad del método frente a excipientes .....	60
4. Evaluación de la linealidad del método .....	65
5. Evaluación de la exactitud del método .....	69
6. Evaluación de la reproducibilidad del método ..	71
7. Evaluación de la estabilidad de la muestra ....	73
ANALISIS DE RESULTADOS .....	75
CONCLUSIONES .....	78
ANEXO .....	79
BIBLIOGRAFIA .....	

## I N T R O D U C C I O N

Gracias a los avances tecnológicos en los equipos y en los métodos analíticos, hoy en día es posible controlar la calidad de los medicamentos para asegurar que estos reúnen las características adecuadas al ejercer su actividad terapéutica. Por tal motivo, en la industria farmacéutica surge la necesidad de validar todos los métodos analíticos utilizados en la determinación de sustancias o principios activos con el propósito de asegurar dicha calidad.

La validación del método analítico permite evaluar implícitamente su variación o error a través de parámetros estadísticos como son: linealidad, precisión, exactitud, reproducibilidad y especificidad entre otros, de aquí se obtiene la información de la confiabilidad del método utilizado para el análisis del o los principios activos, ya sea en una forma farmacéutica o como materia prima.

Hablando en términos generales, se conocen básicamente cuatro métodos para la cuantificación de Acido Acetilsalicílico. Sin embargo, estos métodos no son específicos ya que de algún modo u otro se basan

en la cuantificación a través del producto de degradación, o bien a través de propiedades ácido-base.

Por otro lado, y en fechas recientes, se presentó un método oficial por CLAR (16), de acuerdo al cual se puede cuantificar al mismo tiempo tanto Acido Acetilsalicílico, como el Acido Salicílico. Sin embargo, al tratar de reproducir dicho método con los recursos y el equipo con que se contaba en el laboratorio, se verificó que existen problemas como son: falta de resolución, la cantidad de muestra no es la indicada para dar una buena respuesta del detector, se utiliza un reactivo que además de ser caro es de importación, lo cual, dado el gran número de análisis que se efectúan para éste producto, aumentan el costo y retrasan dicho análisis.

Por lo antes expuesto, a este último método se le hicieron algunas modificaciones para adaptarlo a las condiciones y necesidades del laboratorio.

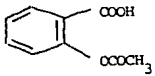


I. ACIDO ACETILSALICILICO.

A. NOMBRES QUIMICOS.

1. Aspirina
2. Acido Acetilsalicílico
3. Acetato del Acido Acetilsalicílico
4. Acido 2-(acetiloxi)-benzoico
5. Acido 2-acetoxibenzoico

B. FORMULAS: CONDENSADA Y DESARROLLADA.



PM= 180.16

C. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS.

Cristales blancos o polvo cristalino, inodoro o con ligero olor a ácido acético, p.f. 135° C, p. de solidificación. 118°C, es estable en el aire seco, pero se hidroliza gradualmente en contacto con la humedad dando ácido acético y ácido salicílico. Un gramo se disuelve en: 300 ml de agua; en 5 ml de alcohol; en 17 ml de cloroformo y en 10 ml de éter. Se descompone con agua caliente o cuando se disuelve en soluciones alcalinas.(17)

D. PROPIEDADES FARMACOLOGICAS.

El Acido Acetilsalicílico (AAS) es un fármaco sintético, derivado del Acido salicílico (AS). Se

considera como el prototipo de los analgésicos no narcóticos y constituye el fármaco de referencia para la evaluación de otros agentes que comparten sus efectos, posee actividad analgésica antiinflamatoria y antipirética. Es un eficaz inhibidor de la síntesis de prostaglandinas (PG), varios de sus efectos se atribuyen a esta propiedad; inhibe la agregación plaquetaria e incrementa el tiempo de sangrado; estabiliza los lisosomas y reduce la permeación capilar. Desacopla la fosforilación oxidativa y reduce las alteraciones en el equilibrio ácido-base. A dosis altas posee efecto uricosúrico e hipoglucémico. Es irritante para la mucosa gástrica. Los efectos analgésico y antipirético implican mecanismos periféricos centrales, posiblemente a nivel de hipotálamo. Como analgésico alivia el dolor leve o moderado y su uso crónico no produce tolerancia ni dependencia (a diferencia de los analgésicos narcóticos).(17)

1. ABSORCIÓN, DISTRIBUCIÓN, BIOTRANSFORMACIÓN Y EXCRECIÓN. El ácido acetilsalicílico se absorbe bien por vía oral, parcialmente en el estómago y principalmente a nivel intestinal; las concentraciones plasmáticas son detectables a los 30 min, y son máximas a las 12 hrs posteriores a la administración oral.

Se distribuye ampliamente en el organismo, incluso en líquido sinovial, espinal y peritoneal; en la saliva y en la leche materna; penetra lentamente la barrera hematoencefálica pero atraviesa rápidamente la placenta. Se metaboliza rápidamente (vida media plasmática de 15 min.) en plasma e hígado a AS (metabolito activo) el cual se une en un 90% a las proteínas plasmáticas; este metabolito se conjuga con glicina(ácido salicílico) y una pequeña fracción se oxida a ácido gentísico. Se excreta principalmente por la orina como ácido salicílico (75%) y en menor grado como ácido salicílico (10%) y ácido gentísico (1%). El ácido salicílico presenta una cinética dependiente de la cantidad del Acido Acetilsalicílico, así el tiempo de vida media del AS es de 3 hrs. con dosis de 300 mg de AAS; se incrementa a 6 hrs con dosis de 1 gr y a 20 hrs con dosis de 20 gr de AAS. La excreción del AS y de sus metabolitos es dependiente del pH; en la orina alcalina se elimina hasta un 85% como salicilato libre, en tanto que en la orina ácida es de solo el 5%.(17)

2. TOXICIDAD. A dosis bajas la toxicidad es poco frecuente; sin embargo, las alteraciones más comunes son las gastro-intestinales (náusea, vómitos, gastritis o intestinal). Otras reacciones que dependen de la inhibición de la síntesis de PG son; inhibición

de la agregación plaquetaria y prolongación de la gestación o del trabajo de parto, así como la prolongación del tiempo de sangrado antes y después del parto o en intervenciones quirúrgicas. La toxicidad a dosis altas y repetidas de salicilatos (salicilismo) se manifiesta como cefalea, mareos, visión borrosa, cansancio, somnolencia, temblor, inquietud, sudoración, sed, zumbido de oídos y vértigo (esto a niveles plasmáticos de 200 ug/ml); hiperventilación (a 350 ug/ml), alcalosis respiratoria, acidez metabólica (a 500ug/ml), anemia, hepatotoxicidad reversible (de 200-400 ug/ml), hipoprotrombinemia, fiebre, coma, colapso cardiovascular e insuficiencia renal (de 400-900 ug/ml). Las reacciones de hipersensibilidad incluyen: ronchas o urticaria, rinitis, sinusitis, polipos nasales y asma. (17)

3. DOSIS Y VIAS DE ADMINISTRACION. Como analgésico y antipirético, las dosis para adulto es de 650 mg administrado cada 4 hrs, hasta un máximo de 3.9 gr al día. La dosis para niños varia según la edad: de 2-4 años es de 160 mg; de 4-6 años es de 200 mg; de 6-9 años es de 320 mg; de 9-11 años es de 400 mg y de 11 a 12 años es de 480 mg. Esta dosis se repite cada 4 hrs si es necesario. Como antiinflamatorio, para la artritis reumatoide o la fiebre reumática la dosis en

adultos es de 5-8 gr al día dividida de 4-6 tomas. En niños la dosis es de 100-125 mg/kg al día dividida de 4-6 tomas durante una semana, luego la dosis se reduce semanalmente hasta 60 mg/kg/día dividida de 4-6 tomas al día, hasta la desaparición de todos los signos antiinflamatorios. Si reaparecen, el tratamiento deberá reanudarse.(17)

4. PRESENTACIONES. Debido a la rápida hidrólisis que sufre con la humedad, el Acido Acetilsalicílico se encuentra solo en tabletas, tabletas efervescentes, capsúlas y grageas, con dosis que varían desde 65-650 mg, y supositorios que contienen de 65-1300 mg.(13,17)

## II. CROMATOGRAFIA.

### A. CONSIDERACIONES GENERALES.

La cromatografía es un técnica desarrollada a principios de siglo, que permite la separación de sustancias que se encuentran en una mezcla. En general es un proceso de migración diferencial en el cual, los componentes de dicha mezcla se transportan por una fase móvil y a la vez, se retienen selectivamente por una fase estacionaria. La afinidad relativa de los solutos por cada una de las fases debe ser reversible para asegurar la transferencia de masa durante la separación cromatográfica. (16)

### B. ANTECEDENTES HISTORICOS.

El antecedente más remoto de la cromatografía es el análisis capilar. En 1850 Runge analizó pigmentos vegetales depositando la muestra sobre papel filtro, observando que estos se separaban en anillos concéntricos de varios colores. (18)

En 1861 Schroenbeim cambio este método circular por el unidimensional sumergiendo un extremo de tira de

papel en la disolución. A esta técnica se le conoce en la actualidad como cromatografía en papel y se le ha utilizado también para separar proteínas e incluso bacterias.(18)

La cromatografía como técnica de separación fue descubierta por el botánico y químico ruso Mijail S. Tswett quien en el año de 1903 publica un trabajo en el cual se incluye la primera descripción del método, posteriormente, en 1906 publica otro que proporciona un informe detallado del método y sus aplicaciones. El propio Tswett eligió el nombre de "cromatografía" que significa "escritura de color", refiriéndose a las bandas de las diferentes sustancias coloreadas que logro separar sobre una columna de vidrio rellena de carbonato de calcio, en la cual, introdujo el extracto vegetal disuelto en éter de petróleo; a continuación agrego más éter de petróleo y observó que a medida que el solvente pasaba a través de la columna se separaban bandas de diferentes colores que correspondían a los carotenos, las clorofilas y las xantofilas. Después de Tswett, transcurrió un periodo relativamente largo durante el cual no tuvo lugar ningún avance esta técnica.(19)

En 1938 el bioquímico polaco Tadeus Reichstein obtuvo el cromatograma de flujo a partir de los

volumenes por unidad de tiempo que se requerían para que eluyeran las diferentes sustancias. Por sus trabajos sobre las hormonas de la corteza suprarrenal y la cortisona, obtuvo el premio Nobel de Medicina en 1950 (junto con E. Kendall y P. Hensch).(18)

En 1941 Martin y Synge introducen la cromatografía de reparto y sugirieron la posibilidad de utilizar un gas en la fase móvil del cromatógrafo.(18)

En 1952 Martin y James obtienen un logro particularmente importante en el desarrollo de la cromatografía de reparto gas-líquido utilizando una bureta automática para detectar y determinar los ácidos y bases; así el primer cromatógrafo de gases cubrió las necesidades de cuando menos dos grupos funcionales.(18)

En este mismo año, Alm efectúa la elusión por gradiente de polaridad del solvente.(18)

En 1953, Wheaton y Bauman observan el principio de exclusión.(18)

En 1954, Ray obtiene un cromatograma empleando un detector de conductividad térmica en cromatografía de gases.(18)

En 1959, Porath y Flodin desarrollan la cromatografía de exclusión en geles suaves de polidextranos, técnica que recibe el nombre de cromatografía de filtración en gel.(19)

En 1962, el químico norteamericano Moore efectúa



separaciones en geles rígidos de poliestireno, técnica que recibe el nombre de permeación en gel.(19)

Hasta fines de los 60's la cromatografía de gases era más popular que la de líquidos debido a que esta última requería de más tiempo por que se efectuaba en columnas abiertas a presión atmosférica, pero gracias al avance en la instrumentación y en los tipos de empaque de las columnas se logro la cromatografía de líquidos de alta resolución.(19)

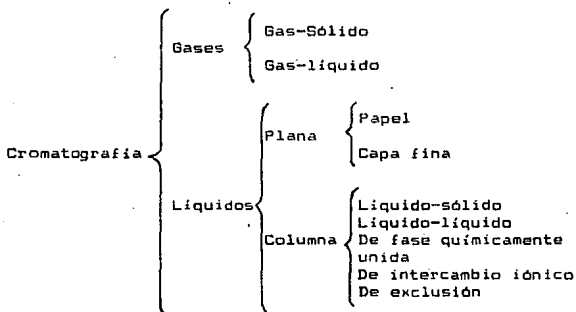
### C. CLASIFICACION.

Como ya se menciona, la cromatografía es un término general aplicado a una amplia gama de técnicas de separación que esencialmente se basan en la distribución de los componentes a separar entre las dos fases; una de ellas es la fase móvil, la cual puede ser un líquido o un gas y la otra es una fase estacionaria, la cual a su vez, puede ser un líquido o un sólido. El proceso cromatográfico tiene lugar como resultado de repetidas adsorciones o repartos durante el movimiento de los componentes de la muestra a lo largo del lecho estacionario, alcanzandose la separación gracias a las diferencias entre los coeficientes de distribución

de los distintos componentes de la muestra (18)

Tomando en cuenta varias consideraciones, la cromatografía se puede clasificar de cuatro diferentes formas:

1. Basándonos en la naturaleza de la fase móvil se divide en:



2. Considerando los procesos de separación se divide en:

a. CROMATOGRAFIA DE ADSORCION. La fase estacionaria es un sólido que funge como adsorbente y la fase móvil puede ser un liquido o un gas; la separación se basa en repetidas etapas de adsorción y

desorción; una partícula se fija a otra superficialmente sin penetrar en ella a través de puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals.

El grado de separación depende por lo tanto notablemente de la superficie activa del sólido y en consecuencia, el tamaño de partícula sólida que se emplea debe ser lo más pequeña posible para tener mayor superficie activa en relación al volumen del empaque.(9)

b. CROMATOGRAFIA DE PARTICION. La fase estacionaria es un líquido que se mantiene fijo por adsorción sobre un sólido poroso e inerte, en tanto que la fase móvil es un gas o un líquido. En este tipo de cromatografía la fase estacionaria está saturada por la fase móvil, de tal manera que la separación se efectúa entre dos fases debido a las diferencias de afinidad de los componentes por cada una de las dos fases, esto es, a sus diferencias en sus coeficientes de reparto.(9)

c. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO. El lecho estacionario tiene una superficie cargada iónicamente, con carga contraria a la de la muestra. Esta técnica se usa casi exclusivamente con muestras iónicas o ionizables. Cuanto mayor sea la carga de la muestra,

más fuertemente será atraída hacia la superficie iónica y, por tanto, más tiempo tardará en ser eluida. La fase móvil generalmente es una solución amortiguadora, en la que el pH y la polaridad se utilizan para controlar el tiempo de elusión. El relleno de la columna es un material que posee poro de dimensiones comprendidas entre ciertos límites, con lo que la muestra es retenida o filtrada según su tamaño molecular.(9)

Si el material estacionario es un gel reticulado se le denomina filtración en gel, y si es un polímero rígido se le denomina permeación en gel; pero en ambos, el proceso de separación se efectúa por la diferencia de pesos moleculares.(9)

3. Según la polaridad relativa de las dos fases y la preponderancia de los fenómenos de adsorción o reparto, la cromatografía se puede clasificar en:

a. CROMATOGRAFIA EN FASE NORMAL. El lecho estacionario es de naturaleza fuertemente polar (p.e. gel de sílice) y la fase móvil es no polar

(p.e. n-hexano o THF). Las muestras polares quedan retenidas en la columna durante mayores tiempos que los materiales menos polares. (20)

b. CROMATOGRAFIA EN FASE REVERSA. Es el proceso inverso, en el cual, el lecho estacionario es de naturaleza no polar (p.e. hidrocarburos), mientras que la fase móvil es un líquido polar. cuanto más polar es la muestra, mayor será su retención. En la fig.1 se muestra el mecanismo de separación de acuerdo a la polaridad de las fases. (20)

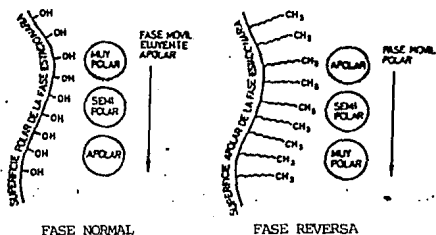


Fig.1. Ilustración gráfica de la cromatografía líquida en fase normal y fase inversa. Los círculos representan los tipos de compuestos presentes en la muestra y su posición relativa en la dirección del flujo de la fase móvil indica su orden de elución.

#### D. CROMATOGRAFIA LIQUIDA.

Durante muchos años se practicó la cromatografía líquida en una forma que se puede llamar "clásica" y que consistía básicamente en lo siguiente (fig.2): una columna de vidrio, habitualmente de 15 o 20 cm de longitud, cuyo diámetro varia entre 2 y 10 cm, rellena de materiales tales como sílice, alúmina, etc., con un tamaño de partícula de aproximadamente 200 u, se introduce la muestra disuelta en la fase móvil y luego se agrega el disolvente con el cual se eluye la muestra a través de la columna.(10)

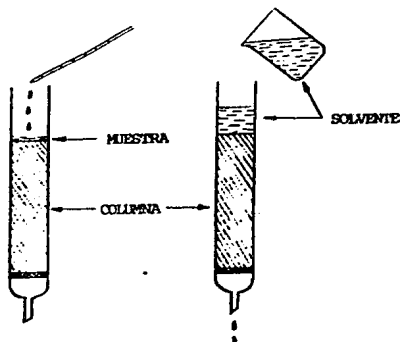


Fig.2 Cromatografía líquida "clásica".

Los tamaños de la muestra varían entre 0.1 y 1 gr o más. El disolvente o fase móvil fluye a través de la columna por efecto de la gravedad, produciéndose apenas una débil presión ejercida por el volumen de la fase móvil que se agrega a la columna, el disolvente se recolecta en la base de la columna en fracciones de determinado volumen. Uno de los inconvenientes de esta técnica es el largo tiempo que se requiere para el análisis, el cual, muchas veces puede ser de horas e incluso de días, otra desventaja es que el material de relleno se utiliza por lo general una sola vez por que parte de la muestra usualmente se adsorbe en forma irreversible. Sin embargo, el problema principal de este tipo de cromatografía líquida "clásica" es la identificación de los componentes que eluyen de la columna.(10)

#### E. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

A diferencia de la cromatografía de líquidos "clásica", la cromatografía líquida de alta resolución utiliza instrumental muy distinto, con ventajas muy significativas (fig.3). En este método se utilizan columnas de diámetro muy reducido, p.e. 2-4 mm, rellenas de materiales especiales, cuyas partículas tienen un tamaño no mayor de 30-40  $\mu$ , y con frecuencia hasta de 5-10  $\mu$ , lo cual reduce su longitud (30, 10, 7 cm). Este tipo de columna es muy eficaz, pero ofrece gran resistencia al flujo de la fase móvil, por lo que es necesario obligarla a pasar a través de la columna empacada aplicando alta presión (1000-6000 psi). Debido a esto el método se llama Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (CLAP), o bien, Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), debido a las altas eficiencias obtenidas (unos 50 000 platos teóricos por metro).(10)

Al igual que todas las demás técnicas cromatográficas, CLAR no es un método de identificación, en general es básicamente una técnica de separación de alta resolución, pero que no identifica al compuesto que da la señal obtenida en el



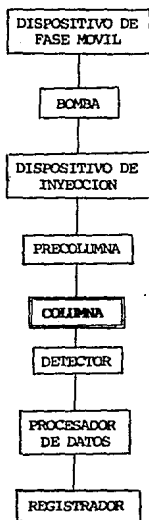


Fig. 3. Componentes principales de un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución.

cromatograma. La comparación de los tiempos de retención no es un método seguro de identificación, ya que aunque estos son característicos de ciertos compuestos, no son exclusivos, y por lo tanto, es necesario utilizar otras técnicas para este fin.

En la actualidad no se ha encontrado aún un detector universal y sensible para la CLAR, la gran mayoría solo han tenido éxito limitado, lo cual ha impedido su adopción definitiva. Existen dos detectores de uso muy generalizado: el de índice de refracción, que aunque es de respuesta universal, su sensibilidad es muy limitada; y el de luz ultravioleta, que es muy sensible, pero su respuesta es selectiva y responde solo a compuestos que absorben la luz UV. (10)

#### F. TERMINOS MAS USUALMENTE UTILIZADOS EN CLAR.

El lenguaje común empleado en cromatografía utiliza algunos términos característicos de esta técnica instrumental; a continuación se mencionan los más comunes, indicando su importancia operacional y la forma en que son evaluados:

a. TIEMPO DE RETENCION. Es el tiempo que transcurre desde la inyección hasta el ápice del pico (fig.4), se considera como el tiempo de retención absoluto y su valor siempre será igual en la misma columna y bajo las mismas condiciones de trabajo.(11)

b. TIEMPO MUERTO. Es el tiempo requerido para que la fase móvil se traslade de un lado a otro de la columna.(11)

c. TIEMPO DE RETENCION CORREGIDO O RELATIVO. Es el tiempo de retención absoluto menos el tiempo muerto.(11)

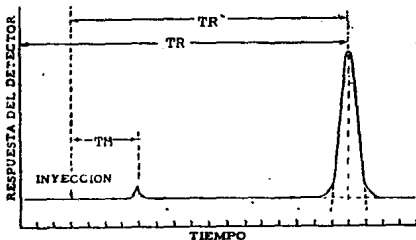


Fig.4 Cromatograma típico, en donde TR es el tiempo de retención, TM es el tiempo muerto y TR' es el tiempo de retención corregido o relativo.

d. FACTOR DE CAPACIDAD ( $k$ ). También conocido como coeficiente de distribución o reparto, es una propiedad física fundamental de cada sustancia que mide la solubilidad de la muestra en la fase estacionaria. Este valor nos indica el tiempo durante el cual puede retenerse cada componente de una muestra en la columna.(11) En este caso  $k$  esta controlada por la fuerza iónica del solvente, debiéndose encontrar el más adecuado para la separación; dependiendo de que tan rápido sale el primer componente de la muestra, los valores óptimos son de 2 a 6 y en muestras con más de dos componentes el rango es de 1 a 10. El factor de capacidad se calcula con la siguiente formula:

$$k = TR' / TM = (TR - TM) / TM$$

e. FACTOR DE SELECTIVIDAD ( $\alpha$ ). Es la medida de la solubilidad diferencial de dos compuestos en la fase estacionaria. De acuerdo a la interacción que haya con un compuesto y otro se realizará una selección de que pico sale primero y cual al final(11). Si el valor de  $\alpha = 1$ , los dos picos tienen solubilidades iguales con respecto a la fase estacionaria y no se realizará

la separación, así, entre más elevados sean los valores de  $\alpha$ , habrá una mayor selectividad de la fase estacionaria y una mejor separación. El factor de selectividad se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula y a la fig.5:

$$\alpha = TR'(B) / TR'(A) = TR(B) - TM / TR(A) - TM$$

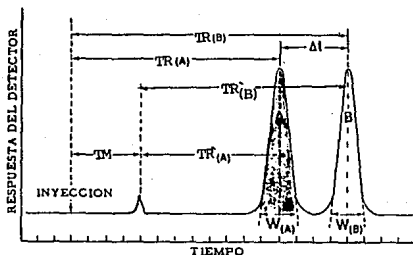


fig.5. Cromatograma que muestra las variables para el cálculo de la selectividad.

En estos casos puede mejorarse la selectividad por:

1. Cambio de fase móvil. Aumentando la polaridad, el pH y/o la fuerza iónica.

2. Cambio de fase estacionaria. Cambiando de columna o variando el tamaño de ésta.

3. Variación de la temperatura. Se puede aumentar o disminuir la temperatura utilizando un horno para columnas o una circulación de agua. Al controlar correctamente la temperatura se mejora la reproducibilidad de la separación.(10)

f. NUMERO DE PLATOS TEORICOS (N). La eficiencia de la columna se mide por los platos teóricos, estos miden el ensanchamiento de la banda del soluto de la muestra a medida que pasa a través de la columna. Los platos teóricos se calculan directamente del cromatograma.(18)

Existen varios métodos para cuantificarlo dependiendo de la altura a la que se tome la anchura del pico. Sin embargo, el más utilizado es el método de las tangentes, en el cual se trazan dos tangentes por los puntos de inflexión y se mide la longitud de la línea base donde cortan las tangentes(18), de acuerdo con la fig.6.

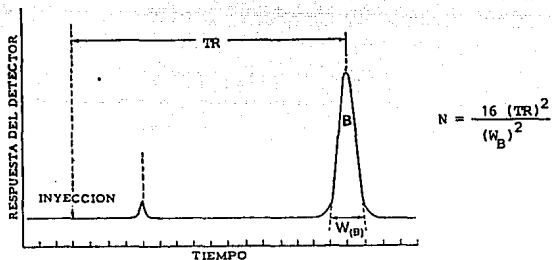


Fig.6. Método de las tangentes para calcular el número de platos teóricos.

g. ALTURA EQUIVALENTE A UN PLATO TEORICO (HEPT).

Recordando la definición de plato teórico referente al proceso de destilación, se deduce que HEPT es la longitud de la columna requerida para obtener un equilibrio de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria (18). Si el valor de HEPT es pequeño, significa que hay un mayor número de platos teóricos por unidad de longitud, y por lo tanto, la columna será más eficiente. La HEPT se puede calcular con la siguiente fórmula:

$$\text{HEPT} = \text{Longitud de la columna} / \text{No. de platos teóricos}$$

h. EFICIENCIA DE LA COLUMNA. Cuando se introduce una muestra a la columna, ésta se presenta como un estrecho perfil de concentración a medida que dicha muestra se reparte entre la fase estacionaria y la móvil, y es arrastrada por la última a través de la columna tiende a adoptar un perfil de distribución normal. Mientras más tiempo permanezca el pico en la columna más se ensancha, volviéndose más corto pero sin perder su forma gaussiana. A la capacidad de una columna de proporcionar picos altos y delgados se le llama eficiencia y se calcula con el número de platos teóricos.(18)

i. ECUACION DE RESOLUCION. La resolución es una medida de la capacidad que tiene una columna para separar dos picos, y se define como la distancia que hay entre el centro de dos picos dividida entre el promedio de la anchura de los mismos (19). Para el cálculo de la resolución se utilizan los picos más difíciles (los más juntos), fig.7, y si estos se pueden separar con éxito, todos los demás que están contenidos en la muestra lo harán.



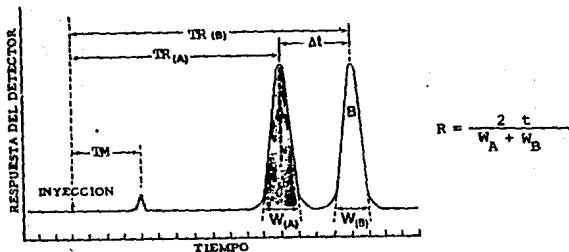


fig.8. Cromatograma que muestra las variables para el cálculo de la resolución de una columna.

Una resolución igual a uno se considera como una separación completa, aunque en realidad es del 98%. Cuando la resolución es de 1.5 la sobreposición de dos picos solo es del 0.3% (18)

Tanto la selectividad ( $\alpha$ ) como la eficiencia (N) y el factor de capacidad están estrechamente ligadas a la resolución al utilizar la siguiente fórmula:

$$R = \frac{1}{4} (\alpha - 1/\alpha) (\sqrt{N}) (k / 1+k).$$

Selectividad    Eficiencia    Capacidad

## G. COMPONENTES DE UN CROMATOGRAFO DE LIQUIDOS

Como ya se ha mencionado anteriormente, en todo tipo de instrumental hay ciertas características de índole general que deben evaluarse, estas son:

**VERSATILIDAD.** El instrumento deberá tener la capacidad para trabajar con muestras de diferente tipo, adaptarse a las diferentes técnicas cromatográficas y realizar el máximo de operaciones, tales como programación de fase móvil, recolección de fracciones a la salida de la columna. Para ello deberá estar equipado con los siguientes aditamentos. sistema de operación de alta presión; diversos detectores; sistema para recolección de fracciones; programador de fase móvil (llamado también generador de gradiente); controlador de temperatura, tanto para la columna como para el detector y controles de flujo.(10)

**RAPIDEZ.** Para obtener rapidez en el análisis es necesario contar con materiales de relleno para la columna de alta eficiencia y que el instrumento posea sistemas de bombeo de alta presión para la fase móvil.(10)

REPRODUCIBILIDAD Y ESTABILIDAD. Son características esenciales si se quiere obtener un funcionamiento efectivo a largo plazo. El instrumento debe proveer un control adecuado sobre los parámetros de operación, tales como flujo y composición constante de la fase móvil, la temperatura, la presión, etc.(10)

SENSIBILIDAD. Un buen instrumento, además de trabajar con pequeñas cantidades de muestra, debe generar señales de intensidad apreciables. La sensibilidad de todo cromatógrafo de líquidos depende sobre todo del sistema de detección que utiliza.(10)

1. FASE MOVIL. Aunque no es una parte del instrumento propiamente dicho, el control de la presión, el flujo y la composición de la misma son muy importantes. En lo que atañe a las características que debe presentar toda fase móvil para utilizarse en cromatografía de líquidos tenemos:

- a. Disolver la muestra.
- b. No degradar o disolver la fase estacionaria.
- c. Tener baja viscosidad.
- d. Ser compatible con el tipo de detector utilizado.
- e. Tener polaridad adecuada para permitir una retención conveniente de la muestra en la columna.
- f. Tener alta pureza.

La fase móvil debe almacenarse en recipientes de vidrio, la toma generalmente se hace a través de un filtro, con el fin de remover pequeñas partículas que pudieran obstruir y dañar al sistema de bombeo y a la columna. Es también recomendable filtrar las fases móviles antes de emplearlas en el cromatografo pasandolas a través de un filtro resistente a solventes de por lo menos  $0.22 \mu$  de tamaño de poro, y desgasificarlas, ya que muchas veces, en especial las fases móviles polares tienen una marcada tendencia al oxígeno y a otros gases que se disuelven en líquidos, si estos gases se desgasifican dentro del instrumento y forman burbujas pueden afectar seriamente el funcionamiento del detector y la eficiencia de la columna.(10)

2. SISTEMA DE BOMBEO. Dado que el material con que están rellenas las columnas son de tamaño de partícula muy pequeño, presentan una elevada resistencia al flujo de la fase móvil. Por esta razón se requiere de un sistema de bombeo que la haga pasar a un flujo razonable, pues de lo contrario el análisis será excesivamente lento (10). Las características más importantes de todo sistema de bombeo son:

- a. Trabajar a altas presiones (6000 psi).
- b. Producir velocidad de flujo variable(0.5-10ml)
- c. Reproducibilidad de flujo (menor al 1%)
- d. Bombeo amortiguado para no producir inestabilidad de la línea base.

También son importantes la resistencia a los líquidos corrosivos, la facilidad para cambiar la composición de la fase móvil conforme transcurre el análisis y la limpieza del sistema.

De acuerdo con las características de funcionamiento y de diseño, se pueden considerar dos tipos de bombas:

a. Bombas mecánicas:

- 1) Recíprocas (de pistón o diafragma).
- 2) De desplazamiento continuo.

b. Bombas neumáticas.

**BOMBAS RECÍPROCAS.** Son bombas que desplazan flujo de volumen constante en forma no continua, sino más bien pulsante. La máxima presión que se puede obtener es en general de aproximadamente 6000 atm. Estas bombas operan mediante el movimiento de un pistón o diafragma, y a través de un sistema de válvulas que alternadamente se abren y se cierran, se llena y se vacía, de modo

alternativo una pequeña cámara (10). La principal desventaja es que el flujo que se obtiene es en forma de pulsos y no en forma continua y uniforme lo cual puede causar pérdida de eficiencia en la columna e inestabilidad en el detector, debido a lo anterior, es necesario eliminar dichas pulsaciones mediante un sistema amortiguador. Una forma sencilla de lograrlo es colocando una sección larga de tubo capilar entre la bomba y la cámara de inyección, este tubo capilar se deja flotar libremente y así absorbe las pulsaciones producidas por la bomba. Por otra parte la ventaja principal de este tipo de bombas es el flujo de volumen constante.

Un avance más reciente en el diseño de este tipo de bombas lo constituyó la bomba de doble pistón, accionado de tal forma que mientras un pistón succiona el disolvente, el otro lo expulsa de la columna; el flujo de ambos pistones, ya libre de pulsaciones, es encausado por una vía común.(10)

**BOMBAS DE DESPLAZAMIENTO CONTINUO.** Llamadas también de émbolo o tipo jeringa, son aquellas en las que un émbolo o pistón se desplaza en forma continua y uniforme, comprimiendo el líquido contenido en una

cámara de cierto volumen; el líquido fluye luego a través de una abertura en la misma cámara obteniéndose así un flujo de volumen constante que puede variar según se desplace el émbolo a mayor o menor velocidad (10). El flujo desplazado por estas bombas es uniforme y continuo, o sea libre de pulsaciones, pero la capacidad de la bomba es limitada y para rellenar la cámara es necesario suspender momentáneamente su operación. Hoy día muy pocos instrumentos emplean este tipo de bombas debido a su alto costo y a las ventajas y adelantos obtenidos en las bombas de tipo recíproco.

**BOMBAS NEUMATICAS.** En este sistema de bombeo el líquido es desplazado mediante la presión ejercida por un gas inerte a alta presión, ya sea en forma directa sobre el líquido o bien sobre el recipiente comprimible que lo contiene.(10)

La presión máxima obtenida está limitada por la presión del gas mismo y por el material de fabricación del sistema. Los flujos obtenidos están libres de pulsaciones y son de presión constante, lo cual implica que si la presión de la columna cambia, el flujo también lo hará.

Las desventajas de estas bombas son la capacidad limitada en el volumen total que pueden bombear y la difusión que presenta el gas en el líquido, esto último se puede evitar utilizando algún tipo de interfase entre el líquido y el gas, o bien, desechando las últimas porciones del líquido que han sido saturadas por el gas.

Sea cual sea el tipo de bomba empleado, conviene colocar un filtro entre la bomba y la cámara de inyección para evitar que partículas extrañas bloqueen el sistema.

3. DISPOSITIVOS DE INYECCION. Esta parte del instrumento exige un cuidadoso diseño puesto que son los que permiten la introducción de la muestra a la columna, además de que debe resistir altas presiones, debe tener un volumen constante y pequeño y sus cavidades deben ser bien barridas por la fase móvil.(10)

Hasta hace relativamente poco tiempo, la introducción de la muestra se realizaba mediante una jeringa, inyectandola dentro de una pequeña cámara donde posteriormente era disuelta y arrastrada por la fase móvil.



Actualmente se emplean válvulas inyectoras, en las cuales, la muestra, introducida mediante una jeringa, desplaza el líquido y lleva el espacio interno dentro de una pequeña porción del tubo capilar (usualmente el volumen contenido en el tubo capilar es de 10 a 50  $\mu$ l). La muestra se inyecta en la columna accionando la válvula de forma tal que la disposición de entrada y salida se invierte. De esta forma se logra inyectar a cualquier presión un intervalo amplio de tamaños de muestra con un alto grado de reproducibilidad. (10)

4. PRECOLUMNAS. Consisten por lo general en una sección corta de tubo, rellena de algún soporte sólido poroso, de preferencia igual que el de la columna pero con un tamaño de partícula mayor, a través de la cual se hace pasar la fase móvil y la muestra antes de que se introduzcan a la columna. Sirven para proteger y alargar la vida de la columna. (18)
  
5. COLUMNAS. En todo proceso cromatográfico, ya sea en fase líquida o gaseosa, la columna es el "corazón" de el sistema puesto que en ella se lleva a cabo la separación de los componentes de una muestra a analizar. Básicamente consiste en un fragmento de tubo de algún material inerte, de diámetro uniforme, capaz

de resistir altas presiones, el más ampliamente utilizado es el acero inoxidable. La longitud de la columna varia entre 7 y 30 cm y su diámetro interno es de alrededor de 3-4 mm, aunque en las columnas de tipo preparativo puede ser hasta de más de 1 cm.(20)

La capacidad de la columna depende por lo tanto de su longitud, diámetro y material de relleno. En general las columnas más eficaces son las de diámetro pequeño (3 mm) que efectúan análisis más rápidos; su capacidad en cambio es muy limitada y la muestra debe ser entonces de tamaño muy reducido, lo que exige un detector muy sensible.

En la actualidad las columnas empleadas para cromatografía de líquidos de alta presión ha alcanzado un desarrollo sorprendente, siendo común obtener eficiencias del orden de 50 000 platos teóricos por metro de columna, lo cual es en general superior a las obtenidas en cromatografía de gases.(10)

a. FASES ESTACIONARIAS. Los materiales que se utilizan en cromatografía líquida "clásica", tales como gel de sílice, Alúmina, zeolitas, celulosa, etc, se utilizan poco en CLAP por que sus partículas suelen ser muy grandes, de forma irregular y en muchas ocasiones sus propiedades son difíciles de reproducir.

En CLAR el tamaño de partícula es importante por que controla el proceso de difusión de las moléculas de la muestra hacia dentro y hacia afuera de los poros de dicha partícula. A medida que el tamaño de ésta aumenta, el proceso de difusión se hace más lento, es decir, la transferencia de masa entre la fase móvil y la estacionaria es lenta. Al mismo tiempo hay que considerar que si aumenta el flujo de la fase móvil para obtener análisis más rápidos, el proceso de difusión, que es lento, hace que la columna pierda eficiencia y por lo tanto, resolución. Conforme disminuye el tamaño de la partícula, la profundidad de los poros también disminuyen el proceso de transferencia de masa se hace más rápido, permitiendo obtener análisis más rápidos sin pérdidas de resolución. Estas razones explican el porqué solo se utilizan materiales porosos cuyo tamaño de partícula es menor a 50 u.(10)

Otros tipos de materiales utilizados son los llamados adsorventes pelliculares, "adsorventes de capa porosa", "de porosidad superficial" o de "centro sólido", consisten en partículas esféricas, generalmente vítreas, no porosas, recubiertas de una capa fina de adsorbente poroso, como gel de sílice o alúmina. Los dos tipos de adsorventes aunque difieren en muchas de sus propiedades, tienen mucho en común;

ambos pueden introducirse en la columna con cierta facilidad dando lugar a altas eficiencias; pueden utilizarse en cromatografía líquido-sólido, dependiendo de la actividad de su superficie, o bien pueden recubrirse de alguna fase líquida y utilizarse en cromatografía líquido-líquido. Así mismo se pueden unir químicamente en su superficie a alguna fase líquida y crear un nuevo tipo de cromatografía, ya que el proceso efectuado con estos rellenos de columna no son exactamente líquido-líquido o líquido-sólido.(20)

Por otra parte los materiales porosos tienen una gran superficie específica (30-500 m<sup>2</sup>/gr) y pueden aceptar muestras de tamaño considerable, del orden de mg/gr de relleno, sin perder eficacia. En contraste los materiales peliculares son de superficies específicas menores (entre 1 y 12 m<sup>2</sup>/gr), aceptan menos muestra, de 10 a 20 veces menos que los materiales porosos, y su costo es considerablemente más elevado.(11)

6. DETECTORES. Durante mucho tiempo el desarrollo de la cromatografía en fase líquida se vió obstaculizado por la falta de detectores adecuados. El detector ideal sería aquel que reuniera los siguientes requisitos:

- Altamente sensible.
- Estable.
- De lectura continua.
- De respuesta universal.

Aún hoy en día no existe este detector, y los que hay disponibles solo son adecuados para ciertas aplicaciones en particular.(10)

Para una buena detección hace falta un dispositivo que mida en forma continua alguna propiedad fisicoquímica de los componentes de la muestra o de la solución que los contiene, y que genere una señal proporcional a la concentración de dicha muestra a medida que ésta sale de la columna. Por desgracia la mayoría de las propiedades de la muestra que pudieran medirse son muy similares en magnitud y características a la de la fase móvil y esto dificulta el proceso de detección. Para resolver este problema se sugieren dos caminos: el primero consiste en eliminar el disolvente con anterioridad al proceso de detección; y el segundo, en medir alguna propiedad de la solución que contiene la muestra y de alguna forma compensar o sustraer aquella porción que corresponde al disolvente. Por supuesto, que esto no es fácil por que para lograr además una alta sensibilidad se deben controlar también los parámetros de operación susceptibles de influenciar dichas propiedades como es el flujo y la temperatura.(20)

Se han probado diversos detectores cuyo funcionamiento se basa en diferentes propiedades de la muestra, pero la gran mayoría de ellos solo han tenido éxito limitado y esto ha impedido su adopción definitiva.

Actualmente existen tres tipos de detectores de uso muy generalizado que se describen a continuación:

a. DETECTOR DE INDICE DE REFRACCION. Mide la diferencia entre los índices de refracción del disolvente puro y la solución de la muestra que sale de la columna; de esta manera se detecta cualquier cambio en la composición de la fase móvil. La respuesta de este detector es universal y su sensibilidad es moderada. Desgraciadamente, debido a dicha respuesta es muy difícil efectuar programaciones de la fase móvil ya que además es sensible a las variaciones de flujo y temperatura. Estos detectores no son instrumentos muy estables ni de fácil manejo, por lo que se ha limitado su uso.(10)

a. DETECTOR DE LUZ ULTRAVIOLETA. Su funcionamiento se basa en la absorción de luz por parte de la muestra al pasar a través de ella un haz de luz monocromática ultravioleta. La respuesta de este detector

es selectiva, ya que solo se detectarán los compuestos que absorben a la longitud de onda a la que opera el detector.(10)

Hay dos tipos de detectores de luz ultravioleta; el de longitud de onda variable, que no solo es de aplicación más variada y más sensible, sino también más costoso; y el de una sola longitud de onda, también llamado fotómetro de luz UV; este último es sencillo, económico y más que suficiente para obtener buenos resultados.

Este fotómetro de luz UV es relativamente sensible a los cambios de flujo y temperatura, y siempre y cuando la fase móvil no absorba en grado apreciable en la longitud de onda que opera, será más fácil efectuar programaciones de gradiente.(10)

La mayor parte de los diseños comerciales operan a una longitud de onda de 254 o 280 nm utilizando como fuente de luz UV un lámpara de mercurio de baja presión.

Los detectores de longitud de onda variable presentan algunas ventajas sobre los fotómetros, y entre las más sobresalientes tenemos:

- Posibilidad de seleccionar la longitud de onda óptima para la muestra.
- Se evitan algunos problemas de absorción excesiva de la fase móvil.
- Algunos diseños permiten obtener el espectro de absorción de cada compuesto por separado.

En ambos tipos de detectores, la pureza espectroscópica de la fase móvil es muy importante, especialmente cuando se efectúa la detección a longitudes de onda muy cortas (menores de 220 nm); se recomienda el empleo de disolventes grado cromatográfico en vez de los de grado espectroscópico, por que estos suelen contener preservativos que afectan las separaciones.(20)

c. DETECTOR DE FLUORESCENCIA. En la actualidad es el detector más sensible de que se dispone. En condiciones óptimas es posible detectar cantidades del orden de picogramos.(10)

Hay dos diseños básicos de estos detectores; los llamados fluorómetros de filtros, que emplean filtros para seleccionar la radiación de excitación y la de emisión; y los espectrofluorómetros que emplean monocrómadores. Ambos diseños rinden buenos resultados y no parece haber muchas desventajas de costo entre uno y otro.



Las fases móviles deben seleccionarse cuidadosamente, debido a que la intensidad de sus emisiones depende notablemente del medio en que se efectúan; esto dificulta grandemente algunas de sus aplicaciones como es la programación de la fase móvil y el análisis cuantitativo. Otra desventaja más es que aunque puede ser de diseño simple, su manejo requiere cuidado, pero su mayor ventaja es la alta selectividad de respuesta y su sensibilidad. (18)

### III. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

Durante todo el proceso de su fabricación, los productos farmacéuticos deben contar con un alto grado de calidad, de manera tal que al final posea las características físicas, químicas y analíticas especificadas. Ante tales requerimientos aumenta cada día la necesidad de desarrollar mejores métodos de análisis que permitan verificar dicha calidad.

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, principalmente por que es un requisito ante la Secretaría de Salud y por otra parte por que debe probar que funciona para las aplicaciones analíticas deseadas.(21)

#### A. DEFINICIONES.

1. VALIDACION. Es el proceso mediante el cual queda establecido, mediante estudios experimentales, que su capacidad satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. Esta capacidad se expresa en términos de parámetros analíticos.(5)

Considerando la variedad de métodos, existen diferentes esquemas de validación (6). Las categorías más comunes que requieren validarse son:

a. Categoría I. Métodos analíticos para cuantificar los componentes principales de sustancias a granel o ingredientes activos en productos farmacéuticos terminados (incluyendo conservadores).

b. Categoría II. Métodos analíticos para determinar impurezas en sustancias a granel o compuestos de degradación en productos farmacéuticos terminados.

c. Categoría III. Métodos analíticos para determinar características físicas (p. ej.: disolución, liberación del principio activo, etc.)

En base a lo anterior, los parámetros que deberán considerarse en la validación de métodos analíticos, se enlistan en la tabla No.1.

Parámetro Analítico	Categoría I	Categoría II	Categoría III
Precisión	+	+	+
Exactitud	+	+	*
Lim. de detecc.	-	-	*
Lim. de Cuantif.	-	+	*
Especificidad	+	+	*
Linealidad	+	+	*
Tolerancia	+	+	+
Estab. muestra	+	+	+

+ Se efectúa la prueba.  
 - No necesariamente se efectúa la prueba  
 \* Puede requerirse dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

Tabla No.1. Parámetros analíticos que se evalúan según la categoría del método a validar.

2. LINEALIDAD. Es la habilidad que tiene el sistema (equipo, reactivos, etc.) o el método para asegurar que los resultados analíticos son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un rango determinado. (4.5.8)

Se determina construyendo una curva de calibración de una misma solución patrón (estándar de referencia), utilizando cuando menos cinco niveles ( p.ej.: 80, 90, 100, 110 v 120 %) y haciendo el análisis por triplicado para cada nivel.

3. PRECISION. Es el grado de concordancia obtenida entre determinaciones independientes cuando el proceso se aplica repetidamente a muestras múltiples de una mezcla homogénea. La precisión es una medida del grado de repetibilidad y/o reproducibilidad de un método analítico bajo las condiciones normales de operación.(4,5,8)

a. REPETIBILIDAD. Es la precisión expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos aparatos, técnicas y reactivos.(4,5,8)

Se determina realizando el análisis por sextuplicado, de una misma solución patrón ( estándar de referencia) correspondiente al 100 % del principio activo.

b. REPRODUCIBILIDAD. Es la precisión expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas en diferentes días, en el mismo y/o diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferente equipo, (4,5,8). Se determina cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes por triplicado cada muestra ( píquetes bregados con el 100 % del principio activo).

4. ESPECIFICIDAD. Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra. Indica el grado de interferencia (o ausencia de ésta) en el análisis de mezclas.(4.5,8)

Se determina confrontando al método, por separado, al placebo. placebo cargado ( excipientes + estándar ) y al estándar.

5. EXACTITUD. Es la concordancia que existe entre los datos obtenidos por el método y el valor real esperado (100 %). Se expresa como el % de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas del principio activo (placebos cargados).(4,5,8)

Se determina analizando de manera independiente y como mínimo seis placebos cargados con el 100 % del principio activo.

6. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA. Son las condiciones a las cuales la muestra mantiene constante su propiedad medible en un lapso determinado.(4.5.6)

Se determina almacenando como mínimo seis muestras analizadas a temperatura ambiente o a las condiciones acostumbradas, por el tiempo acostumbrado o por algunas horas. Después de transcurrido este tiempo se reanalizan bajo las mismas condiciones de operación.

7. TOLERANCIA DEL SISTEMA. Es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como: diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas, sistemas de elusión, tipos de empaque, condiciones ambientales, etc.(4,5,8)

8. LIMITE DE DETECCION. Es la menor concentración de la sustancia en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones de operación establecidas.(4,5,8)

9. LIMITE DE CUANTIFICACION. Es la menor concentración de la sustancia que puede ser detectada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.(4,5,8)

10. PLACEBO. Es la mezcla de todos los componentes que contiene una formulación, exceptuando el o los principios activos.

11. PLACEBO CARGADO. Son muestras de placebos a los que se les ha adicionado cantidades conocidas del principio activo.



#### IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Durante todo el proceso de su fabricación, los productos farmacéuticos deben contar con un alto grado de calidad, de manera tal que el producto final posea las características físicas, químicas y analíticas especificadas. Ante tales requerimientos, aumenta día a día la necesidad de desarrollar mejores métodos de análisis que nos permitan verificar dicha calidad.

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, principalmente por que es un requisito ante la Secretaría de Salud, de que éste debe probarse para establecer que su capacidad satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. (21)

El problema a resolver en este caso particular es que la formulación contiene como principio activo al Ácido Acetilsalicílico que como se sabe, en presencia de la humedad se degrada rápidamente, dando como producto de descomposición el Ácido salicílico.

Este ácido salicílico exhibe propiedades de solubilidad, de comportamiento ácido-base y de absorción al UV muy similares a las del Ácido Acetilsalicílico, lo cual causa interferencia en la cuantificación de éste último ya que los métodos con que se cuenta no son específicos.

Por lo anterior se hace necesario implementar un método por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución que además de ser rápido, es también altamente específico, es decir, que una vez separados se tenga la certeza de que el único que se está cuantificando es el Ácido Acetilsalicílico.

## V. OBJETIVOS.

A. Implementar un método de análisis por Cromatografía de líquidos de Alta Resolución que permita la separación del Acido Acetilsalicílico y de su producto de degradación para su posterior cuantificación.

B. Validar el método analítico propuesto.

## VI. HIPOTESIS.

Dadas las propiedades fisicoquímicas similares que presentan el Acido Acetilsalicílico y su producto de degradación el Acido salicílico, consideramos que mediante la aplicación de un método por cromatografía de Líquidos de Alta Resolución que son altamente específicos, se puede hacer una separación de ambos y una posterior cuantificación del primero.

Material:

Fascos de vidrio ámbar con tapón de rosca de 60 ml  
Pipetas volumétricas de 5 y 20 ml, marca PYREX.  
Matraz volumétrico de 50 ml, marca PYREX.  
Tubos para centrifuga, marca PYREX.  
Membranas de Nylon 66, 0.22  $\mu$  y 47 mm de diámetro.  
Kit de filtración para solventes, marca MILLIPORE.  
Kit de filtración para muestras, marca MILLIPORE.

Reactivos:

Estandar de referencia USP de Acido Acetilsalicílico.  
Estandar de referencia USP de Acido Salicílico.  
Acido acético glacial G.R., marca J.T. Baker.  
Acetonitrilo grado HPLC, marca Baxter.  
Cloroformo grado HPLC, marca Baxter.  
Acido fórmico G.R., marca Merck.  
Agua tridestilada en equipo Milli-Q.

Equipos:

Baño de ultrasonido, marca Mettler, modelo ME-11.  
Centrifuga, marca Solbat, modelo V115.  
Cromatógrafo de líquidos, marca Beckman, equipado con:

Bomba, modelo 126.  
Detector de UV, modelo 166.  
Automuestreador, modelo 506A.  
PC, marca IBM, modelo 50Z.  
Pantalla policromática, marca IBM.  
Impresora, marca EPSON, modelo LX-800.

M E T O D O .

## 1. Preparación de soluciones:

a. Fase móvil. Mezclar 250 ml de agua acidificada (ajustar el pH a aprox. 3.4 con ácido acético glacial) con 150 ml de acetonitrilo, filtrar a través de una membrana de nylon 66 de 0.22  $\mu$  de tamaño de poro y desgasificar durante 45 min en el ultrasonido.

b. Solución diluyente. Mezclar 99 ml de acetonitrilo con 99 ml de cloroformo y 2 ml de ácido fórmico.

c. Solución de referencia. Pesar 50 mg de ácido Acetilsalicílico estándar de referencia USP y llevar a 50 ml en un matraz volumétrico con solución diluyente.

d. Solución de la muestra. Pesar en un contenedor de vidrio con tapón de rosca, una cantidad de muestra equivalente a 200 mg de ácido Acetilsalicílico, añadir 20 ml de solución diluyente, poner en el ultrasonido durante 10 min y posteriormente centrifugar 5 min a 4500 rpm. Transferir una alícuota de 5 ml de el líquido sobrenadante a un matraz volumétrico de 50 ml, completar al volumen con solución diluyente y mezclar.

## 2. Condiciones Cromatográficas:

Fase móvil: la indicada.  
Detector: de UV a 280 nm.  
Columna: de ODS de 300 mm x 4 mm de D.I. y con tamaño de partícula de 10  $\mu$ .  
Velocidad de flujo: 3 ml/min.  
Volumen de inyección: 50  $\mu$ l.

## 3. Procedimiento.

Inyectar al cromatógrafo, por separado y como mínimo seis volúmenes iguales de 50  $\mu$ l de la solución de referencia, registrar el área de los picos y calcular el coeficiente de variación ( $CV < 1.5\%$ ) y el factor de coeico ( $As < 2\%$ ). Una vez cumplidas estas especificaciones, inyectar al cromatógrafo 50  $\mu$ l de la solución de la muestra. Obtener su correspondiente cromatograma y medir el área del pico.

VII. RESULTADOS

1. EVALUACION DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Se trabajaron cinco niveles (80, 90, 100, 110 y 120%) por triplicado c/u obteniendose los resultados que se muestran en la tabla No. 2.

Cantidad Adicionada (%)	Area del pico
80	73.1615
80	73.3309
80	73.4816
90	84.6304
90	84.4299
90	84.6105
100	92.9282
100	92.7525
100	92.9345
110	102.8478
110	102.7517
110	102.7971
120	112.6866
120	112.5827
120	112.5638

Tabla No.2. Muestra las Áreas de los picos obtenidas en la evaluación de la linealidad del sistema.

Con los resultados anteriores se calcularon los siguientes parámetros:

$$\begin{array}{ll}
 a = -3.5646 & \Sigma x = 1500 \\
 b = 0.9680 & \Sigma x^2 = 153\ 000 \\
 r = 0.9992 & \Sigma xy = 142\ 763.2 \\
 & \bar{y} = 93.2420 \\
 S_{y/x} = 1.1613 & DE(v) = 14.1819 \\
 \Sigma (x_i - \bar{x})^2 = 3000 & \Sigma y = 1398.6300 \\
 \bar{x} = 100 & \Sigma v^2 = 133\ 066.8300 \\
 DE(x) = 14.6385 & 
 \end{array}$$

a. Evaluación de A (a). Se hace a través del estadígrafo "t".

$$\begin{array}{l}
 \text{Prueba de hipótesis } H_0: A = 0 \\
 H_a: A \neq 0
 \end{array}$$

Utilizando la fórmula 1 del anexo tenemos:

$$t \text{ calc.} = (-3.5646) / \left[ 1.1613 \sqrt{153\ 000 / 15 \times 3000} \right]$$

$$t \text{ calc.} = -1.1617$$

$$t \text{ tab.} = t(0.975, 14) = 2.16$$

b. Evaluación de B (b). Se hace a través del estadígrafo "t".



Prueba de hipótesis  $H_0: B = 1$   
 $H_a: B \neq 1$

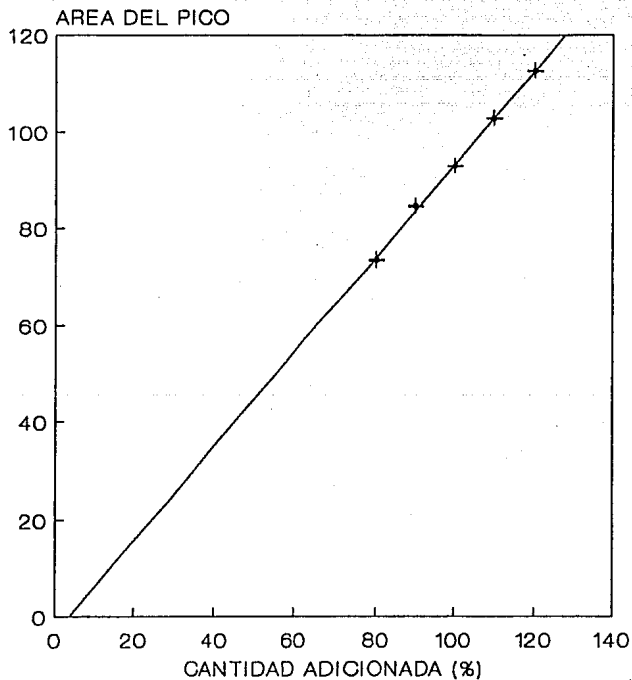
Utilizando la fórmula 1 del anexo tenemos:

$$t_{\text{calc.}} = (0.968-1)(14.638)(\sqrt{14}) / 1.1613$$

$$t_{\text{calc.}} = -1.5092$$

$$t_{\text{tab}} = t(0.975, 14) = 2.16$$

Como en ambos casos  $t(0.975) > t_{\text{calc.}} > t(0.025)$ , podemos decir que el sistema tiene una ordenada al origen considerada como "cero" y una pendiente considerada como "uno".



Gráfica No. 1. Muestra el comportamiento lineal que tiene el sistema.

## 2. Evaluación de la precisión del sistema.

Se trabajó con un solo nivel (100%), con nueve replicaciones, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla No. 3

Cantidad adicionada(%)	Area del pico
100	90.9053
100	92.3234
100	92.4951
100	92.2829
100	90.7154
100	92.5944
100	91.2593
100	91.8775
100	92.5381

Tabla No.3. Muestra las Areas de los picos obtenidos en la evaluación de la precisión del sistema.

Con los datos anteriores se calcularon los siguientes parámetros:

$$\begin{aligned}
 n &= 9 \\
 \bar{x} &= 91.8932 \\
 DE &= 0.7314 \\
 DER &= 0.7960 \%
 \end{aligned}$$

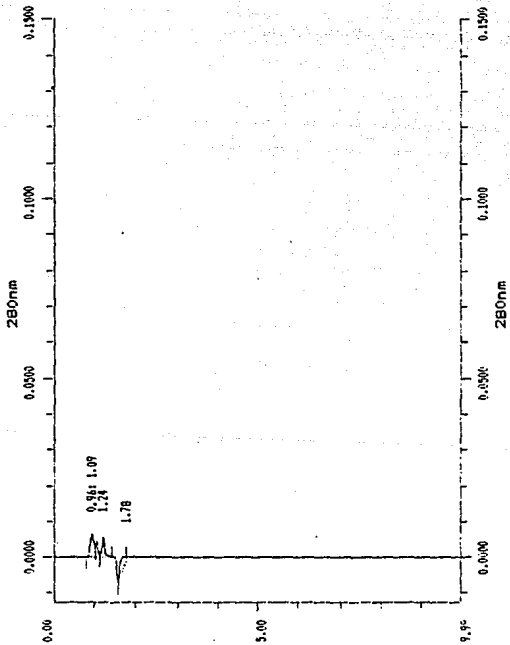
Dado que la DER es  $< 1.5$  podemos decir que el sistema se considera como preciso.

3. Evaluación de la especificidad del método frente a excipientes.

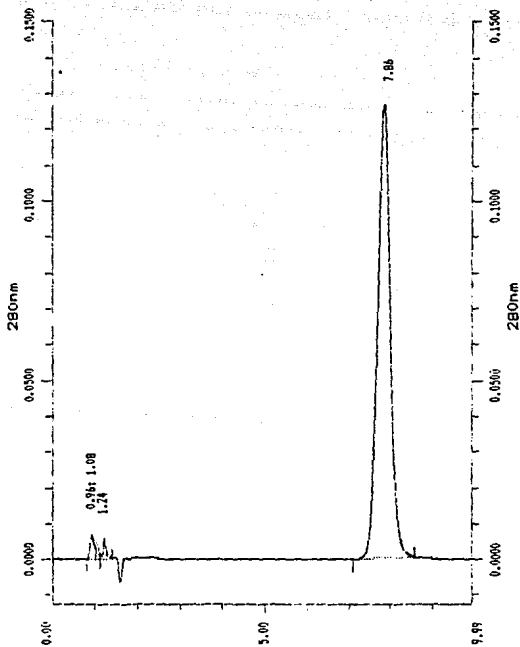
Se determinó analizando las siguientes muestras por separado con el método propuesto:

- a. Placebo
- b. Placebo cargado (excipientes + estándar)
- c. Estándar

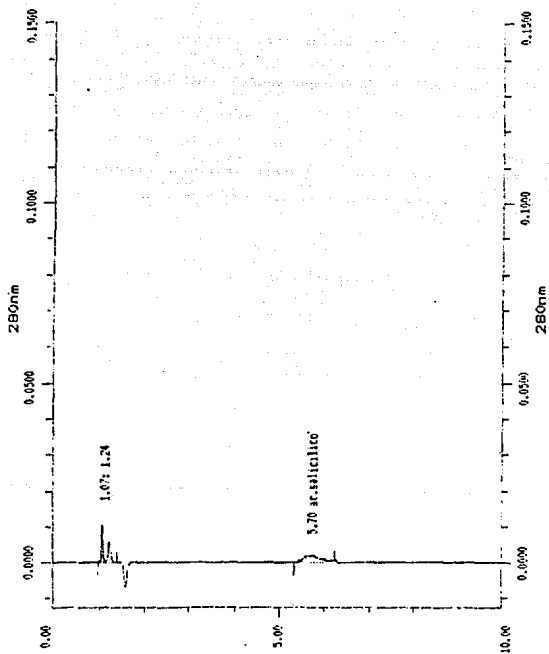
Como podemos observar en los cromatogramas 1, 2, 3 y 4 respectivamente, el método es capaz de separar las sustancias de interés de cualquier otra interferencia.



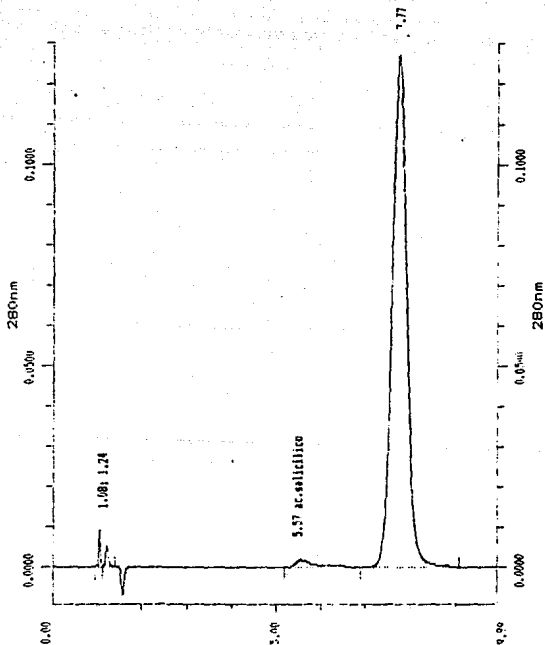
Cromatograma No. 1: Placebo



Cromatograma No.2 : Estandar de Acido Acetilsalicilico.

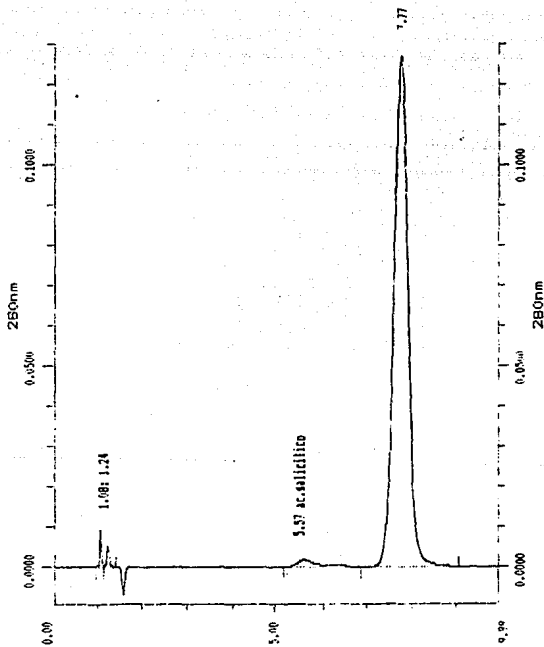


Cromatograma No.3 : Estandar de Acido Salicilico.



Cromatograma No.4 : Placebo cargado con una mezcla de Acido Salicilico y Acetilsalicilico.





Cromatograma No.4 : Placebo cargado con una mezcla de Acido Salicilico y Acido Acetilsalicilico.

## 4. Evaluación de la linealidad del método.

Se trabajó con placebos cargados del principio activo, efectuando cada análisis por triplicado y con cinco diferentes niveles (80, 90, 100, 110 y 120 %). Se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla No.4.

Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)
106.1	161.6778
159.9	160.8632
160.0	161.4426
180.1	180.5415
180.3	180.6156
179.8	179.6156
200.0	200.3658
200.2	200.3658
200.0	199.2230
220.1	220.4144
220.2	220.7304
220.1	220.6170
240.2	240.1554
240.0	240.1508
240.3	240.2940

Tabla No.4. Muestra las cantidades recuperadas en la evaluación de la linealidad del método.

Con los resultados anteriores se calcularon los siguientes parámetros:

$$\begin{array}{ll}
 a = 2.6463 & \Sigma xy = 613\,419.44 \\
 b = 0.9884 & \Sigma (n_1 - x)^2 = 12\,048.186 \\
 r = 0.9998 & \bar{y} = 200.4167 \\
 S_{y/x} = 1.0957 & DE(y) = 29.0011 \\
 \bar{x} = 200.0866 & \Sigma y = 3006.2508 \\
 DE(x) = 29.1358 & \Sigma x^2 = 614\,277.83 \\
 \Sigma x = 3001.3 & \\
 \Sigma x^2 = 612\,568.39 & 
 \end{array}$$

a. Evaluación de A (a). Se efectúa con el estadígrafo de contraste "t".

$$\begin{array}{l}
 \text{Prueba de hipótesis } H_0: A = 1 \\
 H_a: A \neq 1
 \end{array}$$

Calculando con la fórmula 2 del anexo, tenemos:

$$t \text{ calc.} = (2.6273 - 0) / [1.0957 \times \sqrt{612\,568.39 / (15 \times 12048.196)}]$$

$$t \text{ calc.} = 1.3123$$

$$t \text{ tab.} = t(0.975, 14) = 2.16$$

b. Evaluación de B (b). Se efectúa con el estadígrafo de contraste "t".

$$\begin{array}{l}
 \text{Prueba de hipótesis } H_0: B = 0 \\
 B \neq 0
 \end{array}$$

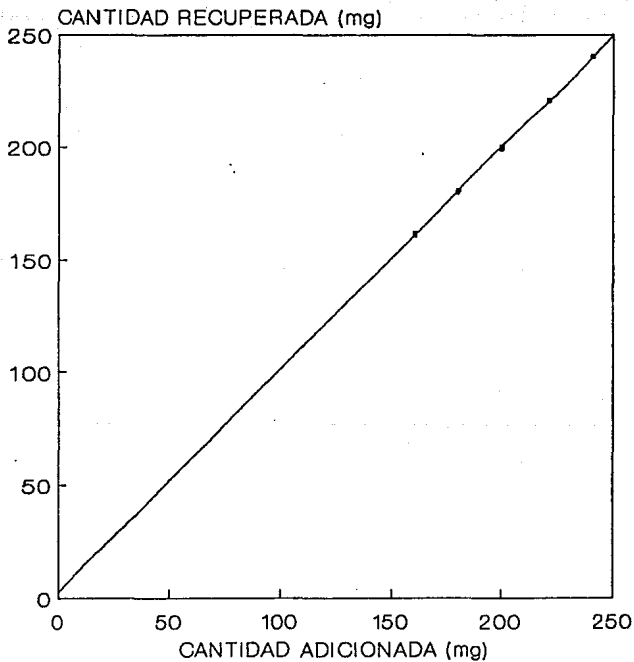
Calculando con la fórmula 3 del anexo, tenemos:

$$t \text{ calc.} = (0.9884-1)(29.3358)(14) / 1.0957$$

$$t \text{ calc.} = -1.1620$$

$$t \text{ tab.} = t(0.975, 14) = 2.16$$

Como en ambos casos  $t(0.975) > t \text{ calc.} > t(0.025)$ , podemos decir que el método tiene una ordenada al origen considerada como "cero" y un pendiente considerada como "uno".



Gráfica No. 2. Muestra el comportamiento lineal que tiene el método para cuantificar AAS en tabletas solubles.

### 5. Evaluación de la exactitud del método.

Se manejaron nueve muestras (placebos cargados), con el 100 % del principio activo, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla No.5.

Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada(%)
200.3	99.93
220.2	101.52
200.4	98.54
200.6	98.95
200.4	99.35
200.3	99.58
200.1	99.08
200.2	99.57
200.0	99.40

Tabla No.5. Muestra los porcentos recuperados en la evaluación de la exactitud del método.

Con los datos anteriores se calcularon los siguientes parámetros:

$$DE(y) = 0.8291$$

$$x(y) = 99.5778$$

La exactitud se evalúa a través del estadigráfico de contraste "t".

Prueba de hipótesis:  $H_0: \mu = 100\%$   
 $H_a: \mu \neq 100\%$

Calculando con la fórmula 4 del anexo tenemos:

$$t_{\text{calc.}} = (99.5778 - 100) / (0.8291 / 9)$$

$$t_{\text{calc.}} = -1.5276$$

$$t_{\text{tab.}} = t(0.975, 8) = 2.3060$$

Como  $t(0.975) > t_{\text{calc.}} > t(0.025)$ , podemos considerar al método como exacto.

b. Evaluación de la reproducibilidad del método.

Se trabajaron placebos cargados al 100 % del principio activo, por triplicado, con dos analistas, en dos días diferentes. Se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla No. 6.

D I A S				
		1	2	
A N A L I S T A S	1	100.6489	99.5990	Y1..= 595.5864
		99.1918	98.4766	
		98.4673	99.2028	
	2	100.3223	99.2028	Y2..= 604.6597
		101.5334	101.1214	
		101.9673	100.3412	
		Y.1.= 602.1310	Y.2.= 598.1153	Y...=1200.2463

Tabla No. 6. Muestra los resultados obtenidos en la evaluación de la reproducibilidad del método.

Con los resultados anteriores se calcularon los parámetros que se muestran en la tabla No.6 con las fórmulas 5.6,7 y 8 del anexo, para construir una tabla de análisis de varianza de acuerdo a la tabla No.1 del anexo.



TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA.

FV	gl	SC	MC	F calc.	F tab.
Analista	1	1.3349	1.3349	0.3723	38.51
Día	2	7.1711	3.5856	4.0388	6.06
Error	8	7.1200	0.8900	-----	-----

Tabla No. 7. Muestra los resultados obtenidos para el análisis de varianza en la evaluación de la reproducibilidad del método

Como en ambos casos  $F \text{ calc.} < F \text{ tabs}$ , podemos decir que el método es reproducible y que no existe efecto por el día en que se realice el análisis, ni por el analista-que lo lleve a cabo.

### 7. Evaluación de la estabilidad de la muestra.

Se analizaron seis muestras sometidas a dos diferentes condiciones y a tres diferentes tiempos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla No. 8.

CONDICION / TIEMPO			
INICIAL	TA/12 hrs	TA/24 hrs	REFRIG./24 hrs
99.73	99.70	99.69	99.68
99.88	99.69	99.56	99.91
99.23	99.34	99.28	99.86
99.79	98.77	98.64	98.86
99.56	99.65	99.53	99.54
99.34	99.41	99.56	99.40
x= 99.43 Y1= 596.58	n= 99.42 Y2= 596.56	n= 99.42 Y3= 596.56	n= 99.51 Y4= 597.06

Tabla No.8. Muestra los resultados obtenidos para la evaluación de la estabilidad de la muestra.

Con los resultados anteriores y aplicando las fórmulas 9,10,11,12 y 13 del anexo se calcularon los siguientes parámetros:

$$\begin{aligned} \sum \sum Y_{ij} &= 357361.75 \\ \sum \sum Y_i &= 1424156.00 \\ SCE &= 2.4152 \\ MCE &= 0.1207 \end{aligned}$$

La estabilidad de la muestra se evalúa a través del estadigráfico "t" de Dunnett.

Aplicando la fórmula 13 del anexo tenemos:

$$\begin{aligned}tD (TA/12 \text{ hrs}) &= -0.0498 \\tD (TA/24 \text{ hrs}) &= -0.0498 \\tD (\text{REFRIG./24 hrs}) &= 0.3988\end{aligned}$$

$$tD \text{ tab.} = t (20, 3, 0.95) = 2.54$$

Como todos los valores de  $tD$  calc.  $<$   $tD$  tab., podemos considerar que la muestra es estable en las condiciones de almacenamiento a las que fue sometida.

## ANÁLISIS DE RESULTADOS

1. LINEALIDAD DEL SISTEMA. Un sistema de medición es lineal si su representación gráfica se aproxima a una línea recta, su coeficiente de correlación tiende a uno, su ordenada al origen es igual a cero y su pendiente es igual a uno. Observando la gráfica para la linealidad del sistema y efectuando el análisis estadístico, se comprueba que éste tiene un coeficiente de correlación ( $r$ ) de 0.9992, una ordenada al origen ( $a$ ) de -3.5646 y una pendiente ( $b$ ) de 0.9680, por lo que consideramos que dicho sistema es lineal según los criterios establecidos por la ley General de Salud.(8)

2. PRECISION DEL SISTEMA. Para métodos cromatográficos, se considera que el sistema de medición es preciso cuando su coeficiente de variación es menor a 1.5%. Al efectuar el análisis estadístico, el valor de dicho coeficiente es de 0.796% por lo que el sistema se considera preciso.

3. ESPECIFICIDAD FRENTE A EXCIPIENTES. Al observar las gráficas 1, 2, 3 y 4 podemos verificar que el método analítico es capaz de separar la sustancia de interés (AAS) del resto de los excipientes, y aún del producto de degradación (AS), por lo que éste se considera específico.

4. LINEALIDAD DEL METODO. La gráfica de la linealidad del método muestra el comportamiento del principio activo, el cual es una línea recta. Al efectuar el análisis estadístico se obtiene un coeficiente de correlación de 0.9998, una ordenada al origen de 2.473 y una pendiente de 0.9884. Bajo los criterios establecidos por la ley General de Salud, el método se considera lineal.

5. EXACTITUD DEL METODO. De acuerdo a los % de recobro y realizando el análisis estadístico, se determinó que estos caen dentro de los límites permitidos para esta forma farmacéutica ( 98-102%), por lo que el método se considera exacto.

#### 6. PRECISION DEL METODO (REPRODUCIBILIDAD).

Realizando el análisis estadístico, correspondiente podemos determinar que no existe efecto por el día en que se realice el análisis, ni por el analista que lo lleve a cabo.

#### 7. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA. Las desviaciones

obtenidas para esta determinación son menores a las establecidas en la prueba de t de Dunnett, por lo cual consideramos que la muestra es estable hasta 24 horas después de preparada, ya sea que se almacene a temperatura ambiente o en refrigeración.

### CONCLUSIONES.

Una vez finalizado este trabajo podemos decir que el método propuesto para cuantificar Acido Acetilsalicílico en tabletas solubles como producto terminado es adecuado de acuerdo a todos los parámetros evaluados.

El método analítico resulta ser lineal, exacto y preciso, además de específico por que separa al principio activo de los demás excipientes y de su principal producto de degradación, lo cual es una gran ventaja ya que puede utilizarse como un indicativo de estabilidad.

Por todo lo anterior podemos concluir que el método analítico implementado cumple con los requisitos analíticos deseados y por lo tanto puede emplearse como método rutinario en la cuantificación del Acido Acetilsalicílico en tabletas solubles como producto terminado.

A N E X O

1. Linealidad.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n - 2}} \quad \dots\dots 1$$

a. Evaluación de A(a).

$$t_{\text{calc}} = \frac{a - A}{S_{y/x} \left[ \frac{\sum x^2}{n} - (\bar{x})^2 \right]} \quad \dots\dots 2$$

\* Criterio de Aceptación. Si  $t(0.975, n-2) > t_{\text{calc}} > t(0.025, n-2)$

el método se acepta y podemos decir que tiene una ordenada - al origen considerada como "cero".

b. Evaluación de B(b).

$$t_{\text{calc}} = \frac{(b - B) \text{ DE } (x) \sqrt{n-1}}{S_{y/x}} \quad \dots\dots 3$$

\* Criterio de Aceptación. Si  $t(0.975, n-2) > t_{\text{calc}} > t(0.025, n-2)$ ,

el método se acepta y podemos decir que tiene un pendiente - considerada como "uno".

2. Exactitud.

$$t_{\text{calc}} = (\bar{x} - u) / (\text{DE} / \sqrt{n}) \quad \dots\dots 4$$

\* Criterio de aceptación.  $t(0.975, n-1) > t_{\text{calc}} > t(0.025, n-1)$  ,

\* Si se acepta consideramos al método como exacto.

3. Reproducibilidad.

$$\sum y_i^2 / bc = (y_{1..})^2 + (y_{2..})^2 / bc \quad \dots\dots 5$$



$$\sum Y_{ij}^2/c = (y_{1..})^2 + (y_{2..})^2 + (y_{.1})^2 + (y_{.2})^2 /c \quad \dots\dots 6$$

$$(Y_{...})^2/abc = (y_{1..} + y_{2..})^2 = (y_{.1} + y_{.2})^2 \quad \dots\dots 7$$

$$\sum \sum Y_{ijk}^2 = (y_{111})^2 + (y_{112})^2 + \dots + (y_{222})^2 + (y_{223})^2 \quad \dots\dots 8$$

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA

FV	gl	SC	MC	F <sub>calc</sub>	F <sub>tabs</sub>
Analista	a-1	$\sum Y_{i..}^2 / bc - Y_{...}^2 / abc$	SC <sub>a</sub> /a-1	MC <sub>a</sub> /MC <sub>e</sub>	F <sub>a</sub> , 1/ 8
Día	b-1	$\sum Y_{ij.}^2 / c - \sum Y_{i..}^2 / bc$	SC <sub>b</sub> /b-1	MC <sub>b</sub> /MC <sub>e</sub>	F <sub>D</sub> , 2/ 8
Error	ab(c-1)	$\sum \sum Y_{ijk}^2 - \sum Y_{ij.}^2 / c$	SC <sub>e</sub> /ab(c-1)	—	—

Tabla No. 1. Muestra los calculos para la evaluación - de la reproducibilidad del método.

\* Criterio de aceptación. Si se cumple que para:

$$\text{Analista: } F_{\text{calc}} < F_{\text{tabs}}$$

$$\text{Día : } F_{\text{calc}} < F_{\text{tabs}}$$

podemos decir que el método es reproducible y que no existe efecto por el día en que se realice el análisis, ni por el - analista que lo lleve a cabo.

#### 4. Estabilidad de la muestra.

$$\sum \sum Y_{ij}^2 = (Y_{a1})^2 + (Y_{a2})^2 + \dots + (Y_{nb})^2 + (Y_{nb})^2 \quad \dots\dots 9$$

$$\sum \sum Y_{i.}^2 = (Y_a)^2 + (Y_b)^2 + (Y_c)^2 + (Y_d)^2 \quad \dots\dots 10$$

$$\text{SCE} = Y_{ij}^2 - Y_{i.}^2 / r \quad \dots\dots 11$$

$$\text{MCE} = \text{SCE} / t (r-1) \quad \dots\dots 12$$

$$t_D = Y_n - (Y_{na} / 2 \text{ MCE} / r) \quad \dots\dots 13$$

## BIBLIOGRAFIA.

1. Florey, K.A., "Analytical Profiles of Drugs Substances", Vol. 8, Editorial Academic Press, Inc., USA, 1986, pages: 3-37.
2. Guerra, J., "Validation of Analytical Methods", J. Anal. Chem. 10(3) 1986, pag: 74.
3. Taylor, J., "Validation of Methods" , J. Anal. Chem., 55(6) 1983, pag: 600A.
4. Pharmaceutical Manufacturers Association. "Current Concepts for Validation of Compendial Assays". Pharmaceutical Forum. 1986. pag: 1241.
5. Asociación Farmacéutica Mexicana. "Taller de Validación" AFM, 1987.
6. Irman, E.L., "General Method Validation Guidelines for Pharmaceutical Samples", J. Chrom. Sci., 25(7) 1987.
7. Cavenaghi, L., "Statistical Evaluation of the Results Obtained with the Analytical Methods Used for the Quality Control of Medicines", Drug. Dev. and Ind. Pharm., 13(14) 1987, pages: 2571-2515.

8. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, Secretaría de Salud, "Métodos Analíticos, Validación", 1990.

9. Remington: Farmacia, Vol.1, 17a.Edición, Editorial Médica Panamericana,S.A., Buenos Aires, Argentina, 1985, pags: 809-844.

10. Harold,M.M.,"Cromatografía Líquida de Alta Presión". 2a.Edición. Secretaría de la Organización de los Estados de Washington,D.C., 1980.

11. García de M.A.,"Cromatografía Líquida de Alta Resolución". 1a.Edición, Editorial Limusa, S.A., de C.V., México,D.F. , 1980.

12. Martindale,"The Extra Pharmacopoeia", 29a.Edición, The Pharmaceutical Press,London, England, 1989, pags: 3-7.

13. Goodman,L.,"Bases Farmacológicas de la Terapéutica". 5a.Edición,Editorial Interamericana, México,D.F., 1978, pags: 270-284.

14. The Merck Index,Elevent Edition,USA, 1989,pag: 870.

15. The United States Pharmacopoeia, 22th Edition, USA, 1990, pags: 113-114.

16. FNEUM. 5a. Edición, pags: 969-972.

17. Rodriguez,C.R., "Vademécum Académico de Medicamentos", tomo I, UNAM, México, 1984, pags: 15-16.

18. Memorias del Curso de Introducción a la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución impartido por Perin Elmer, México,D.F.. Junio. 1989.

19. Yost,R.W., "Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica", Perkin Elmer, México,D.F., 1980.

20. Johnson,E.L., "Basic Liquid Chromatography", Varian Associates, Inc., Library of Congress Catalog, Palo Alto California, USA, 1987.

21. Diario Oficial de la Federación, tomo CDXII, No.11, México, D.F., Lunes 18 de Enero, 1988.

22. Kirchoefer, R., "Aspirin - A National Survey II: Determination of Salicylic Acid in Bulk Aspirin Formulations by High-Pressure Liquid Chromatography Using a Fluorescence Detector", J. Pharm. Sci., 69(5) 1980, pages: 548-550.

23. Kirchoefer, R., "Aspirin - A National Survey III: Determination of Impurities in Bulk Aspirin and Aspirin Formulations by High-Pressure Liquid Chromatography and Spectrophotometry", J. Pharm. Sci., 69(5) 1980, pages: 550-553.

24. Kirchoefer, R., "Simultaneous Determination of Aspirin and Salicylic Acid in Bulk Aspirin and Plain, Buffered and Enteric-Coated Tablets by High-Pressure Liquid Chromatography with UV and Fluorescence Detectors", J. of Pharm. Sci., 69(10) 1980, pages: 1188-1190.