



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA.



**MIGUEL ANGEL AVILA ESPINOSA**

No cuenta: 09463260-8

Folio: 208057

Año de término de carrera: Junio 2000

Orientación: Farmacia

**Titulo de tesis: Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC(Ultra Performance LC).**

Área específica del proyecto: Industria Farmacéutica.

Director: QFB. Domitila Burgos Jara.

Asesor: QFB. Cirenía Sandoval López

Lugar: Laboratorios Zerboni S.A de C.V



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 esta 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.

## **AGRADECIMIENTOS**

### ***Gracias:***

*A mis padres por su comprensión, consejos, por estar conmigo en las buenas, en las malas y haberme dado las bases para ser alguien de provecho en la vida, y por ser mis padres.*

*A mi esposa Susana por ser parte importante en mi vida, por tu amor incondicional y a mis hijos,.*

*A mis hijos Rafael, a mis gemelas Roxana y Maritza por ser el motor para seguir adelante en todo lo que emprendo, motivarme a ser mejor día a día y por haberme cambiado la vida.*

*A mis hermanos por su apoyo y consejos.*

*A mis abuelitos Mau y Nico que aunque ya no están aquí siempre los llevo en el corazón, cumplí lo que prometí abuelito Mau.*

*A mis abuelitos Isaac y Paula , gracias por sus consejos, cariño y paciencia.*

*A mis primos paternos y maternos por sus consejos en el momento indicado..*

*A mis tíos Paternos y maternos*

*A mis compadres Guillermo, Gustavo, Malena.*

*A mis compañeros de trabajo Ale Lazaro(nenorra), Fernando(chacarron), Edgar Solares y López, Esperanza (yoda), Manuel, Victor. Vicky, Gabo, por los buenos y malos momentos.*

*A Josefina por el apoyo y facilidades para la realización de esta tesis.*

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

MARCO TEORICO

INTRODUCCION

DESARROLLO E INVESTIGACION DE LA TECNICA ANALITICA

PROBLEMA RESUELTO

OBJETIVOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

DISEÑO ESTADISTICO

RESULTADOS

ANALISIS DE RESULTADOS

CONCLUSIONES

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

BIBLIOGRAFIA

ANEXOS

SUGERENCIAS

## **RESUMEN.**

La Cromatografía Líquida de Alta Definición (CLAR) representa el mayor mercado en el mundo del instrumental analítico. La popularidad de esta metodología se debe a su gran versatilidad, excelente capacidad para el análisis de trazas, en muchos casos ppb, rapidez y adaptabilidad al análisis cuantitativo. El uso del CLAR se extiende a casi todos los laboratorios industriales farmacéuticos, organismos oficiales, universidades y en todos los laboratorios donde se realicen investigaciones químicas o bioquímicas. En el futuro la CLAR jugará un rol importante en los laboratorios de investigaciones farmacéuticas, de síntesis orgánica, bioquímicas, biológicos, de control del medio ambiente y alimentarios.

Por extraño que parezca una de las mayores limitaciones del CLAR es la falta de operadores experimentados. El entrenamiento en técnicas modernas de CLAR y UPLC (Cromatografía de Líquidos de Ultra Resolución del inglés, Acquity Ultra Performance Liquid Chromatography), en los laboratorios farmacéuticos es casi nulo. Esto ocurre debido al alto costo de los instrumentos y a que los jefes del área farmacéutica no tuvieron la oportunidad de adquirir experiencia en esta disciplina, por lo cual el entrenamiento debe recaer o en fabricante del instrumento o en el químico experimentado en la materia.

La reducción en los tiempos de análisis, poco gasto de reactivos, menos horas hombre, representan ganancias a la Industria farmacéutica, así como menos desechos, contribuyendo a cuidar la ecología y el medio ambiente.

Así, el UPLC toma relevancia y el presente trabajo da impulso al su uso y dominio, tomando en cuenta las cualidades antes mencionadas

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio Zerboni S.A de C.V en base a la necesidad de contar con una técnica analítica de análisis para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por Acquity UPLC., y así mismo poder disminuir el gasto de reactivos, toxicidad de los mismos y tiempos de análisis en pruebas críticas en la determinación de ácido acetilsalicílico, como son valoración, ácido salicílico libre, determinación de carbonatos.

Como en los sistemas CLAR, el corazón de los sistemas ACQUITY UPLC™ de Waters es la columna. Para hacer efectivo el potencial en velocidad de análisis, resolución y sensibilidad que la teoría de las separaciones cromatográficas apuntan, ha sido necesario diseñar un nuevo relleno cromatográfico capaz de trabajar las condiciones que impone la UPLC™. Este nuevo material es la segunda generación de rellenos de particular híbrida, con un componente inorgánico (sílice) y un componente orgánico (organosiloxanos), patentados por Waters.

## **Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

Este material, en partículas esféricas de 1,7 micras de diámetro, permite unas prestaciones inmejorables en eficacia, robustez y simetría de picos. Para obtener el máximo rendimiento de las separaciones UPLC™, Waters ha desarrollado un nuevo método de producción del relleno y las columnas según el cual se obtiene una distribución muy estrecha del tamaño de partícula y el empaquetado se realiza a presiones mucho mayores que en el de las columnas convencionales para CLAR.

Cada columna ACQUITY UPLC™ va equipada con un chip inteligente eCord™ en el que quedan registrados la historia de la columna, número de inyecciones, presión y temperaturas de trabajo, y que contiene además los certificados de análisis de la columna desde la producción del relleno a la columna empaquetada.<sup>18</sup>

### **Hardware y Software.**

Diseñar un equipo para trabajar con tamaños de particular por debajo de 2 µm ha llevado a un nuevo diseño del sistema de bombeo para proporcionar un caudal constante a presiones elevadas, detectores de alta velocidad capaces de capturar datos de picos que pueden tener anchuras inferiores a 1 segundo, y un sistema de inyección que pueda trabajar a presiones elevadas y con ciclos de inyección rápidos que no comprometan el rendimiento del sistema. Y todo ello en un análisis de baja dispersión para obtener un sistema en el que se combinan velocidad de análisis, resolución y sensibilidad.<sup>18</sup>

El sistema ACQUITY UPLC™ de Waters consiste de un módulo para gestión de eluyentes binario, módulo para gestión de muestras, columnas ACQUITY UPLC™, horno para columnas y detector UV, PDA, Light Scattering Evaporativo (ELS) y/o MS. Opcionalmente puede incorporar un organizador de muestras con capacidad para hasta 21 placas de pocillos o 8 bandejas de viales. El sistema se controla desde las estaciones Empower™ o MassLynx™.

El sistema ACQUITY UPLC™ es también el primer sistema de Waters que incorpora el Nuevo software Connections Insight™, una rutina que controla en cada instante los parámetros de funcionamiento para prevenir cualquier operación de mantenimiento. Esta rutina informa de manera automática al analista cuando se detecta cualquier disfunción o incluso, si el analista así lo decide y el equipo está conectado a Internet, manda un mensaje de alerta al servicio técnico de Waters para preparar la acción de mantenimiento necesaria.<sup>18</sup>

## **MARCO TEORICO**

La validación de métodos analíticos es parte fundamental del desarrollo de una nueva formulación y de la técnica de análisis de control de calidad de una nueva forma farmacéutica, ya que es durante esta secuencia de pruebas y análisis, en donde el químico se da cuenta si el estudio, el cual esta siendo evaluado sistemáticamente, cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado.<sup>15</sup>

De acuerdo a las Buenas Prácticas tanto de fabricación como de laboratorio, es necesario que todos los métodos analíticos que empleamos estén validados.

Bajo este marco y considerando a la validación de métodos analíticos como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas., en muchas situaciones cuando se tiene interés en medir un componente en una muestra, es necesario contar con una metodología de medición(método analítico).

Por ello las empresas de transformación (principalmente farmacéuticas) requieren de este tipo de metodologías, pudiendo utilizar metodologías farmacopeicas, o bien dedicar tiempo para su desarrollo, partiendo del hecho de que deben cumplir el atributo de confiabilidad. Como en muchas de las actividades de la industria farmacéutica se hace uso del método cuantifico para alcanzar este atributo, es necesario llevar a cabo en la mayoría de las ocasiones estudios experimentales que permitan demostrar la confiabilidad de lo que se esta midiendo. Un proceso que permite cumplir con este fin es la validación.<sup>14</sup>

Como es bien sabido, todo producto farmacéutico debe tener atributos de identidad, pureza, concentración, potencia, inocuidad y disponibilidad para cumplir con los aspectos normativos oficiales e internos y no menos importantes, los éticos, por lo que si un método analítico, que finalmente es el medido de las características críticas de calidad del producto, no es confiable, se corre el grave riesgo de afectar al usuario final que es un paciente.

Desde este enfoque, la validación de métodos analíticos es un sistema involucrado en los procesos de fabricación en el área de calidad de la empresa y bajo la filosofía de la Validación, las Autoridades Regulatorias verifican que las empresas sustenten estos sistemas con actividades documentadas, como se indica en la NOM-059 SSA1 numerales 5.6.3, 5.7.4, 9.11.3, 9.11.5, y 9.12.3 y en otros lineamientos regulatorios internacionales.<sup>30</sup>

## **Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

El objetivo final de un dictamen de calidad, es la liberación o no liberación de un producto sobre la base de las especificaciones previamente establecidas. Esta decisión es tomada generalmente por el profesional farmacéutico, en gran medida está dada por los resultados obtenidos al aplicar uno o diversos métodos analíticos; si estos no son farmacopeicos y no están validados, decisión corre el riesgo de ser errónea y afectar al usuario del producto y por ende, a la misma empresa. La validación le proporciona, a quien aplica la metodología, una seguridad de la confiabilidad de dichos métodos y puede tomar la decisión final con certeza. La validación de métodos analíticos también impacta en otras áreas relacionadas a la calidad de un producto (estabilidad, limpieza de equipos, entre otras).<sup>14</sup>

Hasta el momento, las empresas que han implantado esta actividad inicialmente se orientaron con la Guía de Validación de Métodos Analíticos publicada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos y avalada por la Secretaría de Salud hace mas de una década. En su momento, esta Guía cubrió las necesidades que por la corriente de validación habían empezado a surgir en la mayoría de las empresas; con el tiempo, por necesidades propias de la validación de procesos, la validación de métodos se especializo al grado de convertirse en una actividad independientemente regulada, hoy en día las Validaciones se basan en la Guía de Validación de Métodos Analíticos del año 2002 del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos y avalada por la Secretaria de Salud actualizada.

No se puede pasar por alto el hecho de que el factor más importante durante la validación de todo método analítico es siempre el criterio profesional, responsable de esta decisión, criterio que es necesario aplicar después de tomar en cuenta todos los factores relacionados con el, o los principios activos, concentraciones, forma farmacéutica, tipo de muestra, método de análisis, propósito de la técnica analítica, instrumentación, sustancias relacionadas, etc., estos requisitos constituyen únicamente una guía para dar al químico un soporte técnico adecuado para resolver cada caso particular.<sup>14</sup>

### **Moral y ética.**

El profesional farmacéutico es el responsable de los procesos farmacéuticos y por lo tanto de la calidad de estos. Todo producto farmacéutico (materias primas, producto intermedio, producto a granel y producto terminado) debe satisfacer requisitos y para ello se utilizan métodos para medir componentes específicos en el producto, lo cual es llevado a cabo con métodos analíticos.

### **Aseguramiento de Calidad.**

Los métodos analíticos están definidos como un sistema crítico en el aseguramiento de calidad en una empresa farmacéutica, ya que impactan de manera directa en la calidad de un producto.

**Economía.**

La carrera de muchas empresas por alcanzar una productividad elevada a costos menores, esta determinada, entre otros factores, al dictamen del producto en menor tiempo, utilizando métodos de prueba de menor costo, mantenimiento o tiempo de análisis entre otros.

**Regulatoria.**

Reglamento de Insumos para la salud. Publicado en el Diario Oficial el 4 de febrero de 1998 referente a los establecimientos que se destinen a la fabricación de insumos (medicamentos, fármacos, materias primas y aditivos), establece lo siguiente.<sup>14</sup>

<b>ARTÍCULO</b>	<b>C O N T E N I D O</b>
15	Los establecimientos que se destinen a la fabricación de insumos, llevaran el control analítico de estos. Dicho control deberá incluir:  III. La validación de las técnicas empleadas.

**Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993.** Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos, establece los siguientes puntos referentes a la Validación de Métodos Analíticos.

<b>NUMERAL DE LA NORMA</b>	<b>C O N T E N I D O</b>
5.6	El encargado del área de producción se encargará de realizar las siguientes funciones, sin perjuicio de las obligaciones y responsabilidades que corresponden al responsable sanitario, conforme a la Ley General de Salud y al Reglamento de Insumos para la Salud:

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

5.6.3	Que se lleven a cabo estudios de validación de los procesos de fabricación y de los sistemas involucrados.
5.7	El encargado del área de calidad se encargara de realizar las siguientes funciones, sin perjuicio de las obligaciones y responsabilidades que corresponden al responsable sanitario conforme a la Ley General de Salud y al reglamento de Insumos para la Salud:
5.7.4	Que se lleven a acabo estudios de validación de los procesos de fabricación y de los sistemas involucrados.
9.11.3	Los métodos analíticos deben ser validados, de acuerdo con lo establecido en el apartado 9.12 "control del laboratorio analítico".
9.12.3	Se debe contar con métodos de análisis validados para productos granel, producto terminado y materia prima en caso de no aparecer en la FEUM o en cualquier farmacopea internacional.

**NORMA Oficial Mexicana NOM-164-SSA1-1998,** Buenas prácticas de fabricación para fármacos.

<b>NUMERAL DE LA NORMA</b>	<b>C O N T E N I D O</b>
16.1	Los controles de laboratorio e inspecciones deben apoyarse en normas, PNO's o manuales que contengan las especificaciones para garantizar la confiabilidad de sus resultados. Tales controles deben incluir:
16.1.5	Validación de métodos analíticos, no farmacopeicos o farmacopeicos que tengan desviaciones frente a la farmacopea de referencia, utilizados por la empresa

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

--	--

**NORMA Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-1993,** Estabilidad de medicamentos.

<b>NUMERAL DE LA NORMA</b>	<b>C O N T E N I D O</b>
5.5	Cuando se cambie el método analítico durante el estudio de estabilidad, se debe demostrar que los dos métodos son equivalentes mediante el proceso de validación.
5.10.2 5.10.2.3	Información general, especificaciones y métodos analíticos. Información de la linealidad, precisión, exactitud, reproducibilidad, repetibilidad y especificidad del método analítico indicativo de estabilidad.
6	Fármacos Para fines de registro de un medicamento con fármacos nuevos en México, el fabricante del medicamento debe presentar ante la Secretaría de Salud estudios de estabilidad acelerada y/o a largo plazo de tres lotes del (los) fármaco(s) efectuados por el fabricante de los mismos, utilizando métodos analíticos validados

Las regulaciones anteriores, determinan la obligación de validar métodos analíticos.

Estas regulaciones podrían ser modificadas, por lo que es importante estar actualizados.

## **INTRODUCCION.**

La Aspirina o Ácido acetilsalicílico, es el fármaco más famoso y más utilizado de todos los tiempos. Verdaderamente ha trascendido el plano eminentemente científico para convertirse en un hecho y en un acontecimiento social, tanto que muchas personas no lo consideran un fármaco sino algo consustancial a la vida cotidiana, que se toma frecuentemente, no sólo cuando se tiene algún tipo de dolor o se está gravemente enfermo, sino simplemente porque te encuentras mal. Tal es su repercusión social que en muchos países su compra no se lleva a cabo sólo en la farmacia, sino también en los supermercados; igualmente es un fármaco disponible en lugares no médicos para el tratamiento de la fiebre y el dolor. Se cataloga como el fármaco más utilizado de todos los tiempos<sup>32</sup>

Desde antes de Cristo ya se conocía el ingrediente básico de la Aspirina, cuando se empleaba la corteza del sauce, machacada. Los egipcios utilizaban los efectos analgésicos del mirto o del sauce para el dolor articular, y en el Papiro de Ebers se describe minuciosamente el proceso de la inflamación, así como la aplicación de pócimas sobre la zona lesionada. Luego, en el 1800, los salicilatos se convirtieron en el fármaco de elección para el tratamiento de los procesos artríticos e inflamatorios. Desde la Grecia antigua hasta los Indios de Norteamérica, ya se conocía la acción analgésica de la misma. Hipócrates ya recetaba hace 24 siglos la corteza de sauce en forma de infusión para aliviar los dolores y la fiebre. Luego llegó un período en el cual su empleo cayó en el olvido, hasta el año 1763, donde el clérigo inglés Edward Stone rescata este antiguo remedio y lo vuelve a utilizar, realizando lo que se conoce como la primera investigación científica con corteza de sauce, en la cual logra con éxito reducir el cuadro febril de 50 pacientes.

En 1838, se extrae el principio activo de la corteza de sauce: el ácido salicílico, consiguiéndose su síntesis química en 1859, por Hermann Kolbe. Poco después se comenzaba su producción a escala industrial en 1874, aunque su forma inicial comercial, el Salicilato Sódico, presentaba efectos secundarios muy molestos que disminuían su tolerancia y su aceptación por los pacientes, tales como, irritación gástrica y su desagradable sabor en extremo<sup>32</sup>

Exactamente, el 10 de Octubre de 1897, el químico y farmacéutico alemán Félix Hoffmann, describió en su diario de laboratorio, cómo había logrado sintetizar la molécula de Ácido Acetil Salicílico, en forma pura y estable, en los Laboratorios de Investigación de Farbenfabriksen Vorn Friedrich Bayern & Co. Esto lo consiguió mediante la acetilación del Ácido Salicílico. Todo esto lo motivó la enfermedad de su padre, quien padecía de un cuadro reumático severo y se medicaba con Ácido Salicílico, lo cual le provocó serios problemas gástricos. En el intento de aliviar el cuadro gástrico, surgió este maravilloso fármaco. Heinrich Dreser, de los laboratorios farmacéuticos

## Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).

Bayern, probó en sí mismo la nueva composición de Hoffmann realizando experimentos, primero en animales y luego en humanos, mostrando los efectos analgésicos y antiinflamatorios del Ácido Acetil Salicílico en la publicación, devenida clásico de la Medicina: "Pflügers Archir für die gesamte Physiologie", en 1899(4). Ya en esta fecha, Bayern inicia la comercialización del Ácido acetilsalicílico bajo el nombre de Aspirina, que en la actualidad se encuentra registrado oficialmente en más de 70 países. Ahora bien, ¿porqué el nombre de Aspirina? La letra "A" viene de Acetil, y el vocablo "Spir" de la planta Spirea Ulmania, de la cual se aisló originalmente el Ácido acetilsalicílico<sup>32</sup>

En 1904, la forma original en polvo se reemplazó por el comprimido, lo que trajo una mejor dosificación del medicamento y la dificultad para que ocurriera una adulteración del mismo. Histórica y curiosamente debemos decir que en la obra de los grandes también ha estado la Aspirina, por ejemplo, en las novelas de Thomas Mann, Graham Green, Edgar Wallace, Kafka, Ortega y Gasset, y Giovanni Guareschi. En 1950, Aspirina logró un lugar en el Libro de los Records Guinness, como el remedio más popular contra el dolor en todo el mundo, hasta el punto de que en 1969, el botiquín de primeros auxilios de la nave espacial Apolo que llevaba a los primeros astronautas americanos a la Luna, contenía Aspirina<sup>(35)</sup>. Todo esto acontecía pero aún no se conocía su mecanismo de acción, hasta el 1971, año en que el científico británico John Vane, descubre que el AAS bloquea la producción de hormonas naturales denominadas prostaglandinas, envueltas en muchos procesos orgánicos incluyendo el dolor y el daño tisular.

En el año 1982, ya convertido en Sir Vane, éste profesor, junto a dos colegas suecos, Sune Bengtröm y Bengt Samuelsson, ganaron el Premio Nobel de Medicina por estos trabajos<sup>(37)</sup>. Actualmente se conoce gran parte de su mecanismo de acción en cuanto a su capacidad de antagonizar la ciclooxigenasa 1 y la ciclooxigenasa 2. Aún hoy en día, los científicos biomédicos continúan investigando sobre los mecanismos de acción y sobre los efectos de la Aspirina. Es tan increíblemente amplio su espectro de acción, que, de las más conocidas acciones farmacológicas, tales como, las analgésicas-antiinflamatorias, y en el área cardiovascular su efecto antiagregante plaquetario, se han descubierto otras como su efecto preventivo sobre los accidentes cerebrovasculares, el cáncer de colon, aquí podemos decir que aunque no se conoce exactamente el mecanismo, parece ser que el fármaco afectaría el crecimiento de los pequeños pólipos de la pared del intestino e impide la malignización de los mismos por su acción sobre las prostaglandinas, que parecen estar envueltas en este proceso. Otro aspecto es su efecto preventivo sobre la Enfermedad de Alzheimer, sobre el crecimiento intrauterino retardado, la preeclampsia<sup>(38)</sup>, y algunas complicaciones de la Diabetes Mellitus, tales como, la ceguera, la enfermedad coronaria, el ictus y el fallo renal.<sup>32</sup>

### Elementos de Farmacología aplicada:

Químicamente Aspirina pertenece a la familia de los salicilatos, siendo un derivado del ácido 2-hidroxibenzoico o Ácido Salicílico. Es un éster acetilado del ácido acetilsalicílico, donde se ha conseguido un aumento de su actividad analgésica con menores efectos irritantes sobre el aparato digestivo. Pertenece a la familia de los antiinflamatorios no esteroideos (39). De forma general puede ser administrada por diversas vías, entre las que se encuentran: <sup>32</sup>

Vía Oral: se absorbe fácilmente, de manera que a los 20-30 minutos ya comienza su acción. El medio ácido del estómago y porción proximal del duodeno favorecen su absorción, ya que se encuentra en forma ionizada y se absorbe mejor. Los alimentos retardan su absorción en cuanto a velocidad, pero no la cantidad total absorbida. Las formas tamponadas y efervescentes favorecen su absorción, ya que, la hacen más soluble, abrevian la desintegración del comprimido y aumentan la motilidad gástrica. Las formas con cubierta entérica o de liberación retardada liberan muy gradualmente el AAS en intestino delgado, permitiendo una hidrólisis a Salicilato mucho más completa, lo que conduce a niveles plasmáticos indetectables de AAS. Es mucho mejor su administración con el estómago vacío, pero esto puede provocar irritación. Ya en sangre su unión a las proteínas plasmáticas es alta, de un 90%, al igual que su disponibilidad. En el hígado sufre una hidrólisis a salicilato, mediante la conjugación con el ácido glucurónico, formando glucurónico salicilacílico, el cual se excreta en parte por la bilis como compuestos del ácido glucurónico, reabsorbiéndose nuevamente, dando lugar al ciclo enterohepático. El salicilato se excreta por vía renal, dependiendo del pH urinario. De forma general, las drogas que alcalinizan la orina facilitan su eliminación, mientras que las que acidifican la misma la enlentecen o la reducen. Esto es muy importante en lo que respecta a las interacciones. Su vida media es variable y depende de la dosis utilizada: dosis bajas determinan una semivida de 4 horas, mientras que dosis mayores de 4 mg por día pueden generar niveles plasmáticos durante un tiempo aproximado de 15 horas.<sup>32</sup>

Vía Rectal: es una vía muy variable en lo que a absorción se refiere, pero el dato más sobresaliente es que no nos garantiza un menor efecto lesivo sobre la mucosa gastrointestinal, por esto no se recomienda la misma.

Vía Parenteral (Endovenosa): por esta vía se evita el primer paso que corresponde a la metabolización hepática, por lo que los niveles en sangre son mayores y sobre todo persisten mucho más tiempo, motivo que puede explicar la mayor acción analgésica al emplear la misma.

En cuanto a Farmacocinética conviene recordar que a dosis moderadas y altas se tarda unos 7 días en conseguir una concentración de equilibrio estacionario. A concentraciones elevadas, pequeñas variaciones en la dosis hacen variar marcadamente los niveles plasmáticos, con lo que, si las dosis

aún no son suficientes, un ligero aumento puede hacer alcanzar los niveles adecuados; y, si aparece toxicidad, un pequeño descenso puede hacerla desaparecer. Difunden bien en todos los tejidos y líquidos orgánicos, incluyendo leche y líquido sinovial.<sup>32</sup>

### **Generalidades de Acción farmacológica:**

Se denominan AINES (Antiinflamatorio No Esteroideos), para diferenciarlos de las hormonas esteroideas de la corteza suprarrenal, que también poseen efecto antiinflamatorio. De forma general, su mecanismo de acción se basa en el bloqueo de la producción de mediadores de la inflamación a partir del ácido araquidónico, como las prostaglandinas y los leucotrienos. Ésta sería su acción fundamental, aunque otros muchos procesos celulares son influenciados por Aspirina, tales como:

La inhibición de superóxidos y radicales oxígeno tóxicos,

La estabilización de los lisosomas,

La inhibición de la adhesividad y la agregación granulocítica, y,

Acción sobre los linfocitos y los monocitos que va a inhibir la síntesis del factor de necrosis tumoral y la interleucina 1.

Resumiendo, podemos decir que, en primer lugar, Aspirina evitaría la síntesis de prostaglandinas, y, en segundo lugar, amortiguaría las respuestas celulares secundarias a una gran agresión inflamatoria<sup>(43)</sup>.

Algunas propiedades farmacológicas más relevantes de Aspirina:

**Analgesia:** Alivian los dolores agudos y crónicos de intensidad leve a moderada, de origen circunscrito o difuso, que surgen de estructuras tegumentarias y no viscerales. Esto depende de la dosis, y se lleva a cabo por dos mecanismos, uno periférico (principalmente inhibición de las ciclooxigenasas 1 y 2, COX 1 y COX 2), y otro sobre el sistema nervioso central.<sup>32</sup>

**Antipiresis:** En dosis moderada, los salicilatos disminuyen la temperatura corporal elevada y aumentan el consumo de oxígeno y el índice metabólico. Es un efecto antipirético muy rápido y efectivo. De extrema importancia es el dato de que las dosis tóxicas tienen un efecto pirético que cursa con sudoraciones profusas.

**Respiración:** aumentan el consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono, fundamentalmente en el músculo esquelético, como resultado del desacople inducido de la fosforilación oxidativa. Esta mayor producción de dióxido de carbono y su acción directa sobre el bulbo, estimulan la frecuencia y la profundidad de la respiración, dando lugar a alcalosis respiratoria. Ahora bien, se conoce que dosis muy elevadas producen depresión bulbar de la respiración, lo cual parejo a la continua producción de dióxido de carbono, produce acidosis respiratoria.

**Equilibrio ácido-base y desequilibrio electrolítico:** Inicialmente puede provocar alcalosis respiratoria extra e intracelular, que se compensa rápidamente mediante la excreción renal de bicarbonato, sodio y potasio

(etapa de alcalosis respiratoria compensada). Ahora, si las dosis son muy altas o el paciente es un niño, puede descender el pH en sangre, puede verse baja concentración plasmática de bicarbonato y presión parcial plasmática de CO<sub>2</sub> casi normal, es decir, una combinación de acidosis respiratoria y metabólica. Aparece deshidratación hipernatrémica por el aumento de la sudoración y depleción de potasio por factores renales y extrarrenales.

Efectos gastrointestinales: Pueden dar lugar a molestias epigástricas, náuseas, vómitos, úlcera gastroduodenal y hemorragia gástrica. Esto es provocado por la inhibición de la formación de la prostaglandina PGI-2, que inhibe la secreción de ácido gástrico y regula el flujo sanguíneo. Por otra parte, los salicilatos desintegran la barrera mucosa gástrica normal. Dato interesante es el que debido a la inhibición de las prostaglandinas del intestino, Aspirina disminuye la diarrea provocada por la radioterapia en el cáncer del cuello uterino.

Hematológicos: los salicilatos dificultan la agregabilidad plaquetaria, que persiste durante toda la vida de estas células ( a diferencia de lo que ocurre con los otros antiinflamatorios no esteroideos). Esto se debe a la inhibición de la ciclooxigenasa COX-1.

Efectos uricosúricos: Dosis bajas (1 a 2 grs por día) pueden disminuir la excreción de uratos y elevar la concentración plasmática de los mismos; dosis intermedias (2 a 3 grs por día) no suelen alterar la excreción de uratos; dosis grandes (más de 5 grs por día) inducen uricosuria y disminuyen los niveles plasmáticos de uratos.<sup>32</sup>

### **Empleos en Terapéutica:**

Someramente desarrollaremos algunos de sus empleos en el área de las enfermedades y grandes síndromes osteomioarticulares. Su objetivo primario fué el tratamiento de la Artrítis, y aún hoy en día se mantiene éste como el primero.

1. Osteoartrosis o Enfermedad Articular Degenerativa: caracterizada por la pérdida del cartílago articular, con exposición del hueso subcondral, y por ende, dolor, inflamación e impotencia funcional, con limitación o pérdida de la movilidad, y neoformación ósea patológica (osteofitos marginales y sindesmofitos), pudiendo llegar a avanzados grados de destrucción articular, incluyendo subluxación de la misma con la correspondiente deformidad clínica. En este caso, la Aspirina en dosis bajas, junto al Paracetamol, sea quizás el tratamiento analgésico más empleado. No se recomienda el uso mixto de los AINES, a menos que las dosis de AAS sean muy bajas, pues pierden eficacia en la resolución del cuadro, esto es válido excepto para Aspirina, por su efecto cardioprotector a bajas dosis (81-325 mgs, por día).<sup>32</sup>

2. Artrítis Reumatoidea: es una enfermedad de origen autoinmune que afecta a todo el organismo, mucho más frecuente en el sexo femenino, cuya principal alteración ocurre por una inflamación de la membrana sinovial, lo

cual provoca dolor, rigidez e inflamación articular. Aspirina es muy útil a dosis que pueden variar desde los 1.500 mgs por día hasta los 6.000 mgs por día, dependiendo de lo que queramos obtener, desinflamación o analgesia.

3. Artritis Crónica Juvenil: Se comienza con dosis diarias de 60 a 90 mgs por kgs, siempre que no exista fiebre. En caso de existir fiebre y enfermedad sistémica, se administra de 90 a 130 mgs por kgs por día, cada 4 horas. Siempre con alimentos, para disminuir sus efectos gastrointestinales. Siempre se deben seguir los niveles en sangre, los cuales no deben exceder de los 150-200 mgs por litro, 2 horas después de la administración del AAS. Se logra controlar los síntomas entre un 50-70%. El tratamiento debe mantenerse por 2 años después de que los signos de actividad de la enfermedad han desaparecido.<sup>32</sup>

4. Enfermedad de Still del adulto: caracterizada por poliartritis crónica seronegativa en combinación con un trastorno inflamatorio sistémico que afecta a adultos jóvenes. Hasta el 20-25% de los casos resuelven adecuadamente la fiebre, la artritis y las artralgias con que cursa la misma. Los pacientes que responden adecuadamente forman parte del grupo de buen pronóstico, con enfermedad autolimitada o intermitente. Los pacientes que no responden a dicha terapia, requieren, necesariamente, corticosteroides.<sup>32</sup>

5. Enfermedad de Kawasaki: La base del tratamiento de esta enfermedad lo constituyen en primer lugar, la administración de Aspirina (en dosis antiinflamatorias al inicio, y luego como antiagregante plaquetario) y en segundo lugar el uso de gammaglobulina endovenosa. En la fase aguda se administra Aspirina a altas dosis (80-120 mgs/kgs/día) en dosis divididas para mantener los niveles entre 20-30 mgs/100 mls, por 14 días. En período subagudo, caracterizado por la resolución de la fiebre y la aparición de trombocitos, se inicia la administración de AAS en dosis antiagregantes, de 3 a 5 mgs/kgs/día, una vez al día.<sup>32</sup>

6. Fiebre Reumática: Aquí, tanto los salicilatos como los glucocorticoides pueden ser de utilidad en el control sintomático de la enfermedad, aunque debemos señalar que ninguno de los dos posee capacidad curativa e incluso pueden prolongar la duración del brote. Su beneficio radica en que controlan las manifestaciones tóxicas de la misma, contribuyen al bienestar del paciente y combaten los síntomas constitucionales. La elección de los salicilatos radica en que deben ser pacientes con artritis franca pero sin carditis. Se administra cada 4 horas, durante las primeras 24-36 horas, y luego en cuatro tomas diarias. La dosis debe personalizarse teniendo en cuenta los siguientes factores: la respuesta clínica, la tolerancia y los niveles de salicilemia. De forma general, puede comenzarse con dosis de 90-100 mgs/kgs/día y después de 2 semanas, reducirlas a 60-70 mgs/kgs/día por 6 semanas más. Por otra parte, los casos que poseen carditis moderada, deben comenzar con glucocorticoides, aunque debemos señalar que no existen reportes que indiquen que sean superiores los salicilatos. En los pacientes con carditis severa, se suelen emplear los esteroides inicialmente asociados

,en ocasiones, a los diuréticos y a restricción de la ingesta de sal. Esto se hace por 6 semanas, comenzando la pauta de descenso en la segunda o tercera semana. En el caso de Aspirina, debe ser administrada durante 1 mes, después de retirar el tratamiento con Prednisona, para minimizar la incidencia de rebote.

7. Tendinitis y Bursitis: aquí se emplean en dosis de 3-4 grs por día, aunque debemos señalar que otros, como la indometacina y el diclofenaco pueden ser más eficaces

8. Eritromelalgia: es una entidad caracterizada por eritema acompañado por sensación quemante que afecta a las extremidades. Cuando la extremidad es descendida y se aplica calor, el dolor se intensifica, mientras que si se eleva la misma y se aplica frío el dolor desaparece. Puede ser primaria o secundaria, según se acompañe o no de otra enfermedad. El tratamiento en los adultos incluye tomas diarias de Aspirina a bajas dosis, pero en niños sin enfermedad subyacente la administración de AAS no mejora el curso clínico de la enfermedad.

### **Origen del dolor en el componente músculo esquelético:**

Generalidades clínicas y justificación anatómico fisiológica del dolor muscular:

El dolor muscular se origina normalmente, en el área lesionada con irradiación hacia la metámera correspondiente, es un dolor muy bien delimitado, de tipo calambre, de una calidad opresiva o de distensión, que suele acompañarse de signos neurovegetativos moderados y con una intensidad, duración, y evolución en el tiempo que suele ser variable, incrementando su intensidad con la aplicación de estímulos adicionales.

Se caracteriza por:

- Presencia de dolor,
- Rigidez,
- No ser de carácter inflamatorio,
- Ausencia de causa infecciosa o neoplásica, y,
- Compañía de un componente emocional ansioso-depresivo.

Clasificación:

El dolor muscular puede ser fundamentalmente de tres tipos:

1. De carácter localizado: entesopatías, bursitis, tenosinovitis, neuropatías por atrapamiento, etc. Estos cuadros de dolor muscular son secundarios a un uso inapropiado o a una actividad intensa desacostumbrada, o demasiado prolongada en el tiempo.

2. De carácter regional: cervicalgia, dorsalgia o lumbalgias, y,
3. De carácter generalizado: aquí el principal exponente es la Fibromialgia.

#### Diagnóstico Diferencial:

El objetivo de esta revisión, en cuanto a diferenciación, es llevarlo a cabo con el dolor de la piel o dolor cutáneo, para lo cual plantearemos lo siguiente:

El dolor cutáneo es un dolor extremadamente localizado, no difuso, y perfectamente delimitado,

Su calidad es quemante o punzante,

Se intensidad, duración y evolución son variables con el tiempo,

Nunca se acompaña de síntomas neurovegetativos,

Tampoco se acompaña de reacciones emocionales,

Se incrementa con la aplicación de estímulos locales adicionales<sup>(52,53)</sup>.

Por sus características muy particulares y debido a la repercusión social que ha tenido y que tiene en la actualidad, siendo padecido por millones de personas, queremos hacer un breve desarrollo sobre el Síndrome de Fibromialgia.

La Fibromialgia es un síndrome caracterizado por dolor generalizado, con sensibilidad dolorosa a la palpación en muy determinados puntos esqueléticos denominados "puntos gatillo" o "Trigger points". Más frecuente en el sexo femenino, entre los 25-45 años, constituye el 20% de todas las consultas de Reumatología, al igual que constituye un importante elemento de diagnóstico diferencial en la especialidad de Ortopedia, donde acuden muchos pacientes afectados de la misma; su prevalencia en la población general está entre el 2-4%. Los síntomas se dividen en tres grandes categorías o grupos:

Síntomas propios del proceso: dolor generalizado y extenso, que puede poseer o no predominio articular, agravado por los cambios climáticos y la ansiedad, que aumenta con la presión en determinados puntos. Puede tener múltiples localizaciones: cervical, lumbar, extremidades superiores, extremidades inferiores, rodillas, codos, manos, etc.

Síntomas típicos de la enfermedad: cansancio persistente, acentuado por la actividad física, con rigidez matutina persistente durante mucho tiempo del día; sueño con mala calidad, que no permite descansar lo necesario; dolor muscular a los esfuerzos mínimos.

Síntomas asociados al proceso: presencia de cólon irritable, cefalea por tensión, cistitis de repetición, síntomas de sequedad ocular, salivar y vaginal, etc.

Es oportuno señalar que el signo clínico más útil y característico para realizar el diagnóstico son los cambios localizados de dolor a la presión (puntos gatillos). También existen otros signos clínicos, tales como:

Alodinia: aumento de sensibilidad a la palpación de un pliegue cutáneo en las zonas altas del músculo trapecio,

Menor distensibilidad muscular: traduce una mayor tensión muscular por la reacción refleja a un aumento de la actividad regional nociceptiva.

Dermografismo cutáneo: provocado por una lesión local firme sobre la zona medio-alta de la espalda. Se ha relacionado con la existencia de reflejos vasculares neurogénicos.

Es nuestro mayor interés dejar claro que el diagnóstico de la Fibromialgia es eminentemente clínico, que como postulado esencial el cuadro doloroso generalizado debe tener una duración mayor de 3 meses, y la existencia de unos puntos desencadenantes del dolor a la presión digital sobre ellos. Hemos de tener en cuenta igualmente los factores asociados de la Fibromialgia, entre ellos tenemos:

Factores psicológicos: existe la duda de si son una consecuencia de la propia enfermedad o si es un factor primario en ella,

Alteraciones del sueño en el 70% de los pacientes, que lo definen como un sueño ligero y poco reparador,

Alteraciones en la modulación del SNP en la captación del dolor <sup>(54, 55, 56)</sup>.

#### Consideraciones generales para el tratamiento del dolor muscular:

Los AINES son un grupo de fármacos cuya acción común es la inhibición de la enzima ciclooxigenasa, que abre la vía de las prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. Siempre es conveniente iniciar el tratamiento con la dosis mínima, para aumentarla de forma paulatina hasta alcanzar el efecto terapéutico deseado o la dosis máxima recomendada según el fármaco. Como medidas analgésicas puras se recomiendan los analgésicos puros y los AINES, siempre en su faceta de analgésicos. Las propiedades analgésicas de los AINES hacen que éstos sean los fármacos ideales para el tratamiento de los procesos musculares dolorosos en los que ambas causas, el dolor y la inflamación son los dos pilares básicos que se necesitan combatir. Dentro de este grupo tenemos al AAS, con una acción analgésica preferentemente a nivel periférico, actuando en las terminaciones nerviosas sobre las que actúan sustancias generadoras de dolor, tales como, las prostaglandinas, la serotonina y la bradiquinina. Actualmente se ha demostrado una acción central de AAS, actuando a nivel del tálamo, estructura localizada cerca de la base del cerebro, donde se lleva a cabo la integración de los estímulos dolorosos. Su actividad analgésica se considera como de intensidad moderada, por debajo de los analgésicos opiáceos, tanto menores como mayores; dependiendo de la dosis administrada, de forma que, a mayor dosis, mayor efecto; aunque la relación dosis-efecto es pequeña, ya que, está demostrado que aumentos de la dosis al doble no significa que su acción analgésica aumente también al doble. Por este motivo no se necesitan dosis muy elevadas de AAS para obtener un efecto analgésico intenso. Su administración como analgésico es muy útil en cuadros dolorosos de

## **Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

intensidad moderada, como cefaleas, dolores articulares, musculares y de partes blandas. Es, por tanto, el primer fármaco que debemos administrar en todo cuadro de dolor, incluido el dolor inducido por neoplasias, donde no sólo debemos aprovechar su efecto analgésico, sino también su efecto antiinflamatorio (39, 60, 61, 62, 63).

### **Dosis de AAS como analgésico:**

Las dosis oscilan entre 500 y 1.000 mgs por vía oral y cada 4-6 horas, y muy importante es el dato de que no se obtiene un mayor efecto analgésico cuando se superan los 4.000 mgs por día. Es por ello que la dosis recomendada de AAS es de 500-600 mgs cada 4-6 horas, aunque es posible aumentarla si no se consigue el alivio del dolor. La duración efectiva del efecto analgésico está comprendido entre las 4-5 horas, por lo que si se espera que el dolor pueda continuar, la dosis debe ser repetida a las 4 horas (60, 61, 62).

### **Algunos efectos adversos de AAS:**

No cabe dudas que el más frecuente es la intolerancia gastrointestinal. Casi siempre son molestias gástricas inespecíficas, tales como, pesadéz de estómago, pirosis, anorexia, vómitos y epigastralgias. Estas lesiones irritativas oscilan entre un ligero enrojecimiento de la mucosa, hasta úlceras superficiales, hemorragias digestivas o perforaciones. Las zonas más afectadas son las de pH más bajo, como el estómago y la primera porción del duodeno. Éste efecto gastrolesivo está estrechamente relacionado con la dosis, y aumenta cuando la dosis supera los 900 mgs por día. Como complicaciones graves tenemos las hemorragias digestivas y las hemorragias cerebrales. Los efectos irritantes sobre la mucosa son más frecuentes cuando administramos el fármaco en forma de tabletas, disminuyendo mucho cuando se administra en polvo disgregable o en solución. Es menester aclarar que cuando se da por vía endovenosa, rectal o intramuscular, el riesgo se reduce pero no se elimina, debido al ciclo enterohepático, donde el salicilato, producto de la metabolización de AAS por el hígado, se elimina por la bilis. Se estima que el riesgo de aparición de una reacción adversa por el uso de AAS es de 2 casos por 10.000 personas. Ahora bien, se invocan determinados factores de riesgo para que esto ocurra con mayor facilidad y mayor frecuencia, entre estos tenemos:

Antecedentes de padecimientos y enfermedades gastrointestinales,

Edad superior a los 60 años,

Estado de Invalidez,

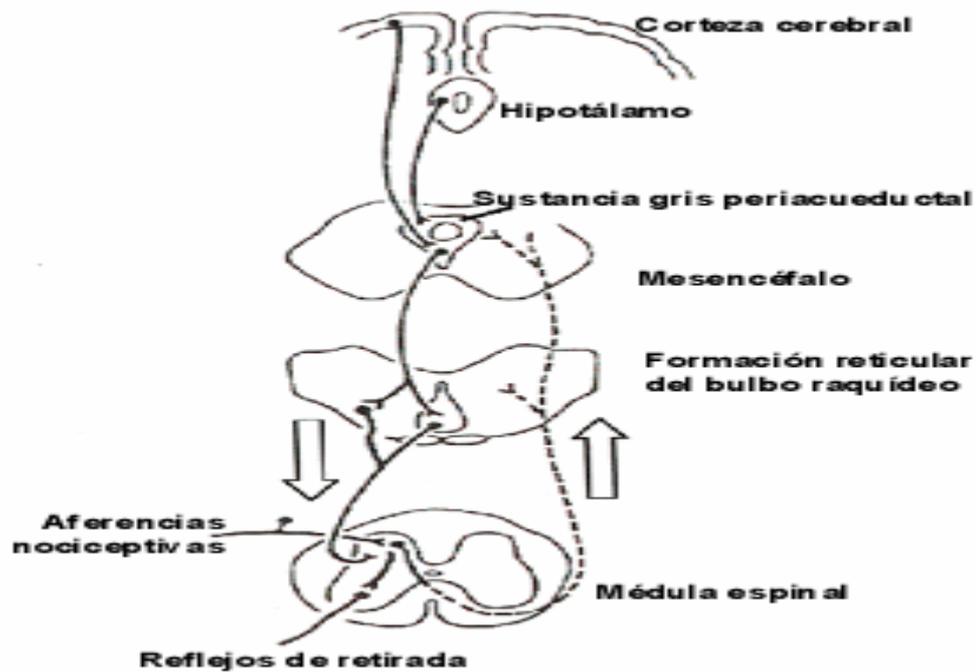
Presencia de enfermedad de base grave asociada.

En lo que casi todos están de acuerdo es que AAS ha demostrado poseer un índice de toxicidad gastrointestinal relativamente bajo, en comparación con otros AINES (63, 64, 65)

factores de riesgo para esto y su estrecha relación con la dosis. Hemos señalado los aspectos más relevantes de su farmacología y de su mecanismo de acción, sobre todo lo que tiene que ver con la inhibición de las

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

ciclooxigenasas 1 y 2. Dentro del espectro de las afecciones musculares que hemos mencionado, hemos hecho especial énfasis en el Síndrome de Fibromialgia, por la repercusión que posee sobre la Sociedad en general y lo frecuente de su aparición en el sexo femenino en particular y en las consultas de Reumatología. Se han planteado las dosis más adecuadas para el empleo de AAS en el área clínica, en dependencia de la afección en cuestión. Se han actualizado los principales tópicos con respecto al empleo de AAS, y se ha hecho vigente que se mantiene aún como el fármaco más famoso y más empleado en la humanidad hasta estos momentos. Dentro de esta exposición se han mencionado otros empleos recientes que se le han descubierto al AAS, tales como, la profilaxis sobre la Enfermedad de Alzheimer, la profilaxis sobre el cáncer de colon, y la profilaxis sobre algunas de las complicaciones de la Diabetes Mellitus.



**Figura 1.** Diagrama esquemático del circuito de modulación descendente del dolor (flecha hacia abajo), el cual involucra como estructuras claves a la sustancia gris periacueductal del mesencéfalo y a la región rostroventromedial de la formación reticular bulbar. La activación de las neuronas de estos dos sitios es capaz de producir la inhibición conductual de las respuestas ante estímulos nocivos. Los analgésicos no opioides son capaces de promover éste efecto como parte de su mecanismo de acción central. La flecha ascendente indica el sentido normal de conducción que sigue la información nociceptiva cuando un estímulo nocivo es aplicado en una región del cuerpo.

## RUTAS DE DEGRADACIÓN DEL ACIDO ACETILSALICILICO.<sup>27</sup>

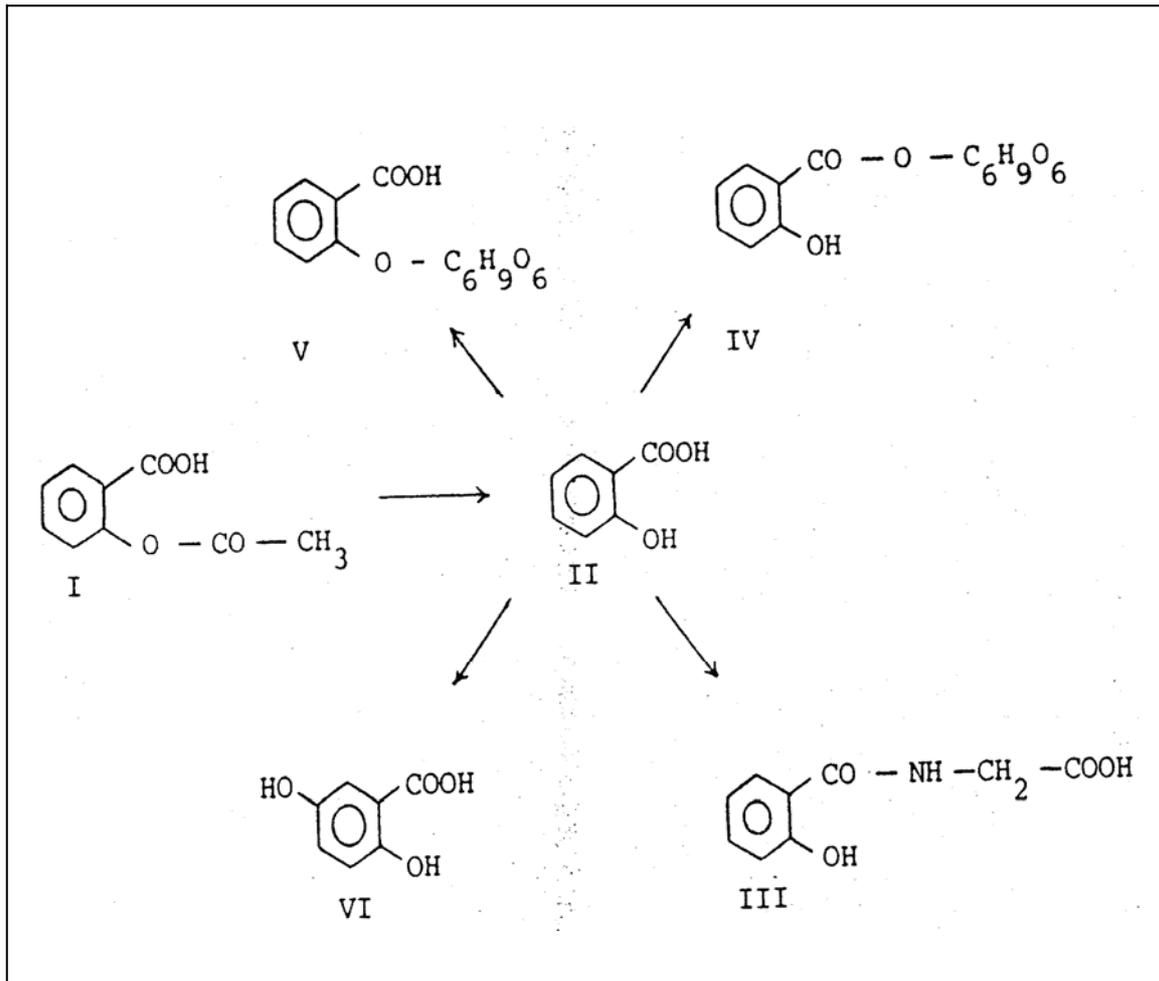


FIGURA 2

- I.- ÁCIDO ACETILSALICILICO.
- II.- ÁCIDO SALICILICO. (MAYOR PORCIENTO DE DEGRADACION)
- III.- ÁCIDO SALICILURICO.
- IV.- GLUCORONIDOS., CONJUGACIÓN.
- V.- GLUCORONIDOS., CONJUGACIÓN.
- VI.- ÁCIDO GENTÍSICO., HIDROXILACIÓN.

### Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).

La CLAR es una técnica de separación que se fundamenta en la interacción de un soluto con una fase estacionaria (líquida o sólida) y una fase móvil líquida. Cuando dos solutos se introducen en una columna estos eluyen a través de la columna por la adición continua de nueva fase móvil. En la columna los solutos se distribuyen entre las dos fases mediante interacciones repetidas, cuando ambas fases se han escogido de forma apropiada los componentes de la muestra se separan gradualmente en bandas en la fase móvil y al final del proceso los componentes separados emergen de la columna, consiguiendo así ser detectados. El detector que responde a la presencia de los solutos proporciona una señal en función del tiempo y se obtienen una serie de picos que se representan en un gráfico denominado cromatograma (Figura 5), el cual es útil tanto para el análisis cualitativo como cuantitativo. Del cromatograma presentado se puede introducir las definiciones de algunos términos importantes para la cromatografía en columna como son:

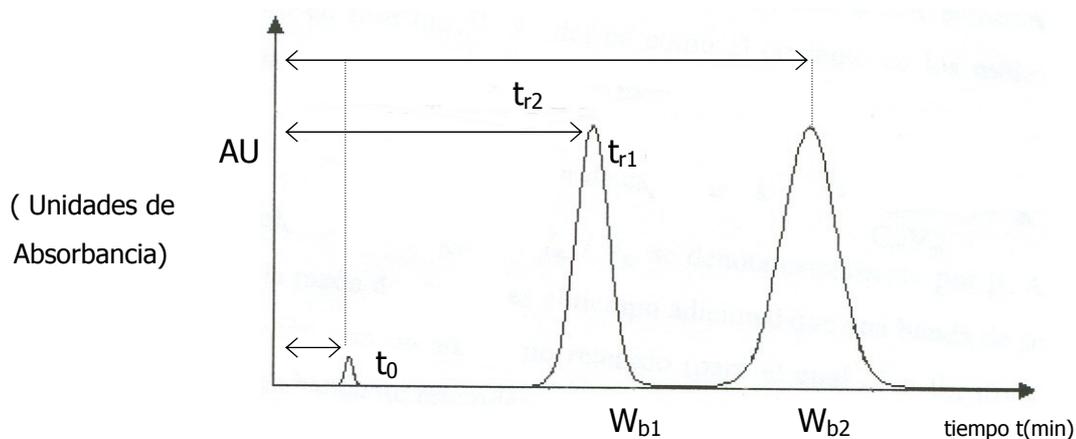


Figura 3. Cromatograma típico en CLAR.

- *Línea base*. Es la porción del cromatograma donde sólo se aprecia la elusión de la fase móvil, sin señal debida al analito.
- *Tiempo de retención* ( $t_r$ ). Tiempo que un soluto permanece en la columna, se mide desde el momento de la inyección hasta la elusión del pico máximo y es característico del soluto para condiciones de operación constantes, auxiliar en la identificación de solutos.
- *Tiempo muerto* ( $t_0$ ). El tiempo requerido para eluir un soluto que no se retiene en la fase estacionaria y representa el espacio vacío de la columna.
- *Tiempo de retención ajustado* ( $t'_r$ ). Mide el tiempo que el componente permanece en la fase estacionaria.

$$t'_r = t_r - t_0$$

- *Velocidad lineal* ( $u$ ). Como la velocidad a la cual la fase móvil se desplaza a través de la columna no es sólo función del caudal sino también de la sección interna de la misma, la comparación de métodos que emplean columnas de diferente diámetro interno hace preferible la expresión de la velocidad lineal en lugar del caudal. Si "L" es la longitud de la columna expresada en cm y  $t_0$  es el tiempo muerto medido en segundos, la velocidad lineal en cm/s puede calcularse como.

$$u = \frac{L}{t_0}$$

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

- *Ancho a la base* ( $W_b$ ). Es la porción de la línea base interceptada por las tangentes al pico y para un pico gaussiano es igual a cuatro, tradicionalmente usado en el cálculo de la eficiencia del sistema.
- *Ancho a la mitad de la altura* ( $W_{1/2}$ ). Una medida más reproducible, adecuada para evaluar manualmente la eficiencia del sistema (platos teóricos).
- *Número de platos teóricos* (N). Cada plato teórico representa un equilibrio teórico de distribución del soluto entre las fases. El numero total de platos teóricos representa el poder de separación o eficacia de una columna; por consiguiente, una buena columna tienen un número alto de platos teóricos y se calcula de la siguiente manera:

$$N=16\left(\frac{t_r}{W_b}\right)^2=5.54\left(\frac{t_r}{W_{1/2}}\right)^2$$

- *Constante de distribución, razón de distribución o coeficiente de distribución* (K). Cuando un soluto entra al sistema cromatográfico inmediatamente se distribuye entre la fase móvil y estacionaria. La concentración en cada fase está dada por el coeficiente termodinámico de distribución:

$$K = C_s / C_m$$

donde  $C_s$  y  $C_m$  son las concentraciones molar de soluto en la fase estacionaria y móvil, respectivamente. Cuando  $K = 1$ , el soluto se encuentra igualmente distribuido entre las dos fases. El coeficiente de distribución determina la velocidad promedio de cada zona de soluto, más específicamente, del centro de la zona de soluto conforme la fase móvil avanza a lo largo de la columna.

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

- *Factor de capacidad (k')*. El factor de capacidad es un parámetro importante que con frecuencia se utiliza para describir las velocidades de migración de los analitos en las columnas. Para una especie A, el factor de capacidad  $k'_A$  se define como:

$$k'_A = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

Cuando el factor de capacidad para una especie es mucho menor que la unidad, la elución tiene lugar tan rápidamente que es difícil determinar con exactitud los tiempos de retención. Cuando el factor de capacidad es del orden de 20 a 30 o tal vez mayor, los tiempos de retención son demasiado largos. Idealmente, las separaciones se realizan en unas condiciones en las que los factores de capacidad para las especies de una mezcla oscilan entre 1 y 5.

- *Factor de selectividad ( $\alpha$ )*. El factor de selectividad de una columna define la habilidad del sistema para separar dos especies, por ejemplo A y B; y se puede calcular por la siguiente formula:

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{t_{rB} - t_0}{t_{rA} - t_0}$$

Si no existe separación,  $\alpha$  es igual a la unidad y su valor aumenta cuando aumenta la separación. A diferencia de  $k'$ , no depende de la fuerza de elución, sino de la afinidad del soluto respecto de la fase móvil y de la columna.

- *Resolución (R)*. La resolución de una columna constituye una medida cuantitativa de su capacidad para separar dos analitos. La resolución de una columna se define como:

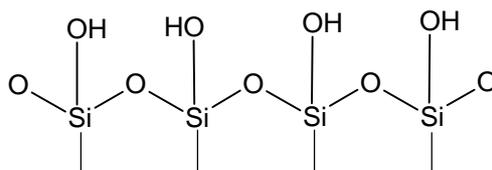
$$R = \frac{2 [t_{r2} - t_{r1}]}{W_2 + W_1}$$

Con una resolución de 1.5 se logra una separación esencialmente completa de dos componentes, mientras que con una resolución de 0.75 no se separan satisfactoriamente. Con una resolución de 1.0 la mejora de la calidad de los picos es de aproximadamente un 4.0 % y con una resolución de 1.5 la mejora de la calidad es del orden de un 0.3 %. Para una fase estacionaria dada, la resolución puede mejorarse alargando la columna, aumentando así el número de platos teóricos. Sin embargo, una consecuencia adversa del aumento del número de platos es un aumento del tiempo necesario para la separación. La resolución alcanzada en un sistema es proporcional al producto de la selectividad, la eficiencia y la capacidad del sistema, que son los tres parámetros más importantes de control en una columna cromatográfica, siendo la expresión matemática para la resolución la siguiente:

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k'_2}{1 + k'_2} \right)$$

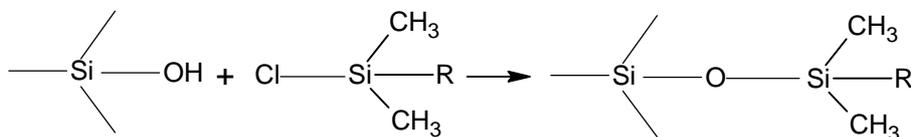
Es incuestionable que la CLAR es la técnica de separación más ampliamente utilizada por varias razones importantes como son su sensibilidad, su adaptación a las determinaciones cuantitativas, su aplicación a la separación de compuestos no volátiles o termolábiles y, sobre todo, a su aplicación en compuestos que son de primordial interés en la industria, para la ciencia y la sociedad en general. La naturaleza tan diversa de las fases estacionarias y móviles que se pueden emplear llevan consigo una gran versatilidad en los mecanismos de separación y los más usados en la práctica son los siguientes.

La  *cromatografía de reparto*: ha llegado a ser el tipo de cromatografía de líquidos más ampliamente utilizado. La cromatografía de reparto se puede dividir en cromatografía  *líquido-líquido* y cromatografía con  *fases unidas químicamente*. La diferencia entre estas técnicas radica en la forma como se une la fase estacionaria sobre las partículas de soporte del relleno. En  *líquido-líquido*, la fase estacionaria líquida se retiene sobre la superficie del soporte por adsorción. En  *fase unida químicamente*, la fase estacionaria se une químicamente a la superficie del soporte. Los soportes para casi todos los rellenos con fases unidas químicamente se preparan con sílice rígida o composiciones constituidas básicamente por sílice. Estos sólidos están formados por partículas mecánicamente resistentes, porosas y uniformes, con diámetros de 3, 5 o 10  $\mu\text{m}$ . La superficie de la sílice totalmente hidrolizada está constituida por grupos silanoles ( $\text{SiOH}$ ) químicamente reactivos (Figura 4).<sup>4-5</sup>



**Figura 4.** Superficie de Sílice rígida con grupos  $\text{SiOH}$  reactivos.

Los recubrimientos de fase enlazada más utilizados son los siloxanos, que se forman por reacción de la superficie hidrolizada con un organoclorosilano (Fig 5). Por ejemplo,



**Figura 5**

donde R es un grupo alquilo o un grupo alquilo sustituido. El recubrimiento de la superficie por sililación se limita a 4  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  o menos a causa de los efectos estéricos. Los grupos  $\text{SiOH}$  que no han reaccionado, imparten una polaridad indeseable a la superficie, lo que origina picos con cola. Para reducir este

## Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).

efecto, los rellenos de siloxano muchas veces se desactivan por reacción con clorotrimetilsilano, el cual, debido a su pequeño tamaño, puede unirse químicamente a los grupos SiOH que no habían reaccionado.<sup>4-5</sup>

En relación con las polaridades relativas de las fases móvil y estacionaria, se distinguen dos tipos de cromatografía de reparto. Inicialmente, la cromatografía de líquidos utilizaba fases estacionarias de elevada polaridad tales como el agua o el trietilenglicol colocadas sobre partículas de sílice o alúmina. Por razones históricas, a este tipo de cromatografía se le conoce como *cromatografía en fase normal*. En la *cromatografía de fase inversa*, la fase estacionaria es no polar, con frecuencia se trata de un hidrocarburo y la fase móvil es relativamente polar (como el agua, el metanol y acetonitrilo). En cromatografía en fase normal, el componente menos polar se eluye primero. En contraste, en los métodos en fase inversa, los componentes más polares aparecen primero. Los rellenos de fase enlazada se clasifican como de fase inversa cuando el recubrimiento unido químicamente tiene un carácter no polar. Por lo general, el grupo R del siloxano en estos recubrimientos es una cadena C<sub>8</sub> (*n*-octilo) o una cadena C<sub>18</sub> (*n*-octadecilo). En estas preparaciones, los grupos de hidrocarburo de cadena larga se alinean el uno junto al otro y en perpendicular a la superficie de la partícula, dando una estructura semejante a una brocha o a un cepillo. Las moléculas de la fase móvil compiten entonces con las del analito por una posición en la superficie orgánica. Sin considerar detalladamente el mecanismo de separación, un recubrimiento enlazado se puede considerar como si fuera un líquido convencional retenido físicamente.<sup>4-5</sup>

En la mayoría de las aplicaciones de la cromatografía de fase inversa, la elusión se lleva a cabo con una fase móvil de levada polaridad como es el caso de una solución acuosa conteniendo concentraciones diversas de disolventes como metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano. Se ha de procurar que el pH sea menor de aproximadamente 7.5 porque si no se disuelve la sílice de base de las columnas, y a un pH menor de 2 se hidroliza la unión entre la sílice y la fase enlazada. Con rellenos de fase enlazada en fase normal, R en la estructura del

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

siloxano es un grupo funcional polar como es el caso de los grupos ciano ( $-\text{C}_2\text{H}_4\text{CN}$ ), diol ( $-\text{C}_3\text{H}_6\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$ ), amino ( $-\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_2$ ) y los dimetilamino [ $-\text{C}_3\text{H}_6\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ]. Las polaridades de estos materiales de relleno varían en un gran intervalo, siendo el tipo ciano el menos polar y el grupo amino el más polar. Con los rellenos de fase normal, la elusión se realiza con disolventes relativamente no polares, tales como el etiléter, el cloroformo y el *n*-hexano.<sup>4-5</sup>

La cromatografía de pares iónicos (o de formación de pares de iones): es un tipo de cromatografía de reparto en fase inversa que se utiliza para la separación y determinación de especies iónicas. En la cromatografía de pares iónicos la fase móvil esta constituida por una disolución acuosa amortiguada que contiene un disolvente orgánico como metanol o acetonitrilo, y un compuesto iónico que aporta un *contraion* de carga opuesta al analito. Un *contraion* es un ion que se combina con el ion analito para formar una *pareja de iones*, que es una especie neutra que es retenida por el relleno de fase inversa. La elusión de los pares iónicos se consigue mediante una disolución acuosa de metanol o de otro disolvente orgánico soluble en agua.<sup>4-5</sup>

La importancia que tiene la diferenciación de isómeros óptimamente activos (enantiómeros) desencadenó a mediados de los años sesenta, un interés creciente por el desarrollo de procedimientos que permitieran su separación. La separación de enantiómeros mediante cromatografía de líquidos puede abordarse desde diferentes modos. El procedimiento tradicional para la separación de enantiómeros es su transformación en diastereoisómeros, que posteriormente pueden separarse por CLAR, generalmente en fase inversa, sin el empleo de fases quirales. Sin embargo, este procedimiento conlleva la necesidad de preparar derivados, con el consiguiente riesgo de reacciones secundarias, y requiere la disponibilidad de reactivos quirales de pureza controlada. Además, el proceso es largo y laborioso y, en muestras con bajo contenido en enantiómeros, es difícil lograr un rendimiento cuantitativo. Estos inconvenientes se evitan con la separación directa de los enantiómeros, que pueden realizarse mediante fases estacionarias quirales o añadiendo aditivos

## Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).

quirales en la fase móvil. Actualmente las fases estacionarias quirales están constituidas por recubrimientos sobre soportes de gel de sílice. El recubrimiento por lo general consiste en un material polimérico al cual se le ha unido un isómero óptimamente activo. La separación con fases estacionarias quirales puede realizarse por unión iónica o covalente del reactivo quiral al material de relleno de la columna. <sup>4-5</sup>

La cromatografía de adsorción o líquido-sólido: se basa en la distinta magnitud de las interacciones de los componentes de la mezcla con la superficie activa de la fase estacionaria. Las únicas fases estacionarias que se utilizan en este tipo de cromatografía son la sílice y la alúmina, siendo la primera la que se prefiere para casi todas las aplicaciones debido a su capacidad de carga y a su diversidad de presentaciones. La cromatografía de adsorción es más adecuada para compuestos no polares probablemente con masas moleculares inferiores a 5000. En general, es más adecuada para muestras que son solubles en disolventes no polares. <sup>4-5</sup>

La cromatografía iónica: está relacionada con los métodos modernos y eficaces para la separación y determinación de iones que se basan en el uso de las resinas de intercambio iónico. Los procesos de intercambio iónico se basan en los equilibrios de intercambio entre los iones de una disolución y los iones del mismo signo que están en la superficie de un sólido de elevada masa molecular y esencialmente insoluble. Los puntos activos en las resinas de intercambio catiónico son los grupos de ácido sulfónico  $-\text{SO}_3^-\text{H}^+$ , un ácido fuerte, y los grupos de ácido carboxílico  $-\text{COO}^-\text{H}^+$ , un ácido débil. Los intercambiadores aniónicos contienen grupos de amina cuaternaria  $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{OH}^-$  o grupos de amina primaria  $-\text{NH}_3^+\text{OH}^-$ ; el primero es de base fuerte y el último de base débil. <sup>4-5</sup>

Históricamente, en cromatografía de intercambio iónico se han empleado pequeñas partículas esféricas porosas que se forman en la copolimerización del estireno y del divinilbenceno emulsionados. La presencia de divinilbenceno

## Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).

(normalmente ~8 %) origina una polimerización entrecruzada que imparte estabilidad mecánica a las bolitas. Con objeto de activar el polímero frente a los iones, a la estructura se le unen químicamente grupos funcionales ácidos o básicos; y los grupos más comunes son el ácido sulfónico y las aminas cuaternarias, respectivamente. Las partículas poliméricas porosas no resultan de todo adecuadas como rellenos cromatográficos debido a la baja velocidad de difusión de las moléculas de los analitos a través de los microporos de la matriz polimérica, y también debido a la compresibilidad de la matriz. Para resolver este problema se emplea un relleno de partícula pelicular en el que la superficie relativamente grande (de 30 a 40  $\mu\text{m}$ ) de una partícula, esférica y no porosa, de vidrio o polimérica se recubre con una resina sintética de intercambio iónico o un segundo tipo de relleno se prepara recubriendo micropartículas porosas de sílice, tal como las que se usan en la cromatografía de adsorción, con una pequeña partícula del intercambiador.<sup>4-5</sup>

La cromatografía de exclusión por tamaños: que también se ha denominado cromatografía en geles permeables o de filtración en geles, es una técnica muy valiosa que se aplica particularmente a especies de alto peso molecular. Los rellenos para la cromatografía de exclusión por tamaños están constituidos por pequeñas partículas ( $\sim 10 \mu\text{m}$ ) poliméricas o de sílice que contienen una red uniforme de poros en los que pueden difundir las moléculas del soluto y del disolvente. En los poros las moléculas son atrapadas efectivamente y eliminadas del flujo de la fase móvil. El tiempo de residencia medio en los poros depende del tamaño efectivo de las moléculas de los analitos. Las moléculas que son más grandes que el tamaño medio de los poros del relleno son excluidas y de esta forma, esencialmente no se retienen y, por lo tanto, son las primeras que eluyen. Las moléculas que tienen diámetros que son significativamente menores que los poros, pueden penetrar a través del laberinto de poros y así resultan atrapadas durante más tiempo, éstas son las últimas en eluir. Entre estos dos extremos, están las moléculas de tamaño intermedio cuya penetración media en los poros depende de sus diámetros. En las separaciones por exclusión por tamaños difieren de los otros

## Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).

procedimientos, en que no implican una interacción química o física entre los analitos y la fase estacionaria. De hecho, se procura evitar este tipo de interacciones dado que originan una mala eficiencia de la columna.<sup>4-5</sup>

En cromatografía de exclusión por tamaños se encuentran dos tipos de rellenos –partículas poliméricas y partículas de sílice- con diámetros de partícula que oscilan de 5 a 10  $\mu\text{m}$ . Los rellenos con partículas de sílice tienen la ventaja de una gran rigidez, lo que facilita el empaquetamiento; una mayor estabilidad, lo que permite el uso de una gran variedad de disolventes incluyendo el agua; una equilibración más rápida al cambiar de disolvente; y una buena estabilidad a elevadas temperaturas. Sus inconvenientes implican la tendencia a retener solutos por adsorción. Las partículas poliméricas que se utilizan implican copolímeros de estireno-divinilbenceno entrecruzados y el tamaño de poro en estos polímeros se controla por el grado de entrelazamiento entre las cadenas poliméricas y por tanto con la cantidad relativa de divinilbenceno presente en la fabricación. Los geles de estireno-divinilbenceno son hidrofóbicos y de este modo sólo pueden utilizarse con fases móviles no acuosas. Sin embargo, en la actualidad se disponen de geles hidrofílicos, por lo general copolímeros de estireno-divinilbenceno con grupos sulfónicos o poliácridamidas, que hacen posible el uso de disolventes acuosos para la separación de moléculas grandes solubles en agua como los azúcares.<sup>4-5</sup>

La cromatografía de afinidad: se basa en la interacción específica entre una molécula y un ligando, que es una molécula que se fija a la fase estacionaria para interactuar con las del soluto. El mayor auge de la cromatografía de afinidad, desde sus orígenes a finales de los años 60, ha correspondido a la cromatografía de bioafinidad, en la que las interacciones entre ligandos y moléculas se basan en reconocimientos de tipo biológico. La retención en cromatografía de bioafinidad se debe a uniones complejas que incluyen distintos tipos de interacciones no covalentes, como son las fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, fuerzas hidrofobas, dipolo-dipolo, de

## Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).

transferencia de carga o electroestáticas. La orientación espacial adecuada de los grupos a través de los cuales se realiza la interacción facilita una elevada combinación cooperativa de fuerzas, lo que constituye la base de la elevada selectividad y especificidad del enlace en cromatografía de bioafinidad. Entre los modos más selectivos de cromatografía de bioafinidad se encuentra la *cromatografía de inmunoafinidad*, basada en el reconocimiento entre antígenos y anticuerpos. Un antígeno es una sustancia que introducida en un organismo origina una respuesta inmune, es decir, origina la producción de anticuerpos específicos frente a ese antígeno. Esta respuesta altamente específica de la naturaleza se ha aprovechado en los métodos inmunológicos de análisis para emplear los anticuerpos como reactivos específicos contra los antígenos. Cuando los anticuerpos se inmovilizan en un relleno cromatográfico en la columna, a través de la cual se hace pasar la muestra que contiene el antígeno, es decir el analito de interés. Éste es capturado y queda retenido en la columna, mientras que el resto de los componentes de la muestra que no son reconocidos por el anticuerpo eluyen sin retenerse. La detección de los compuestos retenidos puede realizarse de diferentes formas, siendo la más usual su elusión con un agente de desorción para medir la respuesta en el detector del cromatógrafo.<sup>4-5</sup>

La CLAR tiene distintas ventajas sobre la cromatografía de gases para el análisis de compuestos orgánicos. En la cromatografía de gases, la fase móvil se comporta como un gas ideal y no contribuye al proceso de separación; sólo sirve como portador de los componentes de la muestra a través de la fase estacionaria. Al contrario, el éxito en una separación por cromatografía de líquidos depende de la elección adecuada de los disolventes a emplear en la fase móvil y el tipo de fase estacionaria, que como se menciono anteriormente, se dispone de un número considerable de posibilidades en la opción de estas lo que permite una mayor gama de mecanismos de separación. Además, los compuestos a ser analizados son disueltos en un líquido orgánico, y la mayor parte de las separaciones se llevan acabo a temperatura ambiente y dado que

## Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).

la mayoría de los compuestos orgánicos son no volátiles o térmicamente estables, pueden ser separados sin descomposición o sin la necesidad de sintetizar derivados volátiles. La mayor parte de los análisis farmacéuticos están basados en cromatografía de adsorción y son completados en un tiempo menor de 30 minutos. El tiempo de elusión de un compuesto puede ser descrito por el factor de capacidad ( $k'$ ) que depende de la naturaleza química del analito, la composición y la velocidad de flujo de la fase móvil, además de la composición y el área de la superficie de la fase estacionaria. La longitud de la columna es determinante de la resolución. Solo compuestos con diferentes factores de capacidad pueden ser separados por CLAR. <sup>(4)</sup>

### 1. Equipo.

Un equipo moderno de CLAR dispone de uno o más recipientes de vidrio de una capacidad de 500 a 1000 mL para la fase móvil, una bomba que empuja la fase móvil a través del sistema a alta presión, un inyector que introduce la muestra a la fase móvil, una columna cromatográfica, un detector y un aparato para recolectar los datos, como una computadora o integrador (Figura.2) Anexo. <sup>4-5</sup>

### CLAR CARACTERÍSTICAS:

1. *Sistema de bombeo.* Las micropartículas de las columnas, entre 3 y 10  $\mu\text{m}$ , desarrollan una alta resistencia a la presión durante la operación. Esto acarrea que sea necesario disponer de ciertos requisitos para el sistema de bombeo empleado en CLAR e incluyen: (1) la generación de presiones por arriba de 6000 psi (lbs/in<sup>2</sup>), (2) un flujo libre de pulsaciones, (3) un intervalo de flujo de 0.1 a 10 mL/min., (4) simplicidad de operación y reproducibilidad del flujo mejor del 0.5 % relativo y (5) componentes resistentes a la corrosión (juntas de acero inoxidable o teflón). Se utilizan tres tipos de bombas, cada una con sus propias ventajas y desventajas: bombas recíprocas (que se utilizan en aproximadamente el 90 % de los equipos de CLAR), bombas de jeringa o de desplazamiento y bombas neumáticas o de presión constante. <sup>(4)</sup>

2. *Inyectores.* A menudo, el factor limitante en la precisión de las medidas en cromatografía de líquidos es la reproducibilidad con que se puede introducir la muestra en la columna. El problema se agrava por el ensanchamiento de banda que acompaña a la sobrecarga de las columnas. Por ello, los volúmenes que se emplean han de ser pequeños de unas pocas décimas de microlitro y además se debe introducir la muestra sin despresurizar el sistema. Existen dos diseños de inyectores: los de desplazamiento y los de aguja. Ambos pueden ser incorporados a un sistema de inyección manual o automático. Los inyectores de desplazamiento fuerzan la muestra hasta un loop (un tubo de acero inoxidable de diámetro interno pequeño y de volumen fijo, lo que permite inyectar el mismo volumen de muestra), pero presentan baja reproducibilidad cuando están parcialmente llenos. En consecuencia, es necesario cambiar físicamente el loop para cambiar los volúmenes de inyección. Los inyectores de tipo aguja conducen la muestra a través del loop. Este mecanismo puede operar con precisión con un loop parcialmente lleno y es, por lo tanto, más versátil. <sup>(4)</sup>
  
3. *Columnas.* La columna contiene la fase estacionaria necesaria para la separación deseada. Están construidas con una pared gruesa de acero inoxidable, el interior es liso, de diámetro interno uniforme y el relleno se mantiene con filtros de acero poroso. La mayoría de las columnas para cromatografía de líquidos tienen una longitud de 100 a 300 mm., aunque hay más cortas o largas. El diámetro interno de las columnas es a menudo de 4 a 10 mm y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son de 3, 4 y 10  $\mu\text{m}$ . Tal vez la columna más utilizada es la de 25 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno, y empaquetada con partícula de 5  $\mu\text{m}$ , las cuales tienen de 40000 a 60000 platos/metro. La columna por lo común se mantiene a temperatura ambiente y en algunos sistemas se coloca en un horno cuya temperatura puede regularse. Recientemente, se han empezado a fabricar columnas de alta resolución, las cuales tienen menores dimensiones que las anteriormente descritas. Estas columnas

pueden tener diámetros internos que oscilan entre 1 y 4.6 mm y se rellenan con partículas de 3 o 5  $\mu\text{m}$ . estas columnas tienen hasta 100000 platos/metro y presentan la ventaja de rapidez y mínimo consumo de disolvente. En muchas ocasiones, para aumentar la vida de la columna analítica, se coloca delante una precolumna que elimina la materia en suspensión y los contaminantes de los disolventes. La composición del relleno de la precolumna debe ser semejante al de la columna analítica; sin embargo, el tamaño de partícula es por lo común mayor para minimizar la caída de presión. <sup>(4)</sup>

4. *Disolventes.* En todas las formas de cromatografía, la calidad y la manipulación de los disolventes a emplear en la preparación de la fase móvil es tan crítica como cualquier parte del sistema cromatográfico. A fin de no degradar costosas columnas de CLAR y minimizar el ruido de fondo en el detector, los disolventes utilizados deben ser muy puros. La primera rutina que se debe llevar a cabo con la fase móvil. antes de introducirlos en el recipiente, es la filtración a vacío con filtros de tamaño de poro de 0.22 a 0.45  $\mu\text{m}$  para eliminar los gases y la materia en suspensión. El tubo de entrada al depósito de los disolventes se protege con un filtro de poro fino el cual retiene partículas de polvo mayores de 2 a 5  $\mu\text{m}$ . Las burbujas que se forman por cambios de presión o por mezclado de ciertos disolventes interfieren en el funcionamiento adecuado de la columna y del detector. En consecuencia, de manera sistemática se eliminan los gases de los disolventes por medio de evacuación, ebullición, ultrasonido o purga con helio (el cual es muy insoluble). Una separación en que se utiliza un solo disolvente o una mezcla de disolventes de composición constante se denomina una *elución isocrática*. Con frecuencia, la eficiencia de la separación se aumenta notablemente por una *elución por gradiente*. En este caso una vez que comienza la elución, se varía la relación de los disolventes empleados de forma programada, a veces continuamente y a veces mediante una serie de etapas escalonadas. Los equipos de CLAR se encuentran equipados con unos dispositivos que permiten introducir los

disolventes desde dos o más recipientes en una cámara de mezcla a una velocidad que varía continuamente y la relación de volumen de los disolventes se puede modificar lineal o exponencialmente con el tiempo.<sup>(4)</sup>

5. *Detectores.* El detector ideal debe de ser (1) sensible a bajas concentraciones de cualquier analito, (2) dar una respuesta lineal (señal proporcional a la concentración del analito) en un amplio intervalo de concentraciones, (3) de buena estabilidad y reproducibilidad, (4) de baja respuesta a los cambios de temperatura, (4) con un tiempo de respuesta corto y (5) de alta fiabilidad y de manejo sencillo. Los detectores en cromatografía de líquidos son de dos tipos básicos. Los *detectores basados en una propiedad de la disolución*, que responden a una propiedad de la fase móvil, tal como el índice de refracción, la constante dieléctrica o la densidad, que se modifican por la presencia del analito. Y los *detectores basados en una propiedad del soluto*, que responden a una propiedad del analito, como la absorbancia ultravioleta, fluorescencia o intensidad de difusión. Los sistemas de detección más empleados en CLAR son los de absorbancia ultravioleta-visible, arreglo de diodos, índice de refracción y electroquímicos, pero existen otros detectores que son capaces de proporcionar información estructural, como por ejemplo el espectrómetro de masa.<sup>(4)</sup>

#### **PARTES DEL UPLC.**

El Sistema Acquity UPLC consiste de una bomba binaria de solventes, un muestreador de 96 viales dividido en 2 platos independientes (A y B), colocando la ubicación de los viales por coordenadas, es decir, A1, A2, etc., incluyendo un horno de columnas, detector PDA(arreglo de diodos) o TUV(ultravioleta).<sup>70</sup> (Fig 1) Anexo.

La bomba binaria de solventes usa 2 flujos independientes, es decir, las dos bombas proporcionan el flujo necesario para ser utilizados con solventes mezclados en gradientes bajo alta presión. Incluye un degasificador que igual sirve para cualquiera de las 4 líneas de solventes seleccionados.

## **Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

Todo esto a un límite de 15,000 psi de presión(alrededor de 1000 bar), esto es una gran ventaja en partículas de 2µm al eluir, ya que esto representa una mejor resolución en menor tiempo.

El muestreador incorpora una nueva tecnología, la poca dispersión es mantenida usando presión a la hora de inyectar muestras y una serie de transductores de presión facilitan el monitoreo y el diagnóstico de las inyecciones. El muestreador usa lo que se llama "aguja en aguja" que provee de robustez y exactitud al momento de inyectar la muestras. Los ciclos de las inyecciones son de 25 segundos con un lavado de agujas de 60 segundos que proporciona una disminución del llamado "carry over",es decir, línea base mejor definida sin tanto ruido. Las muestras colocadas en platos de muestreo por coordenadas y dentro de una cámara, se puede controlar la temperatura y luz. Se puede inyectar desde 0.1µL hasta 20µL como máximo, además de controlar flujos desde 0.1mL/min hasta 2.0 mL/min como máximo. En el horno de las columnas se pueden alcanzar temperaturas hasta 65°C. El equipo PDA detector es muy versátil que se puede acoplar a detector MS y disminuir las dispersiones de las muestras.<sup>70</sup>

El TUV-vis detector y el PDA detector un nuevo soporte electrónico, Ethernet communications y una gran cantidad de datos para detección en UPLC pueden ser usados, el detector del Sistema Acquity UPLC consiste de una celda de flujo equivalente a una fibra óptica.<sup>70</sup>

### **1.1. Cálculo de la concentración de analito (estándares de referencia).**

La concentración de analito en la muestra se puede calcular por diferentes métodos, a saber:

- Normalización interna (estandarización interna)
- Estándar externo
- Estándar interno

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

- Estándar agregado

La selección del método más adecuado depende del tipo de muestra, del nivel de precisión requerido y de la existencia o no de sustancias de referencia.

El método de la *normalización interna*, llamado también *estandarización interna*, consiste en referir el contenido de analito al total de áreas en el cromatograma. Para ello se suman las áreas de todos los picos presentes (exceptuando al pico que corresponde al solvente) y el contenido de analito en la muestra se calcula con:

$$P_i = \frac{A_i}{\sum A_i} \cdot 100$$

Donde  $P_i$  es el porcentaje del componente  $i$  en la mezcla,  $A_i$  es el área del componente  $i$ , y  $\sum A_i$  es la sumatoria de todas las áreas del cromatograma. Este método tiene, fundamentalmente, dos ventajas: no requiere estándar de referencia y es muy preciso ya que los errores de inyección y de preparación de la muestra se compensan. En contrapartida tiene varias limitaciones: en primer lugar, para obtener resultados medianamente exactos es necesario que todos los componentes de la mezcla se separen en el sistema cromatográfico elegido, lo cual no siempre ocurre. Y en segundo lugar se requiere que todos los componentes tengan el mismo factor de respuesta ( $f_i$ ). Es decir que si trabaja con un detector UV, todas las sustancias deben tener el mismo valor de absorptividad a la longitud de onda elegida. Este caso suele darse pocas veces y habitualmente con familias de compuestos o sustancias que están muy relacionadas. Por este motivo, a pesar de sus ventajas y de su amplia difusión en CG con el detector de llama, este método prácticamente no se utiliza en CLAR.

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

El método de *estándar externo* es, sin lugar a dudas, el método de cuantificación más utilizado en CLAR. Consiste en la preparación de estándares de concentración semejante al analito en la muestra y en el ensayo cromatográfico de ambas, muestra y estándar, en las mismas condiciones operativas. La concentración de analito se determina comparando el área del pico en cuestión con el área correspondiente al estándar de referencia. Es decir:

$$P = \frac{A_m C_s}{A_s} D 100$$

Donde P es el porcentaje de analito en la muestra,  $A_m$  y  $A_s$  son las áreas de la muestra y el estándar respectivamente,  $C_s$  es la concentración del estándar y D es un factor de dilución. Este método requiere, obviamente, la utilización de un estándar de referencia y su exactitud dependerá ampliamente de la calidad del estándar utilizado. La precisión de los datos que se obtienen depende tanto de la preparación de la muestra y el estándar como de la inyección de ambos, ya que utilizando esta modalidad de trabajo, ninguna de las dos operaciones se compensa. De hecho, la precisión de esta metodología es muy sensible a los errores de inyección. Por ello, para mejorarla se suelen realizar varias inyecciones, típicamente tres inyecciones de estándar y dos inyecciones de cada muestra. Además, para evitar la falta de precisión originada en las variaciones ambientales se pueden correr alternativamente muestras y estándar o intercalar estándares después de un grupo de unas 5 o 6 muestras. <sup>(4)</sup>

El método de *estándar interno* consiste en agregar cantidades exactamente medidas de sustancia así denominada, tanto a la muestra como a un estándar que contiene al analito, preparado con la misma concentración que la muestra. Para determinar la concentración de analito en la muestra se calcula la relación de áreas de analito a estándar interno tanto en la muestra y como en el estándar y se efectúa el cociente entre ambas. Es decir:

$$P = \frac{R_m C_s}{R_s} D 100$$

Donde P es el porcentaje de analito en la muestra,  $R_m$  y  $R_s$  son las relaciones de área de analito a estándar interno tanto en la muestra y el estándar respectivamente,  $C_s$  es la concentración del estándar y D es un factor de dilución. Este método requiere de patrones de referencia, al igual que el método del estándar externo, por lo cual su exactitud dependerá de la pureza de los mismos. Además requiere del uso de otra sustancia, el estándar interno, cuya pureza no tiene que ser tan controlada como la del patrón de referencia, pero debe cumplir con los siguientes requisitos:

- No debe estar presente en la muestra
- Debe presentar un área similar al analito
- Debe fluir a un valor de  $k'$  cercano al analito
- Debe resolverse completamente ( $R \geq 1.5$ )
- Debe ser estable y químicamente inerte
- Debe responder de forma semejante al analito con el detector seleccionado

El método del estándar interno no es sensible a los errores de inyección debido a que estos errores se compensan al utilizar relaciones de área, y en algunos casos, pueden compensarse los errores generados en la preparación de la muestra cuando se realiza dilución, extracción y derivatización. La utilidad del estándar interno para compensar los errores de dilución es innegable, a un que en el caso de la derivatización y extracción, los resultados deben manejarse con cuidado por que es posible empeorar los resultados en lugar de mejorarlos. El uso de estándar interno para compensar los errores de inyección es prácticamente obligado en CG porque el error de inyección es grande, pero tiene menor sentido en CLAR donde éstos son mucho menores. <sup>(4)</sup>

## Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).

El método del *estándar agregado* consiste en inyectar dos muestras para realizar un análisis, una de ellas es la muestra tal cual y la otra es la muestra a la cual se agrega una cantidad conocida de estándar de referencia. Esta segunda muestra se utiliza como estándar. La concentración del analito en la muestra se calcula de la siguiente manera:

$$P = \frac{A_m C_s}{A_{ms} - A_m} D 100$$

Donde P es el porcentaje de analito en la muestra,  $A_m$  y  $A_{ms}$  son las áreas del analito tal cual y la muestra a la que se le ha agregado estándar respectivamente,  $C_s$  es la concentración del estándar y D es un factor de dilución. Este método como el del estándar externo, tiene principalmente dos desventajas: requiere el uso de un estándar de referencia y es sensible a los errores de inyección y preparación de la muestra. A pesar de que es mucho menos utilizado resulta el método de elección cuando la matriz de la muestra es muy compleja y lleva a cambios o deformaciones en los picos. <sup>(4)</sup>

### 1.2. Validación de métodos analíticos.

La validación de los métodos analíticos apareció en la química analítica desde los años 50. La necesidad de evaluar la confiabilidad de un método de cuantificación para asegurar y documentar la calidad de la ejecución analítica, llevó de manera directa al concepto de validación de un método analítico. Se entiende por validación a la evidencia documentada establecida que proporciona un alto grado de confianza que en un proceso específico se obtendrá consistentemente un producto con las especificaciones y atributos de calidad predeterminados. La validación implica validar el *Sistema de Medición* y el *Método de Medición*, por lo que es necesario definir y diferenciar estos conceptos. El Sistema de Medición, también llamada Técnica de Medición, es el

## **Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

procedimiento donde se asocia la concentración de la sustancia de interés a un valor específico de una propiedad física o química y en los métodos espectrofotométricos es conocida como curva de calibración. El Método de Medición, consiste en cuantificar la sustancia de interés en un tejido, fluido o lugar. Se deben utilizar, en el estudio de validación, materiales de referencia bien caracterizados con pureza documentada. <sup>(4)</sup>

### **1.2.1. Parámetros de validación de métodos analíticos.**

De inicio, proceder a llevar a cabo la calificación de instalación del instrumento de medición, considerando todos aquellos factores mecánicos, eléctricos y electrónicos que pudieran afectar el desempeño del instrumento, a saber:<sup>7-13</sup>

- Adecuación de la instalación eléctrica.
- Tuberías, conexiones y entradas de servicios.
- Celdas, detectores y potencia de lámparas.
- Estándares de calibración adecuados.

## **DESARROLLO E INVESTIGACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA.**

El desarrollo se basó fundamentalmente en el hecho de poder retardar la degradación del ácido acetilsalicílico a ácido salicílico, desde el momento de la preparación de la muestra hasta realizar las inyecciones en el equipo UPLC. Se plantearon diversas fases diluentes en las cuales poder disolver la muestra de ácido acetilsalicílico, y una vez disuelta ver el coeficiente de variación de al menos 20 inyecciones de estándar ácido acetilsalicílico, el cual no debería ser mayor a 2.0 %, además de ver ventajas y desventajas entre estas.

### **A) 97% de ácido fórmico 10mM : 3.0% de acetonitrilo.**

Ventajas:

- Rápida preparación.
- Disolución rápida.
- El coeficiente de variación menor de 1.0 %.
- Retarda la degradación del ácido acetilsalicílico.

Desventajas:

- Debido a su toxicidad se eliminó esta fase diluyente.

### **B) 97% de ácido fosfórico 5mM, pH=3.0 : 3.0% de acetonitrilo.**

Ventajas:

- Poca toxicidad.
- El coeficiente de variación menor de 2.0 %.

Desventajas:

- Lenta preparación.
- Disolución lenta.
- No retarda la degradación del ácido acetilsalicílico.

### **C) 97.0 % ácido cítrico 10 mM : 3.0% de acetonitrilo.**

Ventajas:

- Muy poca toxicidad.
- El coeficiente de variación menor de 2.0%.
- Rápida preparación.
- Disolución rápida.
- Retarda eficientemente la degradación del ácido acetilsalicílico.

Desventajas:

- Ninguna.

### **PREPARACION DEL ESTANDAR Y LAS MUESTRAS.**

La manera de preparar las muestras junto con el estándar es de la siguiente manera:

Estándar:

Pesar 25.0 mg de ácido acetilsalicílico vaciar en un matraz volumétrico de 50 mL, agregar un poco de Fase diluyente y agitar con Vortex hasta la completa disolución, aforar con la fase diluyente.

Muestras:

Pesar y sacar promedio de 20 tabletas, pesar del polvo el equivalente a 156 mg de ácido acetilsalicílico ( 100 mg de polvo), vertir en matraces yodométricos con tapón, agregar alícuota de 20mL de solución diluyente y agitar por 10 minutos mecánicamente., colocar en tubos de centrifuga y centrifugar a 2615 rpm por 10 minutos, tomar una alícuota de 1 mL del sobrenadante y colocar en matraces volumétricos de 10 mL, aforar con fase diluyente.

Colocar en viales, estándar y muestras filtrando con filtros de jeringa de nylon de 0.45µm.

Condiciones del equipo:

- Equipo UPLC PDA 2996
- Columna Acquity C<sub>18</sub> BEH 2.1 x 50mm, 1.7µm
- Volúmen de inyección: 1.0 µL
- Temperatura de la columna 30.0° C
- Flujo: 0.5 mL/ minuto
- Fase móvil: 80 % Heptansulfonato de sodio 10mM, pH= 3.45 y 20% Acetonitrilo
- Longitud de onda: 245 nm
- Lavado Fuerte: 90 % Acetonitrilo : 10% Agua
- Lavado Débil: 10 % Acetonitrilo : 90% Agua

## **PROBLEMA RESUELTO**

El presente trabajo surge como una necesidad del laboratorio de contar con una técnica analítica validada para la determinación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles.

Debido a que se noto que las corridas en CLAR requerían de más tiempo, trayendo consigo mas gasto de reactivos, solventes (toxicidad), resultados mas tardados., y al contar con equipos UPLC pero al no tener una técnica validada de ácido acetilsalicílico tabletas solubles, se empezó a desarrollar la técnica analítica con los equipos UPLC, para comparar equipos y columnas, se noto lo siguiente:

Los análisis con columnas de CLAR tienen las siguientes características:

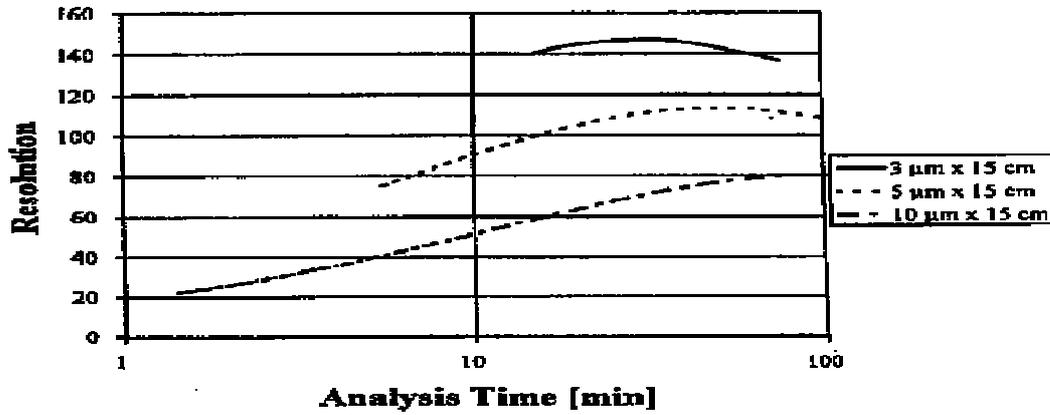
1. Mayor longitud 3.9 x 250mm C<sub>18</sub> Symmetry.
2. Mayor Tiempo de Análisis
3. Menor Resolución
4. Menor Presión
5. Mayor Consumo de Disolvente, flujos de trabajo de 2.0 mL/min
6. Mayor tamaño de partícula, 5 µm

Los análisis con columnas UPLC tienen las siguientes características:

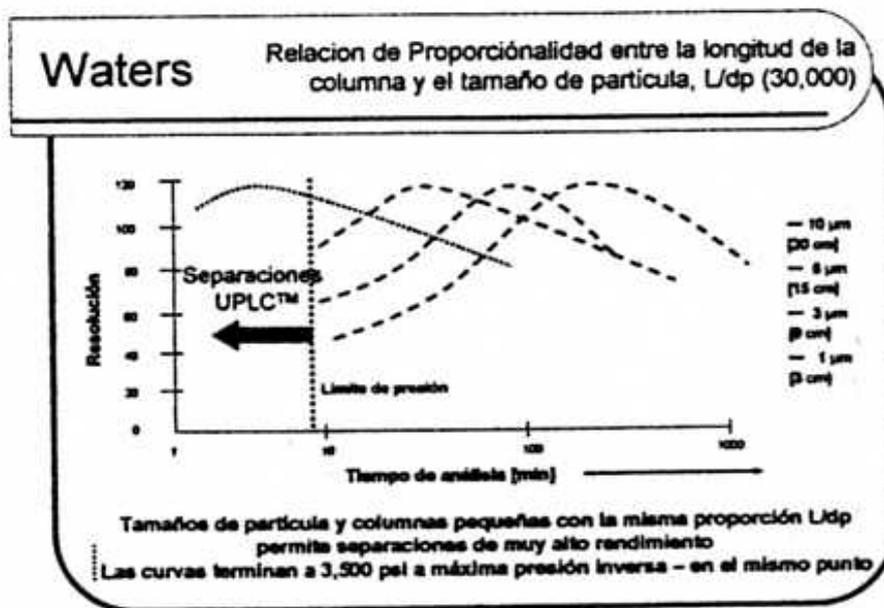
1. Menor longitud de columna.
2. Menor tiempo de análisis, corridas de 2 minutos aproximadamente
3. Mayor resolución
4. Menor consumo de disolventes
5. Menor toxicidad al usar fases inversas con mayor proporción acuosa en Amortiguadores.
6. Menor tamaño de partícula 1.7µm, diámetro de 1.0mm y 2.0 mm x 150mm C<sub>18</sub> Acquity BEH
7. Excelente resolución y forma de pico, distribución de tamaño de partícula estrechas y la operación se realiza a altas presiones, aprox 8000-10000psi

Por lo que se decidió validar la técnica analítica en equipos UPLC PDA detector arreglo de diodos y así se optimizar el análisis.

Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).

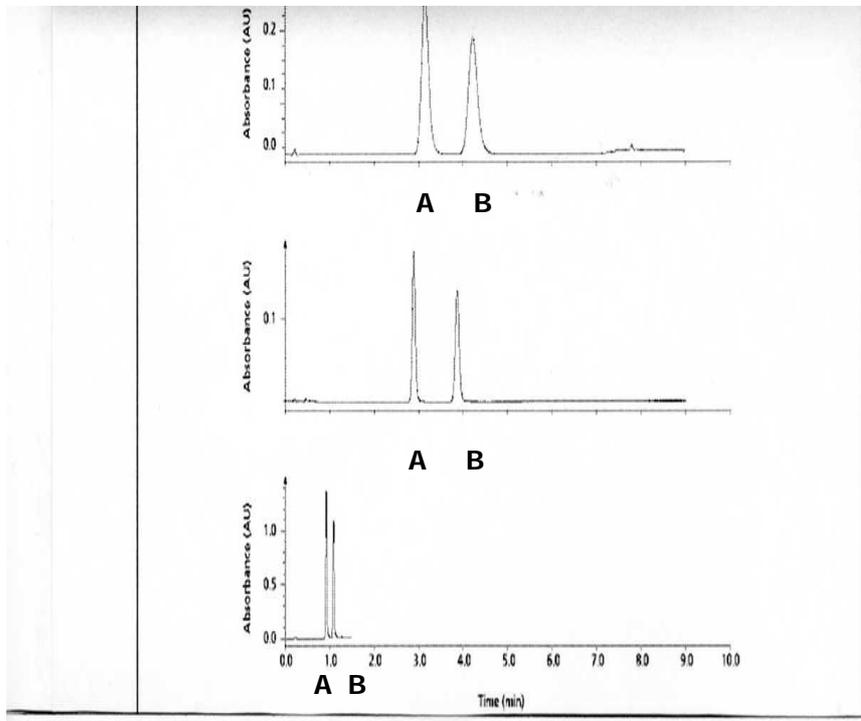


GRAFICA DE RESOLUCION v.s TIEMPO DE ANALISIS EN CLAR <sup>18</sup>  
 Figura 6



GRAFICA DE RESOLUCION v.s TIEMPO DE ANALISIS EN UPLC <sup>18</sup>  
 Figura 7

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**



**GRAFICA 1**

**GRAFICA 2**

**GRAFICA 3**

**CROMATOGRAMAS DE ANALGESICOS PARACETAMOL (A)-ACIDO ACETILSALICILICO(B), COMPARATIVOS DE TIEMPOS DE ANALISIS Y RESOLUCIÓN ENTRE COLUMNAS CLAR(GRAFICA 1 Y 2 v.s UPLC. (Figura 8)<sup>74</sup>**

## **OBJETIVOS**

### Objetivo General:

Diseñar y validar una técnica analítica para la determinación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles, por cromatografía de líquidos de ultra resolución (UPLC).

### Objetivos Particulares:

- Cambio de columnas CLAR a UPLC, concentración de fases móviles.
- Reducir y optimizar tiempos de análisis.
- Disminuir costos de reactivos, toxicidad(proteger el medio ambiente, usando fases inversas con mayor proporción acuosa que solvente orgánico), y horas de análisis.
- Disminuir los residuos de los análisis al manejar flujos de 0.3 a 0.5mL/min y volúmenes de inyección de 1 a 5µL.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

### Tipo de estudio:

- Experimental
- Prospectivo
- Longitudinal

**Población:** Tabletas solubles de ácido acetilsalicílico, 300mg.

**Criterios de exclusión:** Tabletas ácido acetilsalicílico 500mg, gragea recubierta de ácido acetilsalicílico, 500mg y otras presentaciones.

**Criterios de inclusión:** Tabletas solubles de ácido acetilsalicílico, 300mg.

### Variables

#### *Dependientes:*

- Tiempos de análisis.
- Resolución de picos de interés(ácido acetilsalicílico y salicílico).
- Estabilidad de la muestra
- Platos teóricos de la columna

#### *Independientes:*

- Selección de reactivos menos tóxicos.
- Cantidad de desechos de análisis.
- Determinación de ácido salicílico como producto de degradación.

### Materiales:

#### Equipo:

- Acquity UPLC PDA 2690 Detector conectado a computadora con procesador Pentium 4, Windows XP Profesional, Empower.
- Columna UPLC BEH C<sub>18</sub> 2.1 x 50mm, 1.7µm

#### Reactivos:

1. Acetonitrilo CLAR., marca EMD lote 45262 AX0145-1
2. Agua CLAR., Millipore membrana 0.45µm.
3. Heptansulfonato sodico., marca SIGMA lote 014K5409
4. Ácido cítrico anhídrido., marca Fermont lote 416202
5. Ácido ortofosforico 85%., marca Merck lote k33963070 445
6. Estándar secundario de ácido acetilsalicílico., marca Helm lote FRH0531411.
7. Estándar secundario de ácido salicílico., marca Merck lote 844.

## **Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

### **Material:**

- Matraces volumétricos de vidrio de 100mL, PIREX
- Matraces volumétricos de vidrio de 50mL, PIREX
- Matraces volumétricos de vidrio de 10mL, PIREX
- Pipetas volumétricas de 3mL, PIREX
- Pipetas volumétricas de 1mL, PIREX
- Vortex
- Matraces cónicos con tapa de 250mL, PIREX
- Parrilla de agitación
- Centrífuga STIRRER
- Embudos de plástico
- Balanza Analítica, Sartorius

### **Método:**

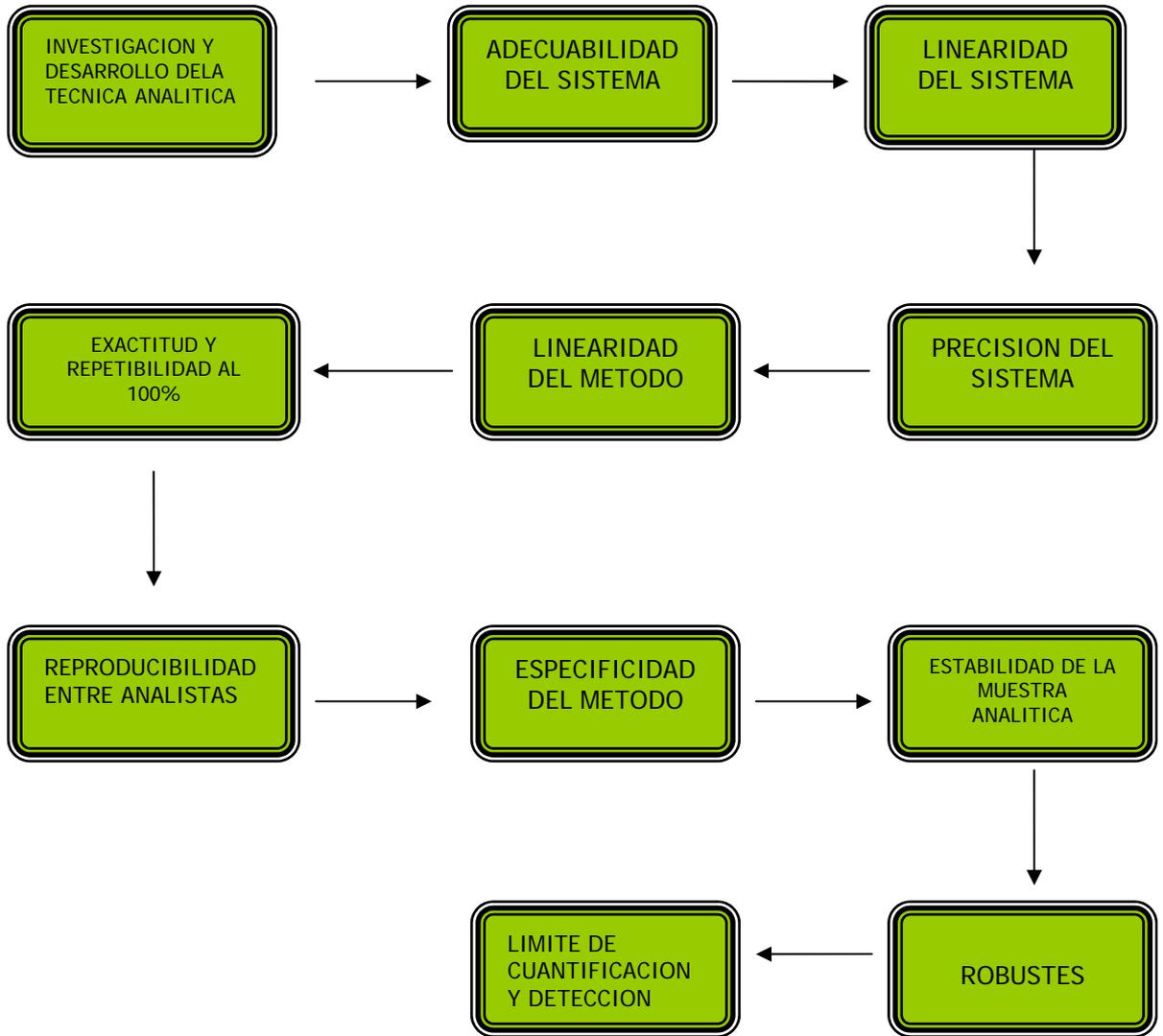
Esta cimentado en un protocolo de validación basándose en la guía de ICH4, optimizando el número de ensayos necesarios para dar credibilidad a los resultados.<sup>16</sup>

El número de ensayos esta limitado para que los resultados entren en rango de validación y pruebas estadísticas. La propuesta experimental propone un número mínimo de ensayos, dando suficientes resultados para responder los diferentes criterios analíticos del método.

En el diseño del trabajo experimental, el primer parámetro a considerar es la especificidad.

Esta dedicado a herramientas analíticas como, espectrofotómetro de masas, detector de arreglo de fotodiodos (PDA), para investigar la identidad y pureza de diferentes sustancias. El Empower PDA, tiene la opción de procesar la información de la validación.

## DIAGRAMA DE FLUJO



## DISEÑO ESTADÍSTICO

### LA ADECUABILIDAD (funcionamiento exacto de los componentes del equipo):

Se lleva a cabo de acuerdo con lo consignado en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 8ª edición, las guías de validación FDA o las especificaciones del fabricante del instrumento.

### LA VALIDACIÓN DEL SISTEMA DE MEDICIÓN:

Consiste en determinar la linealidad y precisión. La *precisión* del sistema de medición, es el grado de concordancia entre mediciones analíticas individuales obtenidas bajo las mismas condiciones de medición, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea de la solución patrón. Se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación (CV). Para determinar la precisión del sistema de medición, un analista debe preparar de manera independiente por lo menos seis diluciones a partir de la misma solución patrón, correspondiente al 100 % de lo establecido en la linealidad del sistema de medición y medir su propiedad bajo las mismas condiciones de medición. En este caso el coeficiente de variación debe de ser:

- Sistema de medición cromatográfico < 2 %.
- Sistema de medición químico y espectrofotométrico < 3 %.
- Sistema de medición microbiológico < 5 %.
- En muestras biológicas (como plasma, orina u otra matriz) < 15 %.

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

Procedimiento:

Tabular los resultados con base al siguiente formato:

Propiedad medida (y)	Porcentaje del metabolito
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Calcular la suma de la propiedad medida ( $\Sigma y$ ) y determinar el número de mediciones (n).

$$\Sigma y = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$n = \underline{\hspace{2cm}}$$

Calcular la media aritmética y la desviación estándar de la propiedad medida con las siguientes ecuaciones:

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

Calcular el coeficiente de variación con:

$$CV = \frac{s}{\bar{y}} \cdot 100$$

## LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICIÓN:

Consiste en determinar si existe relación lineal entre la concentración y una propiedad física, química y/o biológica de la muestra. Para determinar la linealidad de la técnica de medición, un analista debe preparar de manera independiente, por lo menos tres diluciones por duplicado a partir de una solución patrón, midiendo su propiedad bajo las mismas condiciones de medición. <sup>7-13</sup>

- La relación entre la concentración y la propiedad medida, debe ser altamente significativa.
- Es recomendable que la ordenada al origen de la regresión lineal simple, concentración y propiedad medida, sea estadísticamente igual a cero.
- El coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de la relación lineal simple debe ser mayor a 0.98.
  - Si el  $r^2$  es  $\geq 0.98$  %, el sistema de medición tiene buen ajuste.
  - Si el  $r^2$  es  $< 0.98$  %, el sistema de medición tiene falta de ajuste.

En la práctica, se construye una curva de calibración de una misma solución patrón utilizando cuando menos cinco diluciones y haciendo el análisis por duplicado para cada dilución. El intervalo entre las concentraciones a analizar depende del rango de trabajo. <sup>7-13</sup>

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

Procedimiento:

Tabular los resultados con base al siguiente formato:

Propiedad medida (x)	Cantidad adicionada (y)
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Calcular la suma de la propiedad medida ( $\sum x_i$ ), la suma de cuadrados de la propiedad medida ( $\sum x_i^2$ ), la suma de la cantidad adicionada ( $\sum y_i$ ), la suma de cuadrados de la cantidad adicionada ( $\sum y_i^2$ ), la suma del producto de la propiedad medida por la cantidad adicionada ( $\sum x_i y_i$ ), determinar el numero de cantidades adicionadas (t), el numero de determinaciones por cantidad adicionada (r) y el numero de pares ordenados (n).

Calcular el valor de la pendiente (m) y el valor de la ordenada al origen (b), con las siguientes ecuaciones:

$$m = \frac{n (\sum x_i y_i) - (\sum x_i) (\sum y_i)}{n (\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2}$$

$$b = \frac{\sum y_i}{n} - m \frac{\sum x_i}{n}$$

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

Calcular la suma de cuadrados de regresión (SCR), la suma de cuadrados de error de regresión (SCER) y la suma de cuadrados del total (SCT) con las siguientes ecuaciones:

$$SCR = m^2 \left[ \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n} \right]$$

$$SCER = \sum y_i^2 - m \sum x_i y_i - b \sum y_i$$

$$SCT = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n}$$

El coeficiente de determinación ( $r^2$ )

$$r^2 = \frac{SCR}{SCT} = \frac{SCR}{SCR + SCER} = \frac{m^2 \left[ \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n} \right]}{\sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n}}$$

- Construir la tabla de análisis de varianza (ANADEVA) con base al siguiente formato y establecer una decisión con forme a la siguiente regla:

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

<b>FUENTE DE VARIACIÓN</b>	<b>GRADOS DE LIBERTAD</b>	<b>SUMA DE CUADRADOS</b>	<b>MEDIA DE CUADRADOS</b>	<b>F CALCULADA</b>
Regresión	1	SCR	MCR = SCR	MCR/MCER
Error de regresión	n - 2	SCER	MCER = SCER/n - 2	

- Si la F calculada para la regresión es  $>$  a la F de tablas existe una relación lineal significativa entre la cantidad medida y la cantidad adicionada. Hay linealidad del Sistema de Medición.
- Si la F calculada para la regresión es  $\leq$  a la F de tablas no existe una relación lineal significativa entre la cantidad medida y la cantidad adicionada. No hay linealidad del Sistema de Medición.

**LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE MEDICIÓN:**

Consiste en determinar la *exactitud, la linealidad, limite de detección, limite de cuantificación, la precisión (reproducibilidad y repetibilidad) y la estabilidad de la muestra de análisis.* <sup>7-13</sup>

**LA EXACTITUD DEL MÉTODO DE MEDICIÓN:**

Consiste en determinar si existe concordancia absoluta entre el porcentaje recuperado y el porcentaje adicionado. Para ello se calcula el porcentaje de recobro de al menos diez determinaciones de un mínimo de tres concentraciones diferentes, también es posible realizar la exactitud a un porcentaje definido.

Procedimiento:

Tabular los resultados con base al siguiente formato.

Cantidad adicionada	Cantidad recuperada
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Para cada cantidad recuperada calcular el *porcentaje recuperado* ( $y_i$ ) de la siguiente manera.

$$\text{Porcentaje recuperado} = \frac{\text{Cantidad recuperada} \times 100}{\text{Cantidad adicionada}}$$

Calcular la suma del porcentaje recuperado ( $\Sigma y_i$ ) y el número de determinaciones (n).

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

$$\Sigma y_i = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$n = \underline{\hspace{2cm}}$$

Calcular la media aritmética y la desviación estándar del porcentaje recuperado con las siguientes ecuaciones.

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

Al determinar el valor absoluto de la  $t$  ( $t_{calc}$ ) mediante la siguiente ecuación:

$$t_{calc} = \frac{100 - \bar{y}}{\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)}$$

donde  $\bar{y}$  y  $s$  son la media aritmética y la desviación estándar del porcentaje recuperado, respectivamente; y el valor de  $t$  en tablas al 95 % con  $n-1$  grados de libertad, se establece una decisión con base a la siguiente regla:

- Si el valor absoluto de la  $t_{calc}$  es mayor o igual al valor de la  $t$  de tablas, el método de medición es inexacto.
- Si el valor absoluto de la  $t_{calc}$  es menor al valor de la  $t$  de tablas, el método de medición es exacto.

La *linealidad* del método de medición es la relación que se establece por medio de una recta, entre una propiedad medible (cantidad recuperada) y el valor real de la

propiedad (cantidad adicionada). Para que exista linealidad del método de medición:

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

- La relación lineal simple cantidad adicionada y cantidad recuperada debe ser altamente significativa, es decir, la F calculada debe ser mayor que la F de tablas.
- El coeficiente de determinación de la relación lineal simple de la cantidad adicionada y cantidad recuperada debe mayor al 98.0 %.

Si la F calculada es mayor que la F de tablas pero el coeficiente de determinación es menor al 98.0 %, hay linealidad pero el método de medición tiene falta de ajuste. Sí y sólo si hay linealidad, independientemente de la falta de ajuste, se puede seguir evaluando la linealidad del método de medición, para ello es necesario revisar el valor de la pendiente y de la ordenada al origen:

- La ordenada al origen de la relación lineal simple cantidad adicionada y cantidad recuperada, debe ser estadísticamente igual a cero.
- La pendiente de la relación lineal simple cantidad adicionada y cantidad recuperada, debe ser estadísticamente igual a uno.

Cuando la pendiente es diferente de uno, el método de medición tiene error sistemático consistente. Si la ordenada al origen es diferente de cero el método de medición tienen error sistemático constante.<sup>7-13</sup>

La *linealidad* del método de medición se realiza con placebos adicionados del principio activo (placebos cargados), cada uno de manera independiente, cuando menos a cinco diferentes concentraciones, incluyendo el 100 %, haciendo los análisis por duplicado de cada concentración. En química clínica es común el uso de muestras biológicas controles y calibradores para establecer la linealidad del

método de medición, si calculamos los valores recuperados a partir de la recta de calibración, es posible establecer la linealidad del método de medición si se

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

realiza un análisis de regresión entre los valores calculados y los valores reales de las muestras biológicas controles y/o calibradores.<sup>7-13</sup>

Procedimiento:

Tabular los resultados con base al siguiente formato.

Cantidad adicionada (x)	Cantidad recuperada (y)	Total (Ti)
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

Calcular la suma de la cantidad adicionada ( $\sum x_i$ ), la suma de cuadrados de la cantidad adicionada ( $\sum x_i^2$ ), la suma de la cantidad recuperada ( $\sum y_i$ ), la suma de cuadrados de la cantidad recuperada ( $\sum y_i^2$ ), la suma del producto de la cantidad adicionada por la cantidad recuperada ( $\sum x_i y_i$ ), la suma de cuadrados de los totales ( $\sum T_i^2$ ) y determinar el número de cantidades adicionadas (t), el numero de determinaciones por cantidad adicionada (r) y el numero de pares ordenados (n).

$$\begin{aligned}\sum x_i &= \underline{\hspace{2cm}} & \sum y_i &= \underline{\hspace{2cm}} \\ \sum x_i^2 &= \underline{\hspace{2cm}} & \sum y_i^2 &= \underline{\hspace{2cm}} \\ \sum x_i y_i &= \underline{\hspace{2cm}} & \sum T_i^2 &= \underline{\hspace{2cm}} \\ t &= \underline{\hspace{2cm}} & r &= \underline{\hspace{2cm}} \\ n = tr &= \underline{\hspace{2cm}}\end{aligned}$$

Calcular el valor de la pendiente (m) y el valor de la ordenada al origen (b), con las siguientes ecuaciones:

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

$$m = \frac{n (\sum x_i y_i) - (\sum x_i) (\sum y_i)}{n (\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2} \qquad b = \frac{\sum y_i}{n} - m \frac{\sum x_i}{n}$$

Calcular la suma de cuadrados de regresión (SCR), la suma de cuadrados de error de regresión (SCER) y la suma de cuadrados del total (SCT) con las siguientes ecuaciones:

$$SCR = m^2 \left[ \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n} \right]$$

$$SCER = \sum y_i^2 - m \sum x_i y_i - b \sum y_i$$

$$SCT = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n}$$

El coeficiente de determinación ( $r^2$ )

$$r^2 = \frac{SCR}{SCT} = \frac{SCR}{SCR + SCER} = \frac{m^2 \left[ \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n} \right]}{\sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n}}$$

Calcular la suma de cuadrados del error puro (SCEP) y la suma de cuadrados de la falta de ajuste (SCFA) con las siguientes ecuaciones.

$$SCEP = \sum y_i^2 - \frac{\sum T_i^2}{r}$$

$$SCFA = SCER - SCEP$$

Donde  $r$  = número de replicaciones.

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

Al construir una tabla de ANADEVa con el siguiente formato y al determinar los valores de F se establece una decisión con base a la siguiente regla:

<b>FUENTE DE VARIACIÓN</b>	<b>GRADOS DE LIBERTAD</b>	<b>SUMA DE CUADRADOS</b>	<b>MEDIA DE CUADRADOS</b>	<b>F CALCULADA</b>
Regresión	1	SCR	MCR = SCR	MCR/MCER
Error de regresión	n - 1	SCER	MCER = SCER/n - 2	
Falta de ajuste	(n - 2) - t(r-t)	SCFA	MCFA = SCFA/g.l.F.A.	MCFA/MCEP
Error puro	t(r-1)	SCEP	MCEP = SCEP/g.l.E.P.	

- Si F calculada para la regresión es  $\geq$  que la F de tablas existe una relación lineal significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada. Hay linealidad del método de medición.
- Si F calculada para la regresión es  $<$  que la F de tablas no existe una relación lineal significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada. No hay linealidad del método de medición.
- Si  $r^2$  es  $\geq$  a 96.0 %, hay linealidad y el método de medición tiene buen ajuste.
- Si  $r^2$  es  $<$  a 96.0 %, hay que evaluar la F calculada de la falta de ajuste.

Si la F calculada de la falta de ajuste es mayor que la F de tablas, hay linealidad y el método de medición tiene mal ajuste. Si la F calculada de la falta de ajuste es menor que la F de tablas, hay linealidad y el método de medición es impreciso.<sup>7-13</sup>

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

Calcular el intervalo de confianza para la pendiente (I.C.M.) y el intervalo de confianza para la ordenada al origen (I.C.B.) con las siguientes formulas y tomando una decisión con base a la siguiente regla:

$$\text{I.C.M.} = m \pm 1.95S_m$$

Donde  $S_m$  es.

$$S_m = S_{y/x} \left[ \frac{1}{(\sum x^2) - \frac{(\sum x)^2}{n}} \right]^{1/2}$$

Y el termino  $S_{y/x}$  es:

$$S_{y/x} = (\text{MCER})^{1/2} = \left( \frac{\text{SCER}}{n - 2} \right)^{1/2}$$

$$\text{I.C.B.} = b + 1.95S_b$$

Donde  $S_b$  es:

Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).

$$S_b = S_{y/x} \left[ \frac{1}{n} + \frac{\left(\frac{\sum x}{n}\right)^2}{\left(\sum x^2\right) - \frac{(\sum x)^2}{n}} \right]^{1/2}$$

Y el término  $S_{y/x}$  es:

$$S_{y/x} = (\text{MCER})^{1/2} = \left(\frac{\text{SCER}}{n - 2}\right)^{1/2}$$

- Si el intervalo para la pendiente abarca el uno el método de medición carece de error sistemático consistente, si el intervalo no abarca uno el método de medición tiene error sistemático consistente.
- Si el intervalo para la ordenada al origen abarca el cero el método de medición carece de error sistemático constante, si el intervalo no abarca cero el método de medición tiene error sistemático constante.

### **EL LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO DE MEDICIÓN:**

Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra que bajo las condiciones de operación establecidas, puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada. Para establecer el límite de detección del método de medición se evalúa la cantidad recuperada de la sustancia de interés, como mínimo a tres cantidades adicionadas por triplicado y determinando la

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

respuesta de al menos cinco blancos o placebos preparados de manera independiente. <sup>7-13</sup>

Procedimiento:

Tabular los resultados con base al siguiente formato.

Concentración (x)	Propiedad medida (y)
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Blancos

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Calcular la suma de la concentración ( $\sum x_i$ ), la suma de cuadrados de la concentración ( $\sum x_i^2$ ), la suma de la propiedad medida ( $\sum y_i$ ), la suma de cuadrados

de la propiedad medida ( $\sum y_i^2$ ), la suma del producto de la concentración por la propiedad medida ( $\sum x_i y_i$ ), determinar el número de concentraciones (t), el número de replicas por concentración (r), el número de pares ordenados (n), la suma de los blancos ( $\sum Z_i$ ), la suma de cuadrados de los blancos ( $\sum Z_i^2$ ) y el número de blancos (n').

$$\sum x_i = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$\sum y_i = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$\sum x_i^2 = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$\sum y_i^2 = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$\sum x_i y_i = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$t = \underline{\hspace{2cm}}$$

Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).

$$r = \frac{\sum Z_i}{n} \qquad n = tr = \frac{\sum Z_i^2}{\sum Z_i}$$
$$\sum Z_i = \frac{\sum Z_i^2}{n'}$$

Calcular el valor de la pendiente (m).

$$m = \frac{n (\sum x_i y_i) - (\sum x_i) (\sum y_i)}{n (\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2}$$

Calcular la desviación estándar de los blancos (DEb) y calcular el límite de detección (LD), con las siguientes ecuaciones:

$$DEb = \sqrt{\frac{n (\sum Z_i^2) - (\sum Z_i)^2}{n' (n' - 1)}}$$

$$LD = \frac{3 (DEb)}{m}$$

### **EL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO DE MEDICIÓN:**

Es la menor concentración de la sustancia en una muestra que puede ser determinada con exactitud y precisión aceptable, bajo las condiciones de operación establecidas. Se evalúa la respuesta de la sustancia de interés a partir del límite de detección. Considerar como mínimo tres diluciones por quintuplicado, partiendo de una misma solución patrón y determinando la respuesta contra dos blancos preparados de manera independiente. La determinación se efectúa por un mismo analista, bajo las mismas condiciones de operación.

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

Procedimiento.

Con los datos de linealidad del sistema de medición (curva de calibración), se determina el valor teórico de la propiedad medida para las diluciones seleccionadas.

Dilución	Valor teórico de la propiedad medida
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Tabular los valores experimentales de la propiedad medida ( $y_i$ ) que se obtuvieron para cada dilución.

Dilución	Valor experimental de la propiedad medida
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Para cada dilución calcular la suma de los valores experimentales de la propiedad medida ( $\Sigma y_i$ ) y el número de determinaciones (n).

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

$$\Sigma y_i = \underline{\hspace{2cm}} \qquad n = \underline{\hspace{2cm}}$$

Calcular para cada dilución la media y la desviación estándar con las siguientes ecuaciones.

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

Determinar el valor absoluto de la  $t$  ( $t_{calc}$ ) mediante la siguiente ecuación:

$$t_{calc} = \frac{V.T. - \bar{y}}{\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)}$$

Donde V.T. es el valor teórico de la propiedad medida correspondiente a la dilución que se evalúa.

Determinar el valor de la  $t$  de tablas al 95.0 % con  $n-1$  grados de libertad, estableciendo un criterio en base a la siguiente regla:

- Si el valor absoluto de la  $t_{calc} \geq$  al valor de la  $t$  de tablas, se concluye que bajo las condiciones de operación establecidas, la concentración estudiada no se cuantifica con exactitud y precisión aceptable.
- Si el valor absoluto de la  $t_{calc} <$  al valor de la  $t$  de tablas, se concluye que bajo las condiciones de operación establecidas, la concentración estudiada es cuantificada con exactitud y precisión aceptable.

## Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).

- El límite de cuantificación será la concentración estudiada más pequeña, que bajo las condiciones de operación establecidas, puede cuantificarse con exactitud y precisión.

### **LA PRECISIÓN DE UN MÉTODO DE MEDICIÓN:**

Es el grado de concordancia relativa entre resultados individuales de una muestra homogénea del producto. La precisión es también una medida del grado de *reproducibilidad* y/o *repetibilidad* del método analítico bajo condiciones normales de operación. La *reproducibilidad* es la concordancia relativa entre determinaciones independientes, realizadas bajo condiciones diferentes de análisis, como diferentes analistas, diferentes días, diferentes equipos, etc. La *repetibilidad* es la concordancia relativa entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones de prueba. Para realizar la precisión del método analítico se requiere trabajar de manera independiente, partiendo de una muestra homogénea del producto de preferencia cercana al 100 % de la concentración teórica o a una concentración conocida y realizar por triplicado cada muestra considerando las variables o *factores* que se desean analizar y evaluar. Cada *factor* por analizar debe tener al menos dos niveles o clasificaciones, con estos niveles, se construye una matriz de tratamiento y a partir de ésta se realiza un diseño de experimentos con dos criterios de clasificación.<sup>7-13</sup>

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

MATRIZ DE TRATAMIENTO.

FACTOR 2	FACTOR 1	
	NIVEL 1	NIVEL 2
NIVEL 1	Resultado 1	Resultado 1
	Resultado 2	Resultado 2
	.....	.....
	Resultado n	Resultado n
NIVEL 2	Resultado 1	Resultado 1
	Resultado 2	Resultado 2
	.....	.....
	Resultado n	Resultado n

Una forma común de evaluar la precisión de un método de medición consiste en usar como *factores* de prueba a analistas y días. Para ello, al menos dos analistas con pericia suficiente se les asignan por lo menos dos días para que cuantifiquen como mínimo por triplicado un mismo producto. Con estos factores se tiene la siguiente matriz de tratamientos:

DÍA	ANALISTA	
	1	2
1	Resultado 1	Resultado 1
	Resultado 2	Resultado 2
	.....	.....
	Resultado n	Resultado n
2	Resultado 1	Resultado 1
	Resultado 2	Resultado 2
	.....	.....
	Resultado n	Resultado n

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

El modelo estadístico para evaluar la precisión del método de medición es:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_{j(i)} + E_{k(ij)}$$

Donde:

$Y_{ijk}$  = el k-ésimo resultado realizado por el i-ésimo analista el j-ésimo día.

$\mu$  = media general.

$A_i$  = efecto del i-ésimo analista sobre el recobro experimental.

$D_{j(i)}$  = efecto que tiene sobre el recobro experimental el j-ésimo día de un analista dado.

$E_{k(ij)}$  = error experimental.

Procedimiento.

Calcular la suma de los valores para cada analista ( $y_i$ ), la suma de los valores de la combinación Día-Analista ( $y_{ij}$ ), la suma total de los datos ( $y_{...}$ ) y la suma de cada dato elevado al cuadrado ( $\sum\sum\sum y_{ijk}^2$ ).

$$y_{1..} = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$y_{11.} = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$y_{2..} = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$y_{12.} = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$y_{...} = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$y_{21.} = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$y_{22.} = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$\sum\sum\sum y_{ijk}^2 = \underline{\hspace{2cm}}$$

Anotar el número de analistas (a), días (d) y repeticiones (r).

$$a = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$d = \underline{\hspace{2cm}}$$

$$r = \underline{\hspace{2cm}}$$

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

Calcular la suma de cuadrados del analista ( $SCA_i$ ) con la siguiente ecuación.

$$SCA_i = \frac{\sum y_i^2 \dots}{dr} - \frac{y^2 \dots}{adr}$$

Calcular la suma de cuadrados del día anidado en el analista ( $SCD_{j(i)}$ ), por medio de la siguiente ecuación.

$$SCD_{j(i)} = \frac{\sum \sum y_{ij}^2}{r} - \frac{\sum y_i^2 \dots}{rd}$$

Calcular la suma de cuadrados del error ( $SCE_{k(ij)}$ ), con la siguiente ecuación.

$$SCE_{k(ij)} = \sum \sum \sum y_{ijk}^2 - \frac{\sum \sum y_{ij}^2}{r}$$

Con los datos anteriores construir una tabla de ANADEVa con forme al siguiente formato y establecer las decisiones con base a las siguientes reglas:

<b>FUENTE DE VARIACIÓN</b>	<b>GRADOS DE LIBERTAD</b>	<b>SUMA DE CUADRADOS</b>	<b>MEDIA DE CUADRADOS</b>	<b>F CALCULADA</b>
Analista	a - 1	$SCA_i$	$MCA_i = \frac{SCA_i}{a-1}$	$FA_i = \frac{MCA_i}{MCD_{j(i)}}$
Día	(d - 1)a	$SCD_{j(i)}$	$MCD_{j(i)} = \frac{SCD_{j(i)}}{(d-1)a}$	$FD_{j(i)} = \frac{MCD_{j(i)}}{MCE_{k(ij)}}$
Error experimental	(k - 1)ad	$SCE_{k(ij)}$	$MCE_{k(ij)} = \frac{SCE_{k(ij)}}{(k-1)ad}$	

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

- Si  $FA_i \geq F$  de tablas. El método analítico no es reproducible por los analistas.
- Si  $FA_i < F$  de tablas. El método analítico es reproducible por los analistas.
- Si  $FD_{j(i)} \geq F$  de tablas. El método analítico no es reproducible en distintos días por un mismo analista.
- Si  $FD_{j(i)} < F$  de tablas. El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

La variación en el método analítico debido a los analistas se estima de la siguiente manera.

$$\text{Variación interanalista} = \pm \sqrt{\frac{MCA_i - MCD_{j(i)}}{rd}}$$

La variación en el método analítico debido a los días para un mismo analista es:

$$\text{Variación interdías} = \pm \sqrt{\frac{MCD_{j(i)} - MCE_{k(ji)}}{r}}$$

La repetibilidad del método analítico se determina, calculando la media general y la desviación estándar total, para finalmente obtener el coeficiente de variación del método analítico que no debe ser mayor al 3 % para métodos analíticos y no mayor del 15 % para métodos bioanalíticos. <sup>7-13</sup>

$$\text{Media general} = \mu = \frac{Y_{\dots}}{n}$$

$$\text{Desviación estándar total} = s = \sqrt{\frac{n \sum \sum \sum Y_{ijk}^2 - (Y_{\dots})^2}{n(n-1)}}$$

donde  $n = (a) (d) (r)$

Calcular el coeficiente de variación del método analítico con la siguiente fórmula.

$$CV = \frac{s}{\mu} 100$$

### **LA ESTABILIDAD DE LA MUESTRA DE ANÁLISIS DEL MÉTODO DE MEDICIÓN:**

Consiste en determinar las condiciones donde la muestra para análisis mantiene constante su propiedad medible con respecto al tiempo. En esencia esta prueba consiste en almacenar las muestras para análisis en distintas condiciones de temperatura y luz durante un tiempo definido de antemano y determinar la diferencia en los resultados con respecto a una muestra cuantificada en condiciones óptimas de operación. El procedimiento consiste en analizar por el método analítico, al menos por triplicado, una muestra a una concentración conocida y definida. Almacenar las muestras analizadas bajo distintas condiciones (por ejemplo a temperatura ambiente, refrigeración, congelación, protegidas de la luz, etc.), durante un tiempo preestablecido por el analista. Reanalizar las muestras bajo las mismas condiciones de operación utilizando una solución patrón recientemente preparada, para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido en el

método analítico. La determinación debe ser efectuada por un mismo analista. La muestra es estable si la valoración de las muestras reanalizadas es estadísticamente equivalente a la valoración inicial.<sup>7-13</sup>

Hay varias formas para determinar si existe diferencia entre la valoración inicial y cada una de las condiciones de almacenamiento. Es posible usar cualquiera de las siguientes pruebas:

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

- Prueba  $t$  de Dunnett.
- Análisis de varianza de un factor y comparaciones múltiples.
- Prueba de  $t$  para dos medias.

Para determinar las condiciones donde la muestra de análisis del método de medición es estable, es necesario realizar los cálculos del análisis de varianza de un factor y las comparaciones contra un control o prueba de  $t$  de Dunnett.

Como existen restricciones de cálculo para la  $t$  de Dunnett es necesario tener ciertas consideraciones:

- Además del control, se deben ensayar al menos dos condiciones de almacenamiento.
- Tanto control como cada condición de almacenamiento debe analizarse al menos por triplicado.

El modelo estadístico para evaluar la estabilidad de la muestra de análisis del método de medición es:

$$Y_{ij} = \mu + (\tau_i + E_{j(i)})$$

$Y_{ij}$  = el  $j$ -ésimo resultado obtenido bajo la  $i$ -ésima condición de almacenamiento.

$\mu$  = Media general.

$\tau_i$  = efecto de la  $i$ -ésima condición de almacenamiento.

$E_{j(i)}$  = error experimental.

Tomadas las consideraciones anteriores se procede de la siguiente manera.

- Definir al menos dos condiciones de almacenamiento.

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

- Realizar el proceso de cuantificación de la muestra en condiciones de trabajo al menos por triplicado.
- Someter por triplicado, muestras de análisis a las diferentes condiciones de almacenamiento.
- Determinar el porcentaje de recobro.
- Tabular los resultados obtenidos.

MUESTRA CONTROL	CONDICIÓN 1	CONDICIÓN 2	CONDICIÓN i
.....Y <sub>11</sub>	.....Y <sub>21</sub>	.....Y <sub>31</sub>	.....Y <sub>i1</sub>
.....Y <sub>12</sub>	.....Y <sub>22</sub>	.....Y <sub>32</sub>	.....Y <sub>i2</sub>
.....Y <sub>13</sub>	.....Y <sub>23</sub>	.....Y <sub>33</sub>	.....Y <sub>i3</sub>
.....Y <sub>1n<sub>i</sub></sub>	.....Y <sub>2n<sub>i</sub></sub>	.....Y <sub>3n<sub>i</sub></sub>	.....Y <sub>in<sub>i</sub></sub>
SUMA DE VALORES (Y <sub>1•</sub> )	SUMA DE VALORES (Y <sub>2•</sub> )	SUMA DE VALORES (Y <sub>3•</sub> )	SUMA DE VALORES (Y <sub>i•</sub> )

Calcular la suma de los valores para cada condición de almacenamiento ( $y_{i\cdot}$ ), la suma total de los datos ( $y_{\cdot\cdot}$ ) y la suma de cada dato elevado al cuadrado ( $\sum\sum y_{ij}^2$ ).

$$\begin{array}{ll}
 y_{1\cdot} = \underline{\hspace{2cm}} & y_{2\cdot} = \underline{\hspace{2cm}} \\
 y_{3\cdot} = \underline{\hspace{2cm}} & y_{i\cdot} = \underline{\hspace{2cm}} \\
 y_{\cdot\cdot} = \underline{\hspace{2cm}} & \sum\sum y_{ij}^2 = \underline{\hspace{2cm}}
 \end{array}$$

Determinar el número de tratamientos  $n = \underline{\hspace{2cm}}$ , el número de repeticiones para cada tratamiento y el total de repeticiones  $N = \underline{\hspace{2cm}}$ .

Determinar los siguientes valores.

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

$$\frac{\sum y_{i.}^2}{n_i} = \frac{\sum \sum y_{ij}^2}{N} = \frac{y^{2..}}{N}$$

Para evaluar el efecto de cada una de las condiciones de almacenamiento sobre la estabilidad de la muestra se calculan los valores requeridos para la tabla de ANADEVIA siguiente:

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA
Tratamiento $\tau_i$	$n - 1$	$\frac{\sum y_{i.}^2}{n_i} - \frac{y^{2..}}{N} = \text{SCT}$	MCT = $\text{SCT}/n-1$	MCT/MCE
Error experimental $E_{j(i)}$	$N - n$	$\sum \sum y_{ij}^2 - \frac{\sum y_{i.}^2}{n_i} = \text{SCE}$	MCE = $\text{SCE}/N-n$	

SCT = Suma de cuadrados del tratamiento.

MCT = Media de cuadrados del tratamiento.

SCE = Suma de cuadrados del error.

MCE = Media de cuadrados del error.

N = Total de unidades experimentales.

$n_i$  = Número de unidades de la i-ésima nivel del factor.

Con los valores obtenidos concluir de acuerdo a la siguiente regla de decisión:

- Si la F calculada es menor a la F de tablas no se rechaza  $H_0$  (hipótesis nula) y bajo las condiciones de estudio no se existen diferencias significativas entre la muestra de análisis y las diferentes condiciones de almacenamiento.

## **Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

- Si la F calculada es mayor a la F de tablas se rechaza Ho (hipótesis nula) y bajo las condiciones de estudio existen diferencias significativas entre la muestra de análisis y al menos una las diferentes condiciones de almacenamiento.

### **LA ROBUSTEZ DEL MÉTODO DE MEDICIÓN**

Consiste en comprobar la confiabilidad de un análisis con respecto a variaciones deliberadas de los parámetros del método. Si las mediciones son susceptibles de variación en condiciones analíticas, éstas deben ser controladas convenientemente o se deben incluir las precauciones en el procedimiento. Una consecuencia de la evaluación de la robustez debe ser que se establecen una serie de parámetros para asegurar que la validez del método es mantenida en cualquier modo que se use. En el caso de la cromatografía de líquidos, las variaciones típicas son:<sup>7-13</sup>

- Influencia de las variaciones del pH de la fase móvil.
- Influencia de las variaciones de la composición de la fase móvil.
- Columnas diferentes (Lotes o proveedores).
- Temperatura.
- Velocidad de flujo.

# RESULTADOS



*Laboratorio de Control de Calidad*

## **Reporte de Validación del Método: Determinación de Acido acetilsalicílico tabletas solubles**

**Producto:** ACIDO ACETILSALICILICO TABLETAS SOLUBLES  
**Lote:** A025F20

**P. Activo(s):** ACIDO ACETILSALICILICO

**Estándar:** ACIDO ACETILSALICILICO  
**Lote:** O4O8411  
**Pureza:** 100.16%

**Analista 1:** Q.F.B. MIGUEL ANGEL AVILA  
**Analista 2:** Q.F.B. ESPERANZA JIMENEZ MONTESINOS

**Sistema Cromatografico UPLC 1 (Ultra Performance Liquid Cromatography)**

**Realizado Por:** Q.F.B. MIGUEL ANGEL AVILA ESPINOSA

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC(Ultra Performance LC).**

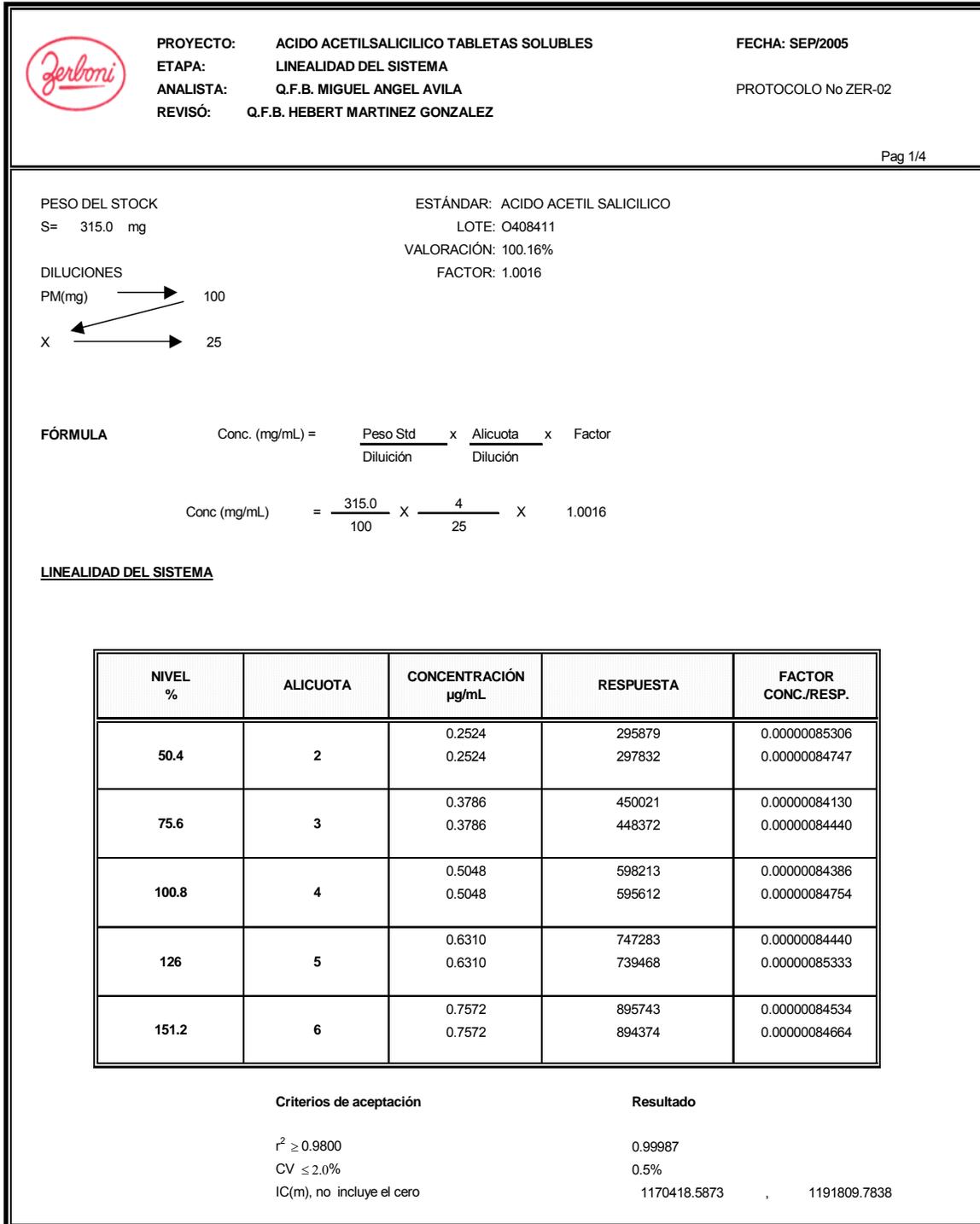


FIGURA 1

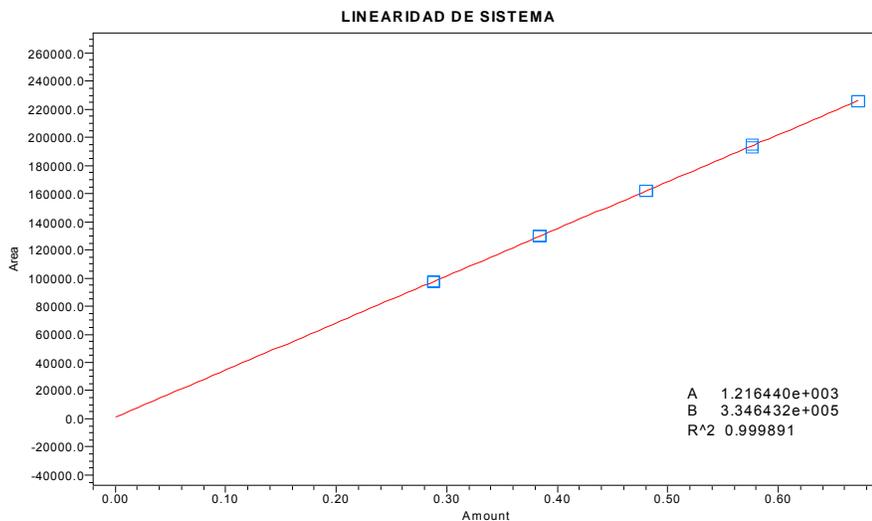
## Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC(Ultra Performance LC).



**PROYECTO:** ACIDO ACETILSALICILICO TABLETAS SOLUBLES  
**ETAPA:** LINEALIDAD DEL SISTEMA  
**ANALISTA:** Q.F.B. MIGUEL ANGEL AVILA  
**REVISOR:** Q.F.B. HEBERT MARTINEZ GONZALEZ

**FECHA:** SEP/2005  
**PROTOCOLO** No ZER-02

Pag 2/4



### Estadística

$\Sigma x = 5.0481$	Desviación estándar de regresión
$\Sigma y = 5962797.0000$	$S_{y/x} = 2709.3790$
$\Sigma x^2 = 2.8668$	Desviación estándar de la pendiente
$\Sigma y^2 = 3999922260641.0000$	$S_m = 4800.5378$
$\Sigma xy = 3386286.5114$	Valor de t de tablas
$n = 10$	$t_{0.975, n-2} = 2.228$
$m = 1181114.1856$	
$b = 45.7000$	

Intervalo de confianza para la pendiente  
 $IC(m) = 1181114.1856 \pm 2.228 \times 4800.5378$

FIGURA 2

## Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC(Ultra Performance LC).

	PROYECTO:	ACIDO ACETILSALICILICO TABLETAS SOLUBLES	FECHA: SEP/2005
	ETAPA:	ADECUABILIDAD DEL SISTEMA	
	ANALISTA:	Q.F.B MIGUEL ANGEL AVILA	PROTOCOLO No ZER-02
	REVISÓ:	Q.F.B HEBERT MARTINEZ GONZALEZ	

Pag 1/2

PESO DEL STOCK S= 315.0 mg	ESTÁNDAR: ACIDO ACETIL SALICILICO LOTE: O408411 VALORACIÓN: 100.16% FACTOR: 1.0016
-------------------------------	---

DILUCIONES PM(mg) → 100 4 ← → 25	
--	--

**FÓRMULA**

$$\text{Conc. (mg/mL)} = \frac{\text{Peso Std}}{\text{Dilución}} \times \frac{\text{Alicuota}}{\text{Dilución}} \times \text{Factor}$$

$$\text{Conc (mg/mL)} = \frac{315.0}{100} \times \frac{4}{25} \times 1.0016$$
  

**ADECUABILIDAD DEL SISTEMA**

<b>CONCENTRACIÓN: 0.5048 mg/mL</b>	<b>Criterio de aceptación</b>	<b>Resultado</b>						
<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="text-align: center; border: 1px solid black;">RESPUESTA (AU)</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">595778</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">596734</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">594361</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">593736</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">590184</td> </tr> </table>	RESPUESTA (AU)	595778	596734	594361	593736	590184	CV ≤ 2.0% k' ≥ 2.0 R ≥ 1.5 T ≤ 2.0	0.4% 2.400 *N.A. 0.800
	RESPUESTA (AU)							
	595778							
	596734							
	594361							
593736								
590184								
	<b>Otros parámetros</b>							
	t <sub>r</sub>	1.006						
	N	2739.3						

Nota: El sistema cromatográfico empleado en esta validación: es un UPLC siendo el Volumen muerto de estos Sistemas de 0.5 mL

FIGURA 3

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC(Ultra Performance LC).**

	<b>PROYECTO:</b> ACIDO ACETILSALICILICO TABLETAS SOLUBLES	<b>FECHA:</b> SEP/2005
	<b>ETAPA:</b> PRECISIÓN DEL SISTEMA <b>ANALISTA:</b> Q.F.B. MIGUEL ANGEL AVILA <b>REVISÓ:</b> Q.F.B. HEBERT MARTINEZ GONZALEZ	<b>PROTOCOLO</b> No ZER-02

Pag 1/2

<b>PESO DEL STOCK</b> S= 315.0 mg	<b>ESTÁNDAR:</b> ACIDO ACETIL SALICILICO LOTE: O4O8411 VALORACIÓN: 100.16% FACTOR: 1.0016
--------------------------------------	--

<b>DILUCIONES</b> PM(mg) → 100 4 ← → 25	
---	--

$$\text{Conc. (mg/mL)} = \frac{\text{Peso Std}}{\text{Diluición}} \times \frac{\text{Alicuota}}{\text{Diluición}} \times \text{Factor}$$

**FÓRMULA**

$$\text{Conc (mg/mL)} = \frac{315.0}{100} \times \frac{4}{25} \times 1.0016$$

**CONCENTRACIÓN: 0.5049 mg/mL**

RESPUESTA (AU)
595778
596734
593360
594361
590184
593736

**X = 594026**

Criterio de aceptación	Resultado
CV ≤ 1.5%	0.4%

FIGURA 4

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC(Ultra Performance LC).**

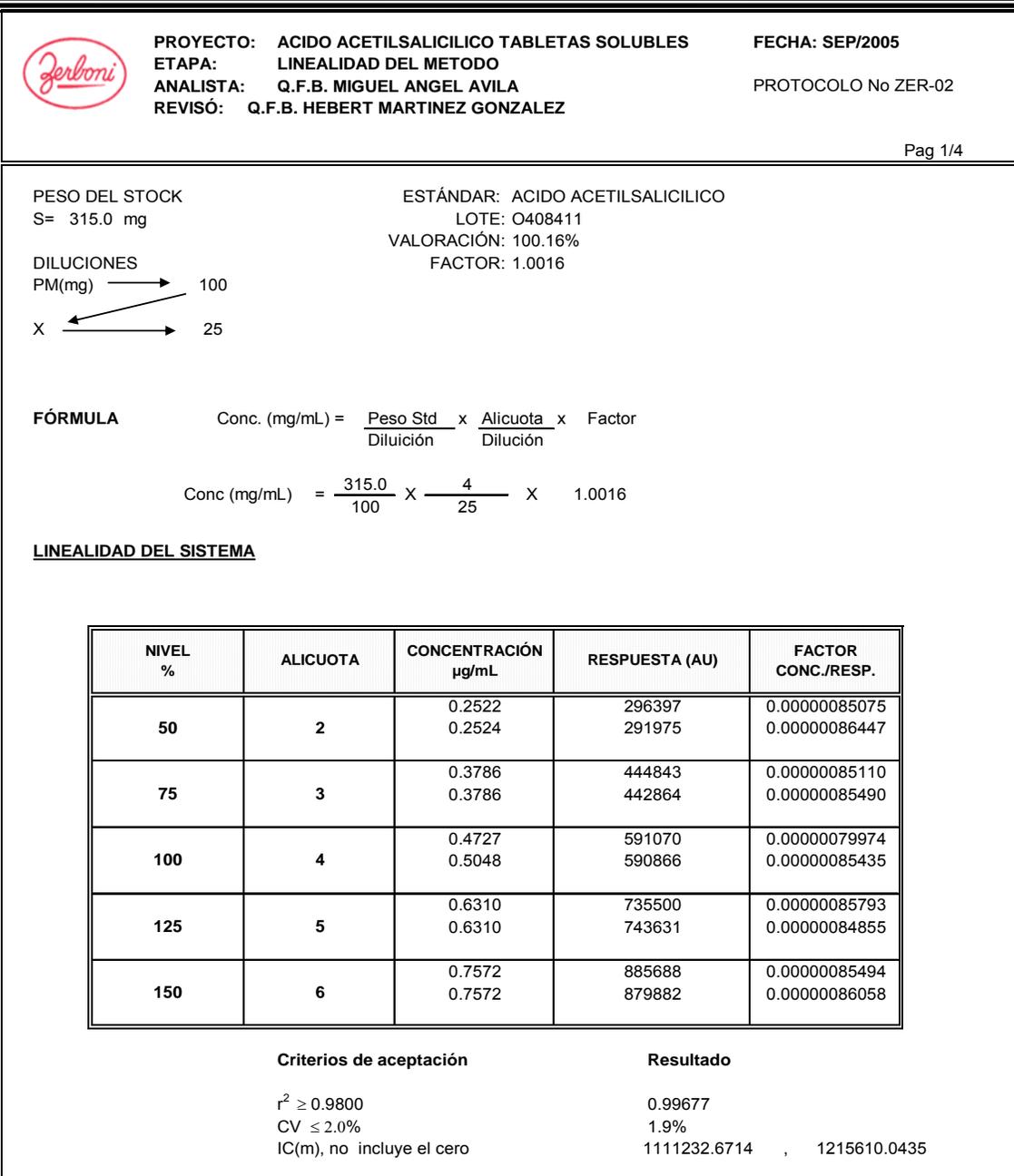


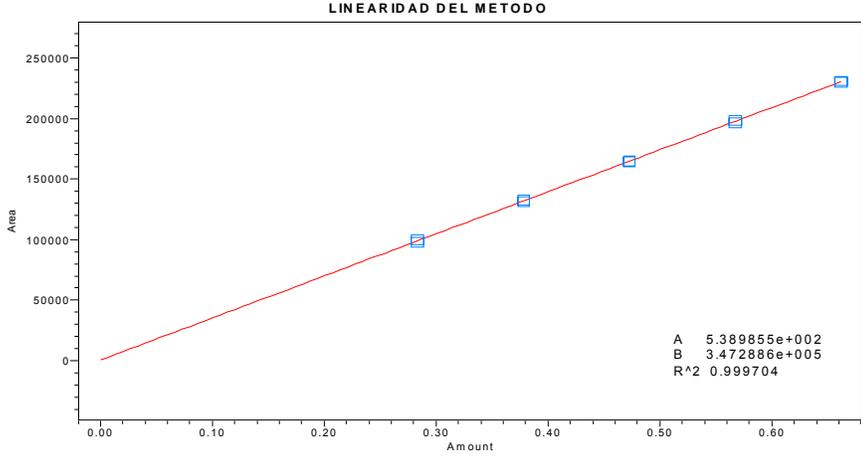
FIGURA 5

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC(Ultra Performance LC).**



**PROYECTO:** ACIDO ACETILSALICILICO TABLETAS SOLUBLES      **FECHA:** SEP/2005  
**ETAPA:** LINEALIDAD DEL METODO  
**ANALISTA:** Q.F.B. MIGUEL ANGEL AVILA      **PROTOCOLO** No ZER-02  
**REVISOR:** Q.F.B. HEBERT MARTINEZ GONZALEZ

Pag 2/4



**Estadística**

$\Sigma x = 5.0157$	Desviación estándar de regresión
$\Sigma y = 5902716.0000$	$S_{y/x} = 13242.0421$
$\Sigma x^2 = 2.8353$	Desviación estándar de la pendiente
$\Sigma y^2 = 3918183655664.0000$	$S_m = 23424.0063$
$\Sigma xy = 3332446.7979$	Valor de t de tablas
$n = 10$	$t_{0.975, n-2} = 2.228$
$m = 1163421.3574$	
$b = 6732.6744$	

Intervalo de confianza para la pendiente  
 $IC(m) = 1163421.3574 \pm 2.228 \times 23424.0063$

FIGURA 6

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC(Ultra Performance LC).**

	<b>PROYECTO:</b> ACIDO ACETILSALICILICO TABLETAS <b>ETAPA:</b> PRECISIÓN DEL METODO <b>ANALISTA:</b> Q.F.B. MIGUEL ANGEL AVILA <b>REVISÓ:</b> Q.F.B. HEBERT MARTINEZ GONZALEZ	<b>FECHA:</b> SEP/05  <b>PROTOCOLO</b> No ZER-02							
Pag 1/2									
PESO DEL STOCK S= 315.0 mg  DILUCIONES PM(mg) → 100 4 ← 25	ESTÁNDAR: ACIDO ACETIL SALICILICO LOTE: O4O8411 VALORACIÓN: 100.16% FACTOR: 1.0016								
$\text{Conc. (mg/mL)} = \frac{\text{Peso Std}}{\text{Dilución}} \times \frac{\text{Alicuota}}{\text{Dilución}} \times \text{Factor}$ <p><b>FÓRMULA</b></p> $\text{Conc (mg/mL)} = \frac{315.0}{100} \times \frac{4}{25} \times 1.0016$									
<b>CONCENTRACIÓN: 0.5048 mg/mL</b>									
<table border="1" style="margin: auto; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="padding: 2px;">RESPUESTA (AU)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td style="padding: 2px;">591802</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">589717</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">588600</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">587093</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">590151</td></tr> <tr><td style="padding: 2px;">588428</td></tr> </tbody> </table>			RESPUESTA (AU)	591802	589717	588600	587093	590151	588428
RESPUESTA (AU)									
591802									
589717									
588600									
587093									
590151									
588428									
<b>X = 589299</b>									
<table style="margin: auto;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Criterio de aceptación</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Resultado</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">CV ≤ 1.5%</td> <td style="padding: 2px;">0.28%</td> </tr> </tbody> </table>			Criterio de aceptación	Resultado	CV ≤ 1.5%	0.28%			
Criterio de aceptación	Resultado								
CV ≤ 1.5%	0.28%								

FIGURA 7

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC(Ultra Performance LC).**

---

---



PROYECTO: ACIDO ACETILSALICILICO TABLETAS SOLUBLES    FECHA: SEP/2005  
ETAPA:    ESPECIFICIDAD  
ANALISTA: Q.F.B MIGUEL ANGEL AVILA    PROTOCOLO No ZER-02  
REVISÓ: Q.F.B HEBERT MARTINEZ GONZALEZ

Pag 1/1

De acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba de Especificidad, no existen interferencias entre las señales obtenidas del blanco con relación a los picos de interés tanto en estándares como en la muestra.

El resultado de la prueba es satisfactoria.

# Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC(Ultra Performance LC).

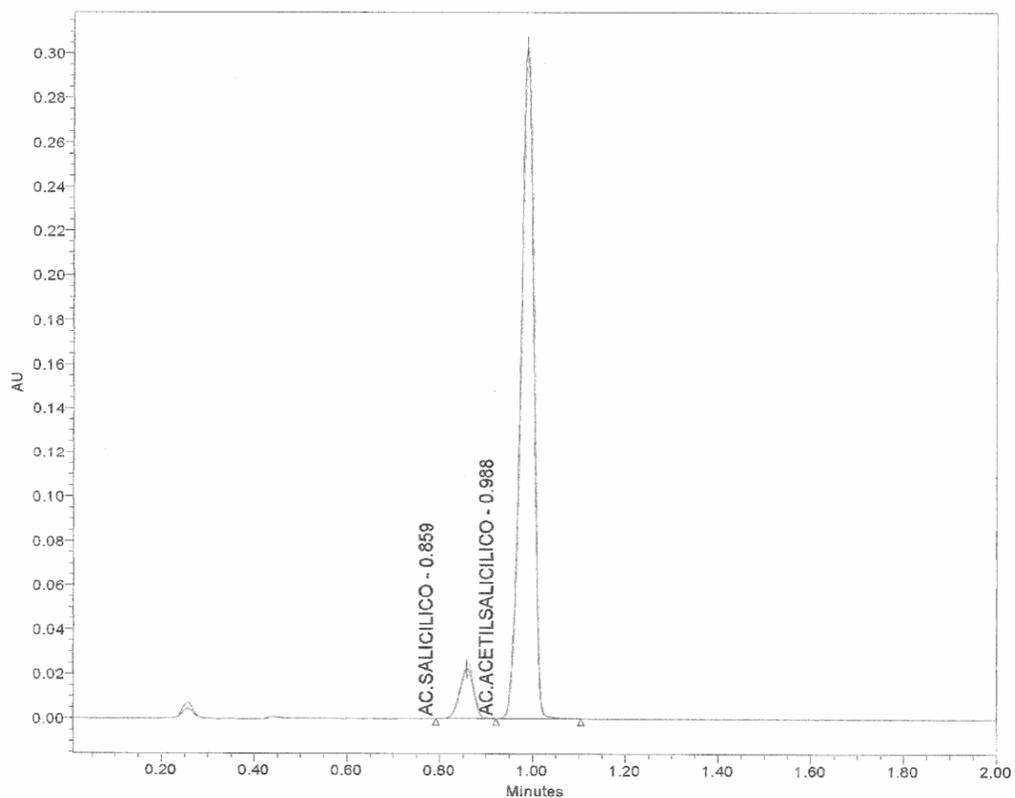


## Overlay Report

System

Project Name: AAS\_Salicilico

### ESPECIFICIDAD BLANCO V.S MUESTRAS



—	Date Acquired: 01/09/2005 02:44:45 p.m.;	Vial: 2:D,2;	Inj #: 2;	Channel: PDA 245.0 nm
—	Date Acquired: 01/09/2005 02:47:35 p.m.;	Vial: 2:D,3;	Inj #: 1;	Channel: PDA 245.0 nm
—	Date Acquired: 01/09/2005 02:53:16 p.m.;	Vial: 2:D,4;	Inj #: 1;	Channel: PDA 245.0 nm
—	Date Acquired: 01/09/2005 03:01:44 p.m.;	Vial: 2:D,5;	Inj #: 2;	Channel: PDA 245.0 nm
—	Date Acquired: 01/09/2005 03:07:24 p.m.;	Vial: 2:D,6;	Inj #: 2;	Channel: PDA 245.0 nm
—	Date Acquired: 01/09/2005 03:13:04 p.m.;	Vial: 2:D,7;	Inj #: 2;	Channel: PDA 245.0 nm
—	Date Acquired: 01/09/2005 04:23:54 p.m.;	Vial: 2:E,7;	Inj #: 1;	Channel: PDA 245.0 nm
—	Date Acquired: 01/09/2005 04:26:43 p.m.;	Vial: 2:E,7;	Inj #: 2;	Channel: PDA 245.0 nm
—	Date Acquired: 01/09/2005 04:29:32 p.m.;	Vial: 2:E,7;	Inj #: 3;	Channel: PDA 245.0 nm

Report Method: Overlay Report

Printed 03:01:52 p.n 21/09/2005

Page: 1 of 2

FIGURA 8

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC(Ultra Performance LC).**



**PROYECTO ACIDO ACETIL SALICILICO TABLETAS SOLUBLES**  
**ETAPA: LINEALIDAD DEL METODO**  
**ANALISTA: Q.F.B MIGUEL ANGEL AVILA**  
**REVISÓ: Q.F.B HEBERT MARTINEZ GONZALEZ**

**FECHA: SEP/2005**  
**PROTOCOLO No ZER-02**

Pag 1/2

PESO DEL STOCK  
 S= 315.0 mg

ESTÁNDAR: ACIDO ACETIL SALICILICO  
 LOTE: O408411  
 VALORACIÓN: 100.16%  
 FACTOR: 1.0016



$$\text{Conc. (mg/mL)} = \frac{\text{Peso Std} \times \text{Alicuota}}{\text{Diluición}} \times \text{Factor}$$

**FÓRMULA**

$$\text{Conc (mg/mL)} = \frac{315.0}{100} \times \frac{4}{25} \times 1.0016$$

$$\% \text{ de Recobro} = \frac{\text{Recuperado}}{\text{Adicionado}} \times 100$$

**AL 75%**

MUESTRA	CANTIDAD ADICIONADA(AU)	CANTIDAD RECUPERADA(AU)	% DE RECOBRO
1	590599	444843	75.32
2	590599	442864	74.98
3	590599	441419	74.74

CV ≤ 2.0%

0.38

**AL 100%**

MUESTRA	CANTIDAD ADICIONADA(AU)	CANTIDAD RECUPERADA(AU)	% DE RECOBRO
1	590599	591070	100.1
2	590599	590866	100.04
3	590599	589861	99.87

CV ≤ 2.0%

0.10

**AL 125%**

MUESTRA	CANTIDAD ADICIONADA(AU)	CANTIDAD RECUPERADA(AU)	% DE RECOBRO
1	590599	735500	124.5
2	590599	743631	125.91
3	590599	744660	126.08

CV ≤ 2.0%

0.69

FIGURA 9

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC(Ultra Performance LC).**

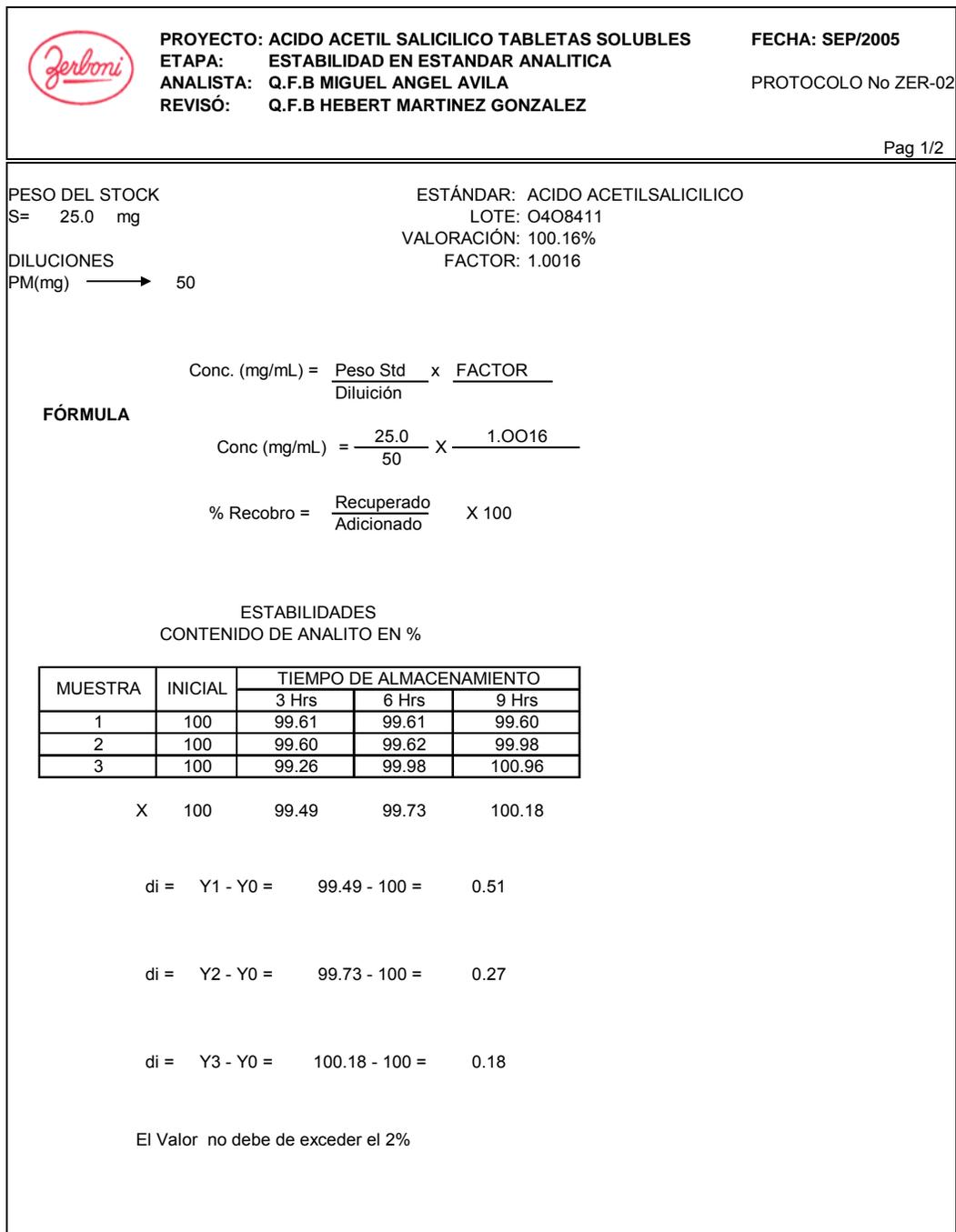


FIGURA 10

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC(Ultra Performance LC).**

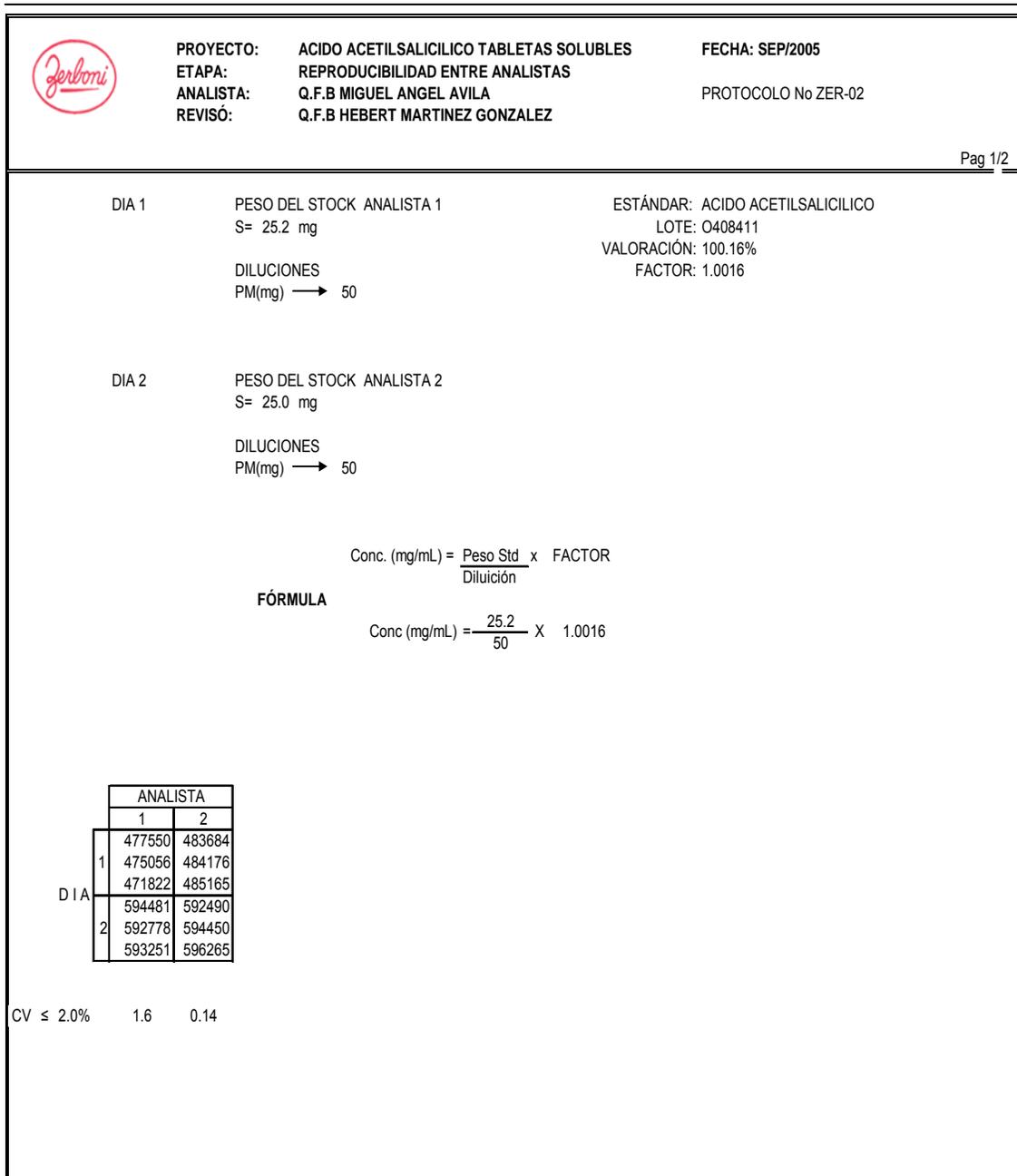


FIGURA 11

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC(Ultra Performance LC).**

	<b>PROYECTO:</b> ACIDO ACETIL SALICILICO <b>ETAPA:</b> ROBUSTES <b>ANALISTA:</b> QFB.MIGUEL ANGEL AVILA ESPINOSA <b>REVISÓ:</b> QFB.HEBERT MARTINEZ G	<b>FECHA:</b> SEP/2005  <b>PROTOCOLO</b> No ZER-02			
<p>PESO DEL STOCK ESTÁNDAR: ACIDO ACETILSALICILICO                  S= 25.0 mg LOTE: O408411                  VALORACIÓN: 100.16%                  DILUCIONES FACTOR: 1.0016                  PM(mg) → 50</p>					
<p><b>FÓRMULA</b></p> $\text{Conc. (mg/mL)} = \frac{\text{Peso Std}}{\text{Dilución}} \times \text{Factor}$ $\text{Conc (mg/mL)} = \frac{25}{50} \times 100.16$ $\% \text{ Recobro} = \frac{\text{Recuperado}}{\text{Adicionado}} \times 100$					
CONDICION					
MUESTRA	FM.20:80,λ=245+/- 5nm,T=30°C,pH=3.4	FM.20:80,λ=245,T=30° C+/-5°C,pH=3.4	FM.20:80+/- 5%,λ=245nm,T=30° C,pH=3.4	FM.20:80,λ=245nm,T =30°C,pH=3.45+/- 0.05%	FM.20:80,λ=245nm,T=30° C,pH=3.4
	240nm 250nm	25°C 35°C	15:85 25:75	3.4 3.45	TUV PDA
1	99.84 99.84	100.87 99.95	99.72 99.89	99.84 99.43	99.58 99.87
2	100.12 100.12	100.56 100.01	99.99 99.90	99.57 100.35	98.66 100.33
3	99.79 99.79	100.02 99.97	100.02 100.20	99.99 99.77	98.80 100.38
Media	99.91 99.91				99.41% 100.19%
Media general		100.48 99.976	99.91 99.99	99.80 99.85	99.80%
C.V Individual					0.98% 0.19%
C.V / General	0.09 0.09	0.48 0.09	0.09 0.003	0.197 0.15	0.55%

Nota: FM = Fase Movil (20:80 Acetonitrilo:Heptansulfonato de sodio 10mM pH 3.4, λ = Longitud de onda , T = Temperatura de Columna  
El C.V no debe de exceder el 2%

FIGURA 12

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC(Ultra Performance LC).**

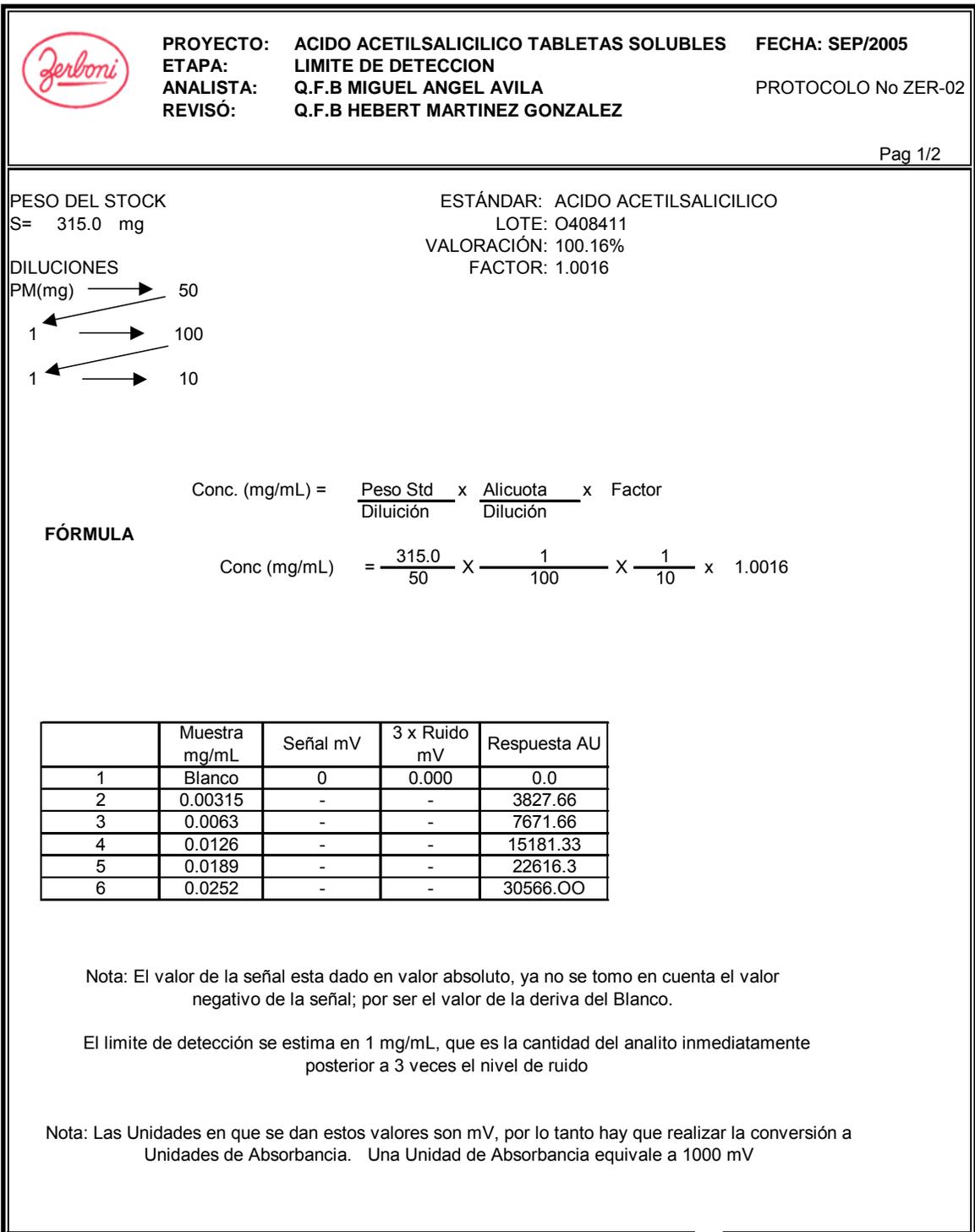


FIGURA 13

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC(Ultra Performance LC).**



**PROYECTO:** ACIDO ACETILSALICILICO TABLETAS SOLUBLES  
**ETAPA:** LIMITE DE CUANTIFICACION  
**ANALISTA:** Q.F.B MIGUEL ANGEL AVILA  
**REVISÓ:** Q.F.B HEBERT MARTINEZ GONZALEZ

**FECHA:** SEP/2005  
**PROCOLO** No ZER-02

Pag 1/2

**PESO DEL STOCK**  
 S= 315.0 mg

**ESTÁNDAR:** ACIDO ACETILSALICILICO  
 LOTE: O408411  
 VALORACIÓN: 100.16%  
 FACTOR: 1.0016

**DILUCIONES**  
 PM(mg) → 50  
 ← 1 → 100  
 ← 1 → 10

$$\text{Conc. (mg/mL)} = \frac{\text{Peso Std}}{\text{Dilución}} \times \frac{\text{Alicuota}}{\text{Dilución}} \times \text{Factor}$$

**FÓRMULA**

$$\text{Conc (mg/mL)} = \frac{315.0}{50} \times \frac{1}{100} \times \frac{1}{10} \times 1.0016$$

	Muestra mg/mL	Señal mV	10 x Ruido mV	Respuesta AU
1	Blanco	0	0.000	0.0
2	0.0031	-	-	3827.66
3	0.0063	-	-	7671.66
4	0.0126	-	-	15181.33
5	0.0189	-	-	22616.3
6	0.0252	-	-	30566.00

Nota: El valor de la señal esta dado en valor absoluto, ya no se tomo en cuenta el valor negativo de la señal; por ser el valor de la deriva del Blanco.

El limite de Cuantificación se estima en 2 mg/mL, que es la cantidad del analito inmediatamente posterior a 10 veces el nivel de ruido

Nota: Las Unidades en que se dan estos valores son mV, por lo tanto hay que realizar la conversión a Unidades de Absorbancia. Una Unidad de Absorbancia equivale a 1000 mV

FIGURA 14

Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC(Ultra Performance LC).



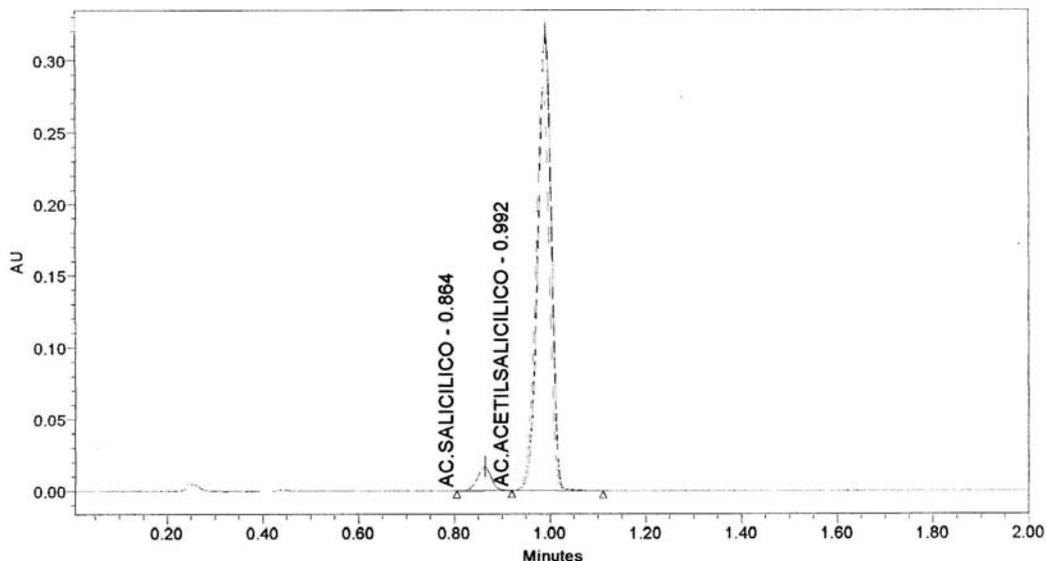
Overlay Report

System

Project Name: AAS\_Salicilico

STD AAS 25.2mg 100.16% Pureza  
 STD AS 25.2mg 99.71% Pureza

TEMPERATURA AMBIENTE 3 HORAS



- Date Acquired: 06/09/2005 09:43:48 a.m.; Vial: 2:A,1; Inj #: 1; Channel: PDA 245.0 nm
- Date Acquired: 06/09/2005 09:46:39 a.m.; Vial: 2:A,1; Inj #: 2; Channel: PDA 245.0 nm
- Date Acquired: 06/09/2005 09:49:28 a.m.; Vial: 2:A,1; Inj #: 3; Channel: PDA 245.0 nm
- Date Acquired: 06/09/2005 09:52:18 a.m.; Vial: 2:A,1; Inj #: 4; Channel: PDA 245.0 nm
- Date Acquired: 06/09/2005 09:55:08 a.m.; Vial: 2:A,1; Inj #: 5; Channel: PDA 245.0 nm
- Date Acquired: 06/09/2005 09:57:57 a.m.; Vial: 2:A,1; Inj #: 6; Channel: PDA 245.0 nm
- Date Acquired: 06/09/2005 10:34:52 a.m.; Vial: 2:A,8; Inj #: 1; Channel: PDA 245.0 nm
- Date Acquired: 06/09/2005 10:37:43 a.m.; Vial: 2:A,8; Inj #: 2; Channel: PDA 245.0 nm
- Date Acquired: 06/09/2005 10:40:31 a.m.; Vial: 2:A,8; Inj #: 3; Channel: PDA 245.0 nm

Peak Results

Label: 2

	Name	RT	Area	USP Plate Count	USP Tailing	Vial	SampleName	Label
1	AC.SALICILICO	0.851	6531	4.134622e+003	1.101512e+000	2:A,8	TEMPAMB3HRS	2
2	AC.SALICILICO	0.852	6587	4.098771e+003	1.118626e+000	2:A,8	TEMPAMB3HRS	2
3	AC.SALICILICO	0.852	6592	4.069255e+003	1.107888e+000	2:A,8	TEMPAMB3HRS	2
Mean			6569.9	4.1e+003	1.1e+000			
Std. Dev.			34.0	3.3e+001	8.6e-003			
% RSD			0.5	8.0e-001	7.8e-001			

Report Method: Overlay Report

Printed 10:53:54 a.m 06/09/2005

Page: 1 of 2

FIGURA 15

Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC(Ultra Performance LC).



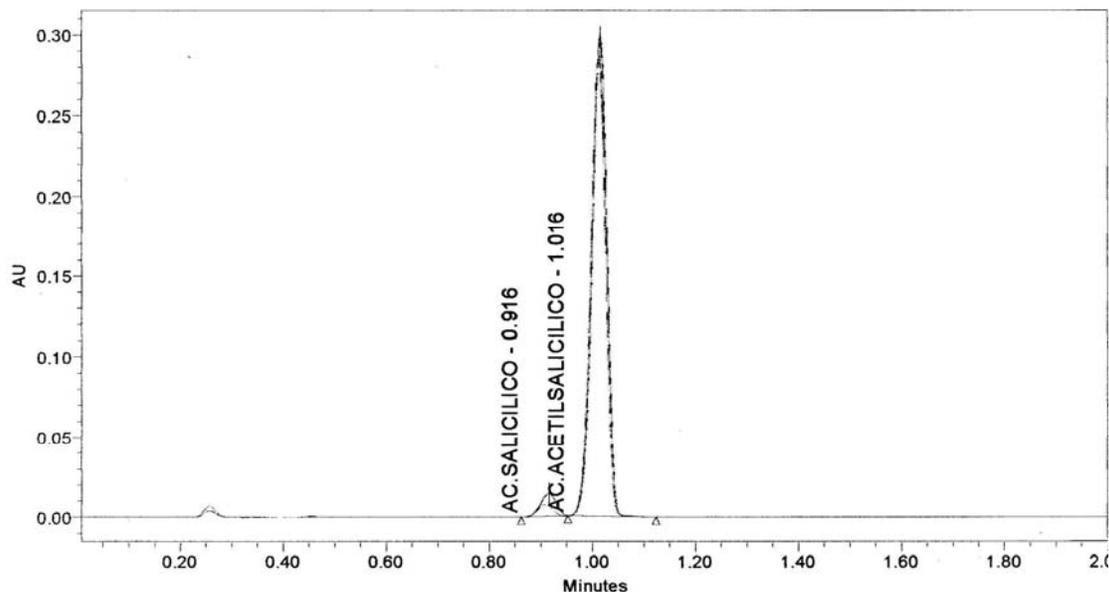
Overlay Report

System

Project Name: AAS\_Salicilico

STD 225 25.0 - 100.16% Purita  
AS 25.0 - 99.71%

TEMPERATURA AMBIENTE/ 24 HORAS



- Date Acquired: 07/09/2005 11:08:44 a.m.; Vial: 2:A,1; Inj #: 1; Channel: PDA 245.0 nm
- Date Acquired: 07/09/2005 11:11:34 a.m.; Vial: 2:A,1; Inj #: 2; Channel: PDA 245.0 nm
- Date Acquired: 07/09/2005 11:14:24 a.m.; Vial: 2:A,1; Inj #: 3; Channel: PDA 245.0 nm
- Date Acquired: 07/09/2005 11:17:14 a.m.; Vial: 2:A,1; Inj #: 4; Channel: PDA 245.0 nm
- Date Acquired: 07/09/2005 11:20:04 a.m.; Vial: 2:A,1; Inj #: 5; Channel: PDA 245.0 nm
- Date Acquired: 07/09/2005 11:22:55 a.m.; Vial: 2:A,1; Inj #: 6; Channel: PDA 245.0 nm
- Date Acquired: 07/09/2005 11:25:45 a.m.; Vial: 2:A,2; Inj #: 1; Channel: PDA 245.0 nm
- Date Acquired: 07/09/2005 11:28:34 a.m.; Vial: 2:A,2; Inj #: 2; Channel: PDA 245.0 nm
- Date Acquired: 07/09/2005 11:31:23 a.m.; Vial: 2:A,2; Inj #: 3; Channel: PDA 245.0 nm

Peak Results  
Label: 2

	Name	RT	Area	USP Plate Count	USP Tailing	Vial	SampleName	Label
1	AC.SALICILICO	0.908	15502	4.155000e+003	9.705317e-001	2:A,2	TEMP AMB/24HRS	2
2	AC.SALICILICO	0.909	15693	4.162962e+003	9.735003e-001	2:A,2	TEMP AMB/24HRS	2
3	AC.SALICILICO	0.909	15606	4.151075e+003	9.713908e-001	2:A,2	TEMP AMB/24HRS	2
	Mean		15600.3	4.2e+003	9.7e-001			
	Std. Dev.		95.3	6.1e+000	1.5e-003			
	% RSD		0.6	1.5e-001	1.6e-001			

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC(Ultra Performance LC).**



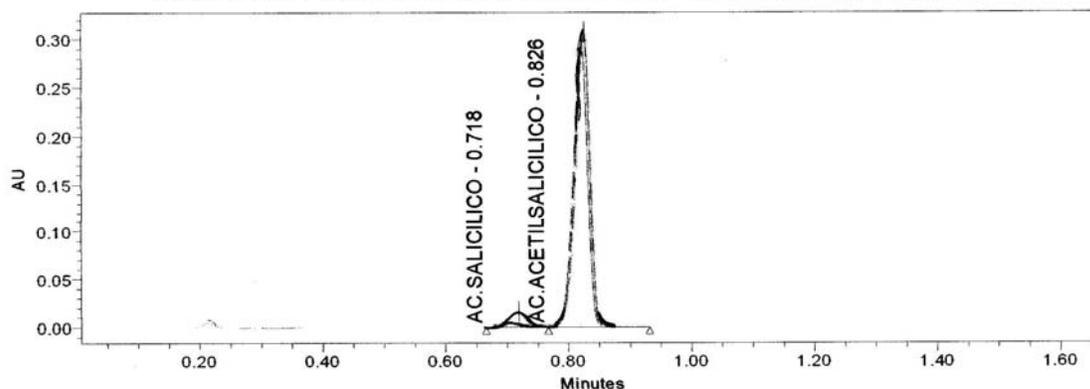
**Overlay Report**

System

Project Name: AAS\_Salicilico

STD and 25.1mg 100.16%

**ESTABILIDAD TEMPERATURA AMBIENTE EXPUESTO A LA LUZ Y AIRE.**



Date Acquired: 05/09/2005 10:10:49 a.m.; Vial: 2:A,1; Inj #: 1; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 10:13:41 a.m.; Vial: 2:A,1; Inj #: 1; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 10:16:33 a.m.; Vial: 2:A,1; Inj #: 2; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 10:19:22 a.m.; Vial: 2:A,1; Inj #: 3; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 10:22:12 a.m.; Vial: 2:A,1; Inj #: 4; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 10:25:02 a.m.; Vial: 2:A,1; Inj #: 5; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 10:27:51 a.m.; Vial: 2:A,1; Inj #: 6; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 11:55:44 a.m.; Vial: 2:B,6; Inj #: 1; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 11:58:33 a.m.; Vial: 2:B,6; Inj #: 2; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 12:01:22 p.m.; Vial: 2:B,6; Inj #: 3; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 12:04:13 p.m.; Vial: 2:B,7; Inj #: 1; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 12:07:03 p.m.; Vial: 2:B,7; Inj #: 2; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 12:09:52 p.m.; Vial: 2:B,7; Inj #: 3; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 12:12:43 p.m.; Vial: 2:B,8; Inj #: 1; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 12:15:34 p.m.; Vial: 2:B,8; Inj #: 2; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 12:18:22 p.m.; Vial: 2:B,8; Inj #: 3; Channel: PDA 245.0 nm

**Peak Results  
Label: 2**

Name	RT	Area	Height	USP Plate Count	USP Tailing	Vial	SampleName	Label
AC.SALICILICO	0.707	7229	4272	4.048832e+003	1.094106e+000	2:B,8	V3-ESTAB-TEMPAMB EXP LUZ/AIRE	2
AC.SALICILICO	0.708	7043	4141	4.046064e+003	1.109349e+000	2:B,7	V2-ESTAB-TEMPAMB EXP LUZ/AIRE	2
AC.SALICILICO	0.708	7112	4171	4.037372e+003	1.113035e+000	2:B,7	V2-ESTAB-TEMPAMB EXP LUZ/AIRE	2
AC.SALICILICO	0.708	7194	4244	4.064880e+003	1.104643e+000	2:B,8	V3-ESTAB-TEMPAMB EXP LUZ/AIRE	2
AC.SALICILICO	0.708	7268	4281	4.059176e+003	1.096595e+000	2:B,8	V3-ESTAB-TEMPAMB EXP LUZ/AIRE	2
AC.SALICILICO	0.708	6866	4015	4.049374e+003	1.104662e+000	2:B,6	V1-ESTAB-TEMPAMB EXP LUZ/AIRE	2

Report Method: Overlay Report

Printed 12:23:35 p.n 05/09/2005

Page: 1 of 3

FIGURA 17

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC(Ultra Performance LC).**

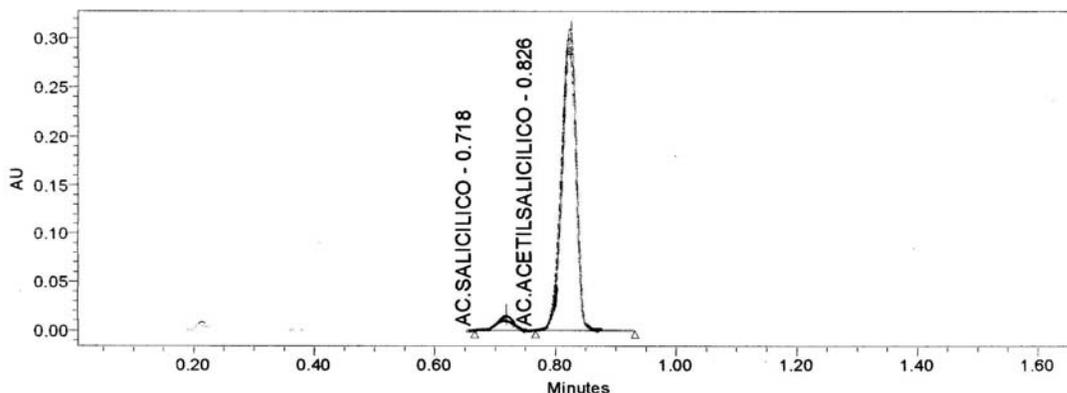


**Overlay Report**

REPRODUCIBILIDAD ENTRE ANALISTAS System

Project Name: AAS\_Salicilico

**ESTABILIDAD 45°C/65%H.R./PROTEGIDA DE LA LUZ**



Date Acquired: 05/09/2005 10:10:49 a.m.; Vial: 2:A,1; Inj #: 1; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 10:13:41 a.m.; Vial: 2:A,1; Inj #: 1; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 10:16:33 a.m.; Vial: 2:A,1; Inj #: 2; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 10:19:22 a.m.; Vial: 2:A,1; Inj #: 3; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 10:22:12 a.m.; Vial: 2:A,1; Inj #: 4; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 10:25:02 a.m.; Vial: 2:A,1; Inj #: 5; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 10:27:51 a.m.; Vial: 2:A,1; Inj #: 6; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 11:04:45 a.m.; Vial: 2:A,8; Inj #: 1; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 11:07:34 a.m.; Vial: 2:A,8; Inj #: 2; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 11:10:23 a.m.; Vial: 2:A,8; Inj #: 3; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 11:13:15 a.m.; Vial: 2:B,1; Inj #: 1; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 11:16:05 a.m.; Vial: 2:B,1; Inj #: 2; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 11:18:54 a.m.; Vial: 2:B,1; Inj #: 3; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 11:21:45 a.m.; Vial: 2:B,2; Inj #: 1; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 11:24:34 a.m.; Vial: 2:B,2; Inj #: 2; Channel: PDA 245.0 nm  
 Date Acquired: 05/09/2005 11:27:24 a.m.; Vial: 2:B,2; Inj #: 3; Channel: PDA 245.0 nm

**Peak Results**

**Label: 2**

Name	RT	Area	Height	USP Plate Count	USP Tailing	Vial	SampleName	Label
AC.SALICILICO	0.710	17888	10639	4.111264e+003	1.026124e+000	2:B,2	V3ESTAB-45°C/65%HR/PROTEG DE LUZ	2
AC.SALICILICO	0.710	18050	10740	4.120099e+003	1.028564e+000	2:B,2	V3ESTAB-45°C/65%HR/PROTEG DE LUZ	2
AC.SALICILICO	0.711	18715	11074	4.072396e+003	1.028126e+000	2:B,1	V2ESTAB-45°C/65%HR/PROTEG DE LUZ	2
AC.SALICILICO	0.711	18362	10952	4.124479e+003	1.023530e+000	2:A,8	V1ESTAB-45°C/65%HR/PROTEG DE LUZ	2
AC.SALICILICO	0.711	18964	11222	4.071970e+003	1.019927e+000	2:B,1	V2ESTAB-45°C/65%HR/PROTEG DE LUZ	2
AC.SALICILICO	0.711	18317	10932	4.148167e+003	1.026569e+000	2:A,8	V1ESTAB-45°C/65%HR/PROTEG DE LUZ	2

Report Method: Overlay Report

Printed 11:37:44 a.n 05/09/2005

Page: 1 of 3

FIGURA 18

Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC(Ultra Performance LC).

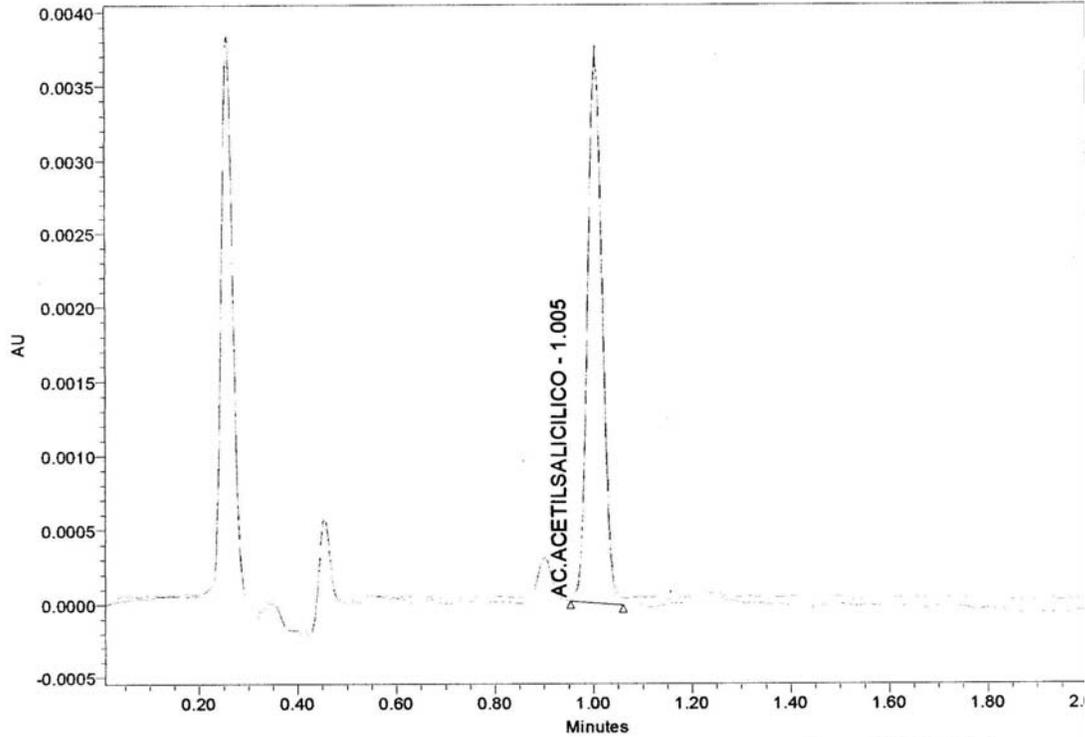


Overlay Report

System

Project Name: AAS\_Salicilico

LIMITE DE DETECCION Y CUANTIFICACION MUESTRA AL 1%



— Date Acquired: 08/09/2005 10:42:19 a.m.; Vial: 2:A,6; Inj #: 1; Channel: PDA 245.0 nm  
 - - - Date Acquired: 08/09/2005 10:45:16 a.m.; Vial: 2:A,6; Inj #: 2; Channel: PDA 245.0 nm  
 . . . Date Acquired: 08/09/2005 10:48:07 a.m.; Vial: 2:A,6; Inj #: 3; Channel: PDA 245.0 nm

**Peak Results**  
**Name: AC.SALICILICO**

	Name	RT	Area	USP Plate Count	USP Tailing	Vial	SampleName	Label
1	AC.SALICILICO	0.904				2:A,6	LIMITE CUANT-DETECCION 1%	6
2	AC.SALICILICO	0.904				2:A,6	LIMITE CUANT-DETECCION 1%	6
3	AC.SALICILICO	0.904				2:A,6	LIMITE CUANT-DETECCION 1%	6
	Mean							
	Std. Dev.							
	% RSD							

FIGURA 19

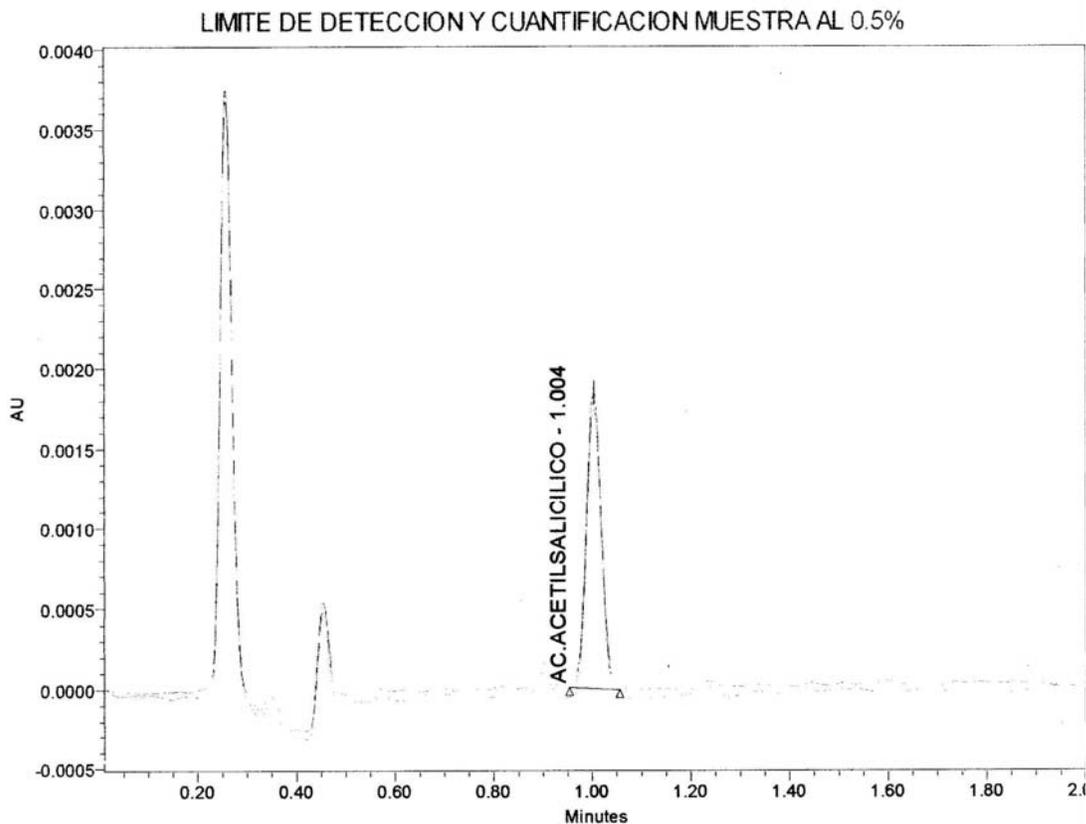
Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC(Ultra Performance LC).



Overlay Report

System

Project Name: AAS\_Salicilico



— Date Acquired: 08/09/2005 10:50:59 a.m.; Vial: 2:A,7; Inj #: 1; Channel: PDA 245.0 nm  
 - - - Date Acquired: 08/09/2005 10:53:50 a.m.; Vial: 2:A,7; Inj #: 2; Channel: PDA 245.0 nm  
 . . . Date Acquired: 08/09/2005 10:56:39 a.m.; Vial: 2:A,7; Inj #: 3; Channel: PDA 245.0 nm

**Peak Results**  
Name: AC.SALICILICO

	Name	RT	Area	USP Plate Count	USP Tailing	Vial	SampleName	Label
1	AC.SALICILICO	0.904				2:A,7	LIMITE CUANT-DETECCION 0.5%	7
2	AC.SALICILICO	0.904				2:A,7	LIMITE CUANT-DETECCION 0.5%	7
3	AC.SALICILICO	0.904				2:A,7	LIMITE CUANT-DETECCION 0.5%	7
Mean								
Std. Dev.								
% RSD								

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC(Ultra Performance LC).**

**CARTA DE VALIDACIÓN AAS TABLETAS SOLUBLES.**

FECHA PROBABLE DE INICIO	FECHA	PRUEBA	CANTIDAD DE MUESTRAS	TIEMPO DE ANALISIS (Hrs)	RESULTADO	ESPECIFICACION	CONCLUSION	OBSERVACIONES																				
23/AGOSTO/05	23/AGOSTO/05	INVESTIGACIÓN						Por carga de trabajo de Waters se cambio la fecha original del 23/ago/05 a 25/ago/05.																				
01/SEP/05		LINEALIDAD DEL SISTEMA	10	3	AAS $r^2=0.99987$ C.V=0.5%	$CV \leq 1.5\%$ , $r \geq 0.99$ , $r^2 \geq 0.98$	OK																					
01/SEP/05		PRECISION DEL SISTEMA	6	1	ACIDO ACETIL SALICILICO 0.4 %	$CV \leq 1.5\%$	OK																					
01/SEP/05		LINEALIDAD DEL METODO	15	4	ACIDO ACETIL SALICILICO $r^2=0.99677$ C.V= 2.0%	Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada $m=1$ , $b=0$ , $r^2 \geq 0.98$ PROMEDIO DE RECOBRO 98-102% $CV \leq 2\%$	OK																					
01/SEP/05		EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%	6	1	C.V= 0.28%	PROMEDIO DE RECOBRO 98-102% $CV \leq 2\%$	OK																					
01/SEP/05 02/SEP/05		REPRODUCIBILIDAD ENTRE ANALISTAS	12 DIA 1 12 DIA 2	3 3	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">ANALISTA 1</th> <th colspan="2">ANALISTA 2</th> </tr> <tr> <th>DIA 1</th> <th>DIA 2</th> <th>DIA 1</th> <th>DIA 2</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>AAS</td> <td>AAS</td> <td>AAS</td> <td>AAS</td> </tr> <tr> <td>95.02%</td> <td>96.75 %</td> <td>97.22%</td> <td>97.16 %</td> </tr> <tr> <td>CV=0.62%</td> <td>CV=0.28%</td> <td>CV=0.28%</td> <td>CV=0.87%</td> </tr> </tbody> </table>	ANALISTA 1		ANALISTA 2		DIA 1	DIA 2	DIA 1	DIA 2	AAS	AAS	AAS	AAS	95.02%	96.75 %	97.22%	97.16 %	CV=0.62%	CV=0.28%	CV=0.28%	CV=0.87%	90.0%-110.0% $CV \leq 2\%$	1° DIA ANALISTA 1 2° DIA ANALISTA 1  1° DIA ANALISTA 2 2° DIA ANALISTA 2	
ANALISTA 1		ANALISTA 2																										
DIA 1	DIA 2	DIA 1	DIA 2																									
AAS	AAS	AAS	AAS																									
95.02%	96.75 %	97.22%	97.16 %																									
CV=0.62%	CV=0.28%	CV=0.28%	CV=0.87%																									
05/SEPT/05		ESPECIFICIDAD DEL METODO	12	3	<table border="1"> <tbody> <tr> <td>45°C,85% H.R</td> <td>OK</td> </tr> <tr> <td>30°C</td> <td>OK</td> </tr> <tr> <td>TEMPERATURA AMBIENTE EXPUESTA A LA LUZ Y AL AIRE</td> <td>OK</td> </tr> </tbody> </table>	45°C,85% H.R	OK	30°C	OK	TEMPERATURA AMBIENTE EXPUESTA A LA LUZ Y AL AIRE	OK	Verificar que los productos de degradación y/o sustancias relacionadas no interfieran con la cuantificación de la sustancia de interés utilizando el método desarrollado.	Los productos de degradación <u>si</u> ó <u>no</u> interfieren en la cuantificación de la sustancia de interés.															
45°C,85% H.R	OK																											
30°C	OK																											
TEMPERATURA AMBIENTE EXPUESTA A LA LUZ Y AL AIRE	OK																											
06/SEPT/2005		ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA	72	5	<table border="1"> <tbody> <tr> <td>TEMP AMBIENTE 3.6,9,24HRS</td> <td>0.51%</td> </tr> <tr> <td>TEMP AMBIENTE PROT DE LA LUZ 3.6,9,24HRS</td> <td>0.27%</td> </tr> <tr> <td>REFRIGERACION 3.6,9,24HRS</td> <td>0.18%</td> </tr> <tr> <td>REFRIGERACION PROT DE LA LUZ 3.6,9,24HRS</td> <td>0.15%</td> </tr> </tbody> </table>	TEMP AMBIENTE 3.6,9,24HRS	0.51%	TEMP AMBIENTE PROT DE LA LUZ 3.6,9,24HRS	0.27%	REFRIGERACION 3.6,9,24HRS	0.18%	REFRIGERACION PROT DE LA LUZ 3.6,9,24HRS	0.15%	La muestra es estable si el intervalo de confianza para la diferencia de la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o magnitud del efecto no exceda $\pm 2\%$														
TEMP AMBIENTE 3.6,9,24HRS	0.51%																											
TEMP AMBIENTE PROT DE LA LUZ 3.6,9,24HRS	0.27%																											
REFRIGERACION 3.6,9,24HRS	0.18%																											
REFRIGERACION PROT DE LA LUZ 3.6,9,24HRS	0.15%																											
07/SEPT/2005		ROBUSTEZ	102	7	<table border="1"> <tbody> <tr> <td>Fase movil (20:80) acetonitrilo:heptanolsulfonato pH=3.4, longitud de onda <b>245nm±5nm</b></td> <td>C.V= 0.09 %</td> </tr> </tbody> </table>	Fase movil (20:80) acetonitrilo:heptanolsulfonato pH=3.4, longitud de onda <b>245nm±5nm</b>	C.V= 0.09 %	$CV \leq 2\%$	OK																			
Fase movil (20:80) acetonitrilo:heptanolsulfonato pH=3.4, longitud de onda <b>245nm±5nm</b>	C.V= 0.09 %																											

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC(Ultra Performance LC).**

					Fase móvil (20:80) acetonitrilo:heptanolsulfonato pH=3.4, longitud de onda 245nm, temperatura <u>30.0°C±5°C</u>	C.V.= 0.40 %			
					<u>Fase móvil (20:80) ±5%, [(15:85)y(25:75)]</u> acetonitrilo:heptanolsulfonato pH=3.4, longitud de onda 245nm, 30.0°C.	C.V.=0.05 %			
					EQUIPO 1 <u>PDA 2996</u>	C.V.= 0.19%			
					EQUIPO 2 <u>TUV</u>	C.V.= 0.98%			
08/SEPT/2005		LIMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	30	6	L. DE DETECCIÓN	1.0 %	$r^2 \geq 0.98$	OK	
					L. DE CUANTIFICACIÓN	1.0 %	$r^2 \geq 0.98$	OK	

**(Figura 21)**

**QFB .MIGUEL ANGEL AVILA ESPINOSA**

## **ANALISIS DE RESULTADOS**

En el presente trabajo después de haber tenido una previa investigación de la información así como las posibles condiciones de análisis y posterior desarrollo de la misma, se procedió a hacer ensayos y así obtener una técnica analítica haciendo la transferencia de CLAR a UPLC., como es cambio de columnas, fases móviles, pH, volúmenes de inyección, etc. Se recolectaron y procesaron los datos de la validación del ácido acetilsalicílico tabletas solubles haciendo uso de una hoja de cálculo en Excel .

En ellos se observa que en la adecuabilidad del sistema se obtiene un coeficiente de variación (C.V) de 0.4 % debajo del límite de 2.0%, y sin este dato no se podía empezar a validar, debido a que este dato es muy crítico durante una validación ya que refleja que tan reproducibles son las determinaciones seguidas de estándar secundario de ácido acetilsalicílico en el equipo, por ello se recomienda por lo menos realizar de 20 a 40 inyecciones de estándar y ver el C.V . FIG 3

Una vez ya obtenido, se procedió a obtener la linealidad del sistema, preparando una curva con 5 concentraciones distintas (50,75,100,126,151 %) obteniendo así la respuesta al integrar el área bajo la curva de las muestras y al tratar estos datos en una hoja de calculo se obtuvo una grafica con una  $r^2=0.999891.$ , optima para seguir la validación. FIG 1,2

La siguiente etapa fue la linealidad del método, en esta se procedió a preparar 5 placebos cargados, es decir, placebo con concentraciones conocidas del principio activo, las concentraciones planteadas fueron (50,75,100,125,150 %) y al obtener las respuestas a estas concentraciones y tratar los datos en una hoja de cálculo, se

## **Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

obtuvo una grafica de los datos con una  $r^2 = 1.87\%$  teniendo un límite de 2.0% y una repetibilidad de 0.28% con un limite de 1.5%. FIG 5,6,9

En los resultados de especificidad se pudo observar que al analizar un estándar y una muestra contra un placebo(excipientes sin principio activo) y un blanco (solo fase móvil) , no se encontraron interferencias entre estos, que no permitiera la cuantificación del principio activo, ni degradación de algún excipiente., por lo que la prueba resulto satisfactoria. FIG 8

La reproducibilidad entre 2 analistas en 2 días distintos resulto satisfactoria al obtener un coeficiente de variación de 1.6% en el día uno y de 0.14% en el día dos., con esto se comprueba que la metodología es confiable entre analistas en distintos días., permitiendo así a cualquier analista llevar a cabo el análisis sin inconvenientes. FIG 11

Para la estabilidad de la muestra se realizaron inyecciones a las siguientes horas de almacenamiento., 3, 6, y 9 hrs, dando coeficientes de variación de 0.51%, 0.27% y 0.18% con un limite de 2.0%., esto nos indica que la muestra se empieza a degradar hasta pasadas las 24 horas FIG15,16,17,18 y no en el día de la preparación, esto por tener una solución diluyente de ácido cítrico:acetonitrilo (97:3) que evito que se degradara la muestra durante el análisis, permitiendo analizar varios lotes a la vez sin importar la manipulación de la muestra ni su degradación. FIG 10

La robustez del análisis nos demostró que al variar +/- 5% ó +/- nanómetros, en las condiciones establecidas, es decir, pH , Temperatura, Fase móvil, Longitud de onda y entre equipos PDA y TUV., en cualquiera de los casos el coeficiente de variación no rebaso el 2.0% por lo que se considera una metodología confiable, y con un amplio rango de variación de las condiciones iniciales , permitiendo así según sea el caso y las circunstancias, realizar el análisis siendo confiable este. FIG 1

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

En el límite de detección y cuantificación de la muestra la idea original es determinar la mínima concentración detectable y cuantificable de principio activo (ácido acetilsalicílico), para lo cual se realizó un acercamiento en la línea base del cromatograma obtenido para cuantificar el ruido obtenido en esta, y se observó que la línea base no tuvo ruido por lo que se consideró un valor de cero. FIG 13,14,19,20

## **CONCLUSIONES**

El resultado de trabajo se consolida con las siguientes conclusiones:

1. La validación del método analítico por UPLC para la cuantificación de ácido acetilsalicílico resulto un éxito al tener un método lineal, recobros óptimos, buena adecuabilidad, estabilidad de la muestra de hasta 24 horas al usar un amortiguador para evitar la degradación del ácido acetilsalicílico a ácido salicílico, determinando así mismo el ácido salicílico libre, al usar un estándar de ácido salicílico de concentración conocida según Farmacopea 0.3%, al comparar los cromatogramas de muestra y estándar.
2. Un método robusto al poder variar condiciones iniciales de análisis de hasta un +/- 5% y +/- 5 nanometros y además poder determinar hasta un 1.0% de concentración de la muestra sin tener lugar a errores de determinación.
3. La resolución, número de platos teóricos, coleo y simetría de los picos obtenidos en los cromatogramas en el UPLC del ácido acetilsalicílico, son óptimos comparados con los obtenidos en CLAR.
4. Los tiempos de análisis del ácido acetilsalicílico en UPLC comparados con los obtenidos en CLAR, son mas cortos generando así, resultados en menos tiempo siendo competitivo y productivo a la vez, menos residuos de análisis (disolventes), contribuyendo con la ecología y el medio ambiente.
5. La toxicidad del análisis usando UPLC es nula al ocupar el mínimo de orgánicos (acetonitrilo) y una mayor proporción de agua para disolver sales (heptansulfonato sodico) en la preparación de fase móvil.

## SIMBOLOS Y ABREVIATURAS.

UPLC	Ultra Performance Liquid Cromatography Cromatografía de Líquidos de <i>Ultra Resolución</i>
CLAR	Cromatografía de Líquidos de <i>Alta Resolución</i>
PDA	Detector de Arreglo de Diodos
TUV	Detector ultravioleta
□cetyl manager	Muestreador
Binary Solvent manager	Bomba binaria
$\alpha$	Factor de separación
C.V	Coficiente de variación
$C.V_{y/x}$	Coficiente de variación de regresión
$F_{0.975,gl}$	Valor de la distribución F de Fisher asociado a una confianza del 97.5% y a grados de libertad (gl) establecidos
$F_{0.05,gl}$	Valor de la distribución F de Fisher asociado a una confianza del 5% y a grados de libertad (gl) establecidos
$F_{0.025,gl}$	Valor de la distribución F de Fisher asociado a una confianza del 2.5% y a grados de libertad (gl) establecidos
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
g	Gramos
gl	Grados de libertad
$IC(\beta_1)$	Intervalo de confianza para la pendiente poblacional
$IC(\beta_{11}-\beta_{12})$	Intervalo de confianza para la diferencia de 2 pendientes Poblacionales.
$IC(\beta_0)$	Intervalo de confianza para la ordenada al origen Poblacional
$IC(\beta_{01}-\beta_{02})$	Intervalo de confianza para la diferencia de 2 ordenadas al

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

	origen poblacionales.
IC( $\mu$ )	Intervalo de confianza para la media poblacional
IC( $\mu_1-\mu_2$ )	Intervalo de confianza para la diferencia de 2 medias Poblacionales
ACN	Acetonitrilo
F.M	Fase móvil
CLAE-EM	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplado a espectrometría de masas
CLAE-DF	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia con Detector de Fluorescencia
CG-EM	Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas
CG-EM-tándem	Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de masas en tándem
CLAE-EM	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia Acoplado a Espectrometría de Masas
CLAE-EM-tándem	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia Acoplado a Espectrometría de masas en tándem
Cromatograma	Es un gráfico u otra representación de la respuesta del detector, concentración del efluente u otra cantidad usada como una medida de la concentración del efluente, versus el volumen del efluente o <i>tiempo</i>
Espectros de masas	Gráfico que muestra la abundancia relativa de los iones producidos en el eje de las ordenadas, mientras que en el eje de las abscisas se expresa la relación $m/z$ , $m$ en unidades atómicas de masa, dividida por el número de cargas que lleva el ión $z$ , que llegan al detector en un espectrómetro de masa
Fármaco	Sustancia química empleado en el tratamiento o prevención de enfermedades
Metabolismo	Conjunto de reacciones químicas que tienen lugar dentro de las células de los organismos vivos, las cuales transforman energía, conservan su identidad y se reproducen

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

Orina	Líquido excretado por los riñones a través de las vías urinarias, con el cual se eliminan sustancias innecesarias para el organismo. Desempeña un papel importante en la regulación del balance de líquidos y electrolitos y del equilibrio entre ácidos y bases. En las personas sanas es clara y de color ambarino con un pH de 5 a 8. La cantidad de orina producida diariamente es de 1 a 1,5 litros, valor que aumenta si se ingieren muchos líquidos y disminuye en caso de sudoración intensa
OMS	Organización Mundial de la Salud
$t_r$	Tiempo de retención
$t_o$	Tiempo muerto
$t'_r$	Tiempo de retención ajustado
$u$	Velocidad lineal
$W_b$	Ancho a la base
$W_{1/2}$	Ancho a la mitad de la altura
$N$	Número de platos teóricos
$K$	Constante de distribución, razón de distribución o coeficiente de distribución
$k'$	Factor de capacidad
$\alpha$	Factor de selectividad
$R$	Resolución
$S$	Simetría
$T$	Coleo
$V.I$	Volumen de inyección
$\lambda$	Longitud de onda
$T$	Temperatura
ppm	Partes por millón
$r^2$	Coficiente de determinación
$R_r$	Retención relativa
$S$	Desviación estándar
$S_b$	Desviación estándar de los blancos

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

$S_{bo}$	Desviación estándar de la ordenada al origen
$S_{bo\ 1 - bo2}$	Desviación estándar para la diferencia de 2 pendientes
$S_{b1}$	Desviación estándar de la pendiente
$S_{bn-b12}$	Desviación estándar para la diferencia de 2 pendientes
$S^2$	Varianza
$S^2_1$	Varianza del método 1
$S^2_2$	Varianza del método 2
$\sigma^2$	Varianza poblacional
$\sigma^2_2 / \sigma^2_1$	Razón de 2 varianzas poblacionales
Sref	Sustancia de referencia
SSA	Secretaria de Salud
$S_{y/x}$	Desviación estándar de regresión
$T_{0.975,gl}$	valor de la distribución t de Student asociado a una confianza del 95% y a grados de libertad (gl) establecidos
LDD	Límite de detección
LDC	Límite de cuantificación
$b_1$	Pendiente
$b_{11}$	Pendiente del método 1
$b_{12}$	Pendiente del método 2
$b_0$	Ordena al origen
$b_{o1}$	Ordenada al origen del método 1
$b_{o2}$	Ordenada al origen del método 2
BPF	Buenas prácticas de fabricación
NIST	Nacional Institute of Standard and Technology
OMS	Organización Mundial de la Salud
PNO	Procedimiento Normalizado de Operación
USP	United States Pharmacopeia
VMA	Validación de métodos analíticos
—	
X	Media aritmética de x
—	
Y	Media aritmética de y

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

—	
Y <sub>1</sub>	Media aritmética del método 1
—	
Y <sub>2</sub>	Media aritmética del método 2
—	
Y <sub>0</sub>	Media aritmética del análisis inicial
—	
Y <sub>1</sub>	Media aritmética de cada condición de almacenaje
%	Porcentaje
AU	Unidades de absorbancia.

## BIBLIOGRAFIA

1. Page. Curtis. Sotter. Walker. Hoffman. Integrated pharmacology. Second edition. China; 2002: 219-241.
2. Martínez Velasco A. Farmacología. 16ª edición. Madrid España: Interamericana Mc Graw-Hill; 1993: 208-215.
3. Prado FM, Covarrubias Herrera MR. Introducción a la cromatografía de líquidos de alta resolución. Primera edición. México, D. F.: CBS; 1996: 1-84.
4. Douglas AS, James JL. Análisis instrumental. Cuarta edición. Madrid España: Mc Graw-Hill; 1994: 731-770.
5. Chávez Carpinteyro MJ. Propuesta de un método por cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación de fitofarmaco  $\beta$ -escina en solución (tesina licenciatura). México, D.F: UNAM Fes Zaragoza; 2003:16-30.
6. Suzuki O, Seno H, Ishii A. Analytical toxicology. Forensic Sci Int 1996;80:137-146.
7. Hinojosa TMA. Desarrollo y validación de un método para la cuantificación de niveles plasmáticos terapéuticos de ácido valpróico por cromatografía de gases aplicado a un estudio de biodisponibilidad(tesis maestría). México D.F: IPN Escuela Nacional de Ciencias Biológicas; 1999.
8. Sanchez RJF, Mora GLA. Control de calidad en el laboratorio de química legal. México D.F.; 2003.
9. FDA. (2001). Guidance for Industry. Bioanalytical methods validation.
10. Hokason, G. (1994). A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development, Part I: The initial method validation process. Pharm. Technol. 18(9), 118-130.
11. Hokason, G. (1994). A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development, Part II: Changes and the need for additional validation. Pharm. Technol. 18(9), 118-130.
12. Secretaría de Salud (2000). Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 8ª Edición. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. México.

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

13. CDER (2000). Guidance for Industry: Analytical methods validation. Food and Drug Administration, USA.
14. Colegio Nacional de Químicos Biológicos, A.C, Métodos Analíticos Guía de Validación, Ed 2002.
15. Quattrocchi O. Alberto, de Andrizzi S. Abelaira, Laba R. Felipe., Introducción a la CLAR, Aplicación y Practica, Artes Graficas farro; 1992.
16. [www.ich.org](http://www.ich.org), Febrero2006
17. [www.fda.gov](http://www.fda.gov), Febrero2006
18. [www.waters.com](http://www.waters.com) Mayo2006
19. [www.pharmaweb.net](http://www.pharmaweb.net)Febrero2006
20. [www.usp.org](http://www.usp.org) FEBRERO2006
21. [www.aoac.org](http://www.aoac.org) FEBRERO2006
22. Drug Development and Industrial Pharmacy, USA 15(10), 1743-1757; 1989.
23. Jenkins, L.G; Quantitative Pharmaceutical Chemistry, Cartensen Drug Stability, USA, 77-144.
24. Lachman L, The Theory and Practice of Industrial Pharmacy, USA, 3ªEd Lea&Febiger, 1986.
25. Remington 2 , Farmacia, 17ª Ed, Panamericana,1990.
26. Lieberman H.A, Pharmaceutical Dosage Forms, 2ª Ed marcel Dekker Inc, Vol I, 1989.
27. Florey K, Analytical Profiles of Drug Substances, Vol 8, USA, Academia Press, 1979.
28. Rosenstein S.e, Diccionario de Especialidades Farmaceuticas, PLM, México, Ed.2005.
29. Colombo M.B, Control of Physical Properties in Pharmaceutical Forms, Medico Farmaceutica, Italia, Ed. 1976.
30. NOM-073-SSA I-2004, Estabilidad de Medicamentos, México, 2
31. VITAE Academia Biomedica Digital.
32. Silva Hernandez Carlos Alejandro, Ruíz Robaina Lazaro., Las bondades del ácido acetilsalicílico, en el sistema osteomioarticular., la Habana, Cuba, 1995.
33. Perez Espinos D, Buenadicha López A, Manuel calvo E., Bases

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

farmacológicas y tratamiento de la inflamación, España,2005, 237-282.

34.Rodríguez Carranza Rodolfo., Vademécum Académico de Medicamentos., 2ª Ed, Interamericana, Mc Graw Hill, México,1995, 17-19.

35.Henderson H. The Paternity of Aspirina. Science 1999; 286:1090-1091.

36.L M Torres. Aspirina: Un viejo remedio en permanente actualización. Rev Soc Esp Dolor 8; Supl III, 1-2, 2001.

37.Taurand S. Aspirina.Soins 1990; II; 538-539.

38.Jack DB. One hundred years of aspirine. Lancet 1997; 350:437-439.

39.Sneider W. Drug discovery. Chichester: John Wiley and Sons 1985.

40.Vane RJ. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirine-like drugs. Nature 1971; 231:232-5.

41.Bremer HA, Wallenburg HC. Low dose Aspirin in pregnancy; changes in patterns of prescription in the Netherlands. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biolo 1993;52:29-33.

42.Lokken P. Acetylsalicylic Acid. Tidsskr nor Lageforen 1997;117:4362.

43.Lorenz R, Weber PC. Acetylsalicylic Acid-low doses: why? Med Klinik West Germ 1985;127::684-6.

44.Freeland GR, Northington RS, Hendrich DA, Walker BR. Hepatic safety of two analgesics used over the counter; Ibuprofen and Aspirin. Clin Pharmacol Ther 1988;43:473-9.

45.Florez J, Reig E. Fármacos analgesicos-antitermicos y antiinflamatorios no esteroideos. En. Florez J,Reig E, eds. Terapeutica farmacologica del dolor. Pamplona. EUNSA, 1993; 120-56.

46.Higuchi S, Osada Y, Shiori Y, Tanaka N, Otomo S. The modes of anti-inflamatory and analgesic actions of Aspirin and Salicylic acid. Folia Pharmacol Jpn 1985;85.49-57.

47.Vergue P, Bertin P, Treves R. aspirin, pain and inflammation. Rev Med Interne 2000;21(Suppl 1):89-96.

48.Bosh F, Baños JE. Farmacología de los analgésicos-antitérmicos y de los AINES. En: Aliaga L, Baños JE, de Batureli C, Molet J, Rodríguez de la Serna A eds. Tratamiento del dolor. Teoría y Práctica. Barcelona: editorial MCR, 1995; 57-74.

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

49.Furst DE. Are there differences among nonsteroidal antiinflammatory drugs? Comparing acetylated salicylates, and nonacetylated antiinflammatory drugs. *Arthritis Rheum* 1994;37:1-9.

50.Prieur A-M-F. Juvenile chronic □cetylsal En: Klippel JH, Dieppe PA, eds. *Rheumatology*, 2da ed. London: CV Mosby, 1998;5.21.1-5.21.9.

51.Pouchot J, Sampalis JS, Beaudet F et al. adult Still's disease; Manifestations, disease course, And outcome in 62 patients. *Medicine* 1991;70:118-36

52.Newburger JW, Takahashi M, Beiser AS et al. A single intravenous infusion of gamma globulin as compared with four infusions in the treatment of acute Kawasaki syndrome. *N Engl J Med* 1991;324:1633.

53.Bisno AL. Rheumatic Fever. En: Kelley W, Harris E, Ruddy S, Sledge C, eds. *Textbook of Rheumatology*. Philadelphia; WB Saunders Company, 1990;1236.

54.Norton JV, Zager E, Grady JF. Erythromelalgia: diagnosis and classification. *J Foot Ankle Surg* 1999; 38:238-41.

55.Vecchiet L, Vecchiet J, Bellomo R, Giambardino MA, Obleter G. Muscle pain for Physical Exercise. En: *Muscle pain and Fibromialgia*.

Eds L Vecchiet, MA Giambardino. New York HMP. 1999;43-53.

56.□cetylsal de la Serna A. Tratamiento de los trastornos músculo esqueléticos localizados. *Farmacoterapia* 1986; 102-106.

57.Wolfe F. Fibromyalgia. The clinical □cetylsa. *Rheum Dis Clin North Am* 1989;15:1-8.

58.Wolfe F, Cathey MA. Prevalence of primary and secondary fibrositis. *J Rheumatol* 1983; 10:965-8.

59.Cohen ML, Quinter JL. Fibromyalgia □cetylsa, a problem of tautology. *Lancet* 1993; 342:906-9.

60.Mulero Mendoza J. dolor musculotendinoso. En: Torres LM, Elorza J, Gómez Sancho M, Micó JA, Muriel C, Reigh E, et al. Eds. Barcelona: Masson, 1997:207-17.

61.Altofer R. □cetylsalicylic acid. Past and future. *Ars Med* 1989;79:462-5.

62.Francis KT, Hoobler T. effects of Aspirin on delayed muscle soreness. *J Sport Med Phys Fitness* 1987;27:333-7.

63.Choudari CP, Elton RA, Palmer KR. The outcome of peptic ulcer haemorrhage in relation to consumption of nonsteroidal antiinflammatory drugs or Aspirin.

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

Aliment Pharmacol Ther  
1994;8:457-60.

64.Lanas A, Serrano P, Bajador E, esteva F, Benito R, Sáinz R. Evidence of aspirin use in both upper and coger gastrointestinal perforation. Gastroenterology 1997;112:683-9.

65.Fowler PD. Aspirin, Paracetamol and nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a comparative review of side effects. Med Toxicol 1987; 2:338-66.

66.Martínez Velazco A. Farmacología. 16ª Edición. Madrid España: Interamericana Mc Graw-Hill; 1993:208-215.

67.Prado FM, Covarrubias Herrera MR. Introducción a la cromatografía de líquidos de alta resolución. Primera edición. México, D.F.: CBS; 1996:1-84.

68.Harris CD. Quantitative chemical análisis. Fifth edition. ASA New Cork: W.H. Freeman and Company; 199:699-705, 712-748.

69.Waters ACQUITY UPLC System, Operator's Guide.

70.Swartz, Michael E., Ultra Performance Liquid Chromatography(UPLC): An Introduction., Separation Science Redefined, USA May 2005, 8-14.

71.Grumbach Eric S., Developing Columns for UPLC: Design Considerations and Recent Developments., Separation Science Redefined, USA May 2005, 40-44.

72.King S, Stoffolano Peter J., The Evaluation and Application of UPLC for The Rapid Analisis of Doses Formulations., Separation Science Redefined, USA May 2005, 36-39.

73.Beattie I, Joncour K., Ultra Performance Liquid Chromatography Coupled to Orthogonal Quadrupole TOF-MS(MS) for Metabolite Identification., Separation Science Redefined, USA May 2005, 22-30.

74.Yang Y, Hodges C., Assay Transfer from CLAR to UPLC for Higuer analisis Throughput., Separation Science Redefined, USA May 2005, 31-35

75.Jerkovich A, LoBrutto R., The Use of ACQUITY in Pharmaceutical Development., Separation Science Redefined, USA May 2005, 15-21

76.Waters ACQUITY UPLC System Literature and Presentation References, Bibliography., Separation Science Redefined, USA May 2005, 45-46.

77.[www.chromatographyonline.com](http://www.chromatographyonline.com)

ENERO 2006.

## ANEXOS

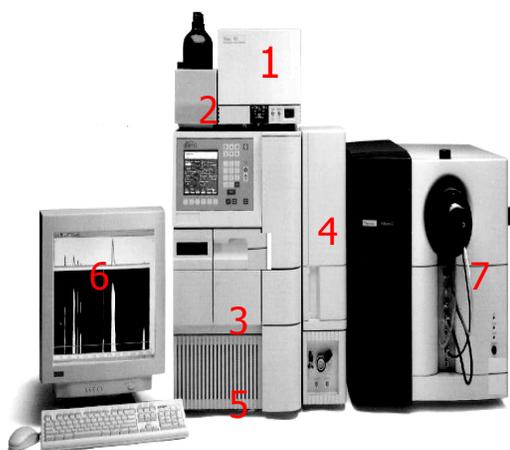
### ACQUITY UPLC PDA ARREGLO DE DIODOS (Fig 1).



- 1) Detector PDA arreglo de diodos.
- 2) Horno de calentamiento para columnas UPLC.
- 2<sup>a</sup>) Chip de registro.
- 3) Automuestreador.
- 4) Inyector.
- 5) Bomba Binaria.
- 6) Empower

Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).

## CLAR ALLIANCE WATERS 2690/2487 ACOPLADO A MS (Fig 2).

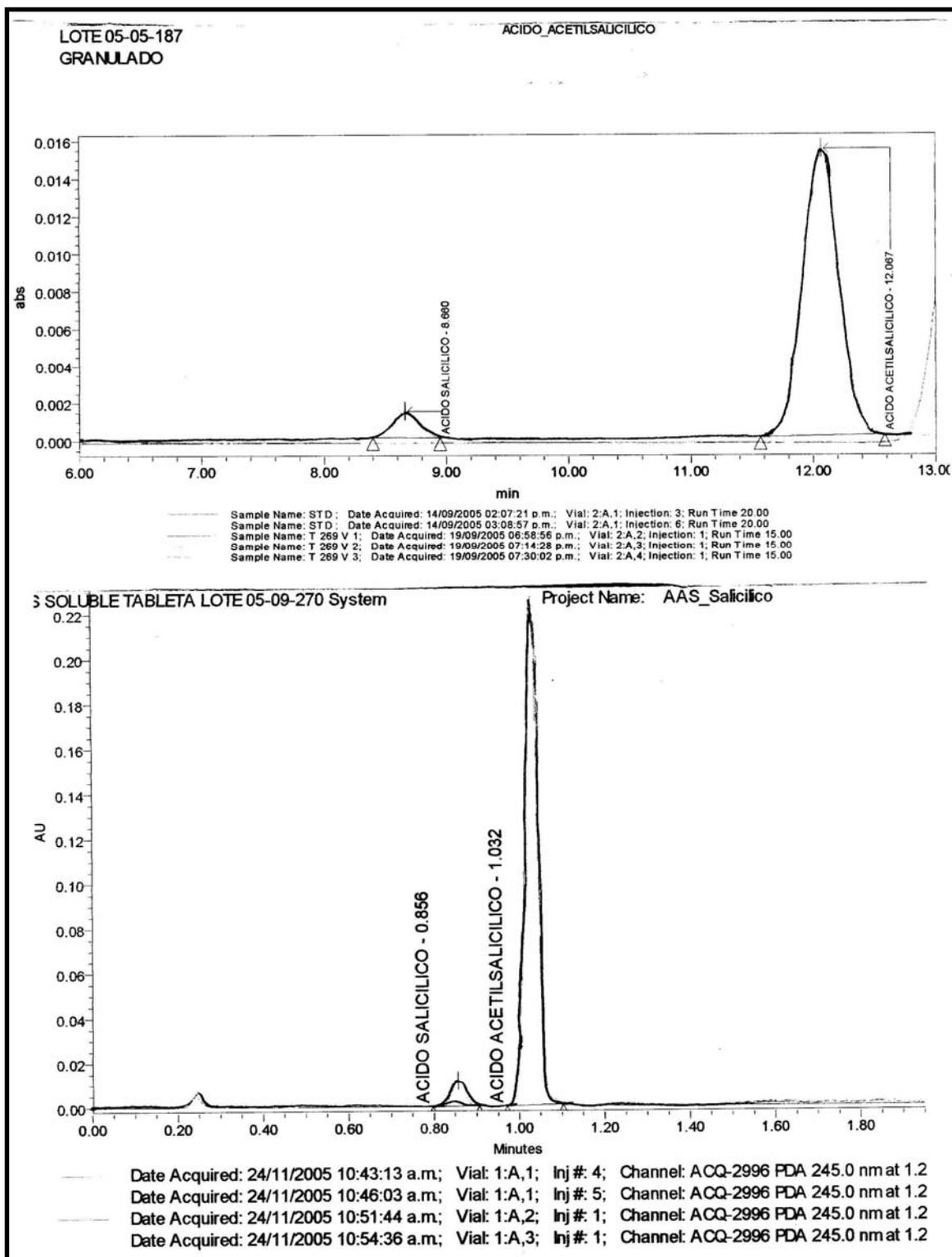


- 1) Detector TUV
- 2) Charola de disolventes

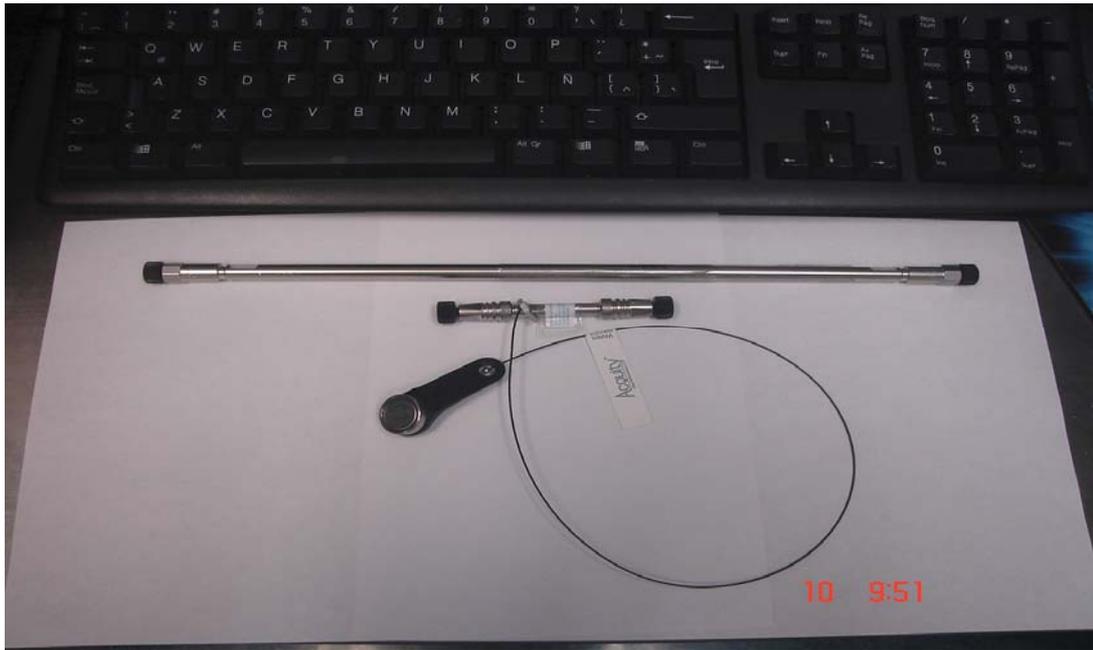
- 3) Automuestreador.
- 4) Inyector
- 5) Bomba Cuaternaria.
- 6) Empower
- 7) MS

Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).

### CROMATOGRAMAS COMPARATIVOS DE CLAR V.S UPLC EN LA DETERMINACION DE ACIDO ACETILSALICILICO, TABLETAS SOLUBLES. (Figura 3)



Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).



**COMPARATIVO DE DIMENSIONES ENTRE COLUMNAS CLAR Y UPLC (Figura 4).**

- PARTE SUPERIOR: COLUMNA HLPC  $\mu$  BONDAPACK C<sub>18</sub> 4.5 X 300mm
- PARTE INFERIOR: COLUMNA ACQUITY C<sub>18</sub> BEH (*Bridged ethylsiloxane/silica hybrid, o sea, un híbrido puentado de etilsiloxano/silica*) 2.1 x 50mm, 1.7 $\mu$ m  
CON CHIP INTEGRADO PARA REGISTRO DE INYECCIONES.

**VENTAJAS , DESVENTAJAS Y SIMILITUDES ENTRE EQUIPOS**  
(Figura 5).

CONDICION	CLAR ALLIANCE 2695/2487	UPLC 2996 PDA DETECTOR	
Columnas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\mu</math>-Bondapack C<sub>18</sub></li> <li>• Symmetry C<sub>18</sub></li> <li>• YMC C<sub>8</sub></li> <li>• Cyano</li> <li>• Phenyl</li> <li>• X-terra C<sub>11</sub></li> <li>• Sphere</li> <li>• C<sub>18</sub> recubierta</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• C<sub>18</sub></li> <li>• C<sub>8</sub></li> <li>• Phenyl</li> <li>• Cyano</li> <li>• RP<sub>18</sub></li> </ul>	En columnas UPLC se tienen hasta la fecha menor variedad pero mejor calidad en el análisis, se tienen proyectadas más tipos de columnas UPLC
Dimensiones y Longitud de columna	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 30cm x 150mm,3-5<math>\mu</math></li> <li>• 25cm x 150mm,3-5<math>\mu</math></li> <li>• 15cm x 150mm,3-5<math>\mu</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1.0x 50mm 1.7<math>\mu</math>m</li> <li>• 1.0 100mm 1.7<math>\mu</math>m</li> <li>• 2.1 x 50mm 1.7<math>\mu</math>m</li> <li>• 2.1 x 100mm 1.7<math>\mu</math>m</li> <li>• 1.0 x 50mm 1.7<math>\mu</math>m</li> </ul>	
Carga de carbono (% C)	Varia desde 4 %C hasta 22 %C	De 3 a 18% C	
Tamaño de poro (Å)	Desde 60 hasta 300	130Å	
Platos teóricos	No menos de 2,000	No menos de 9,000	Mayor numero de platos, mayor resolución y menor coleo en columnas UPLC
Resolución	Mayor de 2.0	Mayor de 3.5	Mejor resolución en columnas UPLC
Coleo	No mayor de 2.0	No mayor de 1.0	En columnas UPLC se obtienen picos mas espigados
Tamaño de partícula	De 3, 5 $\mu$ m	1.7 $\mu$ m	Menor tamaño de partícula en Columnas UPLC, mayor resolución
pH	2 a 9	2 a 12	En columnas CLAR el efecto de pH mayor de 2 o mayor de 9 afecta el empaque de la columna., y en columnas UPLC son híbridas soportando el efecto del pH y temperatura
Presión de trabajo (psi)	Hasta 3000 psi	Hasta 12,000 psi	En columnas UPLC se necesita mayores presiones debido al tamaño de partícula, trayendo con esto mejores resoluciones
Gasto de fase móvil	Aprox 1800 mL en corridas de hasta 15	Aprox 100 mL en corridas de hasta 5 minutos a	Menos residuos en equipos UPLC

**Desarrollo y Validación de un método analítico para la cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas solubles por UPLC( Ultra Performance LC).**

	minutos a flujo de 2.0mL/min	flujo de 0.5mL/min	
Temperatura(°C) de la columna	Hasta 50°C	Hasta 60°C	
Bomba de flujo	Bomba cuaternaria	Bomba binaria	

## **SUGERENCIAS**

- Investigar, Desarrollar y Validar técnicas hechas en condiciones CLAR con columnas UPLC a partir de columnas CLAR., partiendo de fases móviles con amortiguadores y solventes orgánicos, fases normales (solo solventes), hasta llegar a fases móviles UPLC, es decir, fases móviles con bajas concentraciones de sales como pentansulfonato de sodio, hexansulfonato, heptansulfonato y octansulfonato con concentraciones desde 1 hasta 5 mM y manejando pH desde 3.0 hasta 4.0.
- En UPLC no se pueden detectar principios activos disueltos en fases normales (solo solventes orgánicos), ya que debido a la presiones de trabajo que se manejan, por la densidad, volatilidad de los solventes orgánicos (hexano, tetrahidrofurano, octanol, etc), al pasar por las columnas UPLC y luego ir al detector, esta muestra se volatiliza o llega solo una mínima cantidad que no puede ser detectada., aun inyectando el máximo de mL de muestra que es 20µL.
- Otra limitante es el tipo de fases móviles usadas en CLAR, la mayoría tiene mayor cantidad de sales comparadas con las de UPLC, esto es muy critico ya que si no se tienen buenos métodos de lavado en el equipo, en este se tapan las tuberías, los cabezales se saturan de sales y se rayan al tener fricción entre ellos (metal con metal) al no tener liquido (fase móvil o agua) solo sales, y estas rayan los cabezales.
- En el lavado de la aguja de inyección, este se debe hacer preparando 90 % de agua – 10% de solvente orgánico (acetonitrilo, metanol) lavado débil, aquí también puede ir el lavado de sellos y un lavado fuerte con 90 % de solvente orgánico – 10% agua, o según las propiedades del principio activo, como son solubilidad, compatibilidad con la fase móvil, etc., se pueden colocar estos dos lavados en agua. Todo esto con el fin de asegurar la solubilidad de la muestra y no tapar la aguja de inyección con sales, perjudicando en análisis.
- Evitar al máximo los golpes de flujo, es decir, subir muy rápido el flujo de la fase móvil usando columnas Acquity BEH, ya que se puede desempacar esta misma trayendo como consecuencia poca resolución, muy pocos platos teóricos, coleo muy por arriba de 2.0%, presión de trabajo muy alta ya que al desempacarse se tapan las tuberías del equipo UPLC, y estas siendo de un diámetro muy pequeño quedan inservibles , se presuriza el equipo y las válvulas check se dañan ya que al ser de zafiro este se raya con el acumulamiento de sales de las fases y se tiene que dar servicio al equipo, si no de lo contrario queda inservible, trayendo perdidas económicas al ya no poder analizar y no dar dictámenes rápidos a producción para que se venda al público, como el simple hecho de tener un equipo detenido. Se recomienda subir el flujo de trabajo de 0.05mL/min en 0.05mL/min para evitar los problemas antes mencionados
- Al activar una columna Acquity se recomienda activarse con acetonitrilo, o en su caso, en el solvente orgánico con el cual se evaluó la columna.