

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y
BIOQUIMICAS
CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA



DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO
ANALITICO INDICADOR DE ESTABILIDAD PARA EL
ANALISIS DE ACIDO ACETIL SALICILICO EN TABLETAS
POR HPLC

Tesis de Grado Presentado para optar por el título de Maestro en Ciencias en Tecnología
Farmacéutica y Control de Calidad de Medicamentos

POR: Esp. CARLOS CRISTIAN CHOQUE DURAN

ASESOR: M.Sc. MARIA LUISA DAZA

LA PAZ – BOLIVIA

Abril, 2019

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y
BIOQUIMICAS
CARRERA DE QUIMICA FARMACEUTICA



DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO
ANALITICO INDICADOR DE ESTABILIDAD PARA EL
ANALISIS DE ACIDO ACETIL SALICILICO EN TABLETAS
POR HPLC
POR: Esp. CARLOS CRISTIAN CHOQUE DURAN

LA PAZ-BOLIVIA
Abril, 2019

DEDICATORIA

A Dios nuestro señor creador

A mi madre Elena por su apoyo continuo y a mi hermano Jorge

AGRADECIMIENTOS

A Dios a mi familia, a mi madre Elena y a mi hermano Jorge Armando

A la Dra. María Luisa Daza por su apoyo incondicional y amistad sincera

A mis amigos Estefanía, Karla, Dina, Mauricio, Waldo y Heber

Resumen

El ácido acetilsalicílico o ASA ($C_9H_8O_4$), conocido como aspirina es un analgésico, antipirético y antiinflamatorio, uno de los más utilizados en el mundo anualmente de hasta 120 000 millones de comprimidos. Tiene problemas reportados como salicilismo, acidosis metabólica, hemorragia gastrointestinal, nefropatías, trombocitopenia, anemia aplásica y agranulocitosis, por lo que su estabilidad y evaluación de su producto de degradación el Ácido Salicílico es necesaria

Se desarrolló un método analítico indicador de estabilidad para el Ácido Acetilsalicílico tabletas en 3 marcas codificadas como A, B y C con el diseño experimental de Plackett and Burman utilizando HPLC con 8 experimentos variando niveles negativos y positivos en condiciones como pH de la fase móvil, flujo, buffer, longitud de onda, columna cromatográfica, diluyente de los analitos y proporción de la fase móvil en un HPLC marca Agilent Serie 1200.

Se propuso el método analítico indicador de estabilidad con condiciones de pH 2,04, Flujo de 3mL/min, buffer 30 mM, longitud de onda 236nm, Columna de 15cm x 4,6 mmC18 (L1-USP), diluyente (buffer:acetonitrilo) 50%:50% , fase móvil (acetonitrilo: buffer) 30%:70% . Con una resolución de 7,41 y coeficiente de variación de $\pm 0,96\%$. Se sometió a la ASA a degradación forzada en condiciones de termólisis, oxidación, fotólisis, hidrólisis ácida, hidrolisis alcalina donde las soluciones son más estables a la fotólisis e hidrólisis acida. Se determinó la estabilidad de la muestra para análisis en diferentes tiempos siendo estable hasta 120 minutos

Se realizó la validación del método analítico indicador de estabilidad tomando como parámetros, especificidad, linealidad e intervalo, exactitud, precisión, límite de detección y de cuantificación. Se analizaron 3 marcas del mercado tabletas con Ácido Acetilsalicílico (A,B,C) con el método desarrollado, que de acuerdo a USP-37 deben tener un límite de Ácido Salicílico Libre de 0,3 % para tabletas no recubiertas y de 3% para tabletas con recubierta. Siendo que la marca “A” no cumple con el requisito de Ácido Salicílico Libre con un valor de 0,34%

Palabras Clave: Acido Acetilsalicílico, validación, estabilidad, HPLC

Summary

Acetylsalicylic acid or ASA ($C_9H_8O_4$), known as aspirin, is an analgesic, antipyretic, and anti-inflammatory, one of the most widely used annually in the world for up to 120 billion tablets. It has reported problems such as salicylism, metabolic acidosis, gastrointestinal bleeding, kidney disease, thrombocytopenia, aplastic anemia, and agranulocytosis, so its stability and evaluation of its degradation product, salicylic acid is necessarily

A stability indicator analytical method was used for acetylsalicylic acid tablets in 3 brands coded as A, B and C with the experimental design of Plackett and Burman using HPLC with 8 experiments varying negative and positive levels in conditions such as mobile phase pH, flow, buffer, wavelength, chromatographic column, analyte diluent, and mobile phase ratio on an Agilent 1200 Series HPLC.

The analytical method indicating stability with pH 2.04 conditions, Flow of 3mL / min, buffer 30mM, wavelength 236nm, Column 15cm x 4.6mmC18 (L1-USP), diluent (buffer: acetonitrile) was proposed.) 50%: 50%, mobile phase (acetonitrile: buffer) 30%: 70%. With a resolution of 7.41 and coefficient of variation of $\pm 0.96\%$. ASA underwent forced degradation under conditions of thermolysis, oxidation, photolysis, acid hydrolysis, alkaline hydrolysis where solutions are more stable to photolysis and acid hydrolysis. The stability of the sample was determined for analysis at different times, being stable up to 120 minutes.

The validation of the analytical method indicating stability was carried out taking as parameters, specificity, linearity and interval, accuracy, precision, limit of detection and quantification. 3 market brands tablets with acetylsalicylic acid (A, B, C) were analyzed with the developed method, which according to USP-37 must have a limit of free salicylic acid of 0.3% for uncoated tablets and 3% for coated tablets. Being that the "B" mark does not meet the requirement of Free Salicylic Acid with a value of 0.34%

Key Words: Acetylsalicylic acid, validation, stability, HPLC

Índice de Contenido

CAPÍTULO I	1
INTRODUCCION	1
1. Antecedentes	3
1.1 Antecedentes a nivel Mundial	3
1.2 Antecedentes a nivel Latinoamérica	6
Fuente: Propia	8
1.3 Antecedentes a nivel Nacional	8
CAPÍTULO II	11
MARCO TEORICO	11
1. Marco Teórico.....	12
1.1 Ácido Acetilsalicílico	12
1.2 Estabilidad Química del Acido Acetilsalicilico	13
1.3 Propiedades Químicas del Ácido Acetilsalicílico	15
1.4 Propiedades Químicas del Ácido Salicílico	17
2. Desarrollo de Métodos Analíticos	18
3. Diseños Experimentales de Plackett-Burman.....	19
4. Elección de las condiciones cromatográficas	21
5. Cromatografía en Fase Reversa.....	21
6. Parámetros Cromatográficos	22
6.1 Resolución (R)	22
6.2 Ancho de pico (w).....	22
6.3 Platos Teóricos	23
6.4 Asimetría (As).....	24
7. Detectores Generales Utilizados en Cromatografía	25
8. Solventes en HPLC	25
8.1 Compatibilidad con el Detector	25
8.2 Viscosidad.....	25

9. pH y pH aparente	26
10. Metodología para el Desarrollo de Métodos Analíticos	26
11. Definición del Sistema Preliminar de Análisis	27
12. Peso Molecular de los Analitos de Interés	28
12.1 Análisis de Compuestos de Peso Molecular Menor de 2000 g/mol	28
12.2 Fase reversa.....	28
12.3 Análisis de Compuestos Disociables	29
13. Validación de Métodos Analíticos	34
14. Datos requeridos para la Validación.....	34
14.1 Categorías	34
14.2 Categoría I.....	34
14.3 Categoría II	34
14.4 Categoría III.....	34
14.5 Categoría IV	34
15. Especificidad.....	35
15.1 Linealidad e Intervalo de Análisis	35
15.2 Precisión.....	36
15.3 Exactitud	36
15.4 Limite de Detección	36
15.5 Limite de Cuantificación.....	37
15.6 Robustez en el Desarrollo de Métodos Analíticos	37
15.7 Estabilidad Química	37
15.8 Métodos Analíticos Indicadores De Estabilidad.....	38
CAPÍTULO III	41
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	41
1. Justificación	42
2. Planteamiento del Problema.....	43
2.1 Pregunta de Investigación	43

3. Objetivo General	44
3.1 Objetivos Específicos	44
3.1.1 Desarrollo de la metodología Analítica	44
3.1.2 Degradación forzada del Ácido Acetilsalicílico	44
3.1.3 Ensayos de validación del método analítico	44
3.1.4 Desafío del método con Medicamentos comercializados en el mercado local.....	44
4. Hipótesis	45
4.1 Hipótesis Afirmativa (H1).....	45
4.2 Hipótesis Nula (Ho)	45
5. Conceptualización de las Variables	45
6. Operacionalización de las Variables	46
CAPÍTULO IV	47
DISEÑO METODOLÓGICO	47
1. Diseño Metodológico	48
1.1 Equipos, Materiales, reactivos y sustancias de referencia	49
1.2 Desarrollo de la metodología Analítica	50
1.3 Elección del pH de la Fase Móvil.....	50
1.4 Elección del Flujo de la Fase Móvil del Sistema Cromatográfico	51
1.5 Elección de la Concentración del Buffer	52
1.6 Elección de la longitud de Onda.....	52
1.6 Elección de la Columna.....	54
1.7 Elección del Diluyente	55
1.7 Elección de la Fase móvil.....	55
1.8 Robustez-Matriz del Diseño Experimental.....	55
2. Degradación Forzada del Ácido Acetilsalicílico	55
2.1 Hidrólisis Ácida	58
2.2 Hidrólisis Alcalina	58
2.3 Oxidación.....	59

2.4 Termólisis	59
2.5 Condiciones Normales	60
3. Validación del Método Analítico	60
3.1 Determinación de la Especificidad	60
3.2 Determinación de la Linealidad e intervalo	62
3.3 Determinación de la Precisión	63
3.3.1 Repetibilidad Instrumental	64
3.3.2 Repetibilidad del método	64
3.3.3 Precisión Intermedia.....	64
3.4 Determinación de la Exactitud	65
3.5 Determinación del Límite de Detección y Límite de Cuantificación	66
4. Desafío del Método Analítico Indicador de estabilidad.....	67
CAPÍTULO V	68
RESULTADOS	68
1. Resultados	69
1.1 Desarrollo de la metodología Analítica	69
1.1.1 Resultados de Experimento 1	72
1.1.2 Resultados de Experimento 2	73
1.1.3 Resultados de Experimento 3	74
1.1.4 Resultados de Experimento 4	75
1.1.5 Resultados de Experimento 5	76
1.1.6 Resultados de Experimento 6	77
1.1.7 Resultados de Experimento 7	78
1.1.8 Resultados de Experimento 8	79
2. Análisis Estadístico del Diseño Experimental tomando como respuesta la Asimetría del Ácido Salicílico	80
2.1 Interpretación de los resultados del Diseño Experimental tomando como respuesta cromatográfica el factor de Asimetría	82

2.2 Análisis Estadístico del Diseño Experimental tomando como respuesta la Asimetría del Ácido Acetilsalicílico.....	82
2.3 Interpretación de los resultados del Diseño Experimental tomando como respuesta cromatográfica el factor de Asimetría	84
2.4 Análisis Estadístico del Diseño Experimental tomando como respuesta la Resolución del Ácido Acetilsalicílico y el Ácido Salicílico.....	85
2.5 Interpretación de los resultados del Diseño Experimental tomando como respuesta cromatográfica la Resolución entre el Ácido Acetilsalicílico y el Ácido Salicílico.....	87
2.6 Condiciones Cromatográficas del Método Analítico resultado del Análisis Estadístico del Diseño Experimental.....	87
3. Resultado de la degradación Forzada del Ácido Acetilsalicílico	87
3.1 Resultado de la Hidrolisis Acida del Ácido Acetilsalicílico	87
3.2 Resultado de la Hidrólisis Alcalina del Ácido Acetilsalicílico	88
3.3 Resultado de la Oxidación del Ácido Acetilsalicílico	89
3.4 Resultado de la Termólisis del Ácido Acetilsalicílico	90
3.5 Resultado de la Fotólisis del Ácido Acetilsalicílico	91
3.6 Análisis del comportamiento de degradación del Ácido Acetilsalicílico	92
4. Validación del Método Analítico para el Ácido Acetilsalicílico	94
4.1 Validación del Método	94
4.2 Ensayo de Especificidad.....	94
4.2.1 Interpretación y discusión	95
4.3 Ensayo de Linealidad del Método Analítico	96
4.3.1 Interpretación y Discusión.....	99
4.4 Ensayo de Exactitud	99
4.4.1 Interpretación y discusión	101
4.5 Ensayo de Precisión	101
4.5.1 Interpretación y discusión	104
4.6 Ensayo para determinar Límite de Detección y Límite de Cuantificación.....	104
4.6.1 Interpretación del Límite de Detección y Límite de Cuantificación	106

5. Validación del Método Analítico para el Ácido Salicílico	107
5.1 Validación del Método Analítico	107
5.2 Ensayo Especificidad	107
5.2.1 Interpretación y discusión	108
5.3 Ensayo de Linealidad del Método	109
5.3.1 Interpretación y Discusión.....	112
5.4 Ensayo de Exactitud	112
5.4.1 Interpretación y discusión	114
5.5 Ensayo de Precisión	114
5.5.1 Interpretación y discusión	117
5.6 Ensayo para determinar Límite de Detección y Límite de Cuantificación.....	117
5.6.1 Interpretación y discusión	119
6. Desafío del método de análisis de 3 marcas comercializadas a nivel nacional	119
6.1 Resultados de Valoración de Ácido Acetilsalicílico de la Marca “A”	122
6.1.1 Límite de Ácido Salicílico libre de la Marca “A”.....	124
6.2 Resultados de Valoración de Ácido Acetilsalicílico de la Marca “B”	125
6.2.1 Límite de Ácido Salicílico Libre de la Marca “B”.....	126
6.3 Resultados de Valoración de Ácido Acetilsalicílico de la Marca “C”	127
6.3.1 Límite de Ácido Salicílico Libre de la Marca “C”	128
6.5 Resolución cromatográfica entre el Ácido Acetilsalicílico y el Ácido salicílico	129
CAPÍTULO VI	130
CONCLUSIONES	130
1. Conclusiones	131
BIBLIOGRAFÍA	133
ANEXOS	135
1. ANEXOS	136
A.1. Cromatogramas (Validación, degradación, análisis, desarrollo).....	136

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Esquema de Desarrollo de Métodos Analíticos	18
Gráfico 2. Árbol de decisiones para Analitos de Peso Molecular Menor a 2000 g/mol.....	28
Gráfico 3. Ajuste de la concentración de modificador orgánico para aumentar la resolución	29
Gráfico 4. Barrido Espectral del Ácido Acetilsalicílico	53
Gráfico 5. Barrido Espectral del Ácido Salicílico	53
Gráfico 6. Superposición de los Barridos espectrales de Ácido Acetilsalicílico y su producto de degradación el Ácido Salicílico.....	54
Gráfico 7. Hidrólisis Ácida del Ácido Acetilsalicílico	58
Gráfico 8. Hidrolisis Alcalina del Ácido Acetilsalicílico	58
Gráfico 9. Oxidación del del Ácido Acetilsalicílico	59
Gráfico 10. Termólisis del Ácido Acetilsalicílico	59
Gráfico 11. Cromatograma en Condiciones Normales	60
Gráfico 12. Diagrama de Pareto del Análisis de Diseño Experimental tomando en cuenta el Factor de Asimetría	81
Gráfico 13. Efectos de los Factores e Influencia en Nivel (+) y Nivel (-) de la simetría del Ácido Salicílico	81
Gráfico 14. Diagrama de Pareto del Análisis de Diseño Experimental tomando en cuenta el Factor de Asimetría	83
Gráfico 15. Efectos de los Factores e Influencia en Nivel (+) y Nivel (-) de la simetría del Ácido Acetilsalicílico	84
Gráfico 16. Diagrama de Pareto del Análisis de Diseño Experimental tomando la Resolución del Ácido Acetilsalicílico y el Ácido Salicílico.....	86
Gráfico 17. Efectos de los Factores e Influencia en Nivel (+) y Nivel (-) de la Resolución del Ácido Acetilsalicílico y el Ácido Salicílico.....	86

Gráfico 18. Hidrolisis Acida del Ácido Acetilsalicílico a 70°C	88
Gráfico 19. Hidrolisis Alcalina del Ácido Acetilsalicílico a 70°C	89
Gráfico 20. Oxidación del Ácido Acetilsalicílico a 70°C.....	90
Gráfico 21. Termólisis del Ácido Acetilsalicílico a 70°C	91
Gráfico 22. Fotólisis del Ácido Acetilsalicílico a 25°C.....	92
Gráfico 23. Cromatograma de solución estándar de Ácido Acetilsalicílico 0,5 mg/mL y Ácido Salicílico 0,1mg/mL.....	120
Gráfico 24. Cromatograma de Muestra “A” de Ácido Acetilsalicílico concentración nominal de 0,5 mg/mL.....	121
Gráfico 25. Cromatograma de Muestra “B” de Ácido Acetilsalicílico concentración nominal de 0,5 mg/mL.....	121
Gráfico 26. Cromatograma de Muestra “C” de Ácido Acetilsalicílico concentración nominal de 0,5 mg/mL.....	122

Índice de Imágenes

Imagen 1. Curva de Gauss. El área definida por $\mu \pm \sigma$ corresponde al 68 % del total, el de $\mu \pm 2\sigma$ al 95% y el de $\mu \pm 3\sigma$, al 99.7% del área total bajo la curva.....	23
Imagen 2. Representación de Cromatograma indicando a y b para cálculo de asimetría.....	24
Imagen 3. Separación y mejoramiento de la simetría con el añadido de TEA de una base nitrogenada	30

Índice de Tablas

Tabla 1. Criterios propuestos y las condiciones de prueba a largo plazo	5
Tabla 2. Guías de diferentes países sobre estudios de estabilidad y validación de métodos analíticos para medicamentos.....	6
Tabla 3. Registros Sanitarios de Ácido Acetilsalicílico en Bolivia (15 registros sanitarios de Ácido Acetilsalicílico de diferentes concentraciones 81mg, 100mg, 500mg.)	9

Tabla 4. Inclusión del Ácido Acetilsalicílico en el LINAME 2018-2020 Bolivia	13
Tabla 5. Propiedades Químicas del ACIDO ACETILSALICILICO	15
Tabla 6. Constante de Velocidad de la Aspirina en Kcal/mol	16
Tabla 7. Energía de Activación del Ácido Acetilsalicílico	16
Tabla 8. Propiedades Químicas del ACIDO SALICILICO	17
Tabla 9. Diseño Experimental de Plackett-Burman.....	19
Tabla 10. Sistemas Cromatográficos según el tipo de Muestra	31
Tabla 11. Aplicaciones de Diferentes Columnas Cromatograficas.....	32
Tabla 12. Datos requeridos para la Validación de Métodos Analíticos	35
Tabla 13. Coeficientes de Variación Máximos Aceptables	36
Tabla 14. Caracterización del Diseño.....	48
Tabla 15. Matriz del Diseño Experimental Plackett and Burman.....	55
Tabla 16. Determinación de la Precisión Intermedia.....	65
Tabla 17. Matriz del Diseño Experimental.....	69
Tabla 18. Diseño Experimental de Plackett-Burman para desarrollo y Robustez del Método.....	69
Tabla 19. Composición de cada uno de los 8 experimentos del Diseño Experimental	70
Tabla 20. Resultados del Diseño Experimental tomando como respuesta la Asimetría del Ácido Salicílico	80
Tabla 21. Resultados del Diseño Experimental tomando como respuesta la Asimetría del Ácido Acetilsalicílico	82
Tabla 22. Resultados del Diseño Experimental tomando como respuesta la Resolución del Ácido Acetilsalicílico y el Ácido Salicílico.....	85
Tabla 23. Condiciones Cromatográficas para proceder con la validación del método.....	87

Tabla 24. Porcentajes de Degradación del Ácido Acetilsalicílico y % de generación del Ácido Salicílico	93
Tabla 25. Resultados de Especificidad del Método para el Ácido Acetilsalicílico	94
Tabla 26 Resultados del Ensayo de Linealidad del método para el Ácido Acetilsalicílico	96
Tabla 27. Resultados del Ensayo de Exactitud del método para el Ácido Acetilsalicílico	99
Tabla 28 Repetibilidad Instrumental Acido Acetilsalicílico	101
Tabla 29 Repetibilidad del Método Ácido Acetilsalicílico	102
Tabla 30. Resultados de Ensayo de Precisión del método para el Ácido Acetilsalicílico	102
Tabla 31. Resultados de Límite de Detección y Límite de Cuantificación del Método Analítico para el Ácido Acetilsalicílico	104
Tabla 32. Resultados de Especificidad del Método para el Ácido Salicílico	107
Tabla 33. Resultados del Ensayo de Linealidad del método para el Ácido Salicílico	109
Tabla 34. Resultados del Ensayo de Exactitud del método para el Ácido Salicílico	112
Tabla 35 Repetibilidad Instrumental Acido Salicílico	114
Tabla 36 Repetibilidad del Método Ácido Salicílico	115
Tabla 37. Resultados de Ensayo de Precisión del método para el Ácido Salicílico	115
Tabla 38. Resultados de Límite de Detección y Límite de Cuantificación del Método Analítico para el Ácido Salicílico	117
Tabla 39. Resultados de Valoración de Ácido Acetilsalicílico de la Marca “A”	122
Tabla 40. Límite de Ácido Salicílico Libre de la Marca “A”	124
Tabla 41. Resultados de Valoración de Ácido Acetilsalicílico de la Marca “B”	125
Tabla 42. Resultados de Valoración de Ácido Acetilsalicílico de la Marca “C”	127

Índice de Esquemas

Esquema 1. Esquema del Desarrollo del método analítico indicador de estabilidad	49
Esquema 2. De la degradación forzada del Ácido Acetilsalicílico	57
Esquema 3. Ensayo de Especificidad del Método Analítico “Estándares Solos”	61
Esquema 4. Ensayo de Especificidad del Método Analítico “Estándares + Matriz”	62
Esquema 5. Determinación de Linealidad e Intervalo	63
Esquema 6. Determinación de la precisión del Método Analítico	64
Esquema 7. Determinación de la Exactitud	66
Esquema 8. Determinación del Límite de Detección y Límite de Cuantificación	67

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO INDICADOR DE
ESTABILIDAD PARA EL ANALISIS DE ACIDO ACETIL SALICILICO EN
TABLETAS POR HPLC

CAPÍTULO I

INTRODUCCION

El desarrollo de métodos analíticos indicadores de estabilidad y la validación de los mismos son la herramienta necesaria para establecer la seguridad, eficacia, para realizar estudios de estabilidad, tiempo de vida útil y atoxicidad de los productos farmacéuticos terminados.

Al igual que en todo campo de la química analítica, el enfoque general en HPLC puede tener varias perspectivas según la meta perseguida. En la industria farmacéutica o en síntesis orgánica, el factor limitante no es en general la disponibilidad de muestra, y los objetivos del análisis pueden ser del fármaco, excipientes, productos de partida, subproductos de síntesis y productos de degradación. (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992, pág. 268)

Para poder realizar el desarrollo de una metodología analítica indicadora de estabilidad se debe tomar en cuenta el parámetro de robustez que según la farmacopea de los Estados Unidos USP-37 es el siguiente:

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para no ser afectado por variaciones pequeñas, aunque deliberadas, en los parámetros del procedimiento indicados en la documentación, y provee una indicación de su aptitud durante condiciones normales de uso. La robustez puede determinarse durante la etapa de desarrollo del procedimiento analítico. (Expertos, 2014, pág. 1444)

La tecnología escogida para el desarrollo y validación de métodos analíticos indicadores de estabilidad es la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) por su poder separativo de moléculas y la capacidad de detectar productos de degradación con la propiedad de ser específico tras hidrolisis acida, hidrolisis alcalina, termólisis, degradación oxidativa y fotólisis. (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992, pág. 303)

Dado que el desarrollo es costoso e insume mucho tiempo, es preferible emplear caminos sistemáticos, efectuando los ensayos en

una dirección segura o al menos con buenas probabilidades de éxito, evitando ensayos innecesarios y documentando los resultados, no sólo para el desarrollo mismo sino para futuras revisiones. (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992, pág. 268)

La molécula para la cual se desea desarrollar el método analítico indicador de estabilidad es el Ácido Acetilsalicílico que en forma farmacéutica de comprimidos es uno de los más utilizados a nivel mundial con un consumo estimado en 40 000 toneladas anuales, o lo que es lo mismo, entre 50 000 y 120 000 millones de comprimidos” (Licencia Creative Commons, 2019, pág. 2)

Es un medicamento ampliamente utilizado con varios efectos farmacológicos

El ácido acetilsalicílico o AAS ($C_9H_8O_4$), conocido popularmente como aspirina, nombre de una marca que pasó al uso común, es un fármaco de la familia de los salicilatos. Se utiliza como medicamento para tratar el dolor (analgésico), la fiebre (antipirético) y la inflamación (antiinflamatorio), debido a su efecto inhibitorio, no selectivo, de la ciclooxigenasa.

Se utiliza también para tratar inflamaciones específicas tales como la enfermedad de Kawasaki, la pericarditis o la fiebre reumática. La administración de aspirina poco después de un ataque al corazón disminuye el riesgo de muerte y su uso a largo plazo ayuda a prevenir ataques cardíacos, accidentes cerebrovasculares y coágulos de sangre en personas con alto nivel de riesgo. (Licencia Creative Commons, 2019, pág. 1)

1. Antecedentes

1.1 Antecedentes a nivel Mundial

La estabilidad de medicamentos es una preocupación mundial que fue emitida de manera internacional en el informe 32 de la Organización Mundial de la Salud, publicado en el año 1992, el

comité de expertos expuso que se encontraron problemas de estabilidad relacionados con los productos farmacéuticos, donde la información de la frecuencia con la que se detectan productos que no cumplen con los atributos de calidad, además de los problemas por inadecuadas condiciones de almacenamiento y el naciones sobre la influencias de las zonas climáticas del mundo (Especificaciones C. d., 1992)

Se acordó que era necesario clasificar a los países miembros en zonas climáticas (ya que la temperatura es un catalizador de la degradación de los ingredientes farmacéuticos activos) y las previsiones desde la fabricación, transporte hasta la administración en el paciente de Producto Farmacéutico Terminado sea estable. (Expertos C. d., 1992, pág. 7)

Ya en el informe 33 de la OMS se realizaron encuestas a los países miembros de la Organización Mundial de la Salud donde:

El Comité de expertos examinó los resultados de la encuesta de estabilidad de los productos que tenían antecedentes de problemas, que se había realizado conforme a lo acordado en su trigésima segunda reunión. Con la información recolectada se puede mencionar los dos siguientes puntos importantes

1. Más de la mitad de los 200 informes recibidos están relacionados con problemas encontrados con solo cinco de los 25 fármacos incluidos en la encuesta (ácido acetilsalicílico, ampicilina, cloranfenicol, el paracetamol, y tetraciclina).

2. Muchos de los problemas se han encontrado en productos antes de su fecha de vencimiento, a veces poco tiempo después de su fecha de fabricación (en aproximadamente el 70% se produjeron problemas de estabilidad en la mitad de la vida útil propuesta) (Especificaciones C. d., 1993)

En el informe 43 de la OMS publicado en 2003 se establece la utilización de Stability Indicator Methods (SIM), métodos analíticos indicadores de estabilidad para el análisis de productos farmacéuticos terminados (PFT) capaces de evaluar las propiedades químicas y productos de degradación que son susceptibles de cambiar con el tiempo. (Especificaciones C. d., 2003, pág. 113)

En el Informe 43 de la OMS celebrada en Ginebra en octubre de 2005, se recomienda dividir la Zona climática IV (caliente y húmedo) en dos zonas climáticas: la zona IVA - de los cuales el 30 ° C/65 % RH se mantendrá la condición de norma de ensayo a largo plazo - y climáticas Zona IVB para el cual, si es justificado , 30 ° C/75 % RH se harán las pruebas a largo plazo condiciones .

Tabla 1. Criterios propuestos y las condiciones de prueba a largo plazo

Zona Climática	Definición	Criterios Temperatura media anual medida en el aire abierto/ media depresión parcial de vapor agua anual	Largo Plazo Condiciones del ensayo
I	Clima Templado	$\leq 15^{\circ}\text{C} / \leq 11 \text{ hPa}$	21°C/45% HR
II	Clima Subtropical y Mediterráneo	$> 15 \text{ a } 22^{\circ}\text{C} / > 11 \text{ a } 18 \text{ hPa}$	25°C/60% HR
III	Clima Caliente y Seco	$> 22^{\circ}\text{C} / \leq 15 \text{ hPa}$	30°C/30% HR
IVA	Clima Caliente y Húmedo	$> 22^{\circ}\text{C} / > 15 \text{ a } 27 \text{ hPa}$	30°C/65% HR
IVB	Clima Caliente y Altamente Húmedo	$> 22^{\circ}\text{C} / > 27 \text{ hPa}$	30°C/75% HR

Fuente: Informe 43,OMS

Aquí se deben tomar varias consideraciones de las cuales las más importantes son las propiedades químicas de los analítitos de interés. Naturaleza de la matriz (sangre, cremas, tabletas, jarabes, suspensiones). (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

1.2 Antecedentes a nivel Latinoamérica

Varios países en Latinoamérica contemplan en su manual de registro sanitario o en las resoluciones de los ministerios de salud siendo los imprescindibles la validación de métodos analíticos y estudios de estabilidad para la autorización de comercialización de Productos Farmacéuticos, donde un requisito imprescindible es la validación de los métodos y los estudios de estabilidad de medicamentos, dentro de estos estudios esta la validación de los métodos analíticos indicadores de estabilidad.

Tabla 2. Guías de diferentes países sobre estudios de estabilidad y validación de métodos analíticos para medicamentos

País	Documento	Requisito para obtención de Registro Sanitario
Perú	Resolución Ministerial-DIGEMID-MINSA (Ministerio de Salud, 2009)	Evaluación de la Estabilidad de Medicamentos
Chile	Instructivo para completar la solicitud manual de Registro Simplificado de Producto Farmacéutico (SRS) Fuente: (Medicamentos, 2013, pág. 6)	La metodología analítica deberá presentar validación (o test de adecuación, según sea el caso) en todos aquellos casos que no se encuentre descritas en las farmacopeas oficialmente reconocidas.
El Salvador	Guía del usuario para la inscripción de nuevo Registro Sanitario De Medicamento Fuente: (Salvador, 2018, pág. 8)	El etiquetado de los medicamentos, los documentos de estabilidad, de equivalencia terapéutica y de validación de métodos analíticos

Venezuela	Registro Sanitario de Especialidades Farmacéuticas Categoría esencial Fuente: (Sanitarios, 2004, pág. 48)	Los métodos de análisis deben presentar exactitud, precisión, reproducibilidad, especificidad, linealidad y robustez e incluir todas las especificaciones de calidad del Producto Terminado.
México	Autorización de medicamentos, registro, renovación y modificaciones. (Salud, 2013, pág. 44)	6.18.15 Control de proceso de acondicionado y liberación de producto terminado (combo), certificados de análisis, y métodos de análisis para producto terminado y las validaciones de métodos correspondientes.
Paraguay	Ley n° 1.119 de productos para la salud y otros el congreso de la nación paraguaya sanciona con fuerza de Ley (1997)	Estudio de estabilidad: conjunto de pruebas y ensayos a que se somete un producto en condiciones preestablecidas y que permitirá pronosticar o establecer su período de eficacia.
Colombia	Documento técnico guía de estabilidad de medicamentos (2010)	Los procedimientos analíticos deben estar completamente validados y ser indicadores de estabilidad.
Uruguay	Decreto N° 324/999	Descripción del método de valoración usado en el estudio

		de estabilidad.
Panamá	Medicamentos y otros Productos de Salud Humana (2019)	Estudios de estabilidad para los productos que lo soliciten por primera vez.
Costa Rica	Productos farmacéuticos. Estudios de estabilidad de medicamentos (2004)	Evaluación de la Estabilidad
Cuba	Centro para el control estatal de la calidad de los medicamentos (2000)	Evaluación de la Estabilidad
Para las Américas	Requisitos para el registro de medicamentos en las Américas. Fuente: (Farmacéutica, 2013, pág. 12)	2.2.4.4.3. PT. Validación de los métodos analíticos: b) En los productos con métodos de análisis propios del fabricante son indispensables los resúmenes de la validación que reflejen los datos experimentales de los parámetros característicos.

Fuente: Propia

1.3 Antecedentes a nivel Nacional

En Bolivia, en ese momento la entidad reguladora de medicamentos era UNIMED bajo la resolución ministerial N° 0909 del 7 de diciembre de 2005 resuelve en su artículo primero la aprobación del nuevo Manual de Registro Sanitario que en la parte de requisitos establece en el apartado 2.5.11 los Estudios de Estabilidad

Dentro de estos estudios de estabilidad deben tenerse métodos analíticos indicadores de estabilidad de acuerdo al informe 43 de la OMS y ser desarrollados si no se cuenta con la metodología analítica en farmacopeas reconocidas por Bolivia

En Bolivia se cuenta con 15 registros sanitarios de medicamentos que contienen al Ácido Acetilsalicílico como principio activo (datos de la AGEMED junio/2019)

Tabla 3. Registros Sanitarios de Ácido Acetilsalicílico en Bolivia (15 registros sanitarios de Ácido Acetilsalicílico de diferentes concentraciones 81mg, 100mg, 500mg.)

REG.	Nº	AÑO	NOMBRE GENERICICO	LABORATORIO FABRICANTE	PAIS DE ORIGEN	EMPRESA
II	37392	16/4/2014	Ácido Acetil salicílico	Quimfa s.a.	Paraguay	Quimfa Bolivia s.a.
II	37397	15/5/2014	Ácido Acetil salicílico	La Química Farmacéutica s.a.	Paraguay	Quimfa Bolivia s.a.
NN	60701	30/11/2016	Ácido Acetil salicílico	Laboratorios Febsa srl.	Bolivia	Febsa s.r.l.
NN	33648	7/11/2017	Ácido Acetil salicílico	Droguería Inti s.a.	Bolivia	Drogueria Inti s.a.
II	25987	5/3/2018	Ácido Acetil salicílico	Bayer s.a.	Argentina	Bayer Boliviana Ltda
NN	25009	4/1/2018	Ácido Acetil salicílico	Grupo Alcos s.a.	Bolivia	Grupo Alcos s.a.
NN	57907	24/2/2016	Ácido Acetil salicílico	Laboratorios s.a. "Cofar "	Bolivia	Laboratorios Cofar s.a
NN	32071	21/4/2016	Ácido Acetil salicílico	Laboratorios Cofar s.a.	Bolivia	Laboratorios Cofar s.a.
II	23263	2/1/2018	Ácido Acetil salicílico	Indufar C.I.S.A. División laboratorios indufar	Paraguay	Imfar s.r.l
NN	22073	22/3/2017	Ácido Acetil	Lab. Industriales Farmacéuticos	Bolivia	Lab. Industriales Farmacéuticos Vita

			salicílico	Vita s.a.		s.a.
II	38310	10/8/2015	Ácido Acetil salicílico	Quimfa s.a.	Paraguay	Quimfa Bolivia s.a.
NN	33657	29/8/2017	Ácido Acetil salicílico	Droguería Inti s.a.	Bolivia	Droguería Inti s.a.
NN	67868	19/12/2018	Ácido Acetil salicílico	Grupo Alcos s.a.	Bolivia	Grupo Alcos s.a.
II	25986	20/2/2018	Ácido Acetil salicílico	Bayer s.a.	Argentina	Bayer Boliviana Ltda
II	38282	7/11/2014	Ácido Acetil salicílico	Bayer s.a.	Argentina	Bayer Boliviana Ltda

Fuente: Lista de Registros Sanitarios Nacionales e Importados de la AGEMED (junio/2019)

(NN: Registros nacionales, II: Registros Importados)

En la Facultad de Ciencia Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andes, existe el trabajo de Investigación como parte de trabajo de internado:

Este estudio se justifica abordando los distintos problemas que tiene la población de nuestro país, a nivel Social por que los medicamentos son dados a pacientes con diferentes problemas de salud y las tabletas de Aspirina son de gran uso en nuestra sociedad, a nivel Político ya que en Bolivia no existen políticas claras de salud en cuanto a la estabilidad, biodisponibilidad, seguridad y eficacia de los medicamentos. (Mamani Poma, 2016) Por lo que se necesita métodos indicadores de estabilidad para evaluar esta característica.

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO INDICADOR DE
ESTABILIDAD PARA EL ANALISIS DE ACIDO ACETIL SALICILICO EN
TABLETAS POR HPLC

CAPÍTULO II

MARCO TEORICO

1. Marco Teórico

1.1 Ácido Acetilsalicílico

El ácido acetilsalicílico o ASA ($C_9H_8O_4$), conocido popularmente como aspirina, nombre de una marca que pasó al uso común, es un fármaco de la familia de los salicilatos. Se utiliza como medicamento para tratar el dolor (analgésico), la fiebre (antipirético) y la inflamación (antiinflamatorio), debido a su efecto inhibitorio, no selectivo, de la ciclooxigenasa. Tiene problemas reportados como salicilismo, acidosis metabólica, hemorragia gastrointestinal, nefropatías, trombocitopenia, anemia aplásica y agranulocitosis, por lo que su estabilidad. (Sweetman S. C., 2009)

La aspirina es uno de los medicamentos más utilizados en el mundo, con un consumo estimado en 40 000 toneladas anuales, o lo que es lo mismo, entre 50 000 y 120 000 millones de comprimidos. Está en la lista de medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la Salud, donde se clasifican los medicamentos básicos que todo sistema de salud debería tener.

La aspirina también está disponible como medicamento genérico y el coste al por mayor en los países desarrollados en 2014 era de entre 0,002 y 0,025 dólares (USD) por dosis. En el caso de Estados Unidos, en 2015 un mes de medicación tenía un coste de media menor a 25 dólares (USD). (Igual, 2019). La aspirina hoy es un fármaco registrado en más de 70 países del mundo. Desde su comercialización se han consumido más de trescientos cincuenta billones de comprimidos (350 000 000 000 000 de comprimidos) y se estima que el consumo diario es de unos cien millones de aspirinas (100000000 comprimidos/día). (Licencia Creative Commons, 2019)

Consecuentemente, es uno de los fármacos más usados en el mundo, con un consumo estimado de más de 100 toneladas métricas diarias. Actualmente, el 100 % de la producción mundial de ácido acetilsalicílico manufacturada por Bayer se realiza en Langreo, España, en una planta química de esta empresa multinacional. Desde allí se envía a diferentes partes del mundo donde se preparan los comprimidos y diferentes formas farmacéuticas en las que se vende la Aspirina. (Igual, 2019)

En nuestro país en el LINAME 2018-2020 (Listado Nacional de Medicamentos Esenciales) están descritas dos formas farmacéuticas como se muestra a continuación:

Tabla 4. Inclusión del Ácido Acetilsalicílico en el LINAME 2018-2020 Bolivia

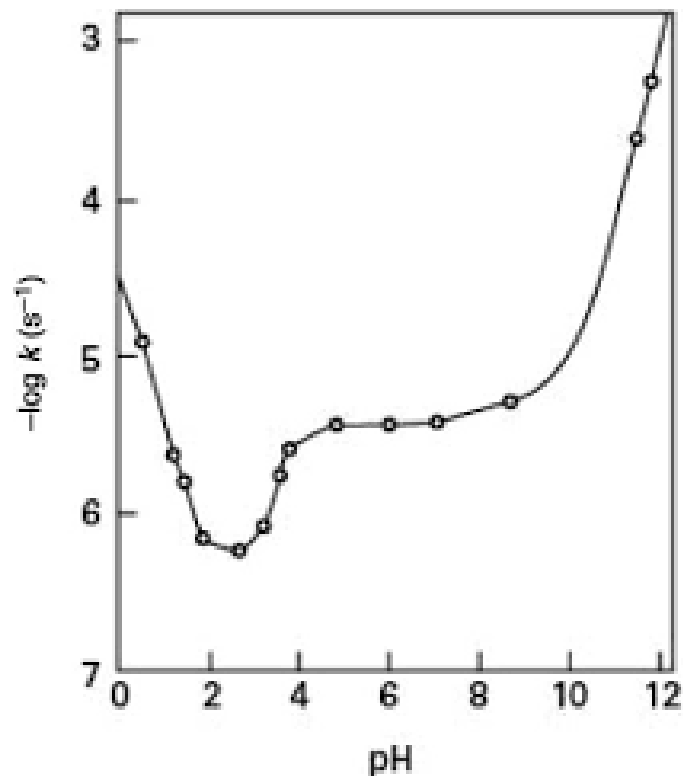
Código	Código			Medicamento	Forma Farmacéutica	Concentración	Classific. A.T.Q.
B0101	B	01	01	Ácido acetil salicílico	Comprimido	100 mg	B01AC06
N0201	N	02	01	Ácido acetil salicílico	Comprimido	500 mg	N02BA01

Fuente: LINAME 2018-2020

1.2 Estabilidad Química del Acido Acetilsalicílico

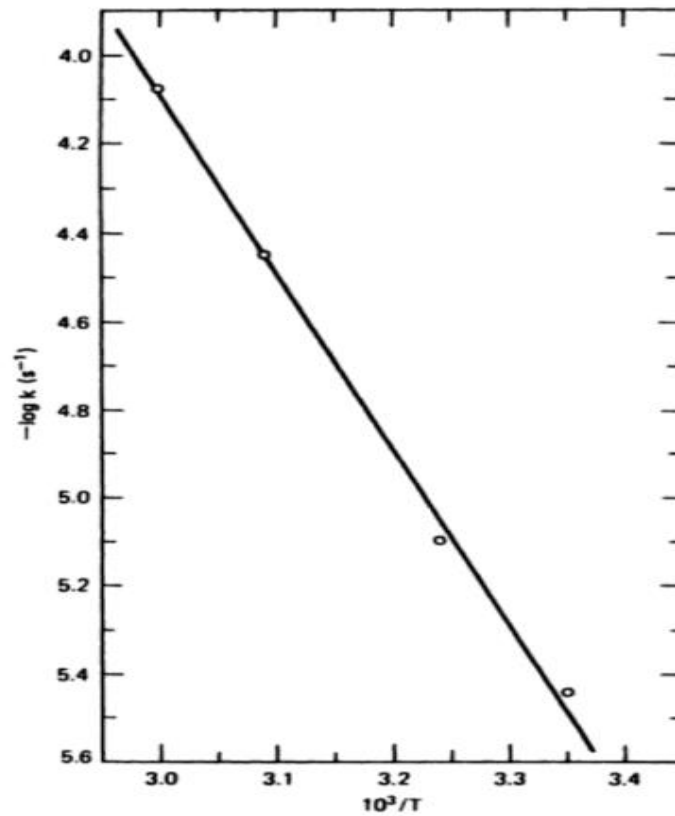
La Aspirina químicamente es un éster aromático tiene un grupo carboxílico, por lo tanto, es relativamente inestable hacia la hidrólisis y otras transferencias de acilo. Su perfil de pH revela una catálisis específica de ácido-base de hidrólisis, más una curva sigmoidea pronunciada que resulta de la hidrólisis del anión aspirina. (Connors, 1986)

Gráfica 1. Perfil de degradación pH dependiente de la Aspirina



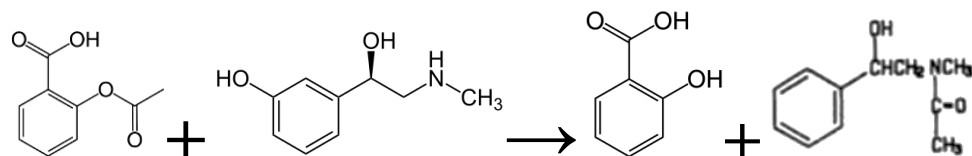
Fuente: (Connors, 1986)

Gráfica 2. Grafica de arrehnius para la hidrolisis de aspirina a pH=5,5

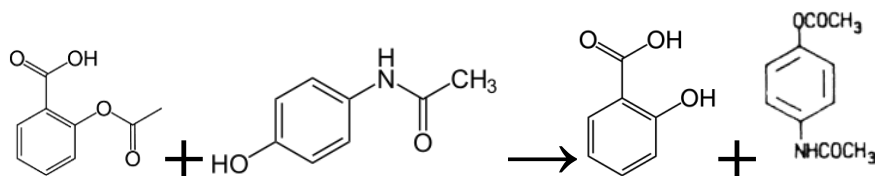


Fuente: (Connors, 1986)

La aspirina es un agente acetilante, ya que es un acetato de fenil sustituido. Puede reaccionar con las aminas y los grupos hidroxilo para producir la correspondiente aspirina y fenilefrina, n-acetilfenilefrina y, en condiciones más severas, puede producirse diacetilación y triacetilación. (Connors, 1986)

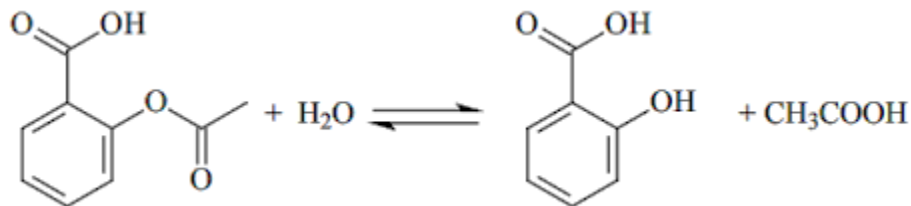


El estearato de magnesio facilita la transferencia de acilo. Se ha informado que la aspirina y el acetaminofeno en mezclas dan diacetil-para-aminofenol en una reacción acelerada por estearato de magnesio (Connors, 1986)



Las tabletas de aspirina que contienen 1% de humedad producen un miligramo de ácido salicílico por cada 200 mg de aspirina (Connors, 1986)

La reacción de degradación del ácido acetilsalicílico que genera dos productos el ácido acético y el ácido salicílico es la siguiente:



1.3 Propiedades Químicas del Ácido Acetilsalicílico

Tabla 5. Propiedades Químicas del ACIDO ACETILSALICILICO

Punto de fusión	134-136 ° C (encendido)
Punto de ebullición	272,96 ° C (estimación aproximada)
Densidad	1,35
índice de refracción	1.4500 (estimación)
Fp	250 ° C
Temperatura de almacenamiento.	Almacenar a T Ambiente.
Solubilidad	H2O: 10 mg / mL a 37 ° C

Formar	crystalino
Color	blanco
Pka	3,5 (a 25 °C)
Solubilidad del agua	3,3 g / L (20 °C)
Merck	14,851
BRN	779271
Estabilidad:	Estable. Mantener seco. Incompatible con agentes oxidantes fuertes, bases fuertes, ácidos fuertes, varios otros compuestos como yoduros, sales de hierro, sales de quinina, etc.
Propiedades químicas	Este producto es un cristalino blanco, con punto de fusión 138 ~ 140 °C, insoluble en agua, soluble en alcohol, éter, etc.

Fuente: (Book, Chemical Book, 2019)

Tabla 6. Constante de Velocidad de la Aspirina en Kcal/mol

Constante de Velocidad	Ea (Kcal/mol)
K_H	16,7
k'	16,4
K^-	17,6
K_{OH}	12,5

Fuente: (Connors, 1986)

Tabla 7. Energía de Activación del Ácido Acetilsalicílico

	Stage	$\lambda/\%$	E/KJmol ⁻¹	ln A/min ⁻¹	n	m
Ácido Acetilsalicílico	I	69,2	24,7±0,9	5,44±0,14	2	3/2
Ácido	II	28,3	58,3±2,4	13,59±0,34	2	2/3

Acetilsalicílico						
------------------	--	--	--	--	--	--

Fuente: (Bogdan Tița, Adriana Fulias, Eleonora Marian, Dumitru Tița, 2009)

1.4 Propiedades Químicas del Ácido Salicílico

Tabla 8. Propiedades Químicas del ACIDO SALICILICO

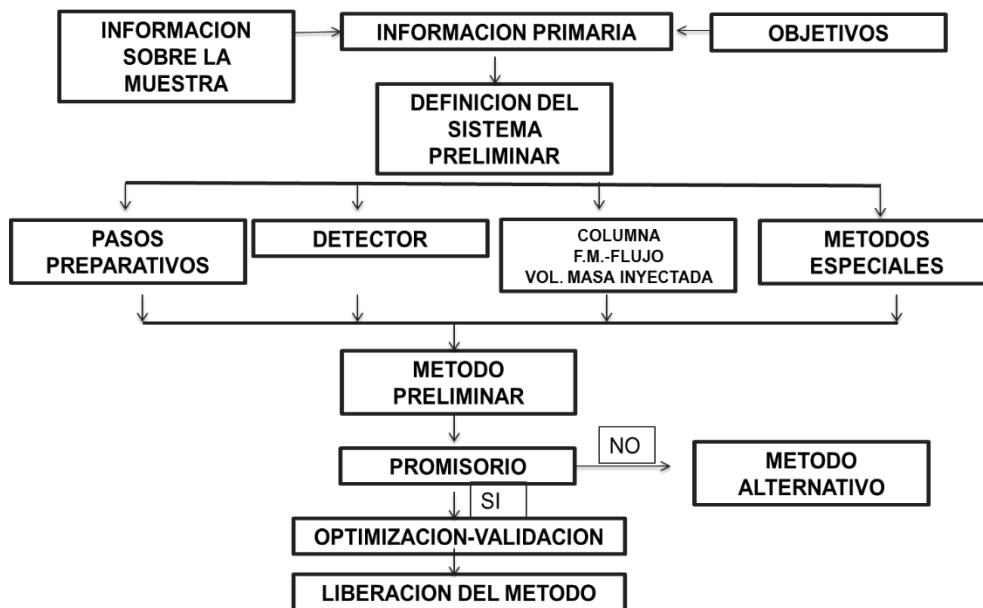
Punto de fusión	158-161 ° C (encendido)
Punto de ebullición	211 ° C (encendido)
Densidad	1,44
índice de refracción	1,565
Punto de Fusión	157 ° C
Temperatura de almacenamiento.	Almacenar a T Ambiente.
Solubilidad	etanol: 1 M a 20 ° C, transparente, incoloro
Pka	2,98 (a 25 ° C)
Forma	Sólido
pH	2.4 (H ₂ O) (solución saturada)
Solubilidad del agua	1,8 g / L (20 ° C)
Sensible	Sensible a la luz
λ _{max}	210nm, 234nm, 303nm
Sublimación	70 ° C
Estabilidad:	Estable. Las sustancias que deben evitarse incluyen agentes oxidantes, bases fuertes, yodo, flúor. Combustible. Sensible a la luz.

Fuente: (Book, Chemical Book, 2019)

2. Desarrollo de Métodos Analíticos

El desarrollo de métodos analíticos es la aplicación armónica y secuencial de un conjunto de conocimientos, métodos y procesos con el fin de lograr alcanzar un objetivo de análisis específico (Oscar Alberto Quattrocchi, Sara Inés Abelaira de Andrizzi, Raúl Felipe Laba, 1992)

Gráfico 1. Esquema de Desarrollo de Métodos Analíticos



Fuente: (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

Para el desarrollo de un método analítico de identificación, screening o cuantificación, se puede realizar las siguientes condicionantes:

Cuál es el nivel presente (macro o microcomponente), cuál es la precisión requerida, cuantos componentes se desea valorar, cuantas muestras se desea procesar, identidad de los componentes de interés, rango de pesos moleculares de los componentes de interés, estructura química, pKa, solubilidad, espectros UV, concentración teórica de los componentes de interés y Naturaleza de la matriz (sangre, cremas, tabletas, jarabes, suspensiones) (Oscar Alberto Quattrocchi, Sara Inés Abelaira de Andrizzi, Raúl Felipe Laba, 1992)

3. Diseños Experimentales de Plackett-Burman

Los diseños experimentales de Plackett-Burman son quizás los más empleados. Permiten evaluar la influencia a dos niveles de 3 a 23 factores con Factores+1 experimentos (un número superior a 24 ensayos se considera impracticable) sin tener en cuenta las posibles interacciones combinadas entre ellos. Para generar la matriz que permite construir el diseño solo es necesario conocer la distribución de la primera columna de cada matriz, que sería la siguiente (AEFI, 2001)

Tabla 9. Diseño Experimental de Plackett-Burman

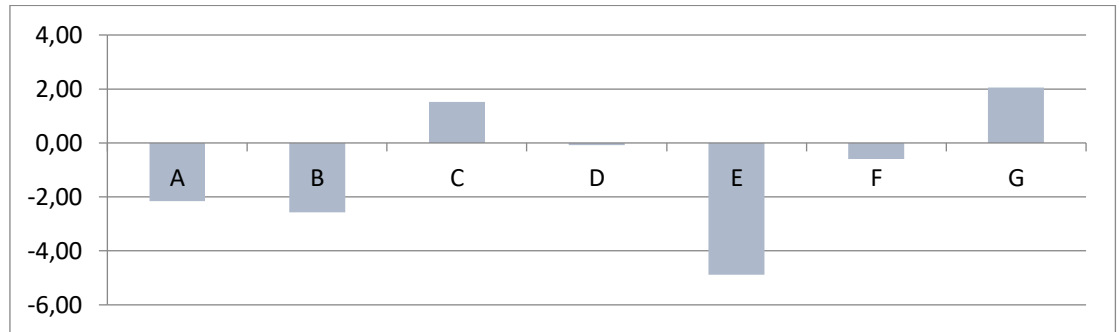
EXP	A	B	C	D	E	F	G	RESPUESTA
1	+	-	+	+	-	-	+	R1
2	+	+	-	+	+	-	-	R2
3	-	+	+	-	+	+	-	R3
4	-	-	+	+	-	+	+	R4
5	+	-	-	+	+	-	+	R5
6	+	+	-	-	+	+	-	R6
7	-	+	+	-	-	+	+	R7
8	-	-	-	-	-	-	-	R8

Fuente: Propia

Para poder determinar la influencia de los factores tanto en sus niveles positivos o negativos se obtiene el efecto (E_i) de las respuestas.

$$E_i = \frac{\sum_{i=1}^n R(+)}{N_{exp}/2} - \frac{\sum_{i=1}^n R(-)}{N_{exp}/2}$$

El signo del efecto determina si el factor influye más estando en su nivel negativo o positivo, esto ayuda a decidir en que nivel debe estar el factor para optimizar el diseño de acuerdo a la respuesta obtenida. Esto se evidencia en la gráfica de efectos como se muestra a continuación:



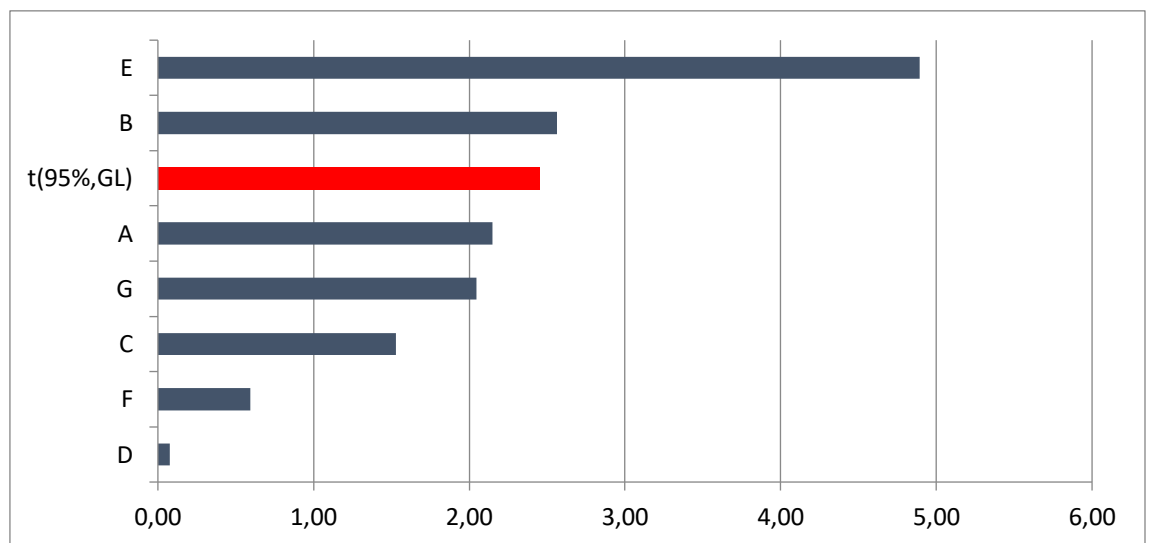
Luego se obtiene la varianza de los efectos (E_i)

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n E_i^2}{n(\text{factores})}$$

Para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa se realiza la prueba de “t” de Student con el valor de los efectos y su desviación estándar

$$t_i = \frac{E_i(nf - 1)^{1/2}}{S}$$

Posteriormente se ordenan de manera decreciente los valores de “t” de Student y se compran con un valor de “t” crítico generalmente al 95% de Nivel de Confianza



4. Elección de las condiciones cromatográficas

Para determinar el pH de la fase móvil se utiliza el pKa de las moléculas en el análisis se intenta que estas estén asociadas (no ionizadas) para tener una distribución equitativa en los platos teóricos de la columna. (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

Para la elección de la columna cromatográfica se utiliza criterios de polaridad de las moléculas y las características de la fase estacionaria se están octadecilsilano (C18), fenilo, octilsilano. (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

Para la elección de la longitud de onda analítica se recomienda encontrar el punto isosbestico de las moléculas de interés y sus productos de degradación. (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

Para la elección de la fase móvil se utiliza las propiedades químicas de las moléculas de interés como la solubilidad para la elección de una fase móvil capaz de tener un buen poder resolutivo y además que la línea base sea poco ruidosa.

5. Cromatografía en Fase Reversa

Este tipo de cromatografía se basa en que la fase móvil tiene un comportamiento polar y la fase estacionaria un comportamiento apolar en la corrida cromatográfica.

Las ventajas de la cromatografía en fase reversa pueden resumirse así:

- Compuestos no iónicos, iónicos e ionizables pueden ser separados en la misma columna, con la misma fase móvil.
- La fuerza de atracción superficie no polar-soluto es débil.
- La adsorción irreversible, frecuente en silicagel, raramente ocurre.
- La fase móvil predominante es agua, abundante y económica.
- El modificador orgánico predominante es el metanol

El tipo de sustituyente más empleado en fase reversa es de tipo alquílico, especialmente C18 y en menor proporción C8. (Quattrocchi, Abelaira de Andrizzi, & Laba, 1992)

6. Parámetros Cromatográficos

La nomenclatura en cromatografía fue estandarizada por la American Society for Testing and Materials, ASTM y la International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC y es, naturalmente, materia de constante debate y actualización (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

6.1 Resolución (R)

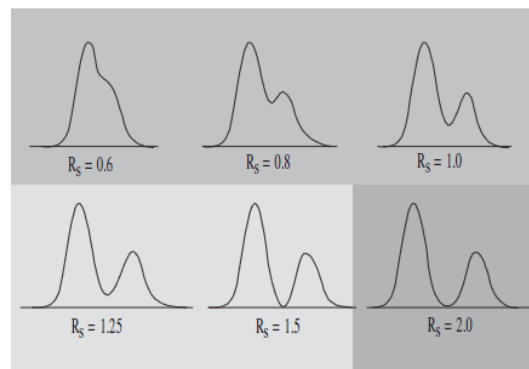
Esta expresión, la resolución, se calcula por cada par de picos adyacentes como:

$$R = \frac{t_2 - t_1}{\frac{1}{2}(w_2 + w_1)}$$

Fórmula 1. Resolución Cromatográfica

La resolución entre picos es una medida cuantitativa de la separación entre picos que es necesaria para la correcta separación de picos

Gráfico 2. Resolución en cromatogramas



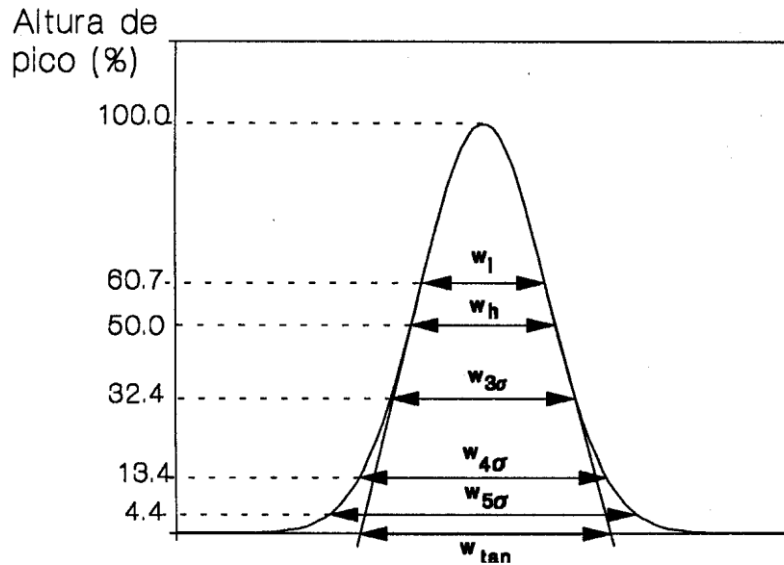
Fuente: (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

6.2 Ancho de pico (w)

Esta medición se puede efectuar con varios objetivos: para calcular la eficiencia de la columna (platos teóricos), la resolución, para el cálculo manual del área de picos y en algunos integradores electrónicos se ingresa como dato de ajuste de integración.

(Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

Imagen 1. Curva de Gauss. El área definida por $\mu \pm \sigma$ corresponde al 68 % del total, el de $\mu \pm 2\sigma$ al 95% y el de $\mu \pm 3\sigma$, al 99.7% del área total bajo la curva



Fuente: (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

6.3 Platos Teóricos

Cada corte se llamó "plato" y su espesor "altura equivalente del plato teórico" (H o HEPT). Entonces, para una columna de longitud L, con N platos teóricos, la altura del plato resulta:

Fórmula 2. Altura equivalente del Plato Teórico

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

La eficiencia de una columna cromatográfica y por lo tanto su "poder" separativo se mide en función de su número de platos teóricos.

Fórmula 3. Número de Platos Teóricos

$$N = \left(\frac{t_n}{w_{tan}}\right)^2$$

H (y consecuentemente N) depende no sólo el diámetro, morfología y calidad de la partícula y otros (Oscar Alberto Quattrocchi, Sara Inés Abelaira de Andrizzi, Raúl Felipe Laba, 1992)

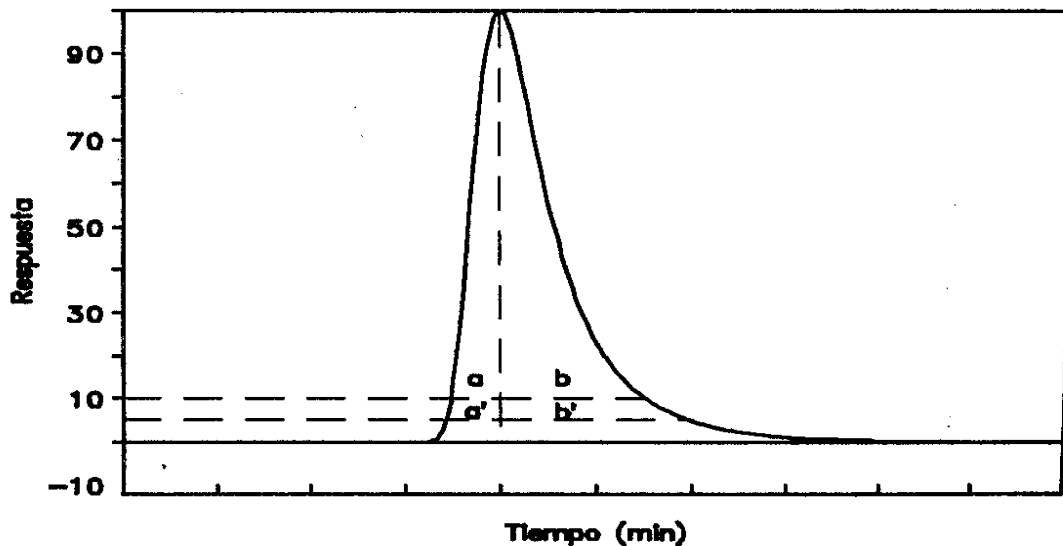
6.4 Asimetría (As)

La asimetría (tailing) es una de las formas más comunes de alejamiento de la curva gaussiana y su medición es importante puesto que puede llevar, de acuerdo a su magnitud, a errores considerables de cuantificación, e incluso a oscurecer picos adyacentes.

Fórmula 4. Cálculo de Factor de Asimetría

$$As5\% = \frac{b'}{a'} \qquad As10\% = \frac{b}{a}$$

Imagen 2. Representación de Cromatograma indicando a y b para cálculo de asimetría



Fuente: (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

7. Detectores Generales Utilizados en Cromatografía

El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite "ver" y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica. (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

8. Solventes en HPLC

Las propiedades más importantes son:

- Alto poder solubilizante de las muestras, Baja reactividad, Compatibilidad con el detector utilizado, Adecuado punto de ebullición, Baja viscosidad, Seguridad, pureza

Todas estas características se detallarán a continuación conjuntamente con las propiedades químicas que se deben evaluar para seleccionar un solvente. (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

8.1 Compatibilidad con el Detector

Compatibilidad con el detector utilizado Teniendo en cuenta que el detector de HPLC más difundido es el espectrofotométrico, es habitual elegir un solvente "transparente" a la longitud de onda de trabajo. Esa transparencia puede evaluarse por la longitud de onda de corte (λ_c). (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

8.2 Viscosidad

La viscosidad de los solventes está estrechamente relacionada con la presión del sistema.

La presión en una columna se puede calcular como:

Fórmula 5. Formula Para calcular la presión de una columna cromatográfica

$$P = \frac{2lfL}{dp^2D^2}$$

Fuente: (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

Donde "P" es la presión medida en atmósferas que se obtiene con agua a un caudal de 1 mL/min, "f" es un factor que vale 1000 para columnas de acero, "L" es la

longitud de la columna medida en cm, “dp” es el tamaño de las partículas expresada en μm y “D” es el diámetro interno de la columna medido en mm.

Para determinar la presión utilizando otro solvente, basta relacionar la presión en agua con la relación de las viscosidades entre el agua y el solvente en cuestión. (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

9. pH y pH aparente

El valor del pH de la fase móvil puede ser un parámetro crítico en la retención de solutos ionizables y en algunos casos, debe controlarse rigurosamente.

Podemos definir el pH, en términos termodinámicos, como:

Fórmula 6. Fórmulas para cálculo de pH

$$pH = -\log mh \gamma m \qquad pH = pHb + \frac{Ex - Eb}{0,0592}$$

Fuente: (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

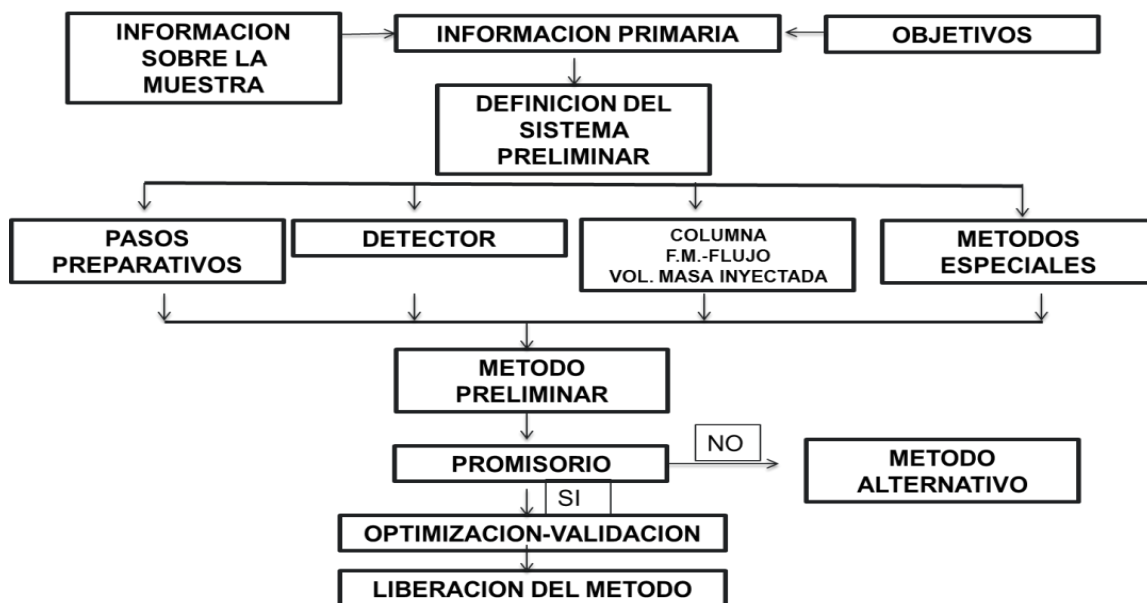
Por su parte el pH operacional medido: Donde mh es la concentración molal de protones, y su coeficiente de actividad, pH" el pH a medir, pHb el pH del buffer de calibración, E" la f.e.m. medida en la solución desconocida y B, la f.e.m. medida con el buffer.

10. Metodología para el Desarrollo de Métodos Analíticos

Se basa en el estudio de las propiedades químicas de los analitos de interés para establecer la variación de las condiciones cromatograficas como longitud de onda, fase móvil, diluyente, pH, columna cromatografica, utilización de buffers. (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

Una vez completada esta información, podrá definirse un sistema preliminar.

Gráfica 3. Pasos en el Desarrollo de Métodos por HPLC



Fuente: (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

11. Definición del Sistema Preliminar de Análisis

El primer punto a evaluar durante la definición del sistema preliminar consiste en determinar qué pasos preparativos pueden necesitarse para mantener el analito en solución, en la concentración adecuada. En muchos casos la preparación puede ser tan simple como la extracción líquido-líquido o líquido-sólido y en otros, pueden necesitarse varios pasos de preconcentración previos como se menciona en el punto “2.2.14 preparación de la muestra”

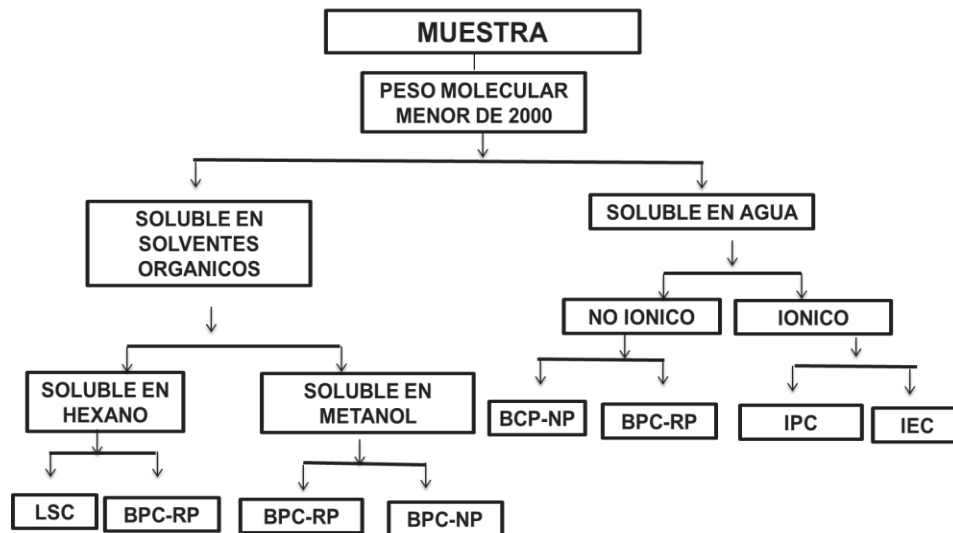
El segundo punto a considerar es el detector a utilizar. El detector de primera elección y el más empleado es el UV, por su simplicidad de uso, robustez y confiabilidad. (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

12. Peso Molecular de los Analitos de Interés

12.1 Análisis de Compuestos de Peso Molecular Menor de 2000 g/mol

Cuando el analito tiene peso molecular menor de 1000 o 2000 Daltons los caminos, indicados en el “Gráfico 3”, son totalmente distintos. (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

Gráfico 2. Árbol de decisiones para Analitos de Peso Molecular Menor a 2000 g/mol



Fuente: (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

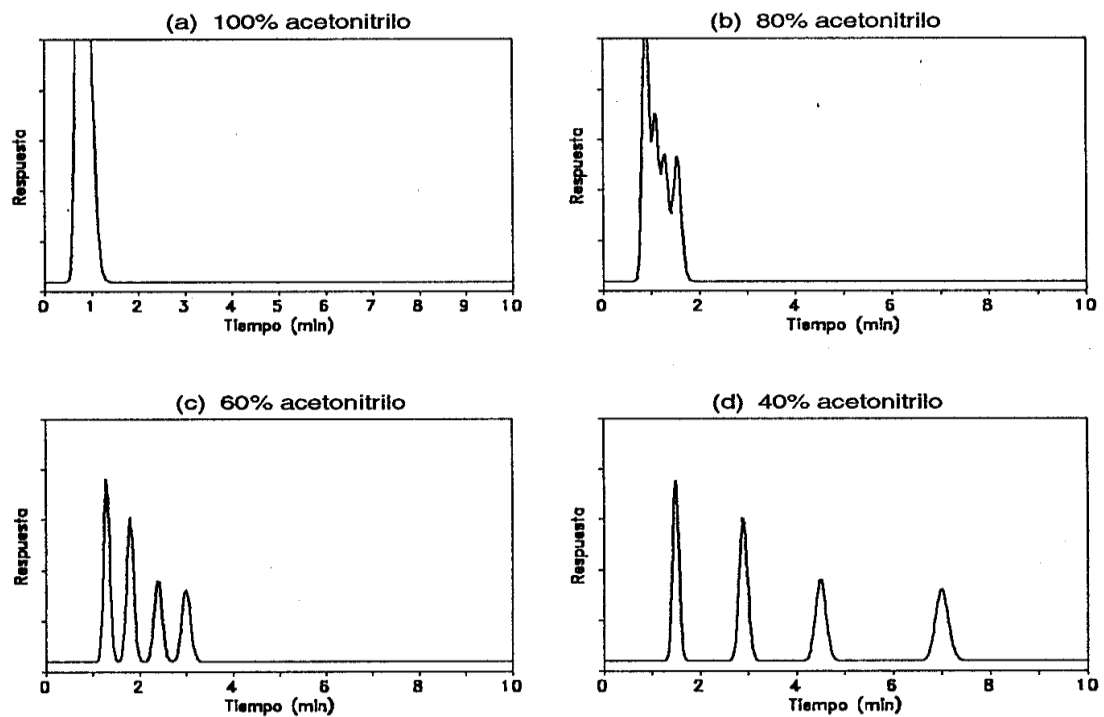
12.2 Fase reversa

Decidido el punto de partida, es claro que deberá definirse un sistema: tipo y características de la columna, fase móvil, caudal, detector, y masa a inyectar, por ejemplo:

- Columna silicagel químicamente unida a ODS (C18).
- Fase móvil mezcla agua-modificador (MeOH o AcN).
- Caudal 1.0 ml/min
- Detección UV a longitud de onda correspondiente al máximo de absorción de 190-210 nm o 254 nm para muestras desconocidas.

- Muestra hasta 100 µg en 20 µl.

Gráfico 3. Ajuste de la concentración de modificador orgánico para aumentar la resolución



Fuente: (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

12.3 Análisis de Compuestos Disociables

De existir compuestos acíclicos, básicos o ambos simultáneamente, se observarán fenómenos mixtos de retención debidos a la presencia de sus formas iónica y no iónica en un medio pobremente regulado:





Por ejemplo, según la ecuación de Henderson-Hasselbalch, si el pK de la base es 7 deberá llevarse el pH a 9 para asegurar que el 99 % de la misma se encuentre en el estado no disociado

Fórmula 7. Formula de Henderson Haselbach para soluciones amortiguadoras

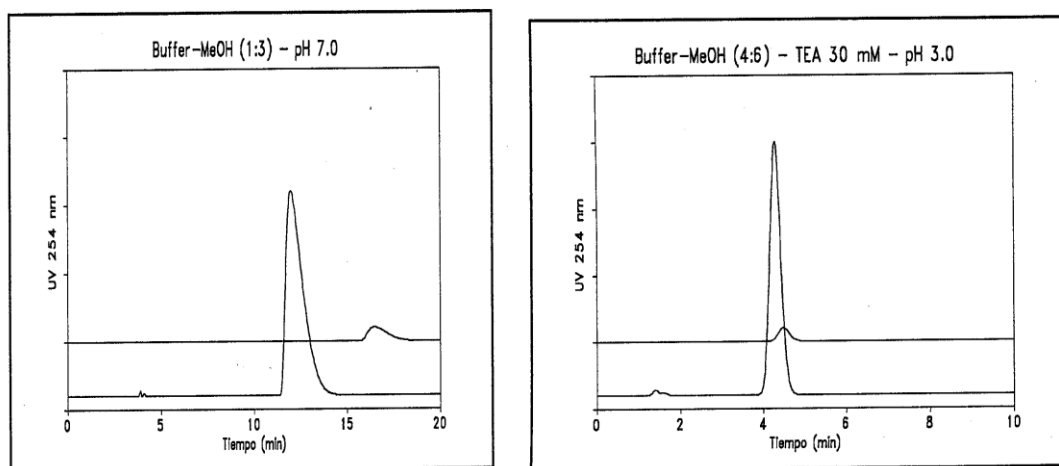
$$pH = Pka + \log \frac{Cs}{Ca}$$

Fuente: (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

En general, la adición de una amina terciaria, por ejemplo 30 mM de trietilarnina (TEA), es suficiente para la corrección del cromatograma, Lógicamente, si el analito fuera una base de igual o mayor fuerza que la TEA puede ser necesario aumentar la concentración de TEA o emplear una amina más fuerte.

La “Imagen 3” muestra el efecto del pH y del agregado de una base sobre los cromatogramas de una base nitrogenada. Se trata de una dilución de la misma solución, en una columna de Cl 8, con una fase móvil hidroalcohólica de pH regulado a 7,0 con buffer de fosfatos.

Imagen 3. Separación y mejoramiento de la simetría con el añadido de TEA de una base nitrogenada



Fuente: (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

Ácidos: pH 7,0 - 7,5 regulado con buffer de fosfatos, hidróxido de tetrabutilamonio 5 mM en agua - metanol (20:80). La proporción de metanol se reduce gradualmente como para las bases.

La separación se puede regular con la longitud de la cadena hidrocarbonada del contraíón (por ejemplo, butanosulfonato hasta dodecilsulfonato de sodio para las bases), su concentración (0 a 200 mM), y la fuerza iónica a través de la concentración del buffer. De observarse asimetría con compuestos básicos, puede corregirse agregando trietilamina hasta 1/5 de la concentración del reactivo de apareamiento iónico.

Tabla 10. Sistemas Cromatográficos según el tipo de Muestra

Compuestos	Método de Elección	Columna	Fase Móvil/Aditivos
Neutros No iónicos	BPC-RP ó RP	C ₁₈ -C ₈ Phe-CN	Agua-Modificador (MeOH-ACN-THF)
Ácidos Débiles	RPLC control de la ionización	C ₁₈ -C ₈ Phe-CN	Agua-Modificador ácido fosfórico pH3- 3,5
Bases Débiles	RPLC	C ₁₈ -C ₈ Phe-CN	Agua-Modificador 30mM trietilamina
Iónicos e ionizables	RPLC de apareamiento iónico	Preferida C ₁₈ Alternativa C ₈ -CN	Agua-MeOH Alquilsulfonatos pH 3,5 (bases) tetraalquilamonios pH 7,5 (ácidos)
Lipofílicos Insolubles en solventes hidroalcolólicos	LSC	CN-NH ₂ Silica	Solventes no polares
Iones inorgánicos Aminoácidos Péptidos, derivados	IEC	SAX-SCX Base silica ó polimérica	Agua-modificador pH controlado, fuerza iónica controlada

de ácidos nucleicos			
Macromoléculas	SEC IEC	Base silica ó polimérica	Acuosos (GFC) Orgánicos (GPC)
Esterioisómeros Isómeros de posición	LSC	Silica	Solventes no polares
Esterioisómeros (isómeros ópticos)	Columna Quiral RPLC	Silica	Solventes no polares
Carbohidratos	Columna Amino	NH ₂	Agua-modificador

Fuente: (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

Tabla 11. Aplicaciones de Diferentes Columnas Cromatográficas

MODIFICACION	GRUPO LIGADO A SILICAGEL	APLICACIONES, COMENTARIOS
C1	-CH3 Metil	-En fase reversa para compuestos muy retenidos en C18
C2	-CH2-CH3 Etil	-Análisis más rápido que con C18 -Análisis de péptidos y proteínas
C4	-(CH2)3-CH3 Butil	
C6	-(CH2)5-CH3 Hexil	
C8	-(CH2)7-CH3 Octil	-En fase reversa de empleo general. algo menos en IPC menos retentiva y más rápida que C18
C18	-(CH2)17-CH3 octadecil (ODS)	-Fase reversa y IPC de empleo general. -Es el relleno más utilizado en fase reversa y HPLC

FENIL (Phe)	-(CH ₂) ₃ -Phe-Metil	Fase reversa y ICP (menos). Para compuestos moderadamente polares -Retención similar a la C ₈ , pero con mayor selectividad hacia grupos aromáticos
CIANO (CN)	-(CH ₂) ₃ -CN Cianopropil	RP (solventes polares) y NP (solventes no polares) -Retención moderada, selectiva hacia dobles y triples enlaces
NITRO (NO₂)	-(CH ₂) ₃ -Phe-NO ₂ Nitrofenilpropil	Separación de compuestos con dobles enlaces y aromáticos
AMINO (NH₂)	-(CH ₂) ₃ -NH ₂ Aminopropil	En NP como alternativa de selectividad a CN,NO ₂ y Silicagel En RP en análisis de carbohidratos En IEC como intercambiador aniónico débil, incompatible con cetonas y aldehídos
DIOL (OH)	OH-R-OH	NP, RP, y SEC menos polar que la silicagel no modificada, pero mas polar que la CN Retención moderada en RP. Menos Estable
N(CH₃)₂	-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂	Intercambiador anicónico débil (WAX)
-SO₃Na	-(CH ₂) ₃ -Phe-SO ⁻ ₃	Intercambiador catiónico fuerte (SCX)
-N(CH₃)₃⁺	-(CH ₂) ₃ -PheN(CH ₃) ⁺	Intercambiador anicónico fuerte (SAX)
-COONa⁺	COO ⁻	Intercambiador catiónico débil (WCX)

Fuente: (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

13. Validación de Métodos Analíticos

Según la Farmacopea de los Estados Unidos (USP-37) la validación de un procedimiento analítico es: “el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas” (Expertos, 2014)

Los parámetros fundamentales para la Validación de un método Analítico son los siguientes:

-Especificidad y Selectividad, Linealidad e Intervalo de Análisis, Precisión, Exactitud, Límite de Detección, Límite de Cuantificación y Robustez

14. Datos requeridos para la Validación

14.1 Categorías

14.2 Categoría I

Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.

14.3 Categoría II

Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos procedimientos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.

14.4 Categoría III

Procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño (p.ej. disolución, liberación de fármacos, etc.).

14.5 Categoría IV

Pruebas de identificación.

Tabla 12. Datos requeridos para la Validación de Métodos Analíticos

Características de Desempeño Analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis Cuantitativos	Pruebas de Límite		
Exactitud	Sí	Sí	*	*	No
Precisión	Sí	Sí	No	Sí	No
Especificidad	Sí	Sí	Sí	*	Sí
Límite de Detección	No	No	Sí	*	No
Límite de Cuantificación	No	Sí	No	*	No
Linealidad	Sí	Sí	No	*	No
Intervalo	Sí	Sí	*	*	No

Fuente: USP-37

15. Especificidad

Los documentos de ICH definen especificidad como la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz. La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual puede compensarse usando otros procedimientos analíticos complementarios (Expertos, 2014)

15.1 Linealidad e Intervalo de Análisis

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras dentro de un intervalo dado. (Expertos, 2014)

15.2 Precisión

La precisión de un procedimiento analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. La precisión de un procedimiento analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad del procedimiento analítico en condiciones normales de operación. (Expertos, 2014)

Para establecer si un método es preciso en sus diferentes componentes se tiene la tabla de Coeficientes de Variación Máximos Acéptales (AEFI, 2001)

Tabla 13. Coeficientes de Variación Máximos Aceptables

INTERVALO DE ACEPTACION		CV(%) máximo aceptable				
Lim.Inf	Lim.Sup.	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5
99	101	0,39	0,55	0,67	0,78	0,87
98,5	101,5	0,58	0,82	1,01	1,16	1,30
98	102	0,78	1,10	1,34	1,55	1,73
95	105	1,94	2,74	3,36	3,88	4,33
90	110	3,88	5,48	6,71	7,75	8,67
85	115	5,81	8,22	10,07	11,63	13,00

Fuente: A.E.F.I.

15.3 Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero. La exactitud de un procedimiento analítico debe establecerse en todo su intervalo. (Expertos, 2014)

15.4 Limite de Detección

El límite de detección es una característica de las pruebas de límite. Es la cantidad mínima de analito que puede detectarse en una muestra, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas. Las pruebas

de límite simplemente comprueban que la cantidad de analito se encuentra por encima o por debajo de un nivel determinado. El límite de detección se expresa habitualmente como concentración de analito (p.ej., porcentaje, partes por billón) en la muestra. (Expertos, 2014)

15.5 Limite de Cuantificación

El límite de cuantificación es una característica de las valoraciones cuantitativas de compuestos que se encuentran en baja concentración en la matriz de una muestra, tales como: impurezas en fármacos a granel y productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas. El límite de cuantificación se expresa habitualmente como concentración de analito (p.ej., porcentaje, partes por billón) en la muestra. (Expertos, 2014)

15.6 Robustez en el Desarrollo de Métodos Analíticos

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para no ser afectado por variaciones pequeñas, aunque deliberadas, en los parámetros del procedimiento indicados en la documentación, y provee una indicación de su aptitud durante condiciones normales de uso. La robustez puede determinarse durante la etapa de desarrollo del procedimiento analítico. (Expertos, 2014)

15.7 Estabilidad Química

Es la extensión de tiempo en la que una molécula en solución puede ser analizada sin tener resultados que sean variables a causa de degradación de la solución. (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

15.8 Métodos Analíticos Indicadores De Estabilidad

Procedimientos analíticos validados, que pueden detectar los cambios con el tiempo en las propiedades químicas, físicas y microbiológicas del IFA o PFT y que son específicos en cuanto al contenido del IFA, productos de degradación, y otros componentes de interés pueden ser medidos con precisión y sin interferencias. (Especificaciones C. d., Informe 43 de la Organización Mundial de la Salud (OMS), 2003)

Para poder determinar la capacidad del método analítico indicador de estabilidad una vez desarrollado se somete al analito estándar a condiciones extremas como temperatura, hidrólisis ácida, hidrólisis básica, oxidación, termólisis de las cuales en la hidrólisis alcalina.

La temperatura para los ensayos se determina a partir de su Energía de Activación de tal manera de que en un tiempo determinado se consuma un 90% del analito de interés y genere sus productos de degradación y se puedan separar por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que es en general el método analítico de elección para determinar la estabilidad química de moléculas

Una vez desarrollado el método a través de un diseño experimental de tipo Plackett and Burman que constituye el estudio de robustez (en niveles positivos y negativos de los factores) se establece las condiciones cromatográficas como pH de la fase móvil, flujo de la Fase Móvil, concentración del Buffer, longitud de onda analítica, columna cromatográfica, diluyente de los analitos, proporción de la fase móvil dentro de un Cromatograma, donde el parámetro para determinar la separación entre picos cromatográficos es la resolución.

Una vez desarrollado el método analítico se procede con su validación para establecer los parámetros de especificidad, linealidad e intervalo, exactitud, precisión, límite de detección y límite de cuantificación

Finalmente se desafía el método analizando un medicamento cuyo límite de producto de degradación este especificado en una farmacopea reconocida.

15.9 Método de Análisis para Ácido Acetilsalicílico en tabletas USP-37

Se describe el siguiente método de análisis en la USP-37.

Valoración:

-Fase móvil: Disolver 2 g de 1-heptanosulfonato de sodio en una mezcla de 850 mL de agua y 150 mL de acetonitrilo y ajustar con ácido acético glacial a un pH de 3,4.

-Solución de dilución: Preparar una mezcla de acetonitrilo y ácido fórmico (99:1).

-Preparación estándar: Disolver una cantidad de ER Aspirina USP, pesada con exactitud, en Solución de dilución para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 0,5 mg por ml.

-Preparación de valoración: Pesar y reducir a polvo fino no menos de 20 Tabletas. Transferir una cantidad del polvo pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 100 mg de aspirina, a un recipiente adecuado. Agregar 20,0 ml de Solución de dilución y aproximadamente 10 perlas. Agitar vigorosamente durante aproximadamente 10 minutos y centrifugar.

Reservar la porción restante de la Solución madre para la prueba de Limite de ácido salicílico libre.

-Sistema cromatográfico (ver Cromatografía (621)):Equipar el Cromatógrafo de líquidos con un detector a 280 nm y una columna de 4,0 mm x 30 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 2 ml por minuto. Inyectar en el Cromatógrafo la Preparación estándar y registrar el cromatograma según se indica en el Procedimiento: el factor de asimetría no es mayor de 2,0 y la desviación estándar relativa no es más de 2,0%.

Límite de Ácido Salicílico Libre:

Los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,7 para el ácido salicílico y 1,0 para la aspirina; la resolución, R, entre el ácido salicílico y la aspirina no es menor de 2,0; y la desviación estándar relativa de las respuestas de los picos del ácido salicílico no es más de 4,0%. No se encuentra más de 0,3%. En el caso de Tabletas recubiertas, no se encuentra más de 3,0%.

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO INDICADOR DE
ESTABILIDAD PARA EL ANALISIS DE ACIDO ACETIL SALICILICO EN
TABLETAS POR HPLC

CAPÍTULO III

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

1. Justificación

En la ley del medicamento de Bolivia y el manual de registro sanitario se especifica que se debe hacer estudios de estabilidad de medicamentos para establecer fechas de vencimiento, la herramienta imprescindible es contar con un método analítico indicador de estabilidad que pueda cuantificar de manera inequívoca al Ácido Acetilsalicílico y a su producto de degradación el Ácido Salicílico que es tóxico hasta niveles especificados en farmacopeas reconocidas (0,3% en tabletas, 3% en tabletas recubiertas)

Esta justificación puede enfocarse en aspectos: políticos, económicos, culturales y sociales

En el aspecto **Social** el desarrollo del método analítico indicador de estabilidad para el Ácido Acetilsalicílico que es uno de los medicamentos más utilizados en el mundo, con un consumo estimado en 40000 toneladas anuales, o lo que es lo mismo, entre 50000 y 120000 millones de comprimidos y en nuestro país existen 15 registros sanitarios de Ácido Acetilsalicílico de acuerdo a los registros de la AGEMED (actualizada en marzo de 2019) de los cuales 7 son importados y 8 producidos en el territorio nacional, al ser un producto masivo , por lo que su estabilidad física, química, microbiológica, biofarmacéutica y organoléptica deben ser evaluadas.

En el aspecto **político** es una política de salud el contar con medicamentos seguros, eficaces y estables en la lista de medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la Salud, donde se clasifican los medicamentos básicos que todo sistema de salud debería tener esta el Ácido Acetilsalicílico está incluido en la LINAME (Lista Nacional de Medicamentos Esenciales) de Bolivia, por lo que es una política de salud la determinación de su estabilidad

En el aspecto **económico** se debe contar con metodologías analíticas Desarrolladas y Validadas para la cuantificación de este medicamento, que sean

alternativas económicas a las metodologías de las farmacopeas internacionales y como un requisito de cumplir con la estabilidad que repercute económicamente

En el aspecto **cultural** nuestro país debe entrar a la fase de adecuación de los Estudios de Estabilidad de Medicamentos exigidas bajo la resolución ministerial N° 0909 del 7 de diciembre de 2005 resuelve en su artículo primero la aprobación del nuevo Manual de Registro Sanitario que en la parte de requisitos establece en el apartado 2.5.11 los Estudios de Estabilidad siendo una parte de las Buenas Prácticas de Manufactura como una actividad necesaria para asegurar la salud pública debido a los problemas de inestabilidad de los medicamentos y asegurara a través de la vida útil, la fecha de vencimiento y condiciones de almacenamiento

2. Planteamiento del Problema

Tras el desarrollo de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución, se podrán fijar las condiciones cromatográficas como pH, fase móvil, fase estacionaria, flujo, concentración de análisis y longitud de onda para cuantificar el ácido acetilsalicílico sometido a variar condiciones de estrés como temperatura, hidrólisis ácida, hidrólisis básica, oxidación, termólisis

2.1 Pregunta de Investigación

¿El método analítico indicador de estabilidad desarrollado tendrá la capacidad de identificar y cuantificar de manera inequívoca al Ácido Acetilsalicílico y su producto de degradación el ácido salicílico en presencia de matriz de la tableta en análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución?

3. Objetivo General

Desarrollar y validar un método analítico indicador de estabilidad utilizando el diseño experimental de Plackett and Burman para la cuantificación de ácido acetilsalicílico y su producto de degradación el ácido salicílico en tabletas

3.1 Objetivos Específicos

3.1.1 Desarrollo de la metodología Analítica

Aplicar el diseño experimental de Plackett and Burman y las variaciones de condiciones cromatográficas estableciendo los niveles positivos (+) y negativos (-)

3.1.2 Degradación forzada del Ácido Acetilsalicílico

Someter soluciones de Ácido Acetilsalicílico a condiciones forzadas como temperatura, hidrólisis ácida, hidrólisis básica, oxidación, termólisis (estrés)

3.1.3 Ensayos de validación del método analítico

Determinar los parámetros de validación como ser Especificidad, linealidad, precisión y exactitud y límite de detección y límite de cuantificación a través de análisis estadístico

3.1.4 Desafío del método con Medicamentos comercializados en el mercado local

Valorar tres marcas de tabletas de Ácido Acetilsalicílico que estén entre 90% y 110% de la fórmula declarada una marca de 500mg/tab sin recubierta, la segunda de 100mg/tab sin recubiertas y la última de 100mg/tab sin recubierta del mercado para establecer con el método analítico validado que cumplan con el límite de ácido salicílico y contenido de ácido acetilsalicílico

4. Hipótesis

4.1 Hipótesis Afirmativa (H1)

La metodología analítica desarrollada y validada para el análisis, separará con una resolución cromatográfica mayor a 2 al ácido acetilsalicílico y a su producto de degradación el ácido salicílico

4.2 Hipótesis Nula (Ho)

La metodología analítica desarrollada y validada para el análisis no separará con una resolución cromatográfica mayor a 2 al ácido acetilsalicílico y a su producto de degradación el ácido salicílico

5. Conceptualización de las Variables

Conceptualización de las Variables	
Variable Independiente	Definición operacional
Condiciones cromatográficas del método analítico indicador de estabilidad desarrollado	Cada una de los componentes de una metodología por cromatografía como ser: pH de la fase móvil, flujo, concentración del buffer, longitud de onda, tipo de columna cromatográfica, diluyente, composición de la fase móvil
Variable Dependiente	Definición operacional
Resolución cromatográfica del ácido acetilsalicílico y su producto de degradación el ácido salicílico	La resolución es una medida cuantitativa de la separación cromatográfica que tiene que ser mayor a 2 en el análisis por cromatografía líquida

Fuente: Propia

6. Operacionalización de las Variables

Variable	Definición Operacional	Dimensiones	Instrumento	Unidad de Medida	Observación
pH de la fase móvil	Potencial de hidrogenión	Acido de 2-5 Acido de 5-7	pHmetro	Potencial de Hidrogenión	Critico
Flujo	Cantidad en mL de fase movil/minuto	Flujo de 2 a 3	Bomba Cuaternaria	mL/min	Medio
Concentración del Buffer	Concentración molar del buffer	De 15 a 30 mM	Balanza	mM	Critico
Longitud de onda	Zona del rango electromagnetico que mide la cantidad de energía absorbida por las moléculas	236 nm y 280 nm	Detector Ultravioleta	nm	Critico
Columna Cromatográfica	Fase estacionaria donde fluye la fase móvil que contiene las moléculas en análisis	Octadecilsilano y fenil	Nominal	Nominal	Critico
Diluyente	Solvente en que se disuelven las moléculas	Acetonitrilo (50%)y Buffer(50%)	Probeta	Proporción	Critico
Fase Móvil	Mezcla de solventes que arrastran las moléculas en análisis a través de la fase estacionaria	Acetonitrilo (50%)y Buffer(50%)	Bomba cuaternaria	Proporción	Critico
Resolución Cromatográfica	Medida cuantitativa de la separación entre picos en un cromatograma	Mayor a 2	Software de HPLC	Unidades adimensionales	Critico

Fuente: Propia

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO INDICADOR DE
ESTABILIDAD PARA EL ANALISIS DE ACIDO ACETIL SALICILICO EN
TABLETAS POR HPLC

CAPÍTULO IV

DISEÑO

METODOLÓGICO

1. Diseño Metodológico

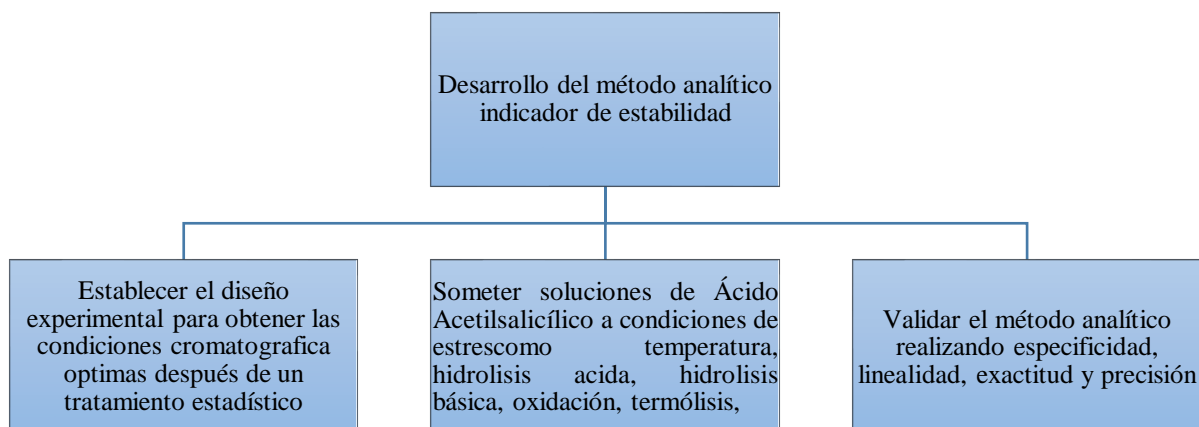
Se tiene el siguiente Diseño metodológico

Tabla 14. Caracterización del Diseño

VARIABLE	CARACTERÍSTICA DEL ESTUDIO
Según la prospección	Concurrente-prospectiva Se determinará el grado de estabilidad del Ácido Acetilsalicílico y se evaluará los resultados para la toma de decisiones (concurrente) Se evaluarán los resultados de validación para establecer el cumplimiento de los parámetros de validación
Según el corte en el tiempo	Longitudinal Se realizará el estudio en un espacio de tiempo delimitado (un inicio y un final)
Según la cuantificación de la variable	Cuali-cuantitativa Las variables a evaluar son de tipo cuali-cuantitativas debido a que algunas son subjetivas (dificiles de medir) y cuantitativas (que hay una magnitud de medición)
Según la profundidad	Correlativa-explicativa Ya que la correlación entre variables como concentración y respuesta analítica determinara la validez del método y explicativa porque si resulta exitosa se generara un método nuevo alternativo para el análisis del Ácido Acetilsalicílico y su producto de degradación más importante el Ácido Salicílico

Fuente: (Bernal, 2010)

Esquema 1. Esquema del Desarrollo del método analítico indicador de estabilidad



Fuente: Propia

1.1 Equipos, Materiales, reactivos y sustancias de referencia

EQUIPOS	MATERIALES	REACTIVOS	SUSTANCIAS DE REFERENCIA
-Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC) Agilent Serie 1200	-Kitasato	-Fosfatos de Sodio p.a.	-Ácido Salicílico
-Espectrofotómetro UV-VIS Jasco V630	-Matraces aforados de 10 mL, 25 mL.	-Ácido Fosfórico p.a.	-Ácido acetilsalicílico
-Espectrofotómetro Infrarrojo (IR) Jasco 1200 con transformadas de Fourier	1000 mL	-Acetonitrilo HPLC	
	-Pipetas Volumétricas de 1,2,5 mL	-Agua Ultrapurificada	

-Estufa de Incubación BINDER			
-Bomba de Vacío Elicom			
-Balanza Analítica AND			
-Ultrapurificador de agua Merck Mily-Q			

1.2 Desarrollo de la metodología Analítica

Mediante el diseño experimental de Plackett and Burman y las variaciones de condiciones cromatograficas establecer los niveles positivos (+) y negativos (-)

Se propusieron las condiciones cromatograficas después del estudio del Ácido Acetilsalicílico y su producto de degradación el Ácido Salicílico

1.3 Elección del pH de la Fase Móvil

Se utilizó la fórmula de pH para determinar el pH en el cual el Ácido Acetilsalicílico y su producto de degradación el Ácido Salicílico están en su forma no disociada (asociada) para lograr picos simétricos en el cromatograma

Fórmula 8. Formula de Henderson Hasellbach para soluciones amortiguadoras

$$pH = Pka + \log \frac{Cs}{Ca}$$

Fuente: (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

$$pH = 3,5 + \log \frac{1\%}{99\%}$$

Del cálculo resulta un pH de 1,5 para que un 99% de las moléculas inyectadas estén en su forma no disociada y 1% en su forma asociada

Ya que se recomienda que el pH de operación en las columnas cromatográficas sea entre 2 y 7 las columnas se eligieron los pH de 3 y 2,04 para el diseño experimental

Teniendo la siguiente proporción de moléculas no asociadas y asociadas para el pH promedio de 2,5 como se muestra a continuación:

$$\frac{C_s}{C_a} = 10^{pH-pKa} \rightarrow \frac{C_s}{C_a} = 10^{2,5-3,5} \rightarrow \frac{C_s}{C_a} = \frac{0,1}{1} \rightarrow \frac{C_s}{C_a} = \frac{9,1\%}{90,9\%}$$

Se observa que en promedio un 9,1% de las moléculas estará disociado (pudiendo causar asimetría en los picos cromatográficos) y un 90,9% está asociada (favoreciendo a la obtención posible de picos cromatográficos simétricos) para el diseño experimental se ensayara a pH=3 y pH=2,04

1.4 Elección del Flujo de la Fase Móvil del Sistema Cromatográfico

Debido a que se está utilizando columnas cromatográficas monoméricas para HPLC se debe tener un flujo que produzca una presión de aproximadamente 200 bar dado que los equipos de HPLC tienen bombas cuaternarias que generan una presión entre 0 y 400 bar

Fórmula 9. Formula Para calcular la presión de una columna cromatografica

$$P = \frac{2lfL}{dp^2D^2}$$

Fuente: (Quattrocchi, Andrizzi, & Laba, 1992)

Donde “P” es la presión medida en atmósferas que se obtiene con agua a un caudal de 1 mL/min(l), “f” es un factor que vale 1000 para columnas de acero, “L” es la longitud de la columna medida en cm, “dp” es el tamaño de las partículas expresada en μm y “D” es el diámetro interno de la columna medido en mm.

Equivalencia 1 atm=1,01325 Bar

P=90 Bar= 88,82 atm, l=1mL/min, f=1000, L=15 cm, dp= 5 μm , D=4,6 mm

Se calculó la presión de la siguiente manera

$$P = \frac{2 * 88,82atm * 100 * 15cm}{5\mu m^2 4,6mm^2} \quad P = 56 atm = 57bar$$

Despejando de la formula el flujo (l) se tiene para obtener una presión de 150 bar se tiene un flujo de 2,6mL/min. Para el diseño experimental se utilizará 3mL/min y 2mL/min)

1.5 Elección de la Concentración del Buffer

Para poder tener Ácido Acetilsalicílico y su producto de degradación el Ácido Salicílico en su forma no disociada se necesita una concentración de Buffer mayor a la concentración de análisis de estas moléculas

Que para el Ácido Acetilsalicílico resulta:

$$C(mM) = \frac{0,5mg}{mL} \times \frac{1mmol}{180mg} = 2,78 mM \text{ Ácido Acetilsalicílico}$$

Y para el Ácido Salicílico resulta:

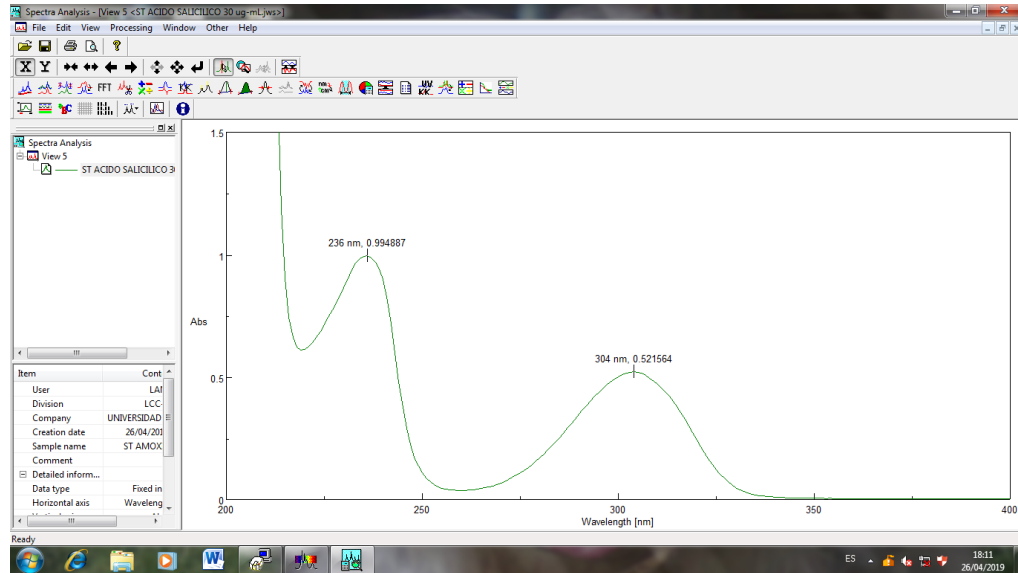
$$C(mM) = \frac{0,1mg}{mL} \times \frac{1mmol}{138mg} = 0,72 mM \text{ Ácido Salicílico}$$

Se eligió un buffer de Fosfato monobásico de sodio (un electrolito débil) NaH_2PO_4 a una concentración 10 veces más grandes para evitar el fenómeno de “Le chatellier” ajustado con un ácido a concentraciones de 15mM y 30 mM.

1.6 Elección de la longitud de Onda

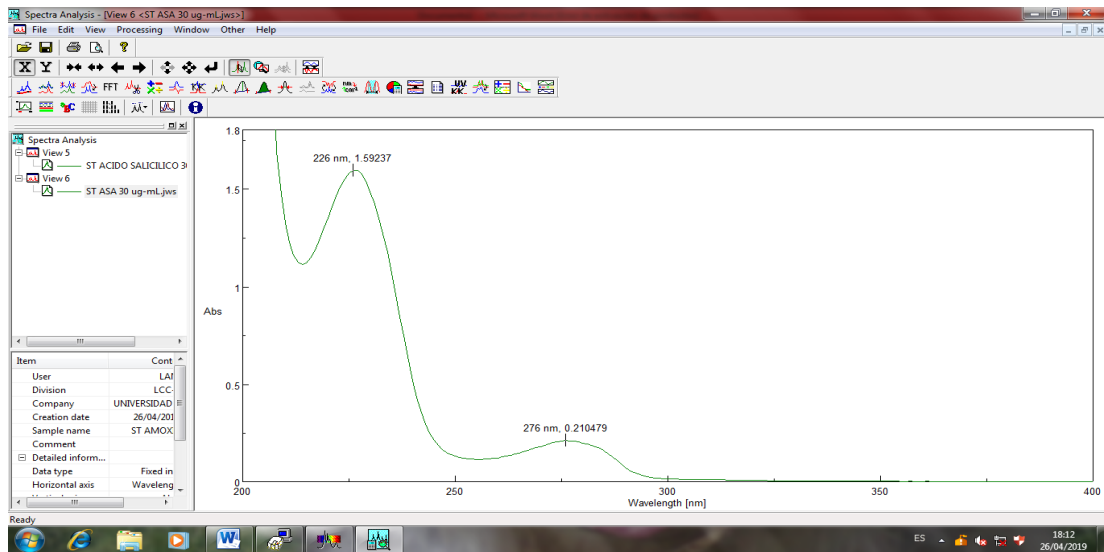
Se disolvió el Ácido Acetilsalicílico y su producto de degradación el Ácido Salicílico en Etanol (96%) para obtener soluciones separadas de 30 $\mu g/mL$ y se realizó los barridos espectrales de 200 a 400 nm opera obtener las longitudes de ondas de mayor absorción y tener la tentativa de los puntos isosbesticos de las moléculas

Gráfico 4. Barrido Espectral del Ácido Acetilsalicílico



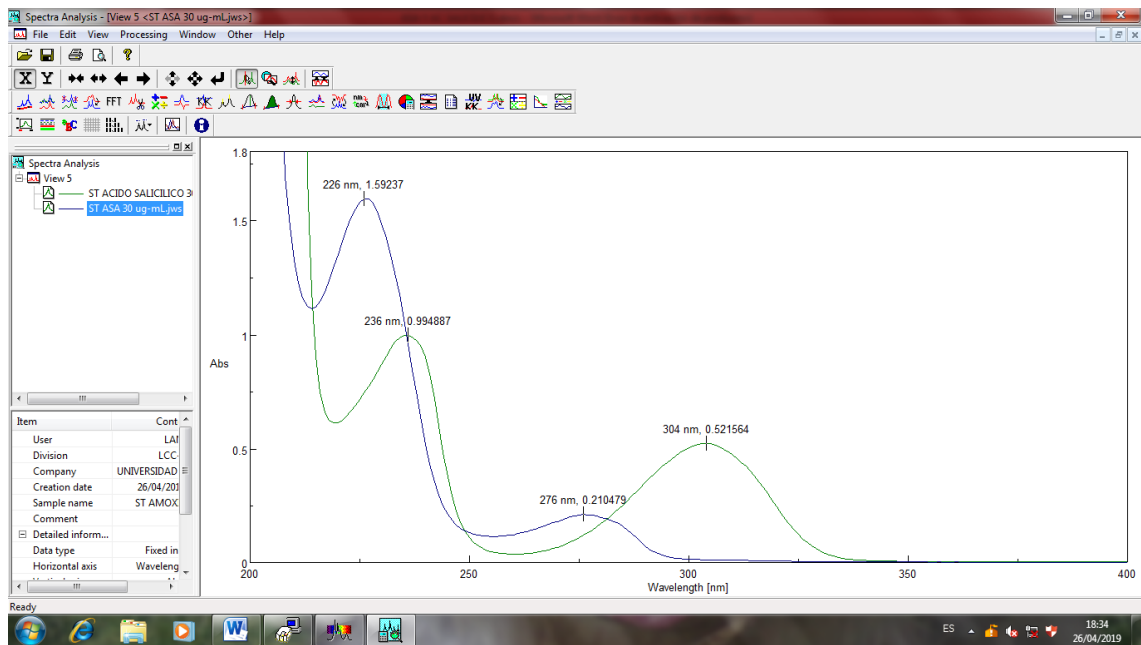
Fuente. Propia

Gráfico 5. Barrido Espectral del Ácido Salicílico



Fuente. Propia

Gráfico 6. Superposición de los Barridos espectrales de Ácido Acetilsalicílico y su producto de degradación el Ácido Salicílico



Fuente. Propia

Se eligió las longitudes de onda de los puntos isobesticos de a 280 nm y 236 nm en la que los dos moléculas inyectados en HPLC tendrían mayores respuestas analíticas y aquí se demuestra que el detector sería un detector de longitud de onda variable-ultravioleta (WDL-UV)

1.6 Elección de la Columna

Como se vio en el fundamento teórico las columnas en fase reversa son las más adecuadas para analizar moléculas de un peso molecular menor de 2000g/mol que tenga ligera solubilidad en agua y elevada solubilidad en solventes orgánicos (metanol) y además dissociables. Por lo que se ha elegido una Columna con base de sílice unida una cadena hidrocarbonada de 18 átomos de carbono (C18-Octadecilsilano) L1 según USP y una Columna con base de sílice unida a grupos Fenil Hexcil (Fenilo) L11 según USP.

1.7 Elección del Diluyente

Ya que se demostró que las moléculas se mantienen asociadas en pHs ácidos y además son solubles en solventes orgánicos se eligió las siguientes diluyente: Buff(50%):ACN (50%) y Buff(100%) y es preferente que sean similares a la FM para evitar señales ruidosas

1.7 Elección de la Fase móvil

Como se vio en el fundamento teórico existen solventes donadores/aceptores de protones (Metanol) y solventes con momento dipolar (Acetonitrilo) por lo que se eligió las siguientes condiciones de fases móviles: Buffer (50%): ACN (50%) y Buffer (75%): ACN (30%)

1.8 Robustez-Matriz del Diseño Experimental

Por los puntos anteriormente expuestos se tiene la siguiente Matriz del Diseño Experimental

Tabla 15. Matriz del Diseño Experimental Plackett and Burman

FACTORES	CODIGO	NIVEL(+)	NIVEL(-)
pH	A	3	2,04
Flujo	B	3mL/min	2mL/min
(Buffer)	C	30mM	15mM
λ	D	280nm	236nm
Columna	E	FenilHexil (L11)	C18 (L1)
Diluyente	F	Buff(50%):ACN (50%)	Buff(100%)
Fase Móvil	G	Buffer (50%): ACN (50%)	Buffer (75%): ACN (30%)

Fuente. Propia

2. Degradación Forzada del Ácido Acetilsalicílico

Tras la revisión bibliográfica se tiene que el Ácido Acetilsalicílico tiene una energía de activación de 12500 cal/mol (Bogdan Tița, Adriana Fulias, Eleonora Marian, Dumitru Tița, 2009)

Según la fórmula de Luis Svant Arrhenius la temperatura para hidrolizar a esta molécula durante 0,5 horas (media hora) sería:

Fórmula 10. Cálculo de temperaturas y constantes de velocidad de degradación

$$\ln \frac{k_2}{k_1} = \frac{Ea * (T_2 - T_1)}{R * T_1 * T_2}$$

Según Connors en “Chemical Stability of Pharmaceuticals” el $t_{1/2}$ del Ácido Acetilsalicílico es de 52 horas a 25°C por lo que la constante de degradación a esta temperatura sería de $K=0,01332h^{-1}$ y un t_{90} del=7,9 h a 25°C se obtiene la $K_2=0,21 h^{-1}$

Entonces la temperatura que se necesitaría para degradar en 0,5 horas un 10% del Ácido Acetilsalicílico sería:

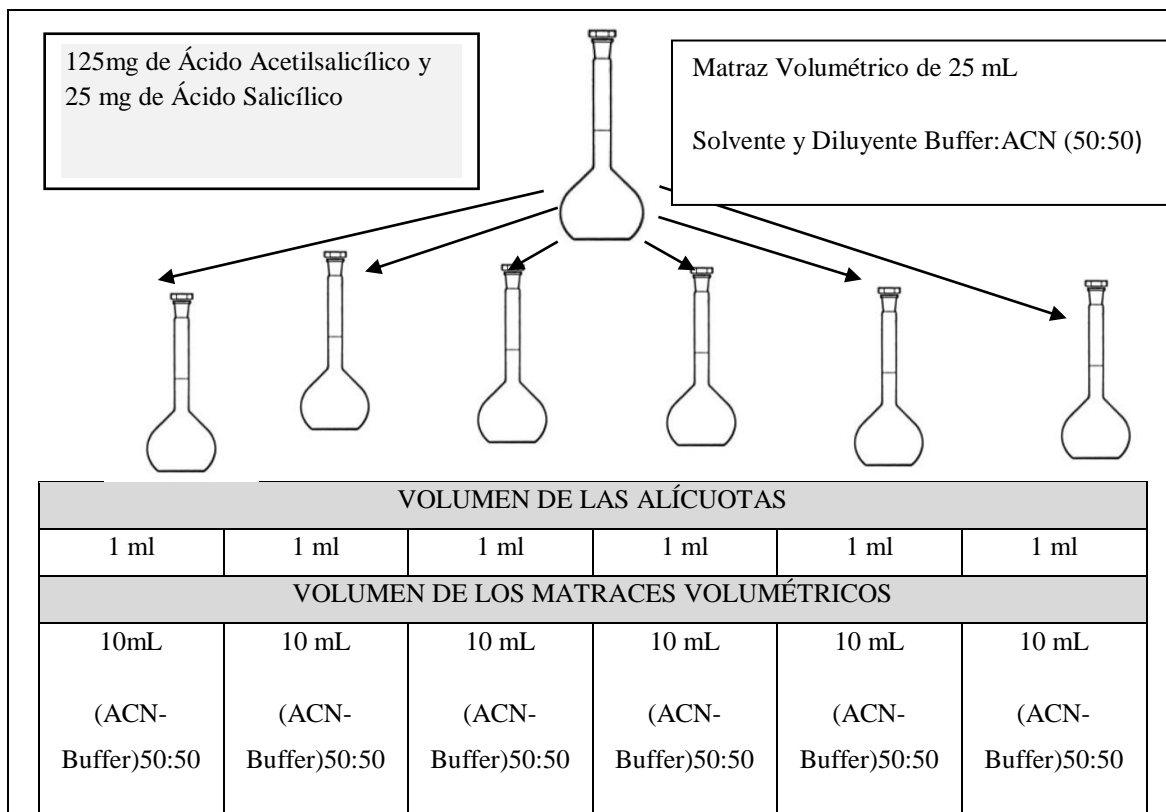
$$T_2 = \frac{Ea}{R * \left(\frac{Ea}{R * T_1} - \ln \frac{K_2}{K_1} \right)}$$

Remplazando datos:

$$T_2 = \frac{12500cal/mol}{1,987 \frac{cal}{K} * mol * \left(\frac{12500cal/mol}{1,987cal/mol * 298K} - \ln \frac{0,21}{0,01332} \right)} \rightarrow T_2 = 342,78K = 69,78^\circ C$$

Por lo que se sometieron las soluciones a 70°C según el siguiente esquema:

Esquema 2. De la degradación forzada del Ácido Acetilsalicílico



Fuente: Propia

Se sometieron soluciones de 0,5 mg/mL de Ácido Acetilsalicílico a las siguientes condiciones y temperaturas.

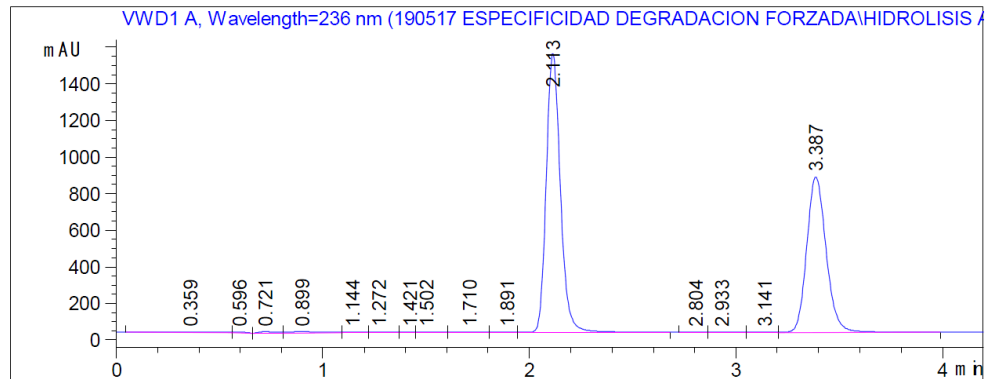
Condición	Temperatura
HCL 0,1 N	70°C
NaOH 0,1N	70°C
H ₂ O ₂	70°C
Agua Destilada	70°C
Luz	25°C
Condiciones Normales	25°C

Registrándose los siguientes cromatogramas:

2.1 Hidrólisis Ácida

Gráfico 7. Hidrólisis Ácida del Ácido Acetilsalicílico

Column Description : Eclipse XDB-C18
Product# : 993967-902 Batch#: B09116
Serial# : USKH058287
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
Maximum Pressure : 600 bar Maximum pH : 9
Maximum Temperature: 60 °C
Comment :

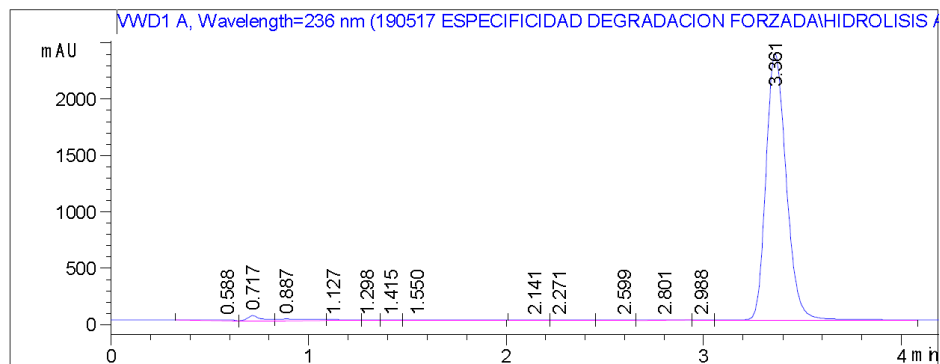


Fuente: Propia

2.2 Hidrólisis Alcalina

Gráfico 8. Hidrólisis Alcalina del Ácido Acetilsalicílico

Column Description : Eclipse XDB-C18
Product# : 993967-902 Batch#: B09116
Serial# : USKH058287
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
Maximum Pressure : 600 bar Maximum pH : 9
Maximum Temperature: 60 °C
Comment :

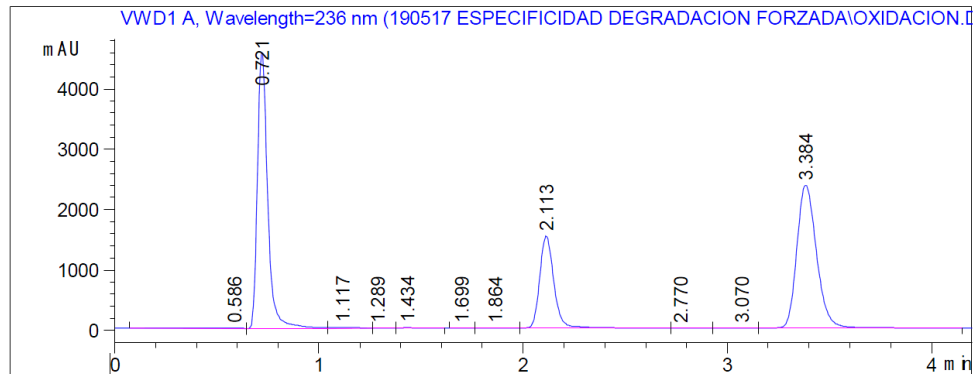


Fuente: Propia

2.3 Oxidación

Gráfico 9. Oxidación del del Ácido Acetilsalicílico

Column Description : Eclipse XDB-C18
Product# : 993967-902 Batch# : B09116
Serial# : USKH058287
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
Maximum Pressure : 600 bar Maximum pH : 9
Maximum Temperature: 60 °C
Comment :

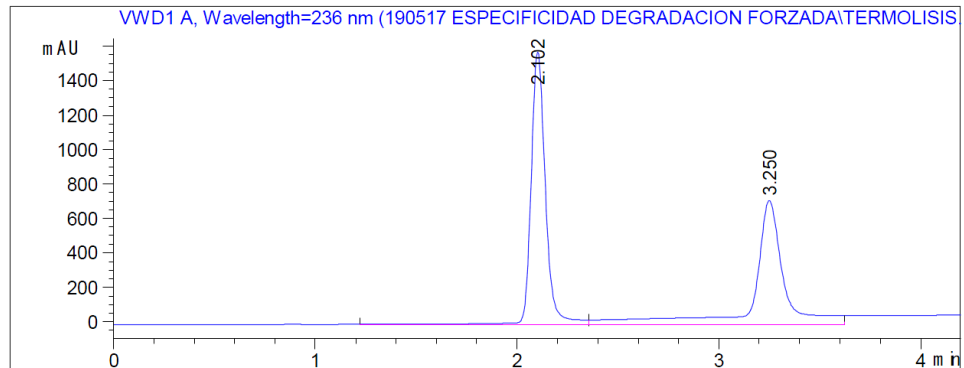


Fuente: Propia

2.4 Termólisis

Gráfico 10. Termólisis del Ácido Acetilsalicílico

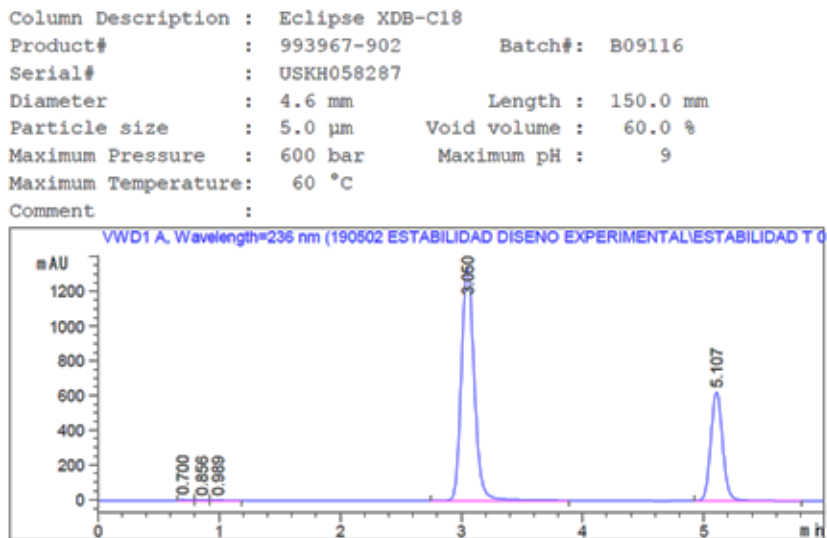
Column Description : Eclipse XDB-C18
Product# : 993967-902 Batch# : B09116
Serial# : USKH058287
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
Maximum Pressure : 600 bar Maximum pH : 9
Maximum Temperature: 60 °C
Comment :



Fuente: Propia

2.5 Condiciones Normales

Gráfico 11. Cromatograma en Condiciones Normales



Fuente: Propia

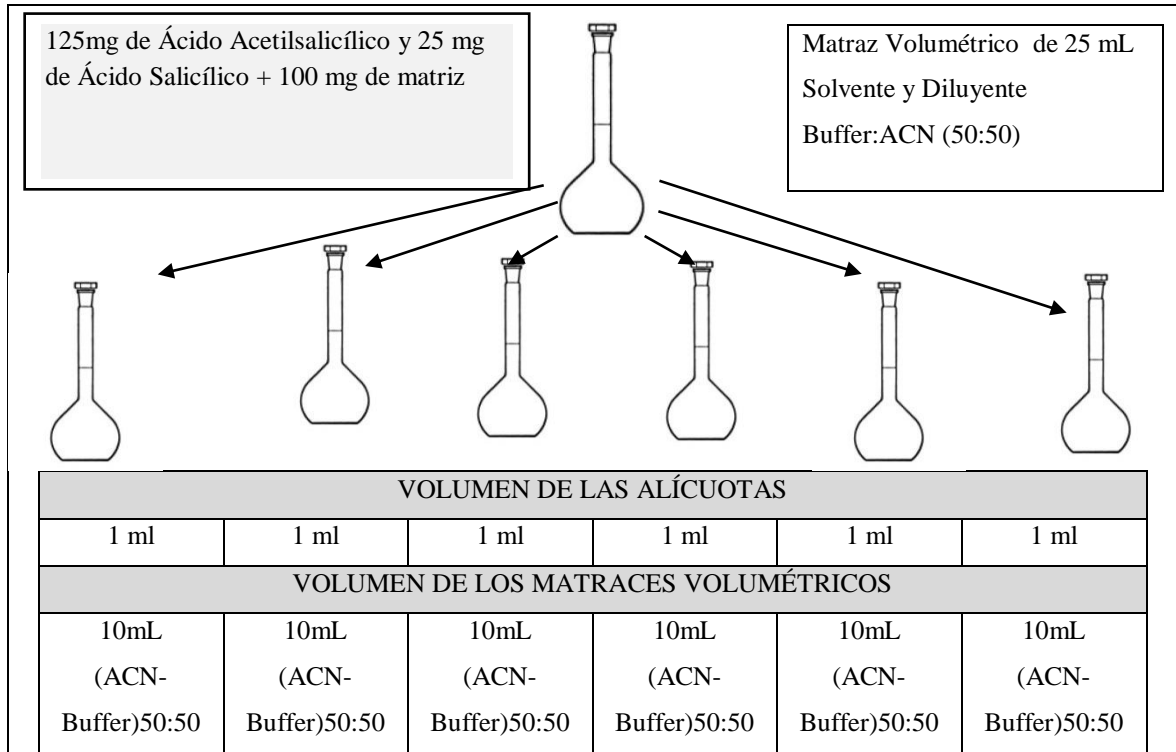
3. Validación del Método Analítico

Para realizar la Validación del Método Analítico se siguió las directrices del Informe 40 de la OMS, anexo 4, apéndice 4 y el capítulo general <1225> de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) según la siguiente metodología.

3.1 Determinación de la Especificidad

Para la especificidad se sometió al análisis de Soluciones Estándar y soluciones “Estándar+ Matriz” con excipientes como ser almidón y croscaramelosa sodica

Esquema 3. Ensayo de Especificidad del Método Analítico “Estándares Solos”

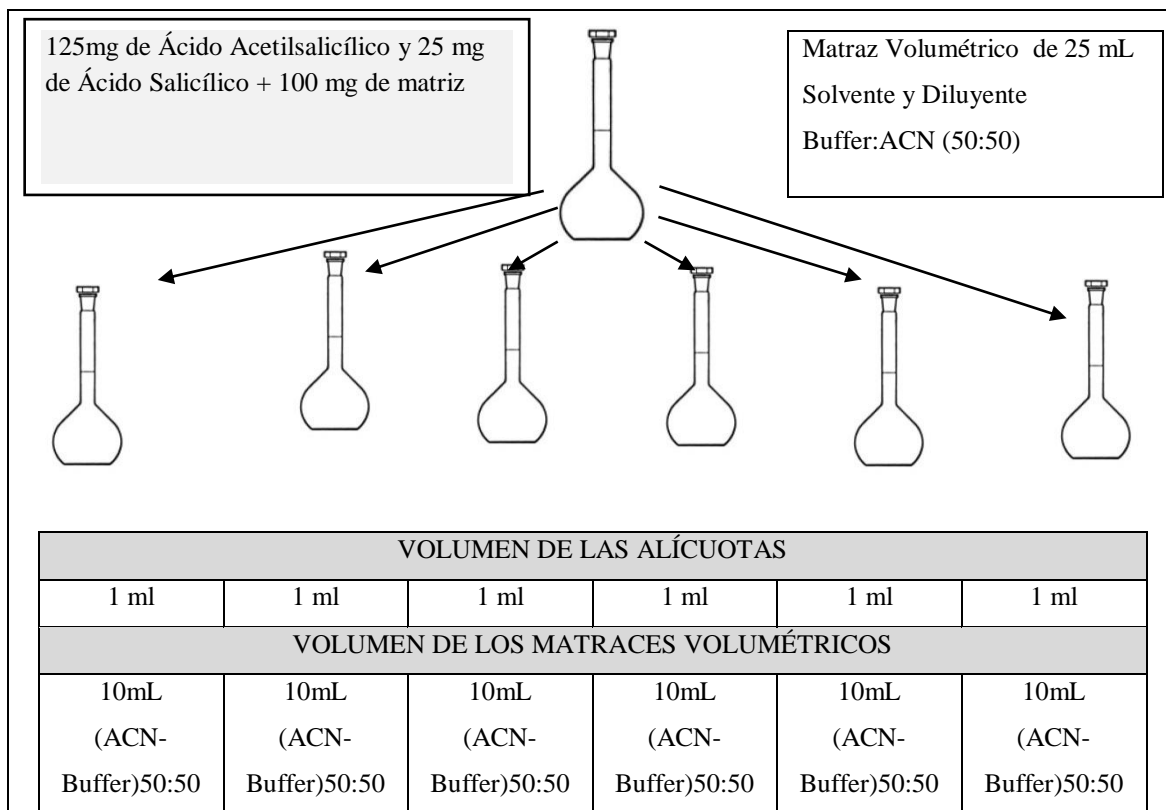


Fuente: Propia

Para la realización de la matriz se obtuvo del mercado y de información Bibliográfica los excipientes utilizados para la fabricación de Comprimidos: almidón de maíz, celulosa microcristalina y croscaramelosa sódica. Cada 100 mg de Ácido Acetilsalicílico van acompañados de 20 mg de excipientes

Para desafiar el método se puso 100 mg de matriz (50% celulosa microcristalina y 50% croscaramelosa sódica) a cada 100 mg de Ácido Acetilsalicílico

Esquema 4. Ensayo de Especificidad del Método Analítico “Estándares + Matriz”



Fuente: Propia

3.2 Determinación de la Linealidad e intervalo

Se determinó el parámetro de Linealidad e Intervalo con soluciones de 80%, 90%, 100%, 110% y 120 % de las concentraciones de análisis del Ácido Acetilsalicílico y su producto de degradación el Ácido Salicílico

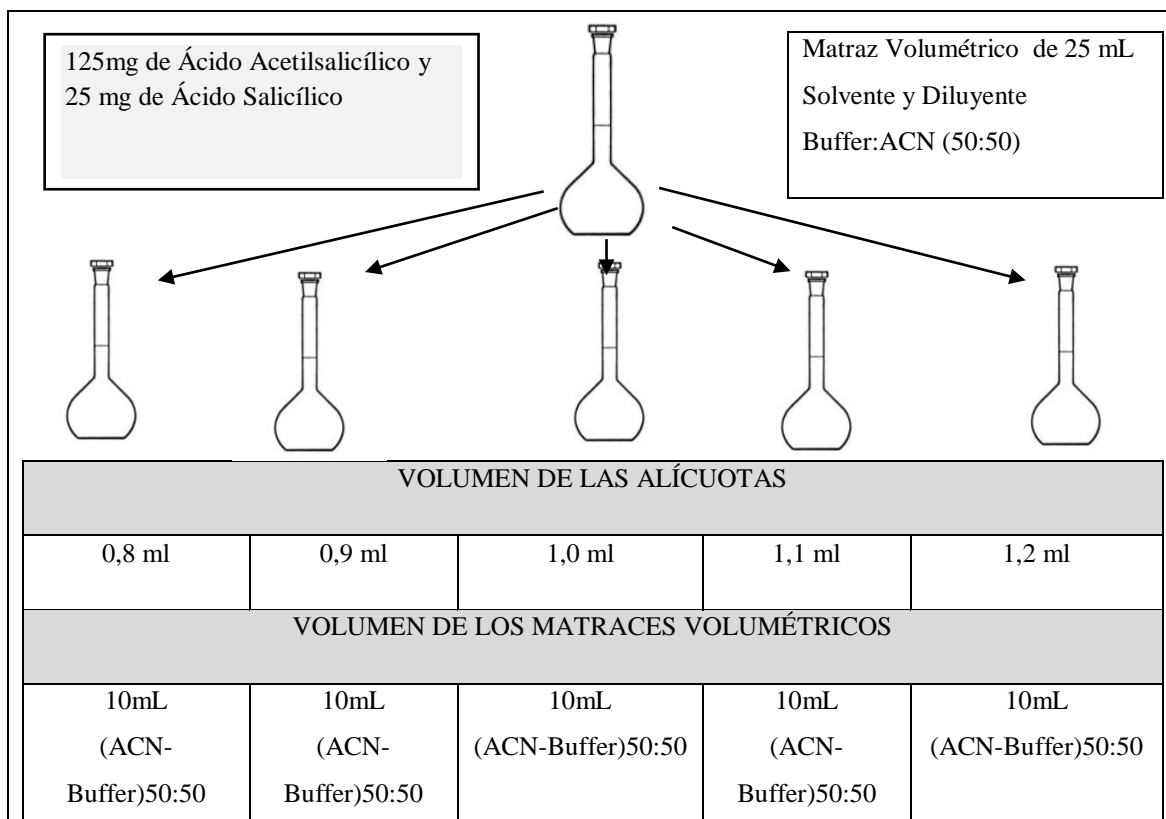
Para tal propósito se preparó una solución de Ácido Acetilsalicílico y su producto de degradación el Ácido Salicílico como se muestra a continuación:

$$C = \frac{125\text{mg Ácido Acetilsalicílico y } 25\text{mg Ácido Salicílico}}{25\text{mL}} \times \frac{X}{10\text{mL}}$$

$$= 0,5 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \text{ y } 0,1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$$

Entonces 0,5 mg/mL y 0,1 mg/mL son las concentraciones de análisis para el Ácido Acetilsalicílico y su producto de degradación el Ácido Salicílico respectivamente

Esquema 5. Determinación de Linealidad e Intervalo

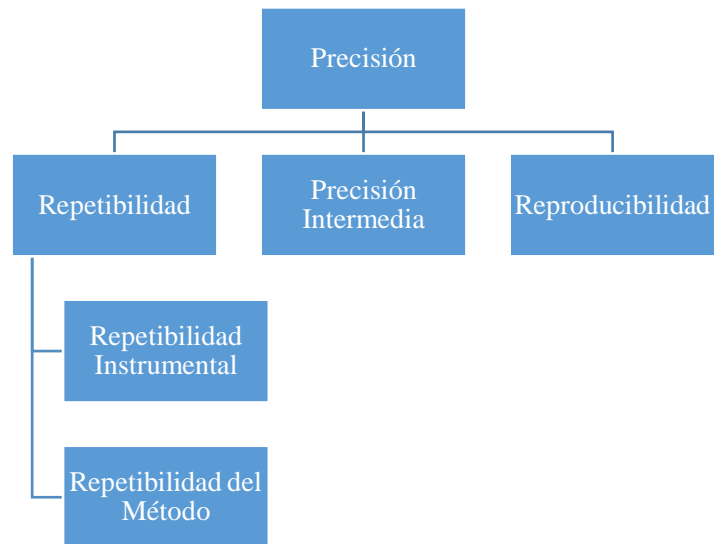


Fuente: Propia

3.3 Determinación de la Precisión

Se determinó la repetibilidad instrumental, repetibilidad del método y precisión intermedia en tres días diferentes con la participación de 2 analistas. No se realizó la reproducibilidad

Esquema 6. Determinación de la precisión del Método Analítico



Fuente: Propia

3.3.1 Repetibilidad Instrumental

Se realizó la inyección al HPLC de seis veces la misma solución que contiene las moléculas de interés y se obtiene el coeficiente de variación tanto de la respuesta analítica (área) y el tiempo de retención (minutos)

3.3.2 Repetibilidad del método

Se realizó la inyección al HPLC de nueve veces de soluciones que contienen las moléculas de interés (en tres diferentes niveles de concentración, 3 por cada nivel para completar las 9) y se obtiene el coeficiente de variación de la relación de la respuesta analítica/concentración

3.3.3 Precisión Intermedia

Se realizó el análisis de la variabilidad de las respuestas analíticas en tres días de análisis, dos analistas y tres replicas por analista

Tabla 16. Determinación de la Precisión Intermedia

ANALISTA	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3
ANALISTA X	ANÁLISIS 1	ANÁLISIS 1	ANÁLISIS 1
	ANÁLISIS 2	ANÁLISIS 2	ANÁLISIS 2
	ANÁLISIS 3	ANÁLISIS 3	ANÁLISIS 3
CV%	CV%	CV%	CV%
ANALISTA Y	ANÁLISIS 1	ANÁLISIS 1	ANÁLISIS 1
	ANÁLISIS 2	ANÁLISIS 2	ANÁLISIS 2
	ANÁLISIS 3	ANÁLISIS 3	ANÁLISIS 3
CV%	CV%	CV%	CV%
CV % (PRECISIÓN INTERMEDIA)		Coeficiente de variación Total	

Fuente: Propia

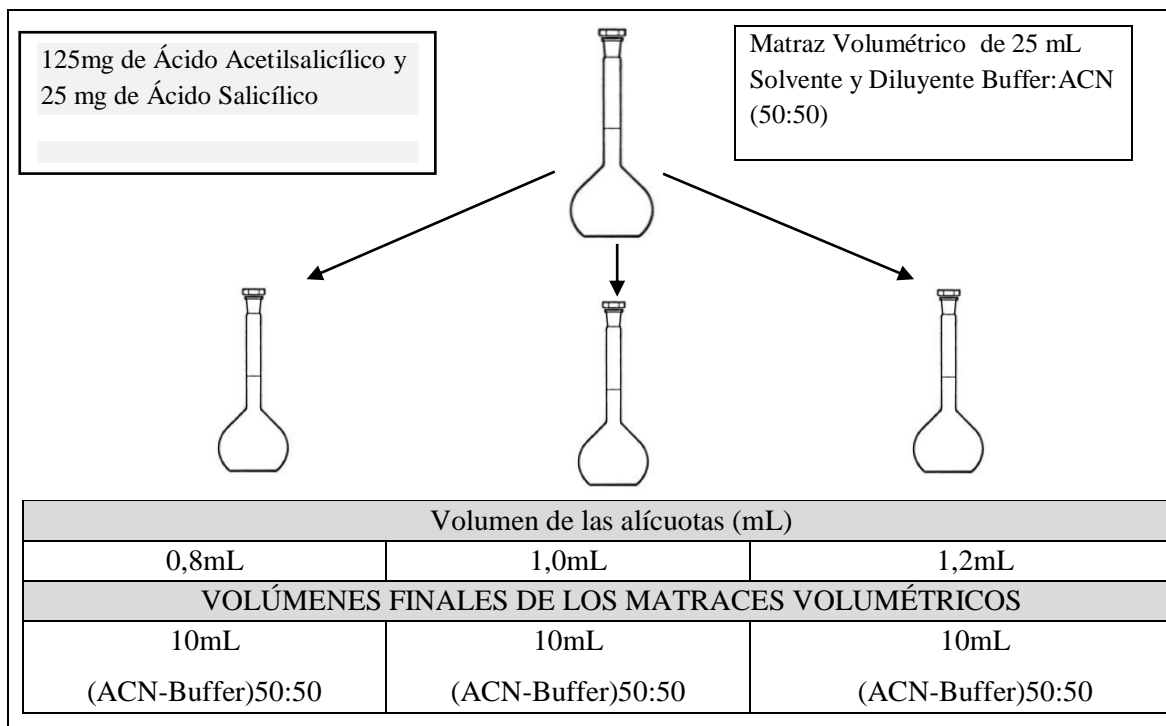
3.4 Determinación de la Exactitud

Se prepararon soluciones con tres niveles de concentración al 80%, 100% y 120% de la concentración de análisis para la determinación de la exactitud

Luego se estimó a cada nivel la recuperación nominal de las soluciones inyectadas al HPLC

Se determinó el porcentaje de recuperación media con el cual se aplica la prueba de “t” de Student para demostrar la exactitud del método en tres niveles de concentración equivalentes a 80%, 100% y 120% de la concentración media. Contrastando con un valor crítico Bilateral al 95% de nivel de confianza

Esquema 7. Determinación de la Exactitud



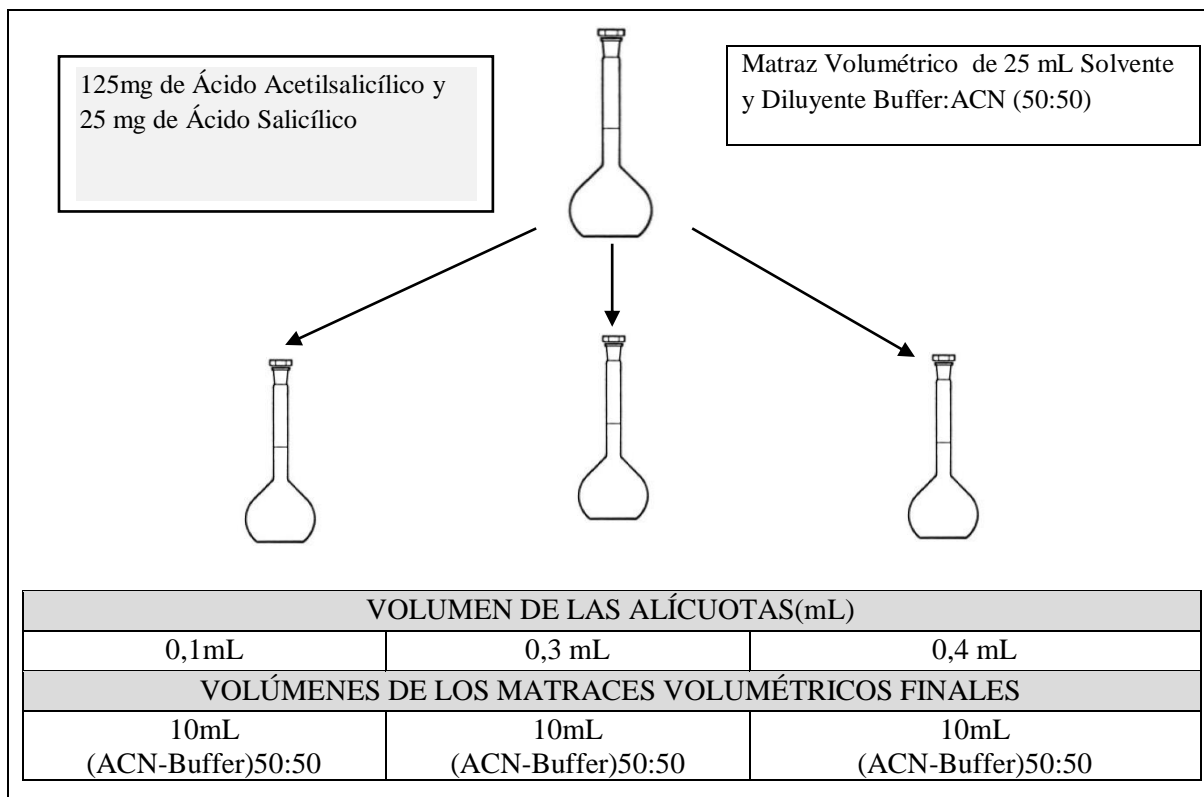
Fuente: Propia

3.5 Determinación del Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Para la determinación del límite de detección y Límite de Cuantificación se preparó soluciones de 0,05mg/mL (10%), 0,15mg/mL (30%) y 0,2mg/mL (40%) del Ácido Acetilsalicílico y de 0,01mg/mL (10%), 0,03mg/mL (30%) y 0,04mg/mL (40%) del Ácido Salicílico

Se realizó la inyección en el HPLC por triplicado para determinar la respuesta en la base línea y la desviación estándar en la base línea de la misma manera que se explica en el “Esquema 8”

Esquema 8. Determinación del Límite de Detección y Límite de Cuantificación



Fuente: Propia

4. Desafío del Método Analítico Indicador de estabilidad

Se analizó 3 marcas del mercado para establecer si cumplen especificaciones farmacopéicas de la valoración del Ácido Acetilsalicílico y su producto de degradación el Ácido Salicílico con tres marcas del mercado nacional la primera tabletas de 500 mg sin recubierta codificada como marca “A”, la segunda tabletas de 100 mg sin recubierta codificada como marca “B” y la tercera tabletas de 100mg sin recubierta codificada como marca “C”.

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO INDICADOR DE
ESTABILIDAD PARA EL ANALISIS DE ACIDO ACETIL SALICILICO EN
TABLETAS POR HPLC

CAPÍTULO V

RESULTADOS

1. Resultados

1.1 Desarrollo de la metodología Analítica

Se tiene la siguiente matriz del Diseño Experimental de Plackett and Burman donde se eligieron 7 factores cromatográficos (codificados del “A” a la “G” en sus niveles positivos y negativos)

Tabla 17. Matriz del Diseño Experimental

FACTORES	CODIGO	NIVEL(+)	NIVEL(-)
pH	A	3	2,04
Flujo	B	3mL/min	2mL/min
(Buffer)	C	30mM	15mM
Long. de onda	D	280nm	236nm
Columna	E	FenilHexil (L11)	C18 (L1)
Diluyente	F	Buffer (50%):ACN (50%)	Buffer (100%)
Fase Móvil	G	Buffer (50%): ACN (50%)	Buffer (75%): ACN (30%)

Fuente. Propia

Después de determinada la matriz del diseño experimental se procedió a la configuración del Diseño como se muestra a continuación:

Tabla 18. Diseño Experimental de Plackett-Burman para desarrollo y Robustez del Método

EXP	A	B	C	D	E	F	G	RESPUESTA
1	+	-	+	+	-	-	+	Factores de asimetría y resolución
2	+	+	-	+	+	-	-	
3	-	+	+	-	+	+	-	
4	-	-	+	+	-	+	+	
5	+	-	-	+	+	-	+	
6	+	+	-	-	+	+	-	
7	-	+	+	-	-	+	+	
8	-	-	-	-	-	-	-	

Fuente. Propia

Donde la respuesta a medir fue la resolución, asimetría del Ácido Acetilsalicílico y su producto de degradación el Ácido Salicílico

Para lo cual se determinó la composición de cada experimento como se muestra a continuación

Tabla 19. Composición de cada uno de los 8 experimentos del Diseño Experimental

EX P	A	B	C	D	E	F	G
1	pH de la fase móvil pH=3	Flujo de la Fase Móvil F=2mL/min	Concentración del Buffer 30mM	Longitud de Onda $\lambda = 280\text{nm}$	Columna C18	Diluyente Buf(50%):ACN(50%)	Proporción de la Fase Móvil Buf(50%):ACN(50%)
2	pH de la fase móvil pH=3	Flujo de la Fase Móvil F=3mL/min	Concentración del Buffer 15mM	Longitud de Onda $\lambda = 280\text{nm}$	Columna Fenil	Diluyente Buffer	Proporción de la Fase Móvil Buf(75%):ACN(25%)
3	pH de la fase móvil pH=2,04	Flujo de la Fase Móvil F=3mL/min	Concentración del Buffer 30mM	Longitud de Onda $\lambda = 236\text{nm}$	Columna Fenil	Diluyente Buf(50%):ACN(50%)	Proporción de la Fase Móvil Buf(50%):ACN(50%)
4	pH de la fase móvil pH=2,04	Flujo de la Fase Móvil F=2mL/min	Concentración del Buffer 15mM	Longitud de Onda $\lambda = 280\text{nm}$	Columna C18	Diluyente Buf(50%):ACN(50%)	Proporción de la Fase Móvil Buf(50%):ACN(50%)
5	pH de la fase móvil pH=3	Flujo de la Fase Móvil F=2mL/min	Concentración del Buffer 15mM	Longitud de Onda $\lambda = 280\text{nm}$	Columna Fenil	Diluyente Buffer	Proporción de la Fase Móvil Buf(50%):ACN(50%)
6	pH de la fase móvil pH=3	Flujo de la Fase Móvil F=3mL/min	Concentración del Buffer 15mM	Longitud de Onda $\lambda = 236\text{nm}$	Columna Fenil	Diluyente Buffer	Proporción de la Fase Móvil Buf(75%):ACN(25%)
7	pH de la fase móvil pH=2,04	Flujo de la Fase Móvil F=3mL/min	Concentración del Buffer 30mM	Longitud de Onda $\lambda = 236\text{nm}$	Columna C18	Diluyente Buf(50%):ACN(50%)	Proporción de la Fase Móvil Buf(50%):ACN(50%)
8	pH de la fase móvil pH=2,04	Flujo de la Fase Móvil F=2mL/min	Concentración del Buffer 15mM	Longitud de Onda $\lambda = 236\text{nm}$	Columna C18	Diluyente Buffer	Proporción de la Fase Móvil Buf(75%):ACN(25%)

Fuente. Propia

Se realizó la inyección en el HPLC, con un volumen de inyección de 20 µL de los 8 experimentos de manera individual y se registraron los parámetros cromatográficos como ser: Factor de Capacidad (k'), Resolución (R), Asimetría(As) y Número de Platos Teóricos (N) para evaluar la calidad de separación cromatográfica

Formula 3 Factor de Capacidad expresado en moles

$$k' = \frac{\text{N}^\circ \text{de Moles en la Fase Estacionaria}}{\text{N}^\circ \text{de Moles en la Fase Movil}}$$

Formula 4 Factor de Capacidad expresado en tiempos de retención

$$k' = \frac{t_n - t_o}{t_o}$$

Fórmula 7. Resolución Cromatográfica

$$R = \frac{t_2 - t_1}{\frac{1}{2}(w_2 + w_1)}$$

Fórmula 10. Cálculo de Factor de Asimetría

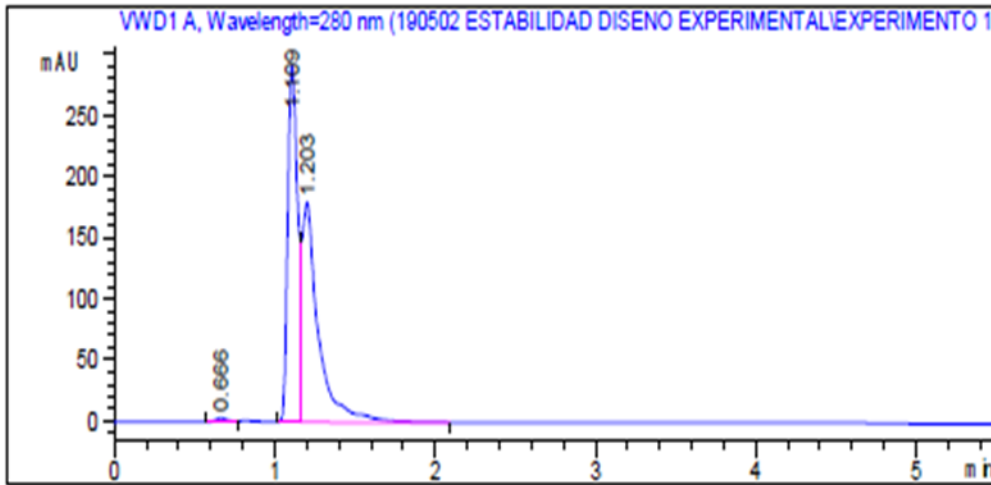
$$As5\% = \frac{b'}{a'} \quad As10\% = \frac{b}{a}$$

Fórmula 11. Número de Platos Teóricos

$$N = \left(\frac{t_n}{w_{tan}} \right)^2$$

1.1.1 Resultados de Experimento 1

Se prepararon las condiciones cromatograficas de acuerdo al experimento 1 descrito en la “Tabla 18”



=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

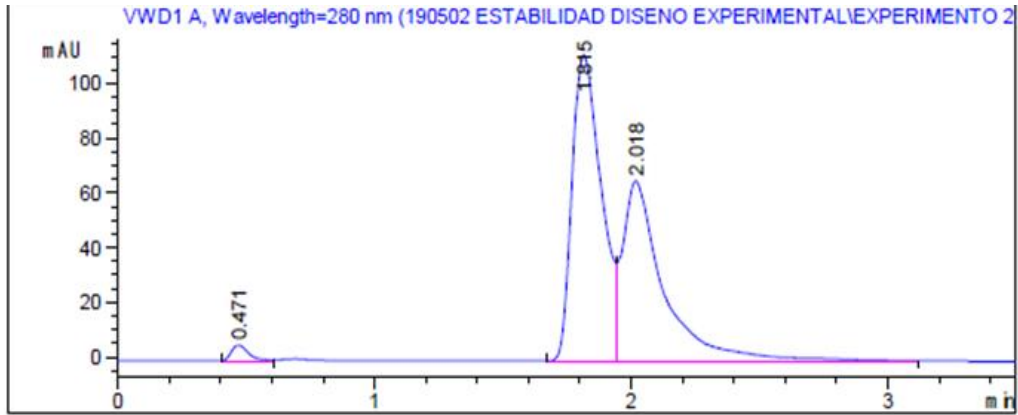
Signal 1: VWD1 A, Wavelength=280 nm

RetTime [min]	k'	Area mAU *s	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ution ivity
0.666	-	18.73102	3.77262	0.72	0.0712	485	-	-
1.109	0.48	1248.59143	292.12863	0.73	0.0859	923	3.31	-
1.203	0.61	1279.64063	179.53078	0.35	0.0890	1012	0.63	1.26

Fuente. Propia

1.1.2 Resultados de Experimento 2

Se prepararon las condiciones cromatograficas de acuerdo al experimento 2 descrito en la “Tabla 18”



=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

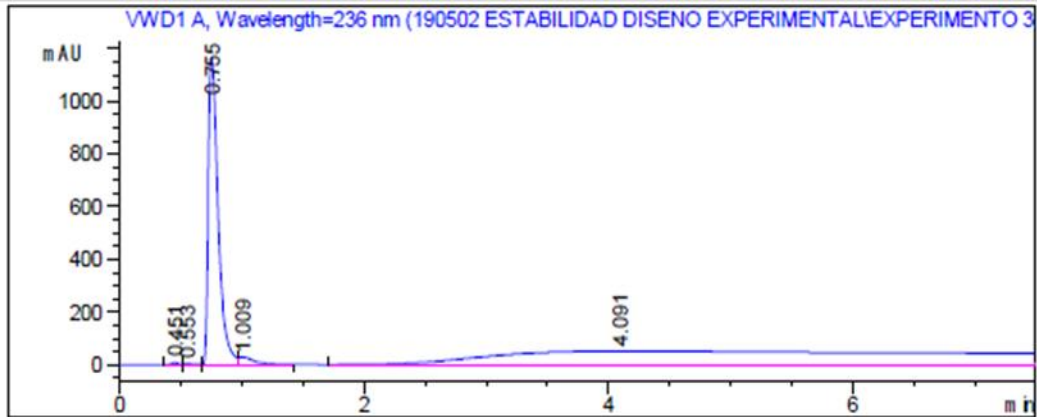
Signal 1: VWD1 A, Wavelength=280 nm

RetTime [min]	k'	Area mAU *s	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol ution	Select ivity
0.471	-	26.77829	5.63634	0.66	0.0709	244	-	-
1.815	2.64	884.78320	111.82800	0.61	0.1272	1128	7.97	-
2.018	3.05	736.28699	65.83191	0.41	0.1576	908	0.84	1.15

Fuente. Propia

1.1.3 Resultados de Experimento 3

Se prepararon las condiciones cromatograficas de acuerdo al experimento 3 descrito en la “Tabla 18”



=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

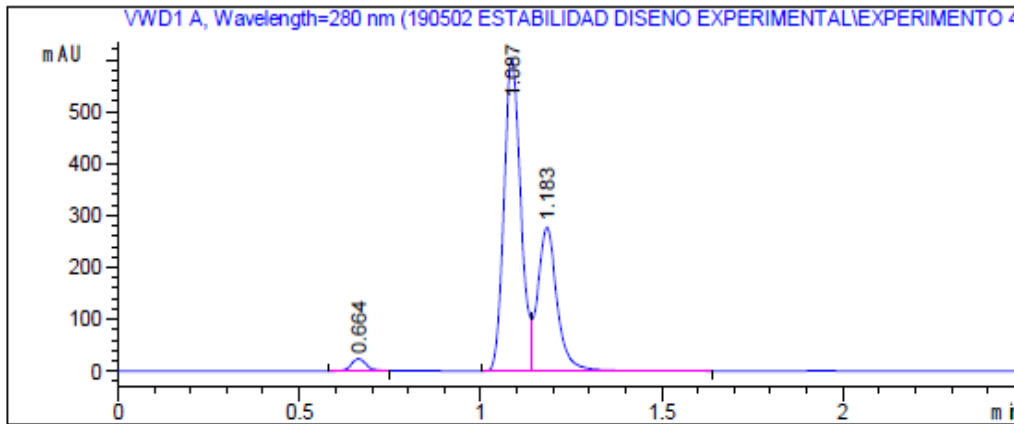
Signal 1: VWD1 A, Wavelength=236 nm

RetTime [min]	k'	Area mAU *s	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol ution	Select ivity
0.451	-	25.58913	7.26157	0.80	0.0529	403	-	-
0.553	0.11	20.79165	4.51434	0.54	0.0659	390	1.01	-
0.755	0.51	6535.24023	1166.03186	0.49	0.0809	483	1.62	4.70
1.009	1.02	270.00125	29.04775	0.27	0.1279	345	1.43	1.99
4.091	7.21	1.32632e4	50.86286	0.38	4.5913	4	0.77	7.03

Fuente. Propia

1.1.4 Resultados de Experimento 4

Se prepararon las condiciones cromatograficas de acuerdo al experimento 4 descrito en la “Tabla 18”



=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

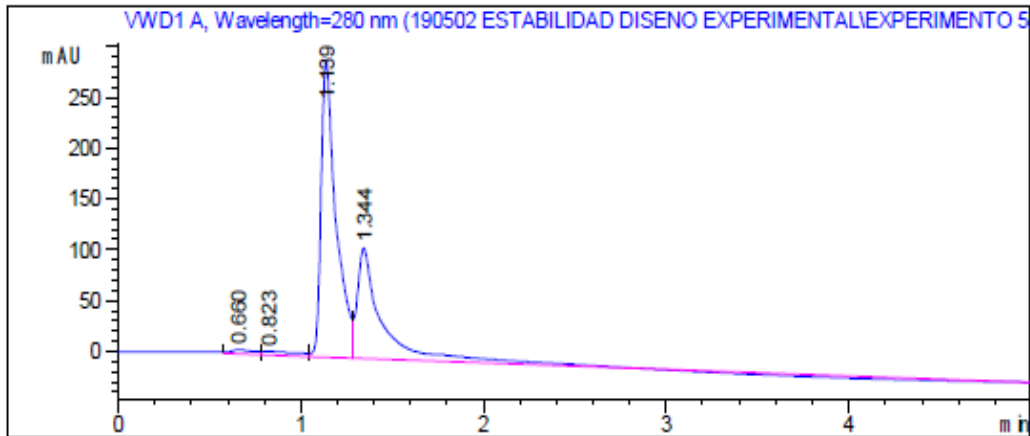
Signal 1: VWD1 A, Wavelength=280 nm

RetTime [min]	k'	Area mAU *s	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ution ivity
0.664	-	69.45210	23.47382	0.83	0.0437	1279	-	-
1.087	0.45	1937.33215	601.79651	0.85	0.0499	2631	5.31	-
1.183	0.58	1031.86462	277.43576	0.79	0.0558	2491	1.08	1.29

Fuente. Propia

1.1.5 Resultados de Experimento 5

Se prepararon las condiciones cromatograficas de acuerdo al experimento 5 descrito en la “Tabla 18”



=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

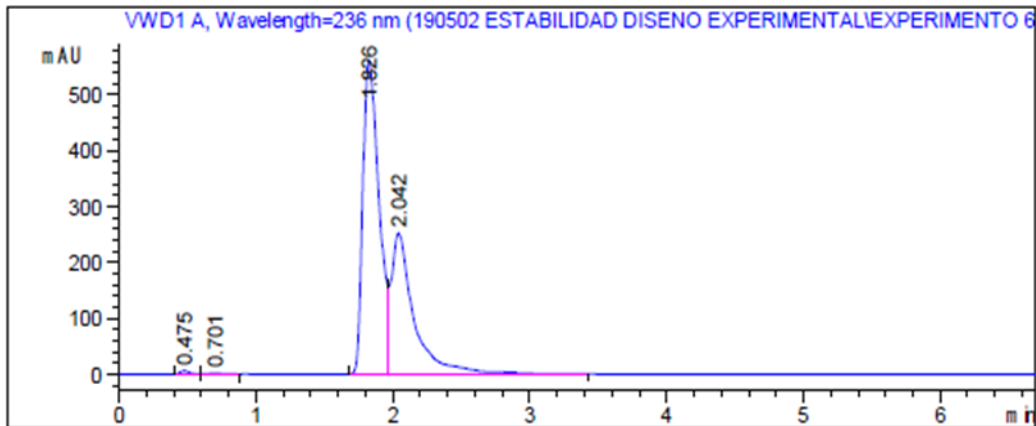
Signal 1: VWD1 A, Wavelength=280 nm

RetTime [min]	k'	Area mAU *s	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol ution	Select ivity
0.660	-	37.53476	4.06890	0.49	-	-	-	-
0.823	0.10	52.73951	3.72251	0.17	-	-	-	-
1.139	0.52	1653.16040	292.38000	0.47	0.0763	1235	-	5.23
1.344	0.80	886.64832	108.86527	0.37	0.0874	1312	1.48	1.53

Fuente. Propia

1.1.6 Resultados de Experimento 6

Se prepararon las condiciones cromatograficas de acuerdo al experimento 6 descrito en la “Tabla 18”



=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

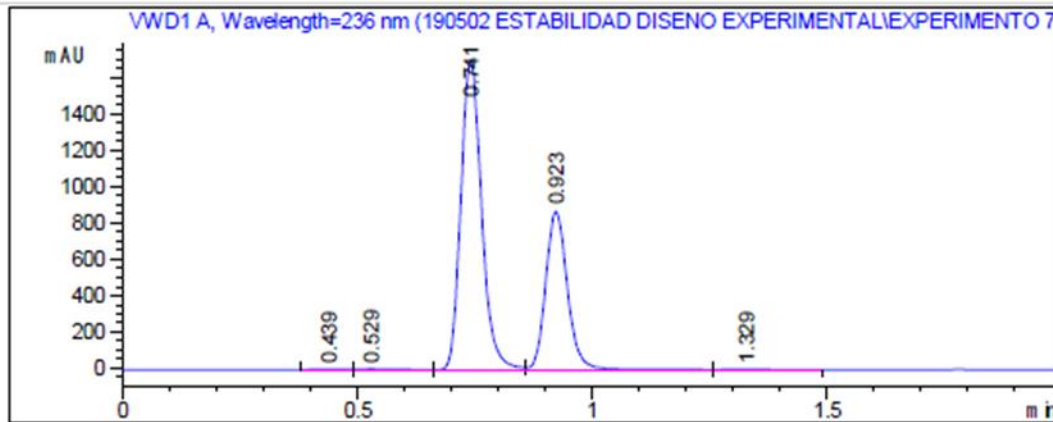
Signal 1: VWD1 A, Wavelength=236 nm

RetTime [min]	k'	Area mAU *s	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol ution	Select ivity
0.475	-	30.62641	6.25900	0.60	0.0714	245	-	-
0.701	0.41	16.51416	2.12485	0.91	0.1068	239	1.49	-
1.826	2.66	4654.41357	561.49103	0.57	0.1310	1076	5.56	6.54
2.042	3.10	2930.33032	252.61610	0.39	0.1592	912	0.88	1.16

Fuente. Propia

1.1.7 Resultados de Experimento 7

Se prepararon las condiciones cromatograficas de acuerdo al experimento 7 descrito en la “Tabla 18”



=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

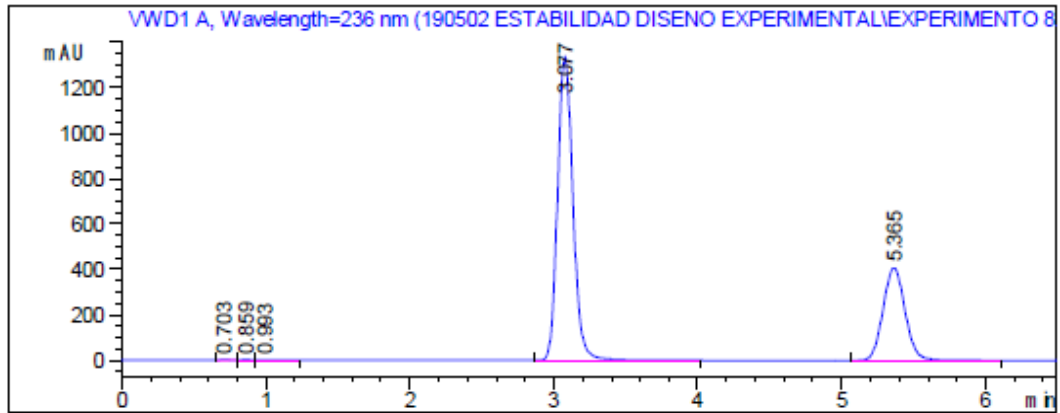
Signal 1: VWD1 A, Wavelength=236 nm

RetTime [min]	k'	Area mAU *s	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ivity
0.439	-	14.51400	3.82652	0.72	0.0651	251	-	-
0.529	6.1e-2	16.15919	4.20295	0.60	0.0512	591	0.91	-
0.741	0.49	5219.70166	1712.01855	0.81	0.0464	1414	2.56	8.01
0.923	0.85	2819.47681	875.24463	0.82	0.0476	2086	2.28	1.75
1.329	1.66	10.89104	2.17407	0.88	0.0704	1975	4.04	1.96

Fuente. Propia

1.1.8 Resultados de Experimento 8

Se prepararon las condiciones cromatograficas de acuerdo al experimento 8 descrito en la “Tabla 18”



=====
 Area Percent Report with Performance
 =====

Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=236 nm

RetTime [min]	k'	Area mAU *s	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
0.703	-	25.36312	5.07376	0.37	0.0777	454	-	-
0.859	0.15	17.99790	3.38571	0.87	-	-	-	-
0.993	0.33	20.21469	2.04990	0.54	0.1250	350	-	2.21
3.077	3.11	9925.87109	1335.89880	0.83	0.1116	4210	10.35	9.49
5.365	6.17	4353.87305	408.44968	0.92	0.1626	6031	9.80	1.98

Fuente. Propia

2. Análisis Estadístico del Diseño Experimental tomando como respuesta la Asimetría del Ácido Salicílico

Se utilizó la prueba de “t” de Student para determinar cuáles son las condiciones cromatográficas que influyen de manera estadísticamente significativa en la simetría del Ácido Salicílico

Tabla 20. Resultados del Diseño Experimental tomando como respuesta la Asimetría del Ácido Salicílico

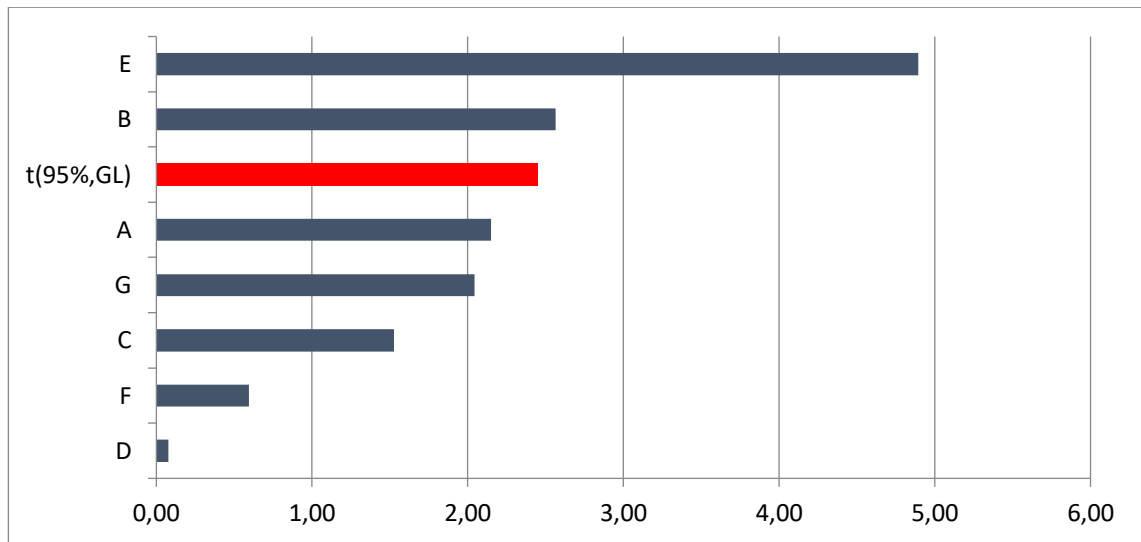
EXP	A	B	C	D	E	F	G	RESPUESTA
1	+	-	+	+	-	-	+	0,80
2	+	+	-	+	+	-	-	0,41
3	-	+	+	-	+	+	-	0,27
4	-	-	+	+	-	+	+	0,79
5	+	-	-	+	+	-	+	0,37
6	+	+	-	-	+	+	-	0,39
7	-	+	+	-	-	+	+	0,82
8	-	-	-	-	-	-	-	0,92
E(+)	0,4925	0,4725	0,67	0,5925	0,36	0,5675	0,695	
E(-)	0,7	0,72	0,5225	0,6	0,8325	0,625	0,4975	
E(+)+E(-)	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	
E(+)-E(-)	-0,21	-0,25	0,15	-0,01	-0,47	-0,06	0,20	
Ei	EA	EB	EC	ED	EE	EF	EG	
	-0,21	-0,25	0,15	-0,01	-0,47	-0,06	0,20	
E ²	0,043056	0,0613	0,0217563	6E-05	0,2233	0,0033	0,039	
s ²	0,055956							
S	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	
EXP	A	B	C	D	E	F	G	
t _i	-2,15	-2,56	1,53	-0,08	-4,89	-0,60	2,05	
t _i	2,15	2,56	1,53	0,08	4,89	0,60	2,05	

A	2,15	D	0,08
B	2,56	F	0,60
C	1,53	C	1,5274
D	0,08	G	2,05
E	4,89	A	2,15

F	0,60	t(95%,GL)	2,45
G	2,05	B	2,56
t(95%,GL)	2,45	E	4,89

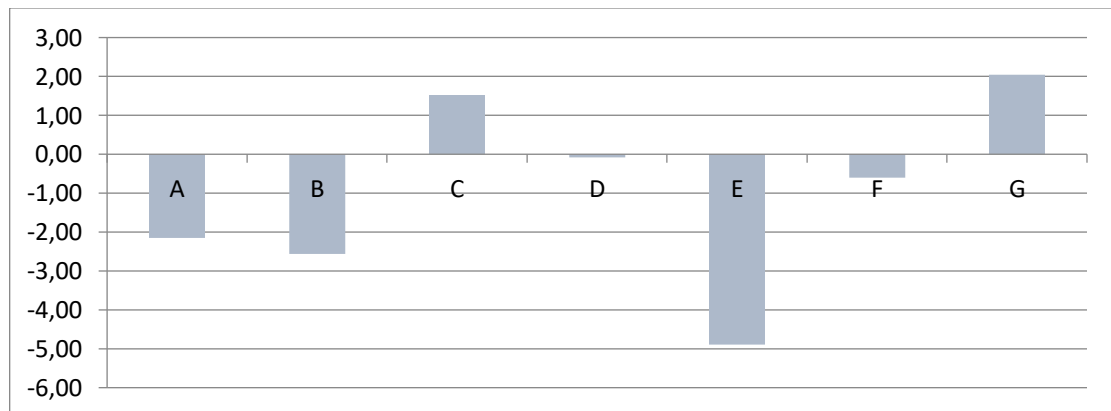
Fuente. Propia

Gráfico 12. Diagrama de Pareto del Análisis de Diseño Experimental tomando en cuenta el Factor de Asimetría



Fuente. Propia

Gráfico 13. Efectos de los Factores e Influencia en Nivel (+) y Nivel (-) de la simetría del Ácido Salicílico



Fuente. Propia

2.1 Interpretación de los resultados del Diseño Experimental tomando como respuesta cromatográfica el factor de Asimetría

En el “Grafico 13” se muestra que los factores B (Flujo) y E (Columna Cromatográfica) influyen de manera estadísticamente Significativa en la simetría del pico del Ácido Salicílico por lo que se tienen que mantener en el nivel (-) según la “Grafica 14”.

Por lo que el Factor B (Flujo) debe ser de 2mL/min y el factor E (Columna Cromatográfica) debe ser una columna C18

2.2 Análisis Estadístico del Diseño Experimental tomando como respuesta la Asimetría del Ácido Acetilsalicílico

Se utilizó la prueba de “t” de Student para determinar cuáles son las condiciones cromatográficas que influyen de manera estadísticamente significativa en la simetría del Ácido Acetilsalicílico

Tabla 21. Resultados del Diseño Experimental tomando como respuesta la Asimetría del Ácido Acetilsalicílico

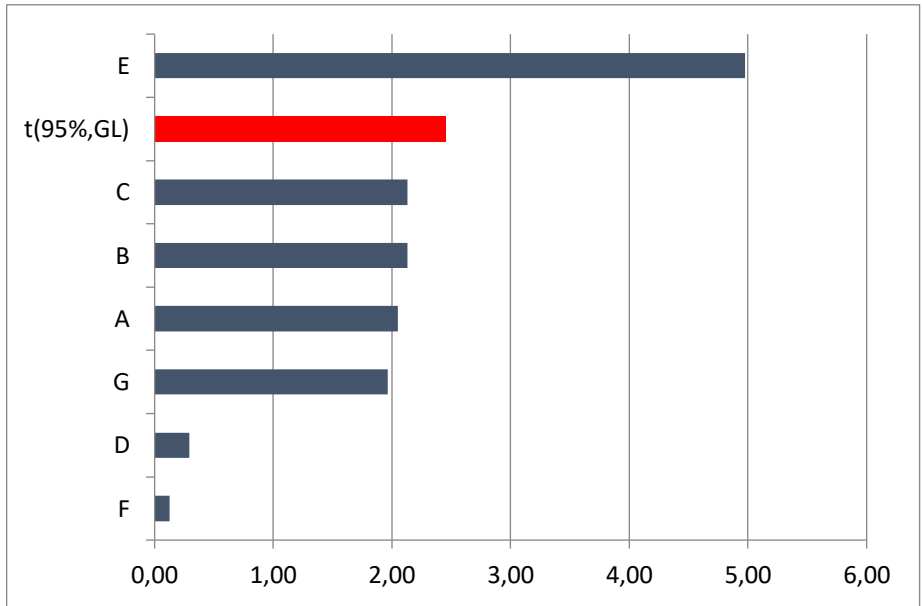
EXP	A	B	C	D	E	F	G	RESPUESTA
1	+	-	+	+	-	-	+	0,84
2	+	+	-	+	+	-	-	0,61
3	-	+	+	-	+	+	-	0,49
4	-	-	+	+	-	+	+	0,85
5	+	-	-	+	+	-	+	0,47
6	+	+	-	-	+	+	-	0,57
7	-	+	+	-	-	+	+	0,81
8	-	-	-	-	-	-	-	0,83
E(+)	0,6225	0,62	0,7475	0,6925	0,535	0,68	0,7425	
E(-)	0,745	0,7475	0,62	0,675	0,8325	0,6875	0,625	
E(+)+E(-)	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	
E(+)-E(-)	-0,12	-0,13	0,13	0,02	-0,30	-0,01	0,12	
Ei	EA	EB	EC	ED	EE	EF	EG	
	-0,12	-0,13	0,13	0,02	-0,30	-0,01	0,12	
E ²	0,015006	0,0163	0,0162563	0,0003	0,0885	6E-05	0,0138	
s ²	0,021456							

S	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
EXP	A	B	C	D	E	F	G
Ti	-2,05	-2,13	2,13	0,29	-4,97	-0,13	1,96
Ti	2,05	2,13	2,13	0,29	4,97	0,13	1,96

A	2,05	F	0,13
B	2,13	D	0,29
C	2,13	G	1,9649
D	0,29	A	2,05
E	4,97	B	2,13
F	0,13	C	2,13
G	1,96	t(95%,GL)	2,45
t(95%,GL)	2,45	E	4,97

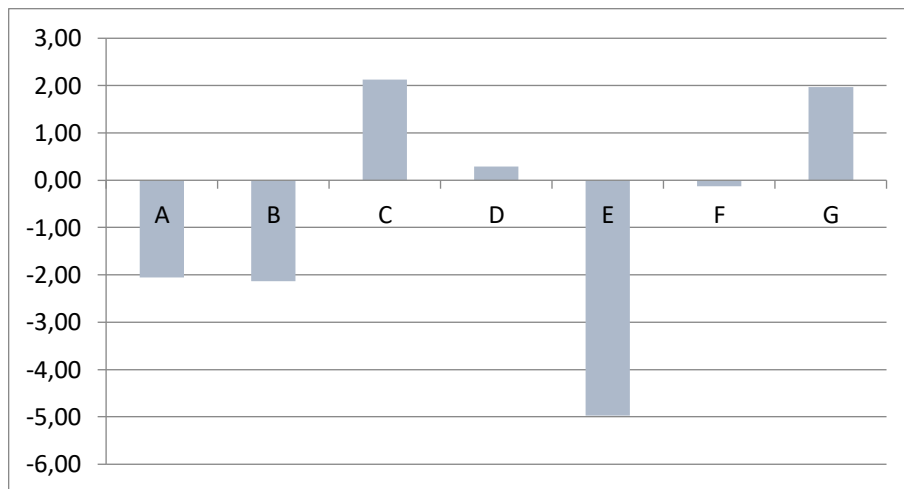
Fuente. Propia

Gráfico 14. Diagrama de Pareto del Análisis de Diseño Experimental tomando en cuenta el Factor de Asimetría



Fuente. Propia

Gráfico 15. Efectos de los Factores e Influencia en Nivel (+) y Nivel (-) de la simetría del Ácido Acetilsalicílico



Fuente. Propia

2.3 Interpretación de los resultados del Diseño Experimental tomando como respuesta cromatográfica el factor de Asimetría

En el “Gráfico 14” se muestra que el factor E (Columna Cromatográfica) influye de manera estadísticamente Significativa en la simetría del pico del Ácido Acetilsalicílico por lo que se tienen que mantener en el nivel (-) según la “Gráfica 15”.

Por lo que el factor E (Columna Cromatográfica) debe ser una columna C18

2.4 Análisis Estadístico del Diseño Experimental tomando como respuesta la Resolución del Ácido Acetilsalicílico y el Ácido Salicílico

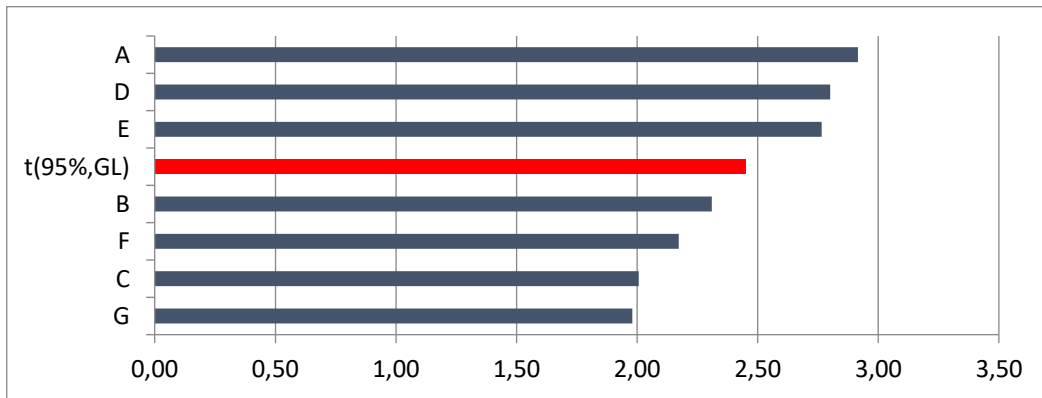
Tabla 22. Resultados del Diseño Experimental tomando como respuesta la Resolución del Ácido Acetilsalicílico y el Ácido Salicílico

EXP	A	B	C	D	E	F	G	RESPUESTA
1	+	-	+	+	-	-	+	1,17
2	+	+	-	+	+	-	-	0,84
3	-	+	+	-	+	+	-	1,43
4	-	-	+	+	-	+	+	1,08
5	+	-	-	+	+	-	+	1,48
6	+	+	-	-	+	+	-	0,88
7	-	+	+	-	-	+	+	2,28
8	-	-	-	-	-	-	-	9,80
E(+)	1,0925	1,3575	1,49	1,1425	1,1575	1,4175	1,5025	
E(-)	3,6475	3,3825	3,25	3,5975	3,5825	3,3225	3,2375	
E(+)+E(-)	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	
E(+)-E(-)	-2,56	-2,03	-1,76	-2,46	-2,43	-1,91	-1,74	
Ei	EA	EB	EC	ED	EE	EF	EG	
	-2,56	-2,03	-1,76	-2,46	-2,43	-1,91	-1,74	
E ²	6,528025	4,1006	3,0976	6,027	5,8806	3,629	3,0102	
s ²	4,61045							
s	2,15	2,15	2,15	2,15	2,15	2,15	2,15	
EXP	A	B	C	D	E	F	G	
ti	-2,91	-2,31	-2,01	-2,80	-2,77	-2,17	-1,98	
ti	2,91	2,31	2,01	2,80	2,77	2,17	1,98	

A	2,91	G	1,98
B	2,31	C	2,01
C	2,01	F	2,17
D	2,80	B	2,31
E	2,77	t(95%,GL)	2,45
F	2,17	E	2,77
G	1,98	D	2,8006
t(95%,GL)	2,45	A	2,91

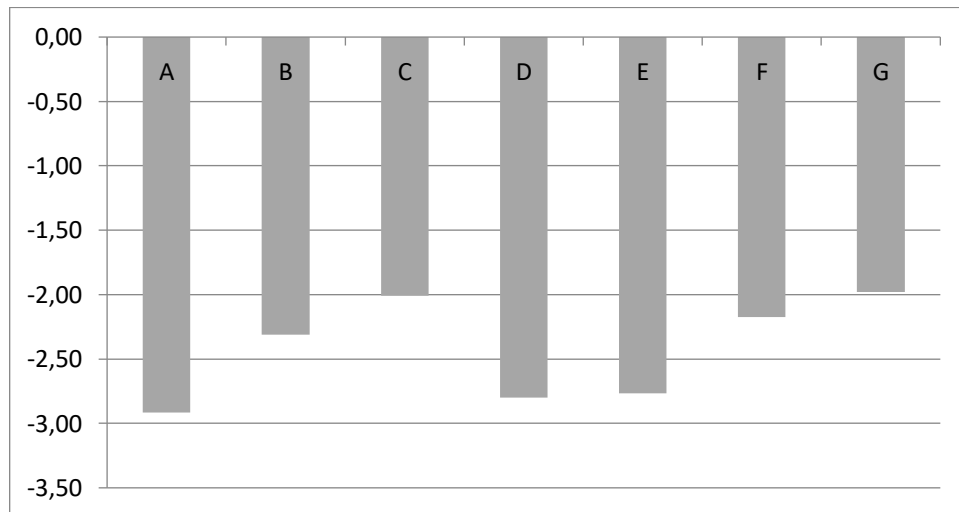
Fuente. Propia

Gráfico 16. Diagrama de Pareto del Análisis de Diseño Experimental tomando la Resolución del Ácido Acetilsalicílico y el Ácido Salicílico



Fuente. Propia

Gráfico 17. Efectos de los Factores e Influencia en Nivel (+) y Nivel (-) de la Resolución del Ácido Acetilsalicílico y el Ácido Salicílico



Fuente. Propia

2.5 Interpretación de los resultados del Diseño Experimental tomando como respuesta cromatográfica la Resolución entre el Ácido Acetilsalicílico y el Ácido Salicílico

En el “Grafico 16” se muestra que los factores A (pH), D (λ -longitud de onda) y E (Columna Cromatográfica) influyen de manera estadísticamente Significativa en la Resolución del Ácido Acetilsalicílico y el Ácido Salicílico por lo que se tienen que mantener en el nivel (-) según la “Grafica 17”.

Por lo que el factor A (pH de la Fase Móvil) debe ser a pH=2,04

Por lo que el factor D (λ -longitud de onda) debe ser a una $\lambda=236\text{nm}$

Por lo que el factor E (Columna Cromatográfica) debe ser una columna C18

2.6 Condiciones Cromatográficas del Método Analítico resultado del Análisis Estadístico del Diseño Experimental

Tras el análisis Estadístico de los diseños experimentales en los que se tomó en cuenta simetría y resolución cromatográfica se tienen las siguientes Condiciones Cromatográficas para proceder con la validación del método

Tabla 23. Condiciones Cromatográficas para proceder con la validación del método

EXP	A	B	C	D	E	F	G
8	pH de la fase móvil pH=2,04	Flujo de la Fase Móvil F=2mL/min	Concentración del Buffer 15mM	Longitud de Onda $\lambda=236\text{nm}$	Columna C18	Diluyente Buffer	Proporción de la Fase Móvil Buf(75%):ACN(25%)

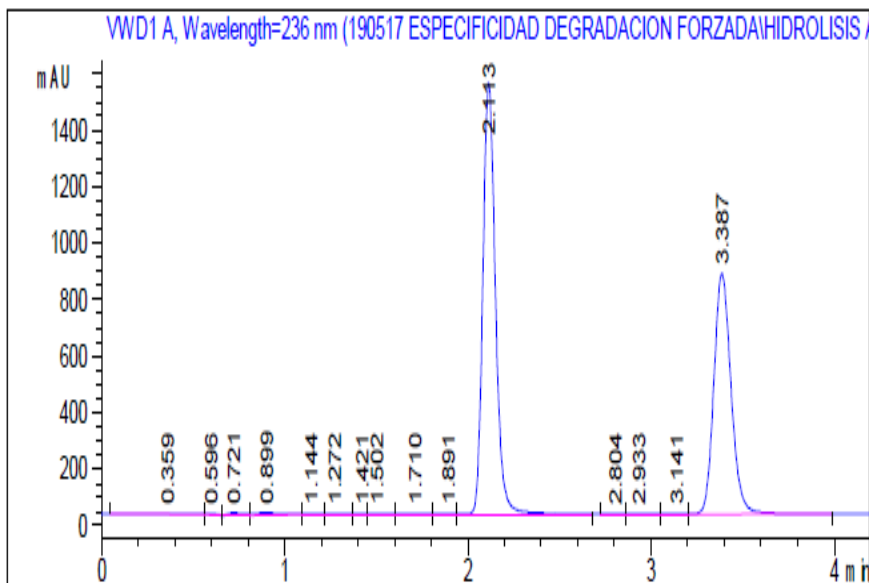
Fuente. Propia

3. Resultado de la degradación Forzada del Ácido Acetilsalicílico

3.1 Resultado de la Hidrolisis Acida del Ácido Acetilsalicílico

Se sometió una solución de concentración final de 0,5mg/mL de Ácido Acetilsalicílico en HCl 0,1 N en una estufa a 70°C

Gráfico 18. Hidrolisis Acida del Ácido Acetilsalicílico a 70°C



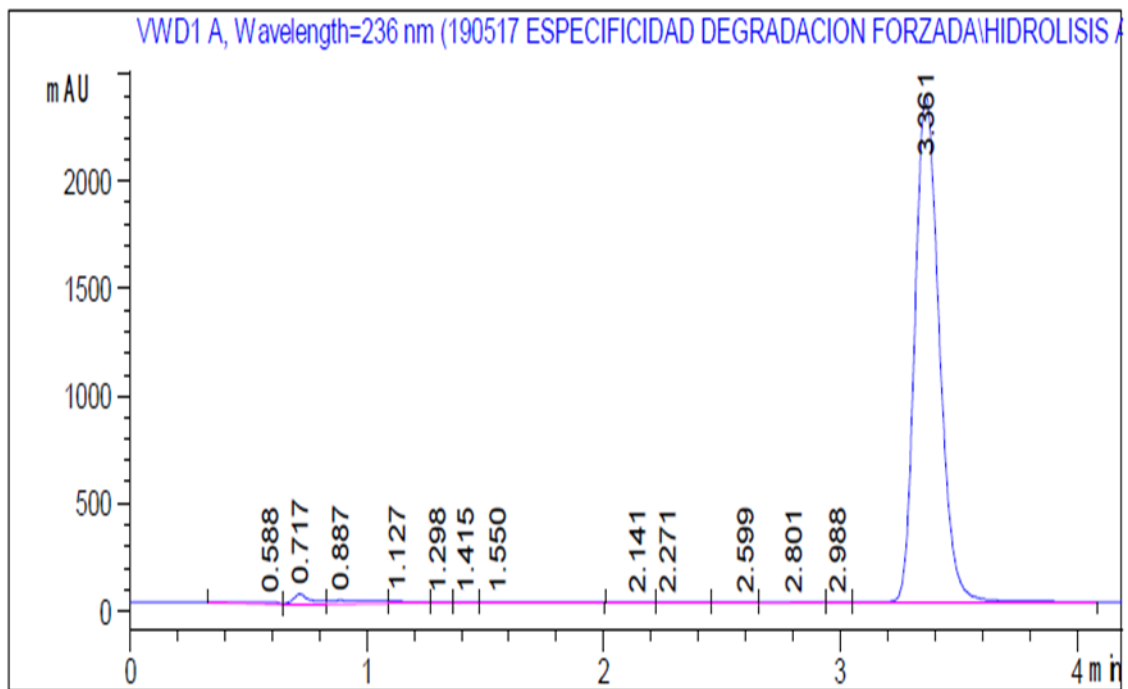
Fuente. Propia

Se observa que los tiempos de retención del Ácido Acetilsalicílico 2,113 min y el Ácido Salicílico 3,387 min no cambian cromatográficamente, pero hay aparición de respuesta analíticas ruidosas

3.2 Resultado de la Hidrólisis Alcalina del Ácido Acetilsalicílico

Se sometió una solución de concentración final de 0,5mg/mL de Ácido Acetilsalicílico en NaOH 0,1 N en una estufa a 70°C

Gráfico 19. Hidrolisis Alcalina del Ácido Acetilsalicílico a 70°C



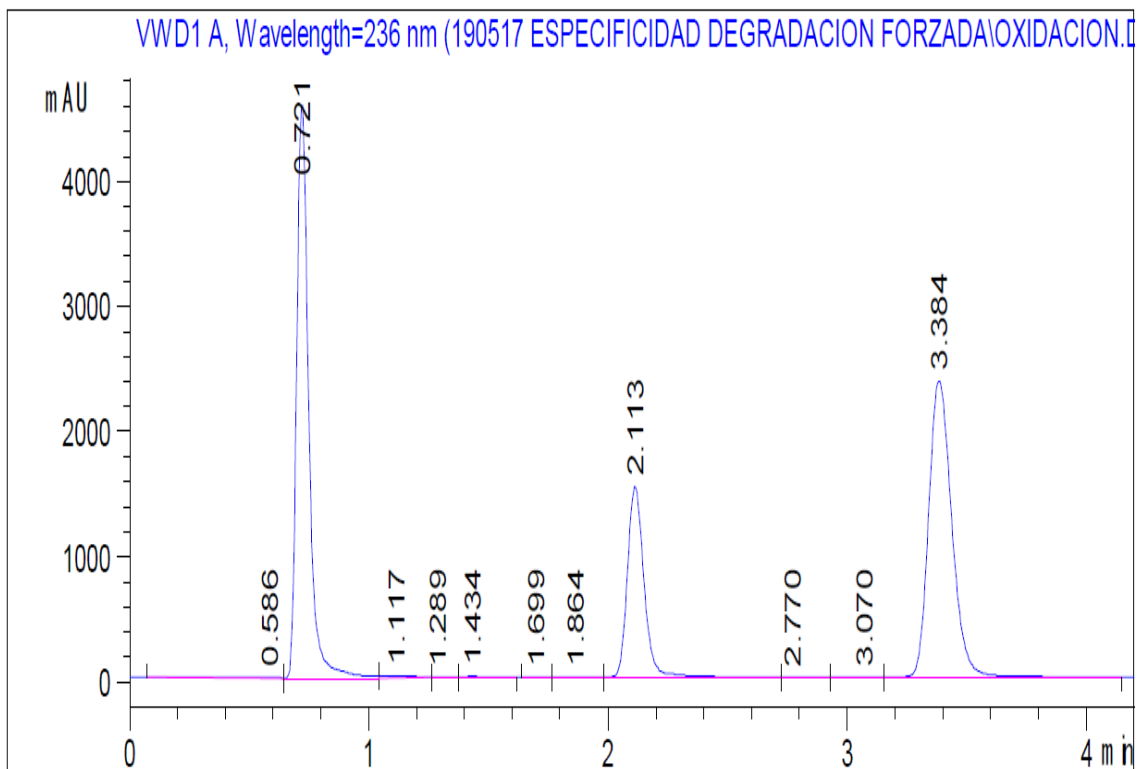
Fuente. Propia

Se observa que los tiempos de retención del Ácido Acetilsalicílico 2,141min y el Ácido Salicílico 3,361min no cambian cromatográficamente, hay aparición de respuesta analíticas ruidosas y es evidente la hidrolisis del Ácido Acetilsalicílico y su degradación a Ácido Salicílico a tiempo de retención de 3,361 min

3.3 Resultado de la Oxidación del Ácido Acetilsalicílico

Se sometió una solución de concentración final de 0,5mg/mL de Ácido Acetilsalicílico en H₂O₂ al 3% en una estufa a 70°C

Gráfico 20. Oxidación del Ácido Acetilsalicílico a 70°C



Fuente. Propia

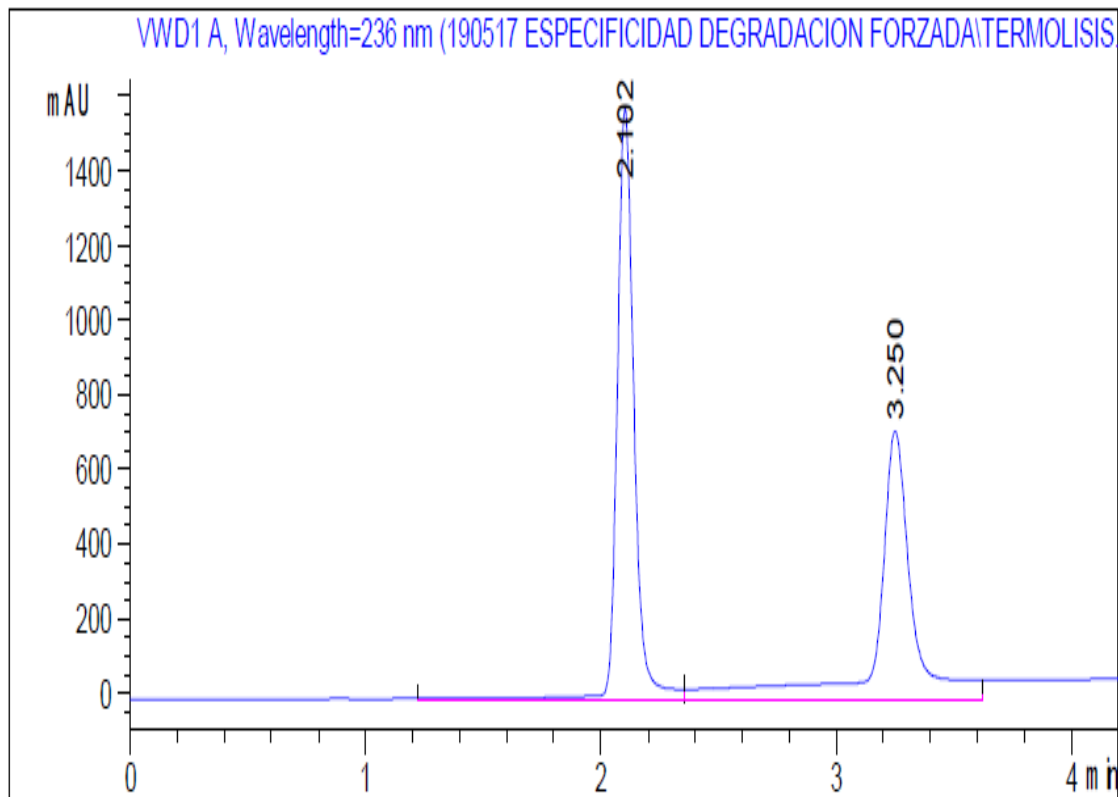
Se observa que los tiempos de retención del Ácido Acetilsalicílico 2,113min y el Ácido Salicílico 3,384min no cambian cromatográficamente, hay aparición de respuesta analítica ruidosa y es evidente la hidrólisis del Ácido Acetilsalicílico y su degradación a Ácido Salicílico a tiempo de retención de 3,384 min.

También aparece un producto de degradación por el proceso de Oxidación a 0,721 min

3.4 Resultado de la Termólisis del Ácido Acetilsalicílico

Se sometió una solución de concentración final de 0,5mg/mL de Ácido Acetilsalicílico en H₂O destilada en una estufa a 70°C

Gráfico 21. Termólisis del Ácido Acetilsalicílico a 70°C



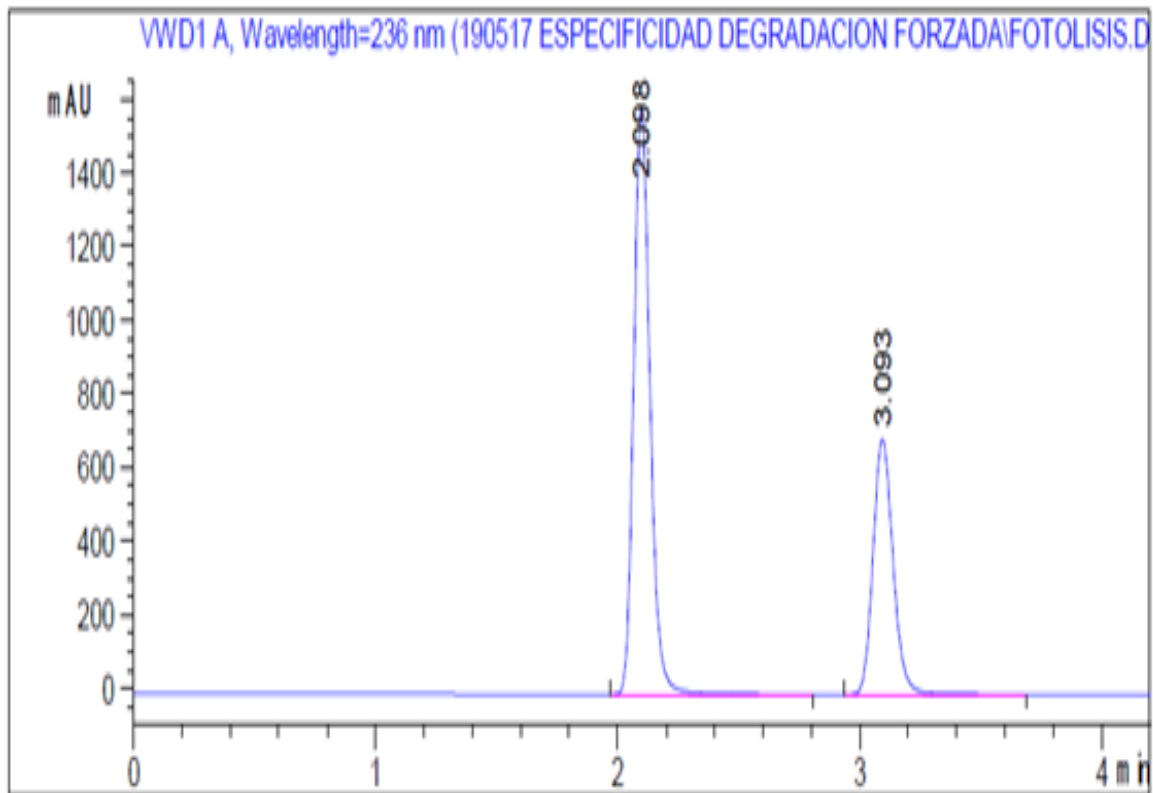
Fuente. Propia

Se observa que los tiempos de retención del Ácido Acetilsalicílico 2,102min y el Ácido Salicílico 3,250min no cambian cromatográficamente, hay aparición de respuesta analíticas ruidosas y es evidente la hidrólisis del Ácido Acetilsalicílico y su degradación a Ácido Salicílico a tiempo de retención de 3,250 min.

3.5 Resultado de la Fotólisis del Ácido Acetilsalicílico

Se sometió una solución de concentración final de 0,5mg/mL de Ácido Acetilsalicílico en H₂O destilada en una estufa a 25°C

Gráfico 22. Fotólisis del Ácido Acetilsalicílico a 25°C



Fuente. Propia

Se observa que los tiempos de retención del Ácido Acetilsalicílico 2,098min y el Ácido Salicílico 3,093min no cambian cromatográficamente, la degradación es mínima

3.6 Análisis del comportamiento de degradación del Ácido Acetilsalicílico

Se realizó el Análisis del comportamiento de degradación del Ácido Acetilsalicílico en las diferentes condiciones de estrés catalítico como ser la hidrólisis acida, hidrólisis básica, hidrólisis oxidativa, fotólisis, termólisis y en condiciones normales

Tabla 24. Porcentajes de Degradación del Ácido Acetilsalicílico y % de generación del Ácido Salicílico

ST Ácido Acetilsalicílico (área)	ST Ácido Salicílico (área)
7896,11	3643
HIDROLISIS ACIDA	
Área Ácido Acetilsalicílico	Área Ácido Salicílico
7335,31	5559,83
% Degradación Ácido Acetilsalicílico	% Aumento Ácido Salicílico
7,1%	52,6%
HIDROLISIS ALCALINA	
Área Ácido Acetilsalicílico	Área Ácido Salicílico
79,37	16843,6
% Degradación Ácido Acetilsalicílico	% Aumento Ácido Salicílico
99,0%	362,4%
OXIDACION	
Área Ácido Acetilsalicílico	Área Ácido Salicílico
7460,97	15816,8
% Degradación Ácido Acetilsalicílico	% Aumento Ácido Salicílico
5,5%	334,2%
TERMOLISIS	
Área Ácido Acetilsalicílico	Área Ácido Salicílico
7869,63	7531,74
% Degradación Ácido Acetilsalicílico	% Aumento Ácido Salicílico
0,3%	106,7%
FOTOLISIS	
Área Ácido Acetilsalicílico	Área Ácido Salicílico
7442,33	3983,06
% Degradación Ácido Acetilsalicílico	% Aumento Ácido Salicílico
5,7%	9,3%

Fuente: Propia

4. Validación del Método Analítico para el Ácido Acetilsalicílico

4.1 Validación del Método

4.2 Ensayo de Especificidad

Tabla 25. Resultados de Especificidad del Método para el Ácido Acetilsalicílico

ESPECIFICIDAD		
CONDICIONES ANALITICAS DEL METODO		
PRUEBA	ESPECIFICIDAD	
PRINCIPIO ACTIVO	ACIDO ACETILSALICILICO	
CONCENTRACION	0,5mg/mL	
LONGITUD DE ONDA	UV 236 nm	
COLUMNA	C18	
METODO	CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION	
DETERMINACION		
ENSAYO	P.A. + MATRIZ	P.A.
1ER ENSAYO	7867,46	7896,11
2DO ENSAYO	7894,21	7901,47
3ER ENSAYO	7585,97	7706,32
4TO ENSAYO	7573,67	7697,82
5TO ENSAYO	7567,33	7704,32
6TO ENSAYO	7968,46	7830,44
PROMEDIO	7742,85	7789,41
S	186,21	98,14
CV	2,40	1,26
VARIANZA	34675,57	9631,76
"F" DE FISHER CALCULADO	3,60	
"F" (0,05-n=5-d=5)	5,05	
CONCLUSION	VARIANZAS IGUALES	
"t" CALCULADO	0,54	
"t" TABULADO(0,05-GL=10)	2,23	
CONCLUSION	METODO ESPECIFICO	
% DE DISCREPANCIA	0,60	
CONCLUSION	LA MATRIZ NO ES UN INTERFERENTE SIGNIFICATIVO	
DIF. ENTRE MEDIAS	46,56	
ERROR ESTANDAR	85,93	

LIMITE SUPERIOR	238,03
LIMITE INFERIOR	-144,91

Fuente: Propia

4.2.1 Interpretación y discusión

Se evidencia que las varianzas entre el grupo “PA+Matriz” y”PA” son estadísticamente homogéneas con un 95% de nivel de confianza, por lo que se concluye que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas de ambos grupos lo que permite determinar igualdad de promedios con la prueba de “t” de Student

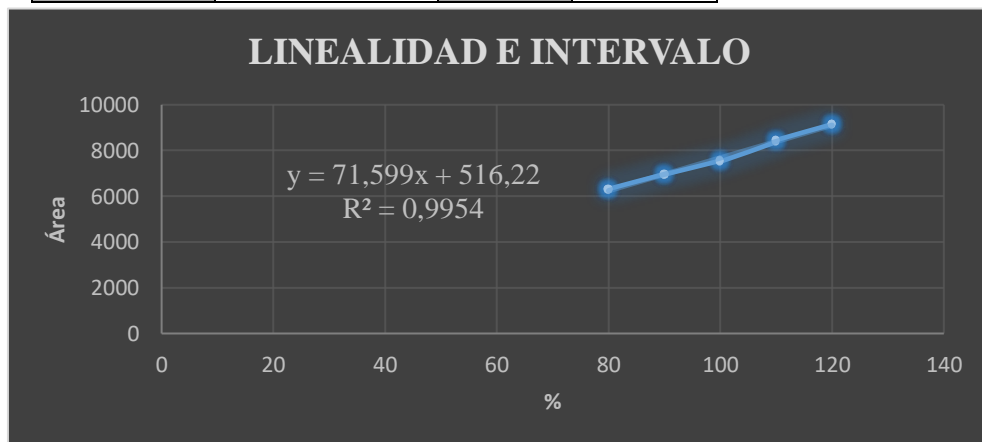
Con la prueba de “t” de Student se concluye que con un 95% de nivel de confianza no hay diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de ambos grupos por lo que se concluye que el método es Específico.

El % de discrepancia entre ambos grupos es de 0,6% que según la A.E.F.I. se recomienda que sea menor al 2%

4.3 Ensayo de Linealidad del Método Analítico

Tabla 26 Resultados del Ensayo de Linealidad del método para el Ácido Acetilsalicílico

Linealidad e Intervalo de Análisis							
C (mg/mL)	C (%)	Y(Respuesta)	X ²	Y ²	X*Y	f(y/x)	Promedio de f
0,4	80	6280,42	6400	39443675,38	502433,6	78,50525	78,729833 33
0,4	80	6295,32	6400	39631053,9	503625,6	78,6915	
0,4	80	6319,42	6400	39935069,14	505553,6	78,99275	
0,45	90	6967,79	8100	48550097,48	627101,1	77,4198889	77,356222 22
0,45	90	6966,18	8100	48527663,79	626956,2	77,402	
0,45	90	6952,21	8100	48333223,88	625698,9	77,2467778	
0,5	100	7555,31	10000	57082709,2	755531	75,5531	75,496266 67
0,5	100	7576,38	10000	57401533,9	757638	75,7638	
0,5	100	7517,19	10000	56508145,5	751719	75,1719	
0,55	110	8373,66	12100	70118181,8	921102,6	76,1241818	76,566121 21
0,55	110	8434,74	12100	71144838,87	927821,4	76,6794545	
0,55	110	8458,42	12100	71544868,9	930426,2	76,8947273	
0,6	120	9146,73	14400	83662669,69	1097607,6	76,22275	76,235222 22
0,6	120	9133,42	14400	83419360,9	1096010,4	76,1118333	
0,6	120	9164,53	14400	83988610,12	1099743,6	76,3710833	
Σ	1500	115141,72	153000	899291702,4	11728968,8		
	A	516,221333	B	71,59893333	N	15	
	R	0,99768560	r ²	0,995376569			



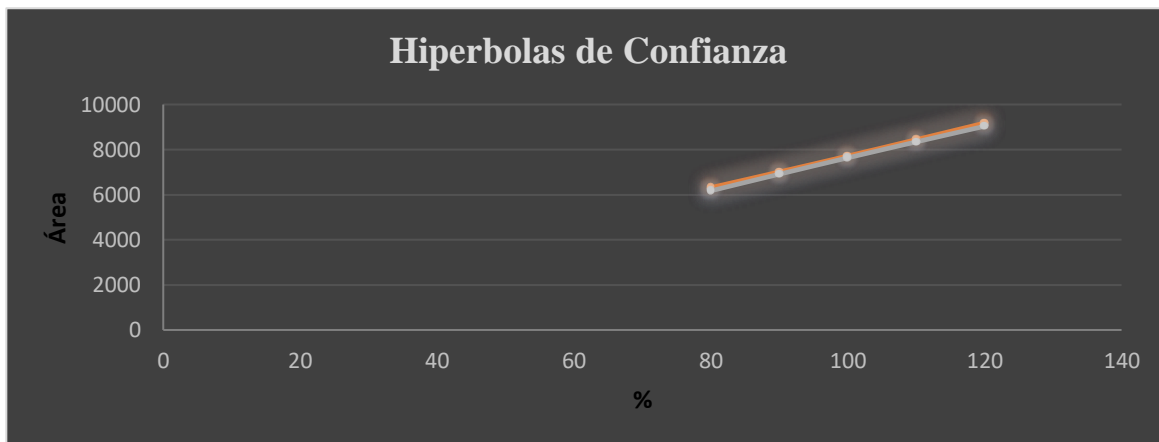
Desviación Est. de la Regresión($S^2_{x,y}$)	5495,0032
Desviación Est. de la Pendiente(S_b)	1,3533912
LC de La Pendiente $LC=b\pm t*S_b$	
Inferior	68,6751094
Superior	74,5227573
Desviación Est. Del Intercepto(S_a)	136,685811
LC del Intercepto $LC=a\pm t*S_a$	
Inferior	220,929592
Superior	811,513075
Test para la Regresión Lineal	52,9033538
Valor de de "t" Critico al 95%;n-2	2,16036866
Conclusión de la Regresión Lineal	Hay Correlación proporcional entre x.y
Test de la pendiente(b)	52,9033538
"t" de Student Critico(0,05,n-2)	2,16036866
Conclusión del comportamiento de (b)	La pendientes es diferente de Cero
Test del Intercepto (a)	3,77670023
"t" de Student Critico(0,05,n-2)	2,16036866
Conclusión del comportamiento de (a)	El Intercepto es diferente de Cero

ANALISIS DE VARIANZA DE LA REGRESION LINEAL	
Sxy	214796,8
Sxx	3000
SCr	15379221, 76
SCep	7034,1464 67
SCec	15443622, 66
SCI	64400,895 09

ANOVA						
Fv	Gl	SC	CM	Fexp	F Critico	Conclusión

Regresión	1	15379221,8	15379221,76	21863,66 44	4,964602 74	La Regresión es Estadísticamen te Lineal
Linealidad	3	64400,8951	21466,96503	30,51822 3	3,708264 82	La falta de ajuste es representativa
Total	10	7034,14647	703,4146467			

Hipérbolas de Confianza			
X	y	y+	y-
80	6244,136	6315,238	6173,03379
90	6960,125333	7010,402	6909,84848
100	7676,114667	7717,166	7635,06379
110	8392,104	8442,381	8341,82715
120	9108,093333	9179,196	9036,99113



Fuente: Propia

4.3.1 Interpretación y Discusión estadística

Se demuestra que hay correlación lineal debido a que el coeficiente de correlación de Pearson $r=0,9977$ y el coeficiente de determinación $r^2=0,9954$.

El valor de “t” de Student de Regresión es de $t_r=52,9$ con lo que se concluye que existe correlación entre el eje “X” que es la concentración y el eje “Y” que es el área

El intercepto “a” con un 95% de nivel de confianza se demuestra que es estadísticamente igual a cero ($a=0$) por lo que se disminuye la probabilidad de obtener resultados falsos positivos o negativos

La pendiente “b” con un 95% de nivel de confianza se demuestra que es estadísticamente diferente de cero ($b\neq 0$) por lo que hay una relación directamente proporcional entre “X” y “Y” o sea entre la concentración y el área del pico en el cromatograma

EL ANOVA demuestra que la regresión es estadísticamente lineal en el intervalo propuesto, por lo que se concluye que con un 95% de nivel de confianza el intervalo de 80%, 90 %, 100%, 110% y 120 % es adecuado para el análisis del Ácido Acetilsalicílico

4.4 Ensayo de Exactitud

Tabla 27. Resultados del Ensayo de Exactitud del método para el Ácido Acetilsalicílico

EXACTITUD	
MOLECULA:	ACIDO ACETILSALICILICO
CONCENTRACION:	0,4mg/mL-0,5mg/mL-0,6mg/mL
LONGITUD DE ONDA:	UV 236 nm
SOLVENTE:	ACN:NaH ₂ PO ₄ 30mM pH=2,04 (50:50)
METODO:	
Concentración (%)	RESPUESTA DE ACIDO ACETIL SALICILICO (ST)

80	6280,42	6295,32	6319,42
100	7555,31	7576,38	7517,19
120	9146,73	9133,42	9164,53
Concentración (%)	RESPUESTA DE ACIDO ACETIL SALICILICO (M)		
80	6405,99	6368,2	6362,93
100	7498,84	7512,27	7779,64
120	9188,9	9128,66	9186,52

Concentración del IFA	Recuperación (%)		
80	81,6	80,9	80,6
100	99,3	99,2	103,5
120	120,6	119,9	120,3
Concentración del IFA	Recuperación Media		
80	102,00	101,16	100,69
100	99,25	99,15	103,49
120	100,46	99,95	100,24
% de Recuperación Media	100,71		
S	1,37		
CV (%)	1,36		
N	9,00		
"t" Experimental	1,57		
"t" (0,05,n-1)	2,31		
Conclusión	METODO EXACTO		
Media	S	S2	G de Cochran
81,03	0,53	0,28	0,94197023
100,63	2,48	6,13	G Critico
120,26	0,31	0,10	0,8709

Conclusión
Método Exacto, El factor concentración si influye en la Variabilidad de los Resultados

Fuente: Propia

4.4.1 Interpretación y discusión estadística

Tras el análisis estadístico se demuestra que el “t” de Student Calculado $t=1,57$ y de t crítico $t_c=2,31$ que con un 95% de nivel de confianza no se detecta diferencia estadísticamente significativa entre el 100% y el % de recuperación media (100,71%) por lo que se concluye que el método es Exacto en los tres niveles de concentración. Aunque el factor concentración si influye en la Variabilidad de los Resultados en los tres niveles de concentración

4.5 Ensayo de Precisión

Repetibilidad Instrumental

Tabla 28 Repetibilidad Instrumental Acido Acetilsalicílico

REPLICA	RESPUESTA ANALITICA
1	36048
2	36706
3	37240
4	35948
5	36478
6	37215
PROMEDIO	36605,83333
DESVIACION ESTANDAR	555,6165644
COEFICIENTE DE VARIACION(%)	1,517836131

Se obtuvo un coeficiente de variación de 1,52% que es menor al 2%, por lo que se considera que el instrumento tiene la capacidad de ofrecer respuestas estadísticamente repetibles

Repetibilidad del Método

Tabla 29 Repetibilidad del Método Ácido Acetilsalicílico

NIVEL DE CONCENTRACION	RESPUESTA ANALITICA	RELACION
80	6405,9900	80,07488
80	6368,2000	79,60250
80	6362,9300	79,53663
100	7498,8400	74,98840
100	7512,2700	75,12270
100	7779,6400	77,79640
120	9188,9000	76,57417
120	9128,6600	76,07217
120	9186,5200	76,55433
	PROMEDIO	77,36913
	DESVIACION ESTANDAR	1,964748364
	COEFICIENTE DE VARIACION(%)	2,539447417

Se obtuvo un coeficiente de variación de 2,54% que es menor al 6,71% (Tabla 13. Coeficientes de Variación Máximos Acetales), por lo que se considera que el método tiene la capacidad de ofrecer relaciones de respuesta y concentración estadísticamente repetibles

Tabla 30. Resultados de Ensayo de Precisión del método para el Ácido Acetilsalicílico

PRECISION	
DATOS DE IDENTIFICACION	
MOLECULA:	ACIDO ACETILSALICILICO
CONCENTRACION:	0,4mg/mL-0,5mg/mL-0,6mg/mL
LONGITUD DE ONDA:	UV 236 nm
SOLVENTE:	ACN:NaH2PO4 30mM pH=2,04 (50:50)
METODO:	CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

PRECISION INTERMEDIA	
CRITERIOS DE ACEPTACION	
COEFICIENTE DE VARIACION:	NO MAS DE 2%

RESPUESTAS ANALITICAS

ANALISTA X	DIA 1	DIA 2	DIA 3
	7968,46	7830,44	7766,03
	7971,91	7685,83	7777,41
	7988,09	7838,45	7762,88
ANALISTA Y	DIA 1	DIA 2	DIA 3
	7800,45	7885,54	7764,47
	7970,41	7857,74	7792,82
	7979,93	7853,35	7771,51

CALCULO DE PORCENTAJE

a	516,22
b	71,60

ANALISTA X	DIA 1	DIA 2	DIA 3
	104,08	102,16	101,26
	104,13	100,14	101,41
	104,36	102,27	101,21
CV(%)	0,14	1,18	0,11
ANALISTA Y	DIA 1	DIA 2	DIA 3
	101,74	102,92	101,23
	104,11	102,54	101,63
	104,24	102,48	101,33
CV(%)	1,36	0,24	0,20

CV TOTAL	1,2691
----------	--------

Fuente: Propia

4.5.1 Interpretación y discusión estadística

Tras el análisis estadístico se muestra que existe repetibilidad instrumental, repetibilidad del método, debido a que el coeficiente de variación de los Días 1,2 y 3 tanto para el analista “X” y “Y” son menores al 6,71 % (Tabla 13. Coeficientes de Variación Máximos Acetales) de acuerdo a la tabla de aceptación.

En cuanto a la precisión intermedia tomando en cuenta los datos de los 2 analistas en los 3 días, haciendo un total de 18 datos el coeficiente de variación es menor al 6,71% por lo que se concluye que el método es preciso para el Ácido Acetilsalicílico

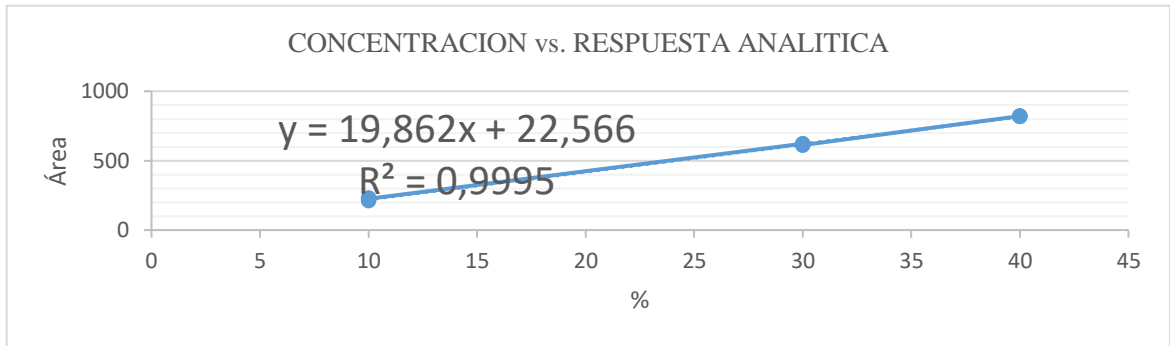
4.6 Ensayo para determinar Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Tabla 31. Resultados de Límite de Detección y Límite de Cuantificación del Método Analítico para el Ácido Acetilsalicílico

LIMITE DE DETECCION Y LIMITE DE CUANTIFICACION	
DATOS DE IDENTIFICACION	
MOLECULA:	ACIDO ACETILSALICILICO
CONCENTRACION:	0,05mg/mL-0,15mg/mL-0,2mg/mL
LONGITUD DE ONDA:	UV 236 nm
SOLVENTE:	ACN:NaH ₂ PO ₄ 30mM pH=2,04 (70:30)
METODO:	CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

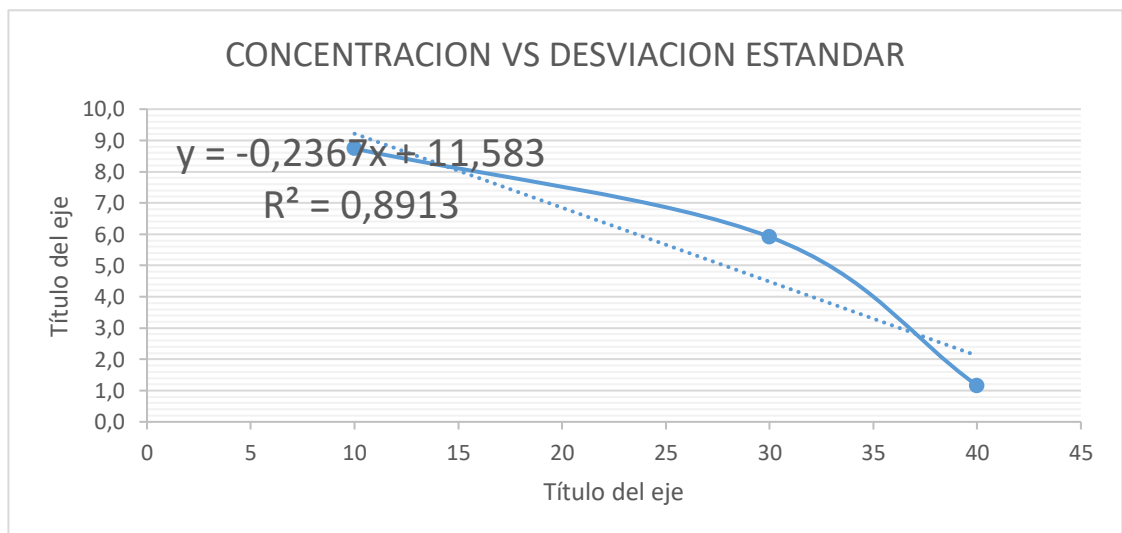
CONCENTRACION (%)	C(mg/m L)	RESPESTA ANALITICA	PROMEDI O	DESV. ESTANDAR
10	0,05	212,38	222,3	8,7
10	0,05	228,94		
10	0,05	225,5		
30	0,15	621,98	615,2	5,9

30	0,15	611,17		
30	0,15	612,42		
40	0,2	820,55	819,2	1,2
40	0,2	818,77		
40	0,2	818,37		



A	b	r
22,57	19,86	1,00
Ybl	Sbl	
19,86	11,58	-0,94

CONCENTRACION (%)	DES. ESTANDAR
10	8,7
30	5,9
40	1,2



A	b	r
11,58	-0,24	-0,94

Sbl
11,58303443

		UNIDADES
LIMITE DE DETECCION	0,44	%
LIMITE DE CUANTIFICACION	1,09	%
CONCENTRACION 100%	0,5	mg/mL
LIMITE DE DETECCION	0,002201848	mg/mL
LIMITE DE CUANTIFICACION	0,005470911	mg/mL

Fuente: Propia

4.6.1 Interpretación del Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Tras el análisis estadístico se tiene la conclusion que el metodo tiene la capacidad de detectar pero no necesariamente cuantificar una concentracion de 0,002201848mg/mL y también tiene la capacidad de cuantificar con exactitud y precisión concentraciones superiores a 0,005470911 mg/mL

5. Validación del Método Analítico para el Ácido Salicílico

5.1 Validación del Método Analítico

5.2 Ensayo Especificidad

Tabla 32. Resultados de Especificidad del Método para el Ácido Salicílico

ESPECIFICIDAD		
CONDICIONES ANALITICAS DEL METODO		
PRUEBA	ESPECIFICIDAD	
PRINCIPIO ACTIVO	ACIDO SALICILICO	
CONCENTRACION	0,1mg/mL	
LONGITUD DE ONDA	UV 236 nm	
COLUMNA	C18	
METODO	CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION	
DETERMINACION		
ENSAYO	P.A. + MATRIZ	P.A.
1ER ENSAYO	4039,99	4033,57
2DO ENSAYO	4029,05	4024,31
3ER ENSAYO	3789,48	3901,99
4TO ENSAYO	3781,53	3900,59
5TO ENSAYO	3779,12	3904,87
6TO ENSAYO	3643	3552,06
PROMEDIO	3843,70	3886,23
S	157,57	175,07
CV	4,10	4,50
VARIANZA	24828,07	30649,36
"F" DE FISHER CALCULADO	1,23	
"F" (0,05-n=5-d=5)	5,05	
CONCLUSION	VARIANZAS IGUALES	
"t" CALCULADO	0,44	
"t" TABULADO(0,05-GL=10)	2,23	
CONCLUSION	METODO ESPECIFICO	
% DE DISCREPANCIA	1,09	

CONCLUSION	LA MATRIZ NO ES UN INTERFERENTE SIGNIFICATIVO
DIF. ENTRE MEDIAS	42,54
ERROR ESTANDAR	96,16
LIMITE SUPERIOR	256,79
LIMITE INFERIOR	-171,72

Fuente: Propia

5.2.1 Interpretación y discusión

Se evidencia que las varianzas entre el grupo “PA+Matriz” y”PA” son estadísticamente homogéneas con un 95% de nivel de confianza, por lo que se concluye que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas de ambos grupos lo que permite determinar igualdad de promedios con la prueba de “t” de Student

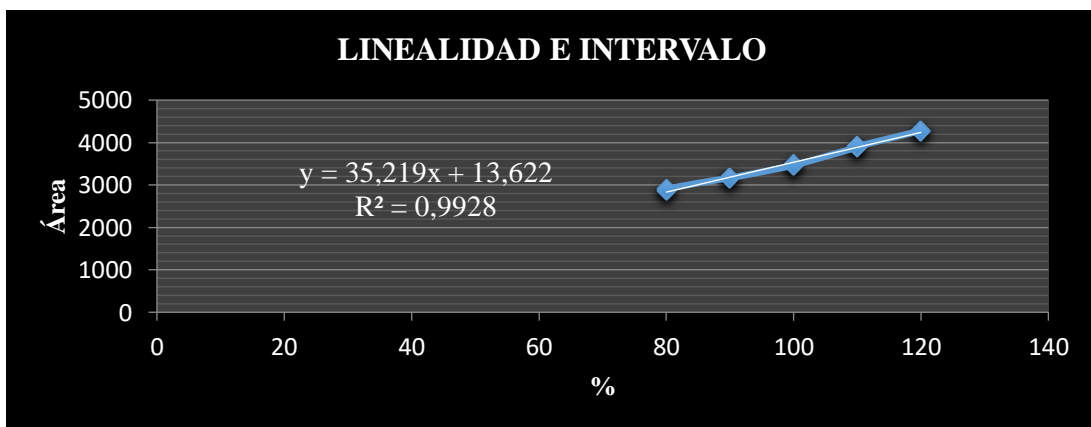
Con la prueba de “t” de Student se concluye que con un 95% de nivel de confianza no hay diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de ambos grupos por lo que se concluye que el método es Específico.

El % de discrepancia entre ambos grupos es de 1,09% que según la A.E.F.I. se recomienda que sea menor al 2%

5.3 Ensayo de Linealidad del Método

Tabla 33. Resultados del Ensayo de Linealidad del método para el Ácido Salicílico

Linealidad e Intervalo de Análisis							
C(mg/mL)	C(%)	Y(Respuesta)	X ²	Y ²	X*Y	f(y/x)	Promedio de f
0,08	80	2864,14	6400	8203297,94	229131,2	35,80175	35,95320833
0,08	80	2855,82	6400	8155707,872	228465,6	35,69775	
0,08	80	2908,81	6400	8461175,616	232704,8	36,36012	
0,09	90	3168,17	8100	10037301,15	285135,3	35,20188	35,16718519
0,09	90	3164,08	8100	10011402,25	284767,2	35,15644	
0,09	90	3162,89	8100	10003873,15	284660,1	35,14322	
0,1	100	3458,17	10000	11958939,75	345817	34,5817	34,6616
0,1	100	3480,72	10000	12115411,72	348072	34,8072	
0,1	100	3459,59	10000	11968762,97	345959	34,5959	
0,11	110	3889,38	12100	15127276,78	427831,8	35,358	35,46075758
0,11	110	3902,86	12100	15232316,18	429314,6	35,48054	
0,11	110	3909,81	12100	15286614,24	430079,1	35,54372	
0,12	120	4277,86	14400	18300086,18	513343,2	35,6488333	35,57816667
0,12	120	4266,65	14400	18204302,22	511998	35,55541	
0,12	120	4263,63	14400	18178540,78	511635,6	35,53025	
Σ	1500	53032,58	153000	191245008,8	5408914,5		
	a	13,622	b	35,21883333	n	15	
	r	0,996399547	r ²	0,992812056			



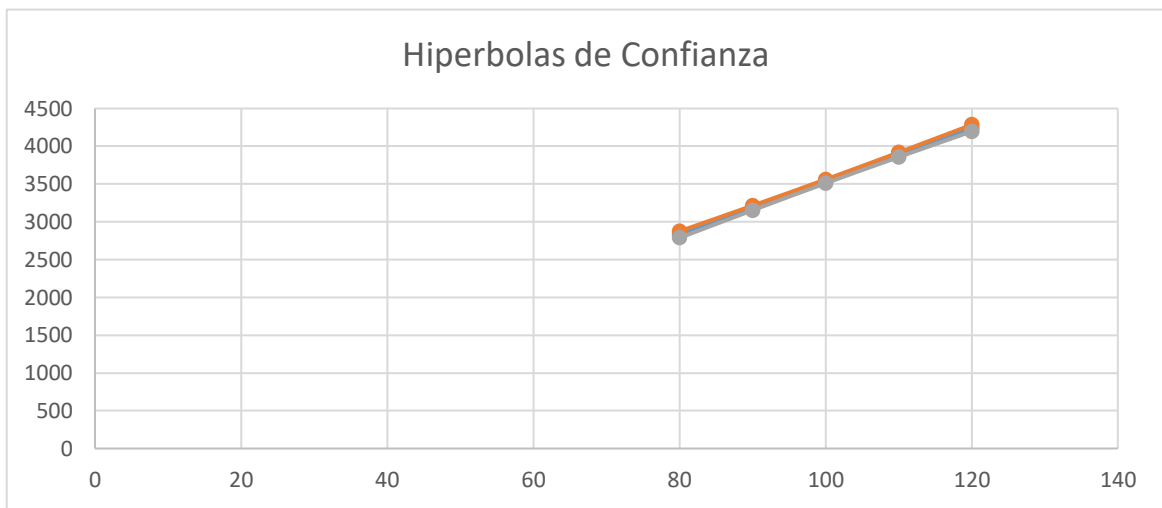
Desviación Est. de la Regresión($S^2_{x,y}$)	2072,36119
Desviación Est. de la Pendiente(S_b)	0,83113601
LC de La Pendiente $LC=b\pm t*S_b$	
Inferior	33,4232732
Superior	37,0143935
Desviación Est. Del Intercepto(S_a)	83,9406222
LC del Intercepto $LC=a\pm t*S_a$	
Inferior	-167,720689
Superior	194,964689
Test para la Regresión Lineal	42,3743322
Valor de de "t" Critico al 95%;n-2	2,16036866
Conclusión de la Regresión Lineal	Hay Correlación proporcional entre x,y
Test de la pendiente(b)	42,3743322
"t" de Student Critico(0,05,n-2)	2,16036866
Conclusión del comportamiento de (b)	La pendientes es diferente de Cero
Test del Intercepto (a)	0,16228138
"t" de Student Critico(0,05,n-2)	2,16036866
Conclusión del comportamiento de (a)	El Intercepto es Cero

ANALISIS DE VARIANZA DE LA REGRESION LINEAL	
Sxy	105656,5
Sxx	3000
SCr	3721098,664
SCep	2286,755
SCec	3745752,605
SCI	24653,94049

ANOVA						
Fv	GL	SC	CM	Fexp	F Critico	Conclusión
Regresión	1	3721098,66	3721098,664	16272,3976	4,96460274	La Regresión es Estadísticamente Lineal

Linealidad	3	24653,9405	8217,980163	35,9373005	3,70826482	La falta de ajuste es representativa
Total	10	2286,755	228,6755			

Hipérbolas de Confianza			
X	y	y+	y-
80	2831,128667	2874,794	2787,46383
90	3183,317	3214,193	3152,4413
100	3535,505333	3560,715	3510,29543
110	3887,693667	3918,569	3856,81797
120	4239,882	4283,547	4196,21716



Fuente: Propia

5.3.1 Interpretación y Discusión

Se demuestra que hay correlación lineal debido a que el coeficiente de correlación de Pearson $r=0,9963$ y el coeficiente de determinación $r^2=0,9928$.

El valor de “t” de Student de Regresión es de $t_r=42.37$ con lo que se concluye que existe correlación entre el eje “X” que es la concentración y el eje “Y” que es el área

El intercepto “a” con un 95% de nivel de confianza se demuestra que es estadísticamente igual a cero ($a=0$) por lo que se disminuye la probabilidad de obtener resultados falsos positivos o negativos

La pendiente “b” con un 95% de nivel de confianza se demuestra que es estadísticamente diferente de cero ($b\neq 0$) por lo que hay una relación directamente proporcional entre “X” y “Y” o sea entre la concentración y el área del pico en el cromatograma

EL ANOVA demuestra que la regresión es estadísticamente lineal en el intervalo propuesto, por lo que se concluye que con un 95% de nivel de confianza el intervalo de 80%, 90 %, 100%, 110% y 120 % es adecuado para el análisis del Ácido Acetilsalicílico

5.4 Ensayo de Exactitud

Tabla 34. Resultados del Ensayo de Exactitud del método para el Ácido Salicílico

EXACTITUD	
MOLECULA:	ACIDO SALICILICO
CONCENTRACION:	0,08mg/mL-0,1mg/mL-0,12mg/mL
LONGITUD DE ONDA:	UV 236 nm
SOLVENTE:	ACN:NaH ₂ PO ₄ 30mM pH=2,04 (50:50)
METODO:	CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

Concentración (%)	RESPUESTA DE ACIDO SALICILICO (ST)
-------------------	------------------------------------

80	2864,14	2855,82	2908,81
100	3458,17	3480,72	3459,59
120	4277,86	4266,65	4263,63
Concentración (%)	RESPUESTA DE ACIDO SALICILICO (M)		
80	2833,64	2829,63	2812,77
100	3401,53	3407,13	3522,60
120	4248,26	4221,70	4234,45

Concentración del IFA	Recuperación (%)		
80	79,1	79,3	77,4
100	98,4	97,9	101,8
120	119,2	118,7	119,2
Concentración del IFA	Recuperación Media		
80	98,94	99,08	96,70
100	98,36	97,89	101,82
120	99,31	98,95	99,32
% de Recuperación Media	98,93		
S	1,37		
CV (%)	1,39		
N	9		
"t" Experimental	2,32		
"t" (0,01,n-1)	3,36		
Conclusión	METODO EXACTO		
Media	S	S2	G de Cochran
78,59	1,07	1,14	0,792686966
99,36	2,15	4,61	G Critico
119,03	0,25	0,06	0,8709

Conclusión	El factor concentración no influye en la Variabilidad de los Resultados
------------	---

Fuente: Propia

5.4.1 Interpretación y discusión

Tras el análisis estadístico se demuestra que el “t” de Student Calculado $t=2,31$ y de t crítico $t_c=2,31$ que con un 99% de nivel de confianza no se detecta diferencia estadísticamente significativa entre el 100% y el % de recuperación media (98,93%) por lo que se concluye que el método es Exacto con tres niveles de concentración. el factor concentración no influye en la Variabilidad de los Resultados

5.5 Ensayo de Precisión

Repetibilidad Instrumental

Tabla 35 Repetibilidad Instrumental Acido Salicílico

REPLICA	RESPUESTA ANALITICA
1	36048
2	36706
3	37240
4	35948
5	36478
6	37215
PROMEDIO	36605,83333
DESVIACION ESTANDAR	555,6165644
COEFICIENTE DE VARIACION(%)	1,517836131

Se obtuvo un coeficiente de variación de 1,52% que es menor al 2%, por lo que se considera que el instrumento tiene la capacidad de ofrecer respuestas estadísticamente repetibles

Repetibilidad del Método

Tabla 36 Repetibilidad del Método Ácido Salicílico

NIVEL DE CONCENTRACION	RESPUESTA ANALITICA	RELACION
80	2833,6400	35,42050
80	2829,6300	35,37038
80	2812,7700	35,15963
100	3401,5300	34,01530
100	3407,1255	34,07125
100	3522,5999	35,22600
120	4248,2559	35,40213
120	4221,7017	35,18085
120	4234,4517	35,28710
	PROMEDIO	35,01479
	DESVIACION ESTANDAR	0,558751552
	COEFICIENTE DE VARIACION(%)	1,595758584

Se obtuvo un coeficiente de variación de 2,54% que es menor al 6,71% (Tabla 13. Coeficientes de Variación Máximos Acetales), por lo que se considera que el método tiene la capacidad de ofrecer relaciones de respuesta y concentración estadísticamente repetibles

Tabla 37. Resultados de Ensayo de Precisión del método para el Ácido Salicílico

PRECISION	
DATOS DE IDENTIFICACION	
MOLECULA:	ACIDO SALICILICO
CONCENTRACION:	0,08mg/mL-0,1mg/mL-0,12mg/mL
LONGITUD DE ONDA:	UV 236 nm
SOLVENTE:	ACN:NaH2PO4 30mM pH=2,04 (50:50)
METODO:	CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

PRECISION INTERMEDIA	
CRITERIOS DE ACEPTACION	
COEFICIENTE DE VARIACION:	NO MAS DE 2%
RESPUESTAS ANALITICAS	

ANALISTA X	DIA 1	DIA 2	DIA 3
	3643,00	3552,06	3513,44
	3645,69	3478,24	3515,92
	3655,10	3509,20	3514,95
ANALISTA Y	DIA 1	DIA 2	DIA 3
	3556,52	3544,33	3522,22
	3656,15	3545,73	3524,05
	3673,37	3538,35	3520,29
CALCULO DE PORCENTAJE			

		a	13,62
		b	35,22
ANALISTA X	DIA 1	DIA 2	DIA 3
	103,05	100,47	99,37
	103,13	98,37	99,44
	103,40	99,25	99,42
CV(%)	0,17	1,06	0,04
ANALISTA Y	DIA 1	DIA 2	DIA 3
	100,60	100,25	99,62
	103,43	100,29	99,67
	103,91	100,08	99,57
CV(%)	1,74	0,11	0,05
CV TOTAL	1,76		

Fuente: Propia

5.5.1 Interpretación y discusión

Tras el análisis estadístico se muestra que existe repetibilidad instrumental, debido a que el coeficiente de variación de los Días 1,2 y 3 tanto para el analista “X” y “Y” son menores al 6.71% (Tabla 13. Coeficientes de Variación Máximos Acetales).

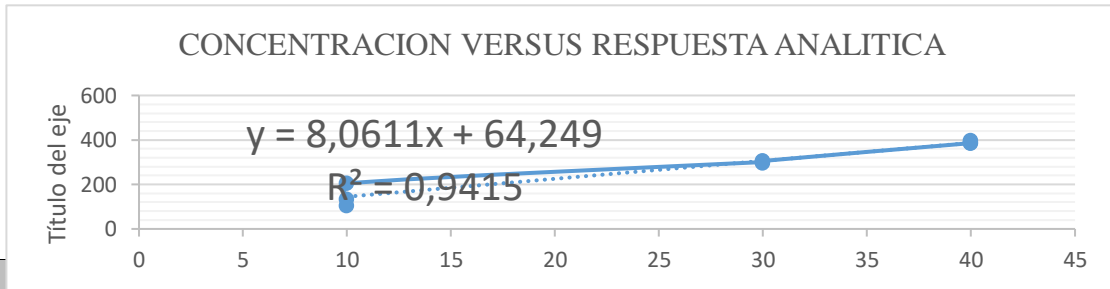
En cuanto a la precisión intermedia tomando en cuenta los datos de los 2 analistas en los 3 días, haciendo un total de 18 datos el coeficiente de variación es menor al 6,71 % por lo que se concluye que el método es preciso para el Ácido Salicílico

5.6 Ensayo para determinar Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Tabla 38. Resultados de Límite de Detección y Límite de Cuantificación del Método Analítico para el Ácido Salicílico

LIMITE DE DETECCION Y LIMITE DE CUANTIFICACION				
DATOS DE IDENTIFICACION				
MOLECULA:		ACIDO SALICILICO		
CONCENTRACION:		0,01mg/mL-0,03mg/mL-0,04mg/MI		
LONGITUD DE ONDA:		UV 236 nm		
SOLVENTE:		ACN:NaH ₂ PO ₄ 30mM pH=2,04 (50:50)		
METODO:		CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION		
CONCENTRACION (%)	C(μg/mL)	RESPUESTA ANALITICA	PROMEDIO	DESV. ESTANDAR
10	0,01	103,23	146,6	52,0
10	0,01	132,24		
10	0,01	204,28		
30	0,03	300,64	300,9	4,6
30	0,03	296,49		

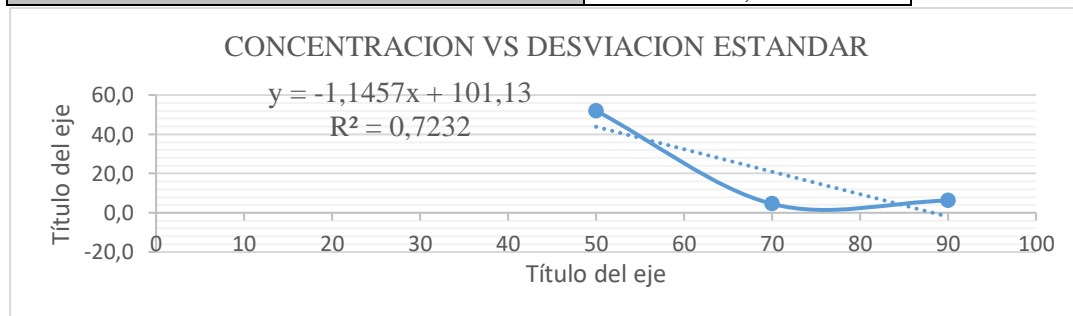
30	0,03	305,6	390,1	6,2
40	0,04	385,78		
40	0,04	387,4		
40	0,04	397,24		



CONCENTRACION	PROMEDIO
50	146,6
70	300,9
90	390,1

A	b	R
-147,01	6,09	0,99
Ybl	Sbl	
6,09	101,13	-0,85

CONCENTRACION	DESV. ESTANDAR
50	52,0
70	4,6
90	6,2



A	b	r
101,13	-1,15	-0,85

Sbl
101,1291984

		UNIDADES
LIMITE DE DETECCION	5,07	ng/mL
LIMITE DE CUANTIFICACION	16,68	ng/mL
CONCENTRACION 100%	0,1	mg/mL
LIMITE DE DETECCION	0,005073318	mg/mL
LIMITE DE CUANTIFICACION	0,016678154	mg/mL

Fuente: Propia

5.6.1 Interpretación y discusión

Tras el análisis estadístico se tiene la conclusión que el método tiene la capacidad de detectar pero no necesariamente cuantificar una concentración de 0,005073318 mg/mL y también tiene la capacidad de cuantificar con exactitud y precisión concentraciones superiores a 0,016678154 mg/mL, la del coeficiente de correlación el LD y LC se debe

6. Desafío del método de análisis de 3 marcas comercializadas a nivel nacional

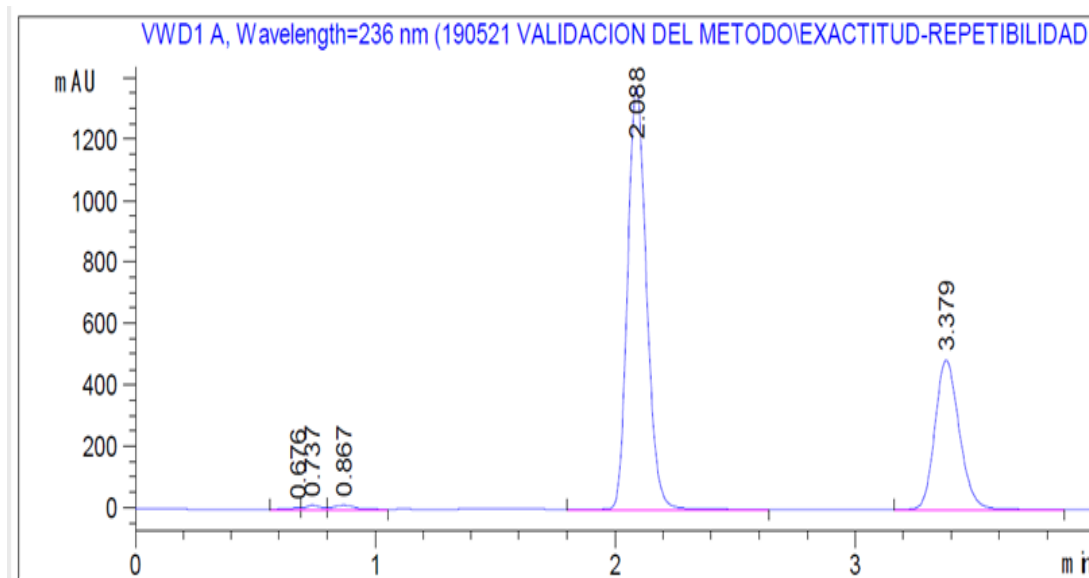
Para desafiar el método analítico indicado de estabilidad desarrollado, se analizaron 3 marcas del mercado, la primera tabletas de 500 mg sin recubierta codificada como marca "A", la segunda tabletas de 100 mg sin recubierta codificada como marca "B" y la tercera tabletas de 100mg sin recubierta codificada como marca "C" con el método desarrollado, que de acuerdo a USP-37 deben tener un límite de Ácido Salicílico Libre de 0,3 % para tabletas no recubiertas y de 3% para tabletas con recubierta.

A continuación se muestran cromatogramas de Soluciones Estandar de Acido Acetilsalicilico y Acido Salicilico a concentraciones de 0,5 mg/mL y 0,1mg/mL respectivamente y los cromatogramas de 3 marcas comercializadas a nivel nacional a concentracion de 0,5 mg/mL para el Acido Acetilsalicilico .

La concentración del acido salicilico en la tabletas debe ser menor a la especificaciones ya descritas para que eviten problemas de envenamiento po salicilatos, acidosis metabolica, síndrome hemofilico y otros descritos.

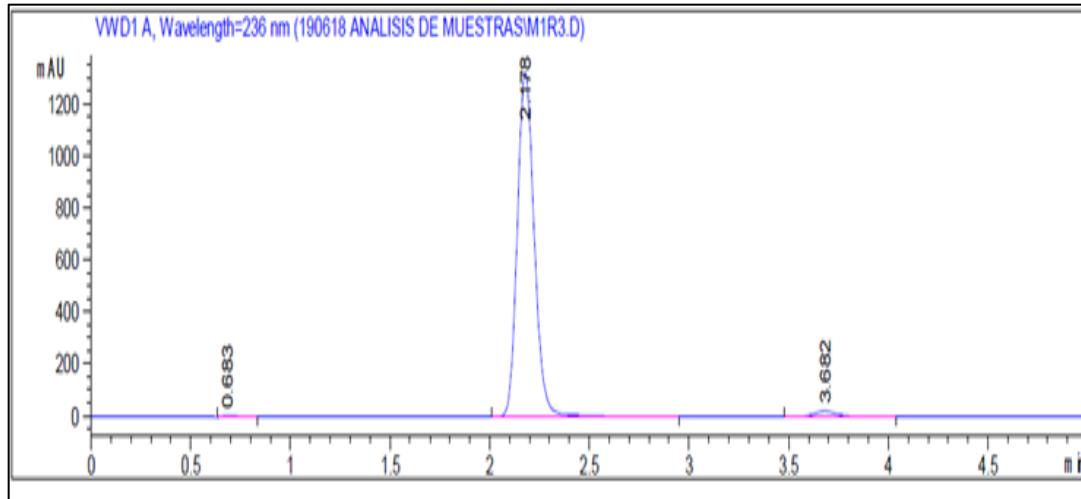
Po lo que se puede apreciar en los cromatogramas que fueron elegidos como ejemplo que alrededor de un tiempo de retencion de 3,5 minutos se

Gráfico 23. Cromatograma de solución estándar de Ácido Acetilsalicílico 0,5 mg/mL y Ácido Salicílico 0,1mg/mL



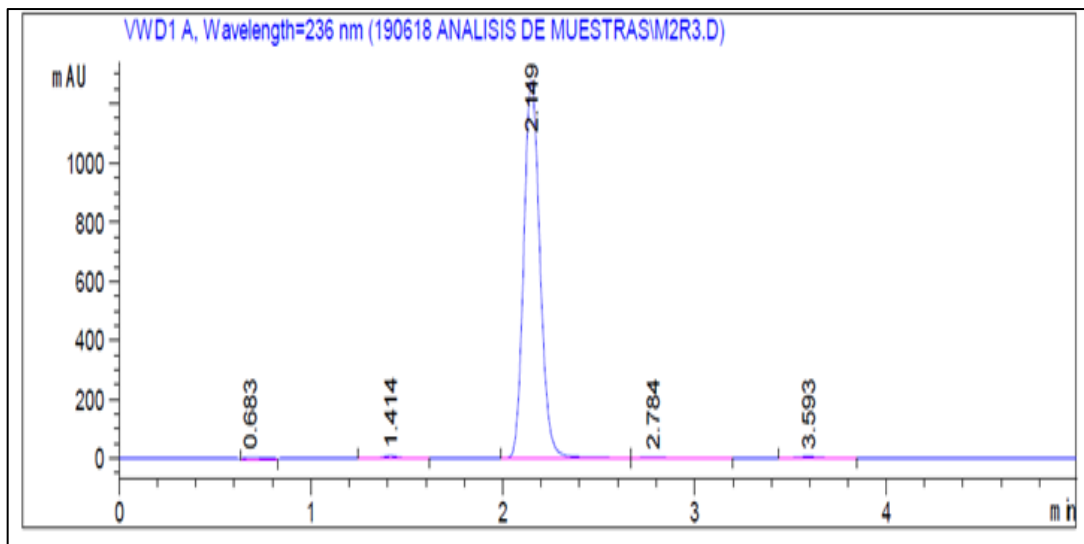
Fuente: Propia

Gráfico 24. Cromatograma de Muestra “A” de Ácido Acetilsalicílico concentración nominal de 0,5 mg/mL



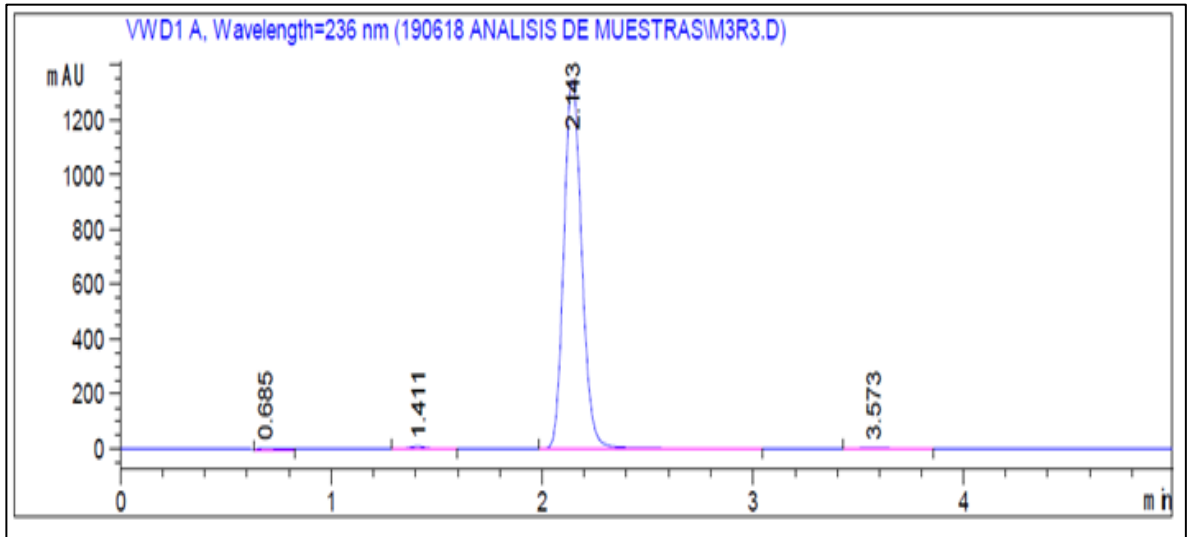
Fuente: Propia

Gráfico 25. Cromatograma de Muestra “B” de Ácido Acetilsalicílico concentración nominal de 0,5 mg/mL



Fuente: Propia

Gráfico 26. Cromatograma de Muestra “C” de Ácido Acetilsalicílico concentración nominal de 0,5 mg/mL



Fuente: Propia

Como se evidencia en las muestras a un tiempo de retención alrededor de 2,1 min aparece el Ácido Acetilsalicílico y entre 3,5min y 3,6min aparece una señal cromatográfica, que es el ácido salicílico según el estudio de Validación.

6.1 Resultados de Valoración de Ácido Acetilsalicílico de la Marca “A”

Tabla 39. Resultados de Valoración de Ácido Acetilsalicílico de la Marca “A”

VALORACION	
CONDICIONES ANALITICAS DEL METODO VALIDADO	
PRUEBA	VALORACION MARCA “A”
PRINCIPIO ACTIVO	ACIDO ACETILSALICILICO
CONCENTRACION	0,5mg/mL
LONGITUD DE ONDA	UV 236 nm
COLUMNA	C18

METODO	CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION	
LOTE	ARMJ23	
FECHA DE VENCIMIENTO	MAYO de 2020	
FORMULA DECLARADA	500 mg	
FORMA FARMACEUTICA	COMPRIMIDO RECUBIERTO	
DETERMINACION		
ENSAYO	ESTANDAR	MUESTRA "A" (3 REPLICAS)
1ER ENSAYO	7968,46	7955,50
2DO ENSAYO	7971,91	
3ER ENSAYO	7988,09	7891,29
4TO ENSAYO	7800,45	
5TO ENSAYO	7970,41	7832,24
6TO ENSAYO	7979,93	
PROMEDIO	7946,54	7893,01
S	71,94	61,65
CV	0,91	0,78
CONCENTRACION NOMINAL(mg/mL)	0,5	0,5
%R	99,3 %	
RENDIMIENTO (mg/tab)	497 mg/tab	
ESPECIFICACION	ENTRE 90% y 110% DE LO DECLARADO	
CONCLUSION	CUMPLE ESPECIFICACION DE VALORACION	

Fuente: Propia

Las tabletas de la Marca "A" cumplen con la especificación de Valoración que esta entre 90% y 110% de lo declarado. Con un resultado de 99,3% equivalente a 497 mg/tab

6.1.1 Límite de Ácido Salicílico libre de la Marca “A”

Tabla 40. Límite de Ácido Salicílico Libre de la Marca “A”

LIMITE DE ACIDO SALICILICO LIBRE		
CONDICIONES ANALITICAS DEL METODO VALIDADO		
PRUEBA	LIMITE DE ACIDO SALICILICO LIBRE	
PRINCIPIO ACTIVO	ACIDO SALICILICO	
CONCENTRACION	0,1mg/mL	
LONGITUD DE ONDA	UV 236 nm	
COLUMNA	C18	
METODO	CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION	
LOTE	ARMJ23	
FECHA DE VENCIMIENTO	MAYO de 2020	
FORMULA DECLARADA	500 mg	
FORMA FARMACEUTICA	COMPRIMIDO SIN RECUBIERTA	
DETERMINACION		
ENSAYO	ESTANDAR	MUESTRA “A”
1ER ENSAYO	3643,0	62,45
2DO ENSAYO	3645,7	
3ER ENSAYO	3655,1	
4TO ENSAYO	3556,52	
5TO ENSAYO	3656,15	
6TO ENSAYO	3673,37	
PROMEDIO	3638,31	62,45
S	41,46	N/A
CV	1,14	N/A
CONCENTRACION NOMINAL (mg/mL)	0,1	0,5
%R	0,34	
ESPECIFICACION	NO MAS DE 0,3% DE ACIDO SALICILICO LIBRE	
CONCLUSION	NO CUMPLE ESPECIFICACION DE ACIDO SALICILICO LIBRE	

Fuente: Propia

No cumple con la especificación de ácido salicílico libre

6.2 Resultados de Valoración de Ácido Acetilsalicílico de la Marca “B”

Tabla 41. Resultados de Valoración de Ácido Acetilsalicílico de la Marca “B”

VALORACION		
CONDICIONES ANALITICAS DEL METODO VALIDADO		
PRUEBA	VALORACION	
PRINCIPIO ACTIVO	ACIDO ACETILSALICILICO	
CONCENTRACION	0,5mg/mL	
LONGITUD DE ONDA	UV 236 nm	
COLUMNA	C18	
METODO	CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION	
LOTE	ARM065	
FECHA DE VENCIMIENTO	OCTUBRE de 2020	
FORMULA DECLARADA	100 mg	
FORMA FARMACEUTICA	COMPRIMIDO SIN RECUBIERTA	
DETERMINACION		
ENSAYO	ESTANDAR	MUESTRA 1 (3 REPLICAS)
1ER ENSAYO	7968,46	7550,47
2DO ENSAYO	7971,91	
3ER ENSAYO	7988,09	7559,38
4TO ENSAYO	7800,45	
5TO ENSAYO	7970,41	7540,61
6TO ENSAYO	7979,93	
PROMEDIO	7946,54	7550,15
S	71,94	9,39
CV	0,91	0,12
CONCENTRACION(mg/mL)	0,5	0,5
%R	95,0	
RENDIMIENTO (mg/tab)	95	
ESPECIFICACION	ENTRE 90% y 110% DE LO DECLARADO	
CONCLUSION	CUMPLE ESPECIFICACION DE VALORACION	

Fuente: Propia

Las tabletas de la Marca 1 cumplen con la especificación de Valoración que esta entre 90% y 110% de lo declarado. Con un resultado de 95,0% equivalente a 95 mg/tab

6.2.1 Limite de Ácido Salicílico Libre de la Marca “B”

LIMITE DE ACIDO SALICILICO LIBRE		
CONDICIONES ANALITICAS DEL METODO		
PRUEBA	LIMITE DE ACIDO SALICILICO LIBRE	
PRINCIPIO ACTIVO	ACIDO SALICILICO	
CONCENTRACION	0,1mg/mL	
LONGITUD DE ONDA	UV 236 nm	
COLUMNA	C18	
METODO	CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION	
LOTE	ARM065	
FECHA DE VENCIMIENTO	OCTUBRE de 2020	
FORMULA DECLARADA	100 mg	
FORMA FARMACEUTICA	COMPRIMIDO RECUBIERTO	
DETERMINACION		
ENSAYO	ESTANDAR	MUESTRA “A”
1ER ENSAYO	3643,0	22,44
2DO ENSAYO	3645,7	
3ER ENSAYO	3655,1	
4TO ENSAYO	3556,52	
5TO ENSAYO	3656,15	
6TO ENSAYO	3673,37	
PROMEDIO	3638,31	22,44
S	41,46	N/A
CV	1,14	N/A
CONCENTRACION(mg/mL)	0,1	0,5
%R	0,123354128	
ESPECIFICACION	NO MAS DE 3% DE ACIDO SALICILICO LIBRE	
CONCLUSION	CUMPLE ESPECIFICACION DEACIDO SALICILICO LIBRE	

Fuente: Propia

6.3 Resultados de Valoración de Ácido Acetilsalicílico de la Marca “C”

Tabla 42. Resultados de Valoración de Ácido Acetilsalicílico de la Marca “C”

VALORACION		
CONDICIONES ANALITICAS DEL METODO		
PRUEBA	VALORACION	
PRINCIPIO ACTIVO	ACIDO ACETILSALICILICO	
CONCENTRACION	0,5mg/mL	
LONGITUD DE ONDA	UV 236 nm	
COLUMNA	C18	
METODO	CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION	
LOTE	ORO153A	
FECHA DE VENCIMIENTO	JUNIO de 2020	
FORMULA DECLARADA	100 mg	
FORMA FARMACEUTICA	COMPRIMIDO SIN RECUBIERTA	
DETERMINACION		
ENSAYO	ESTANDAR	MUESTRA “C” (3 REPLICAS)
1ER ENSAYO	7968,46	8026,58
2DO ENSAYO	7971,91	
3ER ENSAYO	7988,09	7979,64
4TO ENSAYO	7800,45	
5TO ENSAYO	7970,41	7979,10
6TO ENSAYO	7979,93	
PROMEDIO	7946,54	7995,11
S	71,94	27,26
CV	0,91	0,34
CONCENTRACION(mg/mL)	0,5	0,5
%R	100,6	
RENDIMIENTO (mg/tab)	101	
ESPECIFICACION	ENTRE 90% y 110% DE LO DECLARADO	
CONCLUSION	CUMPLE ESPECIFICACION DE VALORACION	

Fuente: Propia

Las tabletas de la Marca 1 cumplen con la especificación de Valoración que esta entre 90% y 110% de lo declarado. Con un resultado de 100,6% equivalente a 101 mg/tab

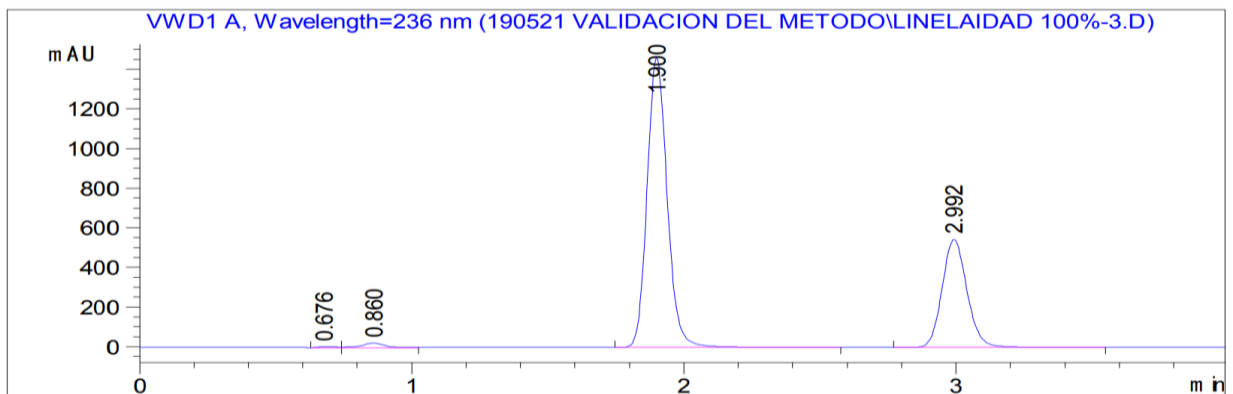
6.3.1 Límite de Ácido Salicílico Libre de la Marca “C”

LIMITE DE ACIDO SALICILICO LIBRE		
CONDICIONES ANALITICAS DEL METODO		
PRUEBA	LIMITE DE ACIDO SALICILICO LIBRE	
PRINCIPIO ACTIVO	ACIDO SALICILICO	
CONCENTRACION	0,1mg/mL	
LONGITUD DE ONDA	UV 236 nm	
COLUMNA	C18	
METODO	CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION	
LOTE	ORO153A	
FECHA DE VENCIMIENTO	JUNIO de 2020	
FORMULA DECLARADA	100 mg	
FORMA FARMACEUTICA	COMPRIMIDO SIN RECUBIERTA	
DETERMINACION		
ENSAYO	ESTANDAR	MUESTRA “C”
1ER ENSAYO	3643,0	20,71
2DO ENSAYO	3645,7	
3ER ENSAYO	3655,1	
4TO ENSAYO	3556,52	
5TO ENSAYO	3656,15	
6TO ENSAYO	3673,37	
PROMEDIO	3638,31	20,71
S	41,46	N/A
CV	1,14	N/A
CONCENTRACION(mg/mL)	0,1	0,5
%R	0,113844206	
ESPECIFICACION	NO MAS DE 0,3% DE ACIDO SALICILICO LIBRE	
CONCLUSION	CUMPLE ESPECIFICACION DEACIDO SALICILICO LIBRE	

6.5 Resolución cromatográfica entre el Ácido Acetilsalicílico y el Ácido salicílico

Se obtuvo una resolución cromatográfica promedio de 7,41 con un coeficiente de variación de $\pm 0,96\%$ entre el Ácido Acetilsalicílico y el Ácido salicílico que cumple con la hipótesis planteada ya que resolución debe ser mayor a 2 para cuantificar con precisión y exactitud

Determinación	Resolución
1	7,34
2	7,43
3	7,48
Promedio	7,41
Desviación Estándar	0,0709
Coeficiente de Variación	0,96



DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO INDICADOR DE
ESTABILIDAD PARA EL ANALISIS DE ACIDO ACETIL SALICILICO EN
TABLETAS POR HPLC

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

1. Conclusiones

Se logró desarrollar un método analítico indicador de estabilidad con la utilización de diseño experimental de plackett and burman por Cromatografía Líquida de Alta resolución (HPLC) variando condiciones cromatográficas en dos niveles, un nivel negativo y un nivel positivo como ser pH de 2,4 y 2,04, un flujo de 3mL/min y 2mL/min, buffer de 30mM y 15 mM, longitudes analíticas de 280 nm y 236 nm, las columnas cromatográficas una de 15cm x 4,6 mm C18 (L1 según USP) y otra columna fenil-hexil (L11 según USP), diluyente 50% de buffer:50% de acetonitrilo y otro 100% de Buffer, proporción de la fase móvil una de 50% de acetonitrilo:50% de buffer y otra de 25% de acetonitrilo:75% de buffer, las concentraciones fueron de 0,5 mg/mL para el Ácido Acetilsalicílico y 0,1 mg/mL para el Ácido Salicílico para su cuantificación obteniendo un método robusto alternativo al farmacopéico con las siguientes condiciones, pH de la fase móvil 2,04, flujo de la Fase Móvil 2mL/min, concentración del Buffer 15mM, longitud de onda 236nm, columna C18, diluyente buffer, proporción de la fase móvil Buffer(75%):ACN(25%).

Con el método desarrollado se logra establecer las condiciones de estabilidad química, a través de someter al ácido acetilsalicílico a condiciones extremas como temperatura, hidrólisis ácida, hidrólisis básica, oxidación, termólisis de las cuales en la hidrólisis alcalina se consume el 99% del ácido acetilsalicílico a 70°C durante 30 minutos, 7,1% en Hidrólisis Ácida a 70°C durante 30 minutos, 5,5% en Oxidación a 70°C durante 30 minutos, 0,3% a 70°C durante 30 minutos y 5,7% a 25°C durante 30 minutos irradiado con luz visible. Se determinó la estabilidad de la muestra para análisis en diferentes tiempos siendo estable hasta 120 minutos para el análisis.

Se establece que el método analítico cumple los parámetros de Validación, en Especificidad con la prueba “t” de student se establece que estadísticamente es capaz de

cuantificar de manera inequívoca al Ácido Acetilsalicílico y su producto de degradación el Ácido Salicílico, en el parámetro de Linealidad se establece que existe relación directamente proporcional entre la concentración y la respuesta analítica, que el intercepto es igual a cero y la pendiente diferente de cero con la prueba de “t” de student y ANOVA, en el parámetro de Exactitud se estableció que el método es capaz de recuperar estadísticamente al rededor del 100% de la concentración de análisis con la prueba “t” de student, en el parámetro de precisión a través de los coeficientes de variación se determinó la repetibilidad instrumental, repetibilidad del método y precisión intermedia todas cumpliendo los requisitos, también se determinó el Limite de Detección y Limite de Cuantificación demostrando la sensibilidad del método en el análisis de pequeñas concentraciones de ambos analitos, finalmente se obtuvo una resolución entre ambos analitos de 7,41 con un coeficiente de variación de $\pm 0,96\%$

Se desafió el método analítico indicador de estabilidad desarrollado analizando 3 marcas del mercado, tabletas que contienen Ácido Acetilsalicílico codificadas como (A,B,C), que de acuerdo a USP-37 deben tener un límite de Ácido Salicílico Libre de 0,3 % para tabletas no recubiertas. Siendo que la marca “A” no cumple con el requisito de Ácido Salicílico Libre con un valor de 0,34%

BIBLIOGRAFÍA

- AEFI. (2001). *Asociacion Española de Farmaceuticos de la Industria*. Madrid: AEFI.
- Bogdan Tița, Adriana Fuias, Eleonora Marian, Dumitru Tița. (2009). Thermal Behaviour of Acetylsalicylic Acid - active Substance and Tablets. *REV. CHIM.*, 60.
- Book, C. (23 de Junio de 2019). *Chemical Book*. Obtenido de Chemical Book: https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB5114818_EN.htm
- Book, C. (23 de Junio de 2019). *Chemical Book*. Obtenido de Chemical Book: https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB1680010_EN.htm
- Especificaciones, C. d. (1992). *Informe 32 de la Organizacion mundial de la Salud (OMS)*. Ginebra: WHO Technical Report Series.
- Especificaciones, C. d. (1993). *Informe 33 de la Organizacion Mundial de la Salud (OMS)*. Ginebra: WHO Technical Report Series.
- Especificaciones, C. d. (2003). *Informe 43 de la Organizacion Mundial de la Salud (OMS)*. Ginebra: WHO Technical Report Series.
- Expertos, C. d. (2014). *Farmacopea de los Estados Unidos de America USP 37*. Rockville: United Book Press, Inc., Baltimore, Maryland.
- Farmacéutica, R. P. (2013). *Requisitos para el registro de Medicamentos en las Américas*. Washington: Organizacion Panamericana de la Salud.
- kenneth A. Connors, Gordon L. Amidon, Valentino J. Stella. (1986). *Chemical Stability of Pharmaceuticals*. Estados Unidos: Jhon Wiley & Sons.
- Leon, L. F. (2016). Diseños Experimentales-Posgrado de Especialidad Tec. Cosmetica [Grabado por L. F. Leon]. La Paz, La Paz, Bolivia.
- Licencia Creative Commons, A. (25 de Abril de 2019). *Wikipedia*. Obtenido de Wikipedia: https://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_acetilsalic%C3%ADlico

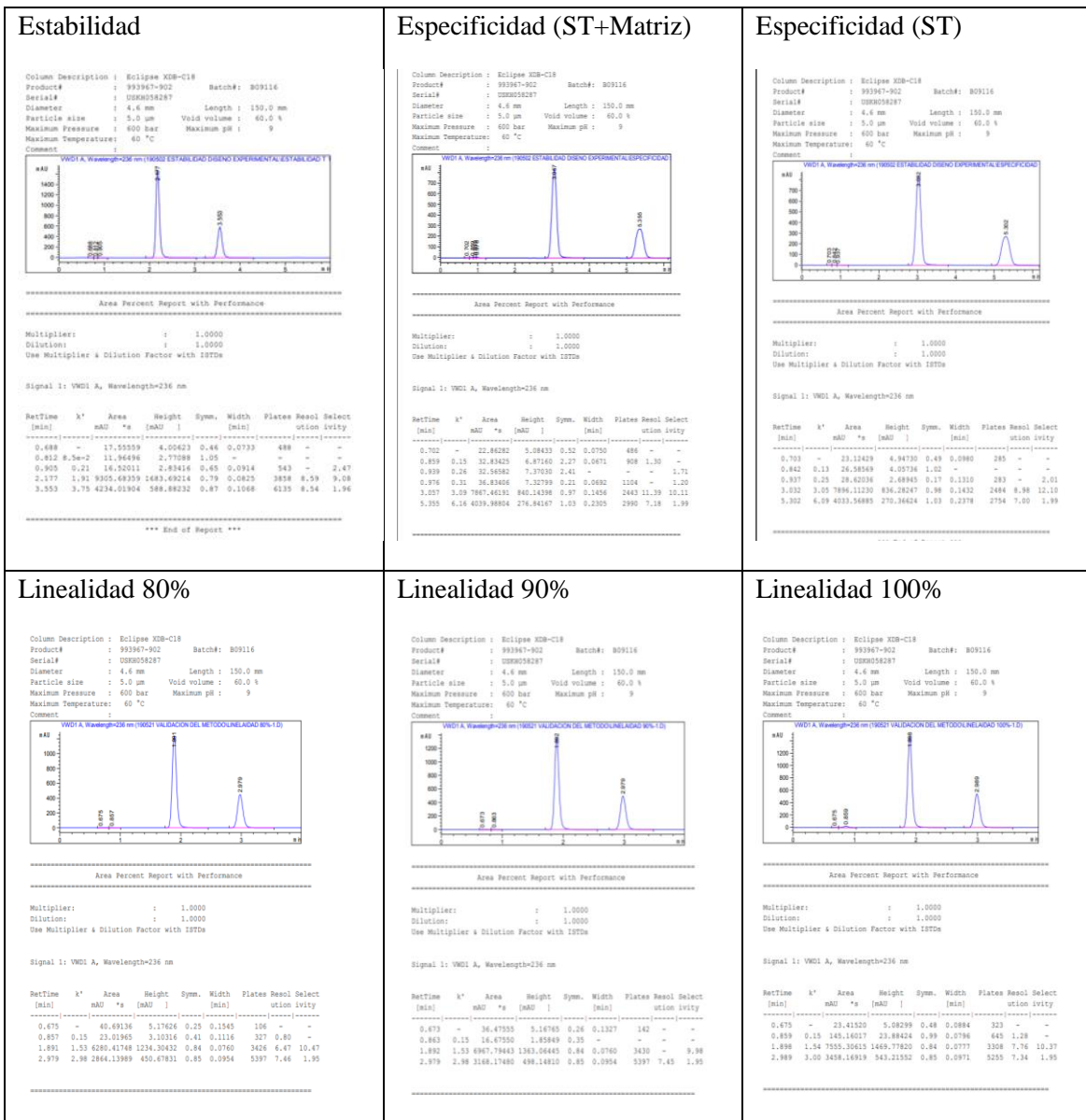
- Mamani Poma, M. A. (2016). Estudio de degradación de la aspirina en tabletas de diferentes marcas comercializadas en la ciudad de La Paz en la gestión 2015. *CON-CIENCIA*, 50-62.
- Medicamentos, A. N. (2013). *Instructivo para completar la solicitud de Registro Simplificado de Producto Farmaceutico (SRS)*. Santiago: Agencia Nacional de Medicamentos.
- Mercosur. (1996). *Estabilidad de Productos Farmacéuticos*. Buenos Aires: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica.
- Quattrocchi, O. A., Andrizzi, S. A., & Laba, F. R. (1992). *Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica*. Buenos Aires: Farro S.A.
- Salud, S. d. (2013). *PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-257-SSA1-2013, Autorización de medicamentos, registro, renovación y modificaciones*. Mexico D.F.: Secretaría de Salud.
- Salvador, D. N.-E. (2018). *Guía del Usuario para la inscripción de Medicamento*. San Salvador: Dirección Nacional de Medicamentos-El Salvador.
- Sanitarios, S. V. (2004). *Registro Sanitario de Especialidades Farmacéuticas Categoría Esencial*. Caracas: Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rengel".
- Sweetman, S. C. (2009). *Martindale-The Complete Drug Reference*. Londres: Published by the Pharmaceutical Press.

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO INDICADOR DE
ESTABILIDAD PARA EL ANALISIS DE ACIDO ACETIL SALICILICO EN
TABLETAS POR HPLC

ANEXOS

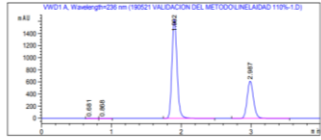
1. ANEXOS

A.1. Cromatogramas (Validación, degradación, análisis, desarrollo)



Linealidad 110%

Column Description : Eclipse XDB-C18
 Product# : 993967-902 Batch#: B09116
 Serial# : USK058287
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
 Maximum Pressure : 600 bar Maximum pH : 9
 Maximum Temperature : 60 °C
 Comment :



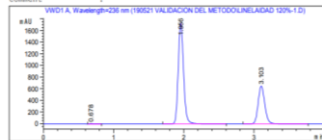
Area Percent Report with Performance
 Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=236 nm

RetTime [min]	k'	Area [mAU]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select	ution	ivity
0.681	-	34.87684	4.98761	0.26	0.1327	246	-	-	-	-
0.688	0.16	18.3921	2.12284	0.37	-	-	-	-	-	-
1.902	1.54	8373.6613	1632.31067	0.83	0.0760	3465	-	-	9.60	-
2.987	2.99	3889.38647	615.35693	0.85	0.0954	5425	7.44	1.94	-	-

Linealidad 120%

Column Description : Eclipse XDB-C18
 Product# : 993967-902 Batch#: B09116
 Serial# : USK058287
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
 Maximum Pressure : 600 bar Maximum pH : 9
 Maximum Temperature : 60 °C
 Comment :



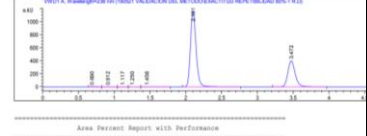
Area Percent Report with Performance
 Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=236 nm

RetTime [min]	k'	Area [mAU]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select	ution	ivity
0.678	-	33.19829	4.93982	0.26	0.1272	157	-	-	-	-
1.956	1.62	9166.72949	1731.81580	0.82	0.0793	3374	7.28	-	-	-
3.103	3.15	4277.86279	650.67468	0.84	0.0987	5478	7.57	1.95	-	-

Exactitud 80%

Column Description : Eclipse XDB-C18
 Product# : 993967-902 Batch#: B09116
 Serial# : USK058287
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
 Maximum Pressure : 600 bar Maximum pH : 9
 Maximum Temperature : 60 °C
 Comment :



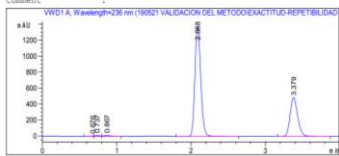
Area Percent Report with Performance
 Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=236 nm

RetTime [min]	k'	Area [mAU]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select	ution	ivity
0.690	-	36.97958	5.04623	0.29	0.1363	158	-	-	-	-
0.912	0.22	30.93907	3.84829	0.38	-	-	-	-	-	-
1.117	0.49	30.99998	3.9799	0.38	-	-	-	-	2.24	-
1.230	0.47	20.25894	2.69907	0.46	-	-	-	-	1.38	-
1.454	0.90	36.90050	1.82338	0.30	-	-	-	-	1.61	-
2.101	1.81	8405.99219	1543.62397	0.79	0.0823	3594	-	-	1.91	-

Exactitud 100%

Column Description : Eclipse XDB-C18
 Product# : 993967-902 Batch#: B09116
 Serial# : USK058287
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
 Maximum Pressure : 600 bar Maximum pH : 9
 Maximum Temperature : 60 °C
 Comment :



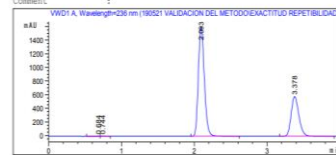
Area Percent Report with Performance
 Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=236 nm

RetTime [min]	k'	Area [mAU]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select	ution	ivity
0.676	-	11.25971	4.03234	2.50	0.0372	1831	-	-	-	-
0.727	-	49.01346	12.35091	0.75	0.0603	828	0.73	-	-	-
0.867	0.16	69.69212	11.88497	0.88	0.0906	508	1.01	-	-	-
2.088	1.79	7498.83936	1373.28455	0.81	0.0825	3549	8.29	11.20	-	-
3.379	3.52	3401.53271	486.50204	0.80	0.1068	5549	8.01	1.96	-	-

Exactitud 120%

Column Description : Eclipse XDB-C18
 Product# : 993967-902 Batch#: B09116
 Serial# : USK058287
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
 Maximum Pressure : 600 bar Maximum pH : 9
 Maximum Temperature : 60 °C
 Comment :



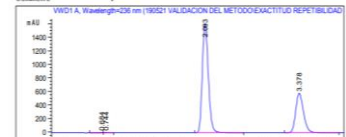
Area Percent Report with Performance
 Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=236 nm

RetTime [min]	k'	Area [mAU]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select	ution	ivity
0.684	-	22.54074	4.18351	3.54	0.0569	801	-	-	-	-
0.744	-	27.45178	4.63106	0.49	0.1075	265	0.43	-	-	-
2.093	1.80	9188.90234	1603.26563	0.79	0.0874	3181	8.14	-	-	-
3.378	3.52	4248.25586	582.30518	0.78	0.1100	5224	7.65	1.95	-	-

Precisión Analista "X"

Column Description : Eclipse XDB-C18
 Product# : 993967-902 Batch#: B09116
 Serial# : USK058287
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
 Maximum Pressure : 600 bar Maximum pH : 9
 Maximum Temperature : 60 °C
 Comment :



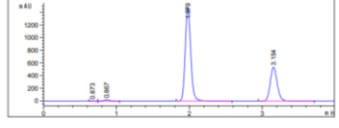
Area Percent Report with Performance
 Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=236 nm

RetTime [min]	k'	Area [mAU]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select	ution	ivity
0.684	-	22.54074	4.18351	3.54	0.0569	801	-	-	-	-
0.744	-	27.45178	4.63106	0.49	0.1075	265	0.43	-	-	-
2.093	1.80	9188.90234	1603.26563	0.79	0.0874	3181	8.14	-	-	-
3.378	3.52	4248.25586	582.30518	0.78	0.1100	5224	7.65	1.95	-	-

Precisión Analista "Y"

Column Description : Eclipse XDB-C18
 Product# : 993967-902 Batch#: B09116
 Serial# : US9058287
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
 Maximum Pressure : 600 bar Maximum pH : 9
 Maximum Temperature : 60 °C
 Comment :



Area Percent Report with Performance

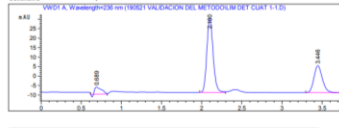
Multiplier: 1.0000
 Dilution: 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=236 nm

RetTime [min]	k'	Area [mAU]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
0.873	-	23.75726	5.37361	0.47	0.0948	279	-	-
0.867	0.16	116.02837	18.78213	1.03	0.0815	626	1.29	-
1.979	1.45	7890.45410	1481.03113	0.84	0.0777	3597	8.21	10.38
3.154	3.22	3556.52417	535.82977	0.85	0.1003	5479	7.76	1.96

Límite de Detección y Limite de Cuantificación "1"

Column Description : Eclipse XDB-C18
 Product# : 993967-902 Batch#: B09116
 Serial# : US9058287
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
 Maximum Pressure : 600 bar Maximum pH : 9
 Maximum Temperature : 60 °C
 Comment :



Area Percent Report with Performance

Multiplier: 1.0000
 Dilution: 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

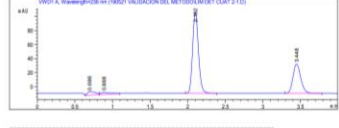
Signal 1: WVD1 A, Wavelength=236 nm

RetTime [min]	k'	Area [mAU]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
0.689	-	20.48106	3.71314	0.24	0.1107	215	-	-
2.100	1.81	212.28054	39.18205	0.83	0.0825	3889	8.38	-
3.446	3.45	103.02861	14.82379	0.81	0.1092	3516	8.25	2.00

Instrument 1 6/4/2019 6:34:33 PM CHRISTIAN CHOQUE DURAN

Límite de Detección y Limite de Cuantificación "2"

Column Description : Eclipse XDB-C18
 Product# : 993967-902 Batch#: B09116
 Serial# : US9058287
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
 Maximum Pressure : 600 bar Maximum pH : 9
 Maximum Temperature : 60 °C
 Comment :



Area Percent Report with Performance

Multiplier: 1.0000
 Dilution: 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

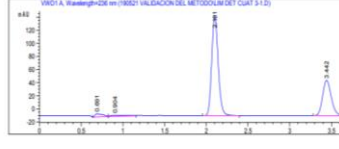
Signal 1: WVD1 A, Wavelength=236 nm

RetTime [min]	k'	Area [mAU]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
0.496	-	25.34390	4.78034	0.34	0.1448	128	-	-
0.888	0.19	26.71013	2.78938	0.46	-	-	-	-
2.100	1.81	421.97904	115.58848	0.81	0.0815	3482	-	9.48
3.446	3.45	300.43739	41.87187	0.81	0.1092	3522	8.29	1.99

Instrument 1 6/4/2019 6:37:44 PM CHRISTIAN CHOQUE DURAN Page 1

Límite de Detección y Cuantificación

Column Description : Eclipse XDB-C18
 Product# : 993967-902 Batch#: B09116
 Serial# : US9058287
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
 Maximum Pressure : 600 bar Maximum pH : 9
 Maximum Temperature : 60 °C
 Comment :



Area Percent Report with Performance

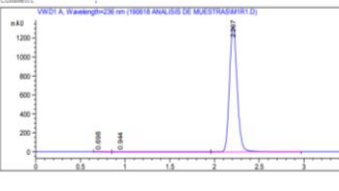
Multiplier: 1.0000
 Dilution: 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=236 nm

RetTime [min]	k'	Area [mAU]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
0.691	-	32.45046	4.80046	0.34	0.1294	158	-	-
0.904	0.21	23.48486	1.78517	0.39	-	-	-	-
2.101	1.81	620.55289	151.89748	0.83	0.0815	3879	-	8.45
3.442	3.40	385.78387	53.04891	0.81	0.1092	3505	8.26	1.99

Análisis de Muestras "A"

Column Description : Eclipse XDB-C18
 Product# : 993967-902 Batch#: B09116
 Serial# : US9058287
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
 Maximum Pressure : 600 bar Maximum pH : 9
 Maximum Temperature : 60 °C
 Comment :



Area Percent Report with Performance

Multiplier: 1.0000
 Dilution: 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

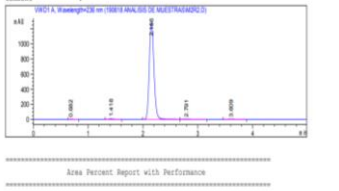
Signal 1: WVD1 A, Wavelength=236 nm

RetTime [min]	k'	Area [mAU]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
0.698	-	37.94698	5.14039	0.28	0.1343	150	-	-
0.946	0.26	108.12154	2.24776	0.10	1.0920	4	0.24	-
2.207	1.95	7955.50195	1328.13635	0.81	0.0898	3347	1.26	7.44

Instrument 1 6/19/2019 12:44:38 PM CHRISTIAN CHOQUE DURAN

Análisis de Muestras "B"

Column Description : Eclipse XDB-C18
 Product# : 993967-902 Batch#: B09116
 Serial# : US9058287
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
 Maximum Pressure : 600 bar Maximum pH : 9
 Maximum Temperature : 60 °C
 Comment :



Area Percent Report with Performance

Multiplier: 1.0000
 Dilution: 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

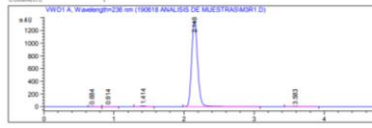
Signal 1: WVD1 A, Wavelength=236 nm

RetTime [min]	k'	Area [mAU]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
0.682	-	28.48835	4.61737	0.33	0.1175	187	-	-
1.418	0.90	39.41385	8.23014	0.89	0.0718	2140	4.37	-
2.104	1.80	7539.26232	1274.16208	0.82	0.0890	3252	3.39	1.18
2.791	2.73	38.81261	4.13789	0.73	0.1189	3032	3.39	1.43
3.629	3.83	24.74179	3.29593	0.88	0.1223	4806	3.98	1.40

Instrument 1 6/19/2019 12:46:44 PM CHRISTIAN CHOQUE DURAN

Análisis de Muestras "C"

Column Description : Eclipse XDB-C18
 Product# : 993967-902 Batch#: B09116
 Serial# : 058058287
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
 Maximum Pressure : 600 bar Maximum pH : 9
 Maximum Temperature : 60 °C
 Comment :



Area Percent Report with Performance

Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

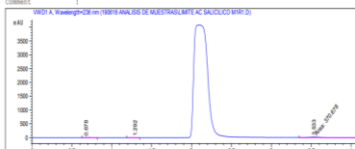
Signal 1: WVD1 A, Wavelength=236 nm

RetTime [min]	k'	Area [mAU]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select	Union	ivity
0.4884	-	32.65708	4.89367	0.33	0.1141	139	-	-	-	-
0.914	0.22	21.23085	1.81861	0.44	0.2105	104	0.83	-	-	-
1.414	0.89	62.80122	10.06044	0.92	0.5796	174	2.03	4.02	-	-
2.148	1.87	8026.57617	1369.88660	0.82	0.6874	3348	8.17	2.10	-	-
3.583	3.79	20.71160	2.57685	0.86	0.1201	4929	8.13	2.03	-	-

Instrument 1 6/19/2019 12:47:08 PM CRISTIAN CHOQUE DURAN

Límite de Ácido Salicílico "MA"

Column Description : Eclipse XDB-C18
 Product# : 993967-902 Batch#: B09116
 Serial# : 058058287
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
 Maximum Pressure : 600 bar Maximum pH : 9
 Maximum Temperature : 60 °C
 Comment :



Area Percent Report with Performance

Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

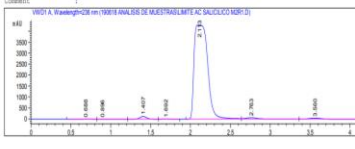
Signal 1: WVD1 A, Wavelength=236 nm

RetTime [min]	k'	Area [mAU]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select	Union	ivity
1.679	-	28.68330	4.54090	0.33	0.1155	130	-	-	-	-
1.282	0.73	12.57526	1.73682	1.55	0.1284	580	2.96	-	-	-
3.532	3.72	370.67981	27.17907	0.68	0.1650	2540	6.98	5.12	-	-

Instrument 1 6/25/2019 7:26:17 PM CRISTIAN CHOQUE DURAN Page 1 of 2

Límite de Ácido Salicílico "MB"

Column Description : Eclipse XDB-C18
 Product# : 993967-902 Batch#: B09116
 Serial# : 058058287
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
 Maximum Pressure : 600 bar Maximum pH : 9
 Maximum Temperature : 60 °C
 Comment :



Area Percent Report with Performance

Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

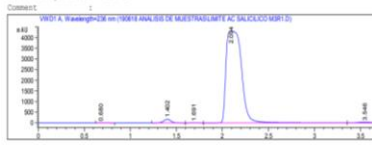
Signal 1: WVD1 A, Wavelength=236 nm

RetTime [min]	k'	Area [mAU]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select	Union	ivity
0.686	-	29.60101	3.66457	0.62	0.1349	143	-	-	-	-
0.896	0.20	28.49255	1.70280	0.21	0.2322	42	0.54	-	-	-
1.407	0.68	637.25232	21.68313	0.50	0.5766	1715	1.49	4.44	-	-
1.852	1.26	46.22975	8.46089	0.84	0.0815	2385	2.09	1.43	-	-
2.113	1.83	5.051964	0.8618011	0.43	0.1864	727	1.86	1.45	-	-
2.743	2.49	723.13062	38.04739	0.60	0.1505	1889	2.28	1.48	-	-
3.562	3.76	428.20971	39.30214	0.94	0.1569	2852	3.35	1.40	-	-

Instrument 1 6/25/2019 7:29:03 PM CRISTIAN CHOQUE DURAN Page 1 of 2

Límite de Ácido Salicílico "MC"

Column Description : Eclipse XDB-C18
 Product# : 993967-902 Batch#: B09116
 Serial# : 058058287
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
 Maximum Pressure : 600 bar Maximum pH : 9
 Maximum Temperature : 60 °C
 Comment :



Area Percent Report with Performance

Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

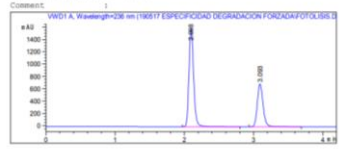
Signal 1: WVD1 A, Wavelength=236 nm

RetTime [min]	k'	Area [mAU]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select	Union	ivity
0.480	-	32.61862	4.82722	0.33	0.1213	174	-	-	-	-
1.022	0.87	936.26404	174.56532	0.99	0.5796	1719	4.23	-	-	-
1.691	1.28	28.97498	4.19823	0.79	0.1057	1418	1.83	1.44	-	-
2.094	1.80	5.034226	4.309.22510	0.46	0.1820	733	1.64	1.43	-	-
3.548	3.76	405.66058	40.49177	0.96	0.1553	2888	3.06	2.08	-	-

Instrument 1 6/25/2019 7:30:22 PM CRISTIAN CHOQUE DURAN Page 1

Fotólisis

Column Description : Eclipse XDB-C18
 Product# : 993967-902 Batch#: B09116
 Serial# : 058058287
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
 Maximum Pressure : 600 bar Maximum pH : 9
 Maximum Temperature : 60 °C
 Comment :



Area Percent Report with Performance

Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

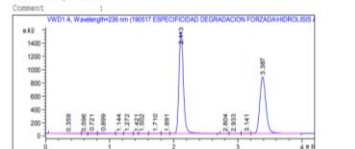
Signal 1: WVD1 A, Wavelength=236 nm

RetTime [min]	k'	Area [mAU]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select	Union	ivity
2.098	1.80	7442.32666	1590.76001	0.79	0.0696	5037	-	-	-	-
3.093	3.14	3983.06396	694.19818	0.82	0.0857	7210	7.53	1.74	-	-

*** End of Report ***

Hidrólisis Ácida

Column Description : Eclipse XDB-C18
 Product# : 993967-902 Batch#: B09116
 Serial# : 058058287
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
 Maximum Pressure : 600 bar Maximum pH : 9
 Maximum Temperature : 60 °C
 Comment :



Area Percent Report with Performance

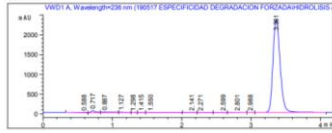
Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=236 nm

RetTime [min]	k'	Area [mAU]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select	Union	ivity
0.359	-	72.76154	3.05297	0.62	-	-	-	-	-	-
0.596	-	20.59203	4.75516	0.91	0.0718	381	-	-	-	-
0.721	-	61.14840	8.25089	0.48	0.1180	203	0.77	-	-	-
0.899	0.20	97.09053	8.35004	0.48	-	-	-	-	-	-
1.144	0.53	35.69355	4.91145	0.66	-	-	-	-	-	-
1.272	0.70	38.86290	4.42887	0.53	-	-	-	-	-	-
1.421	0.90	19.14037	4.14280	1.48	-	-	-	-	-	-
1.502	1.01	37.24254	4.28332	0.54	-	-	-	-	-	-
1.710	1.29	41.97647	3.51919	1.16	-	-	-	-	-	-

Hidrolisis Alcalina

Column Description : Eclipse XDB-C18
 Product# : 993967-902 Batch#: B09116
 Serial# : USKH058287
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
 Maximum Pressure : 600 bar Maximum pH : 9
 Maximum Temperature : 60 °C
 Comment :



Area Percent Report with Performance

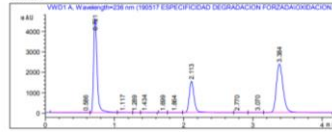
Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=236 nm

RetTime [min]	k'	Area mAU	%	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
0.588	-	104.86318	8.69577	4.54	0.2951	22	-	-	-
0.717	-	226.97239	46.96530	0.51	0.0593	809	0.43	-	-
0.887	0.19	184.23651	15.45863	0.33	-	-	-	-	-
1.127	0.51	97.02458	9.80513	0.27	-	-	-	-	2.72
1.298	0.74	47.85565	8.43479	0.49	-	-	-	-	1.45
1.415	0.89	34.56060	8.03274	0.90	-	-	-	-	1.21
1.550	1.07	220.00676	7.59724	0.17	-	-	-	-	1.20
2.121	1.86	79.37239	6.49894	1.65	-	-	-	-	1.74
2.273	2.04	75.89828	5.99468	0.39	-	-	-	-	1.09

Oxidación

Column Description : Eclipse XDB-C18
 Product# : 993967-902 Batch#: B09116
 Serial# : USKH058287
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
 Maximum Pressure : 600 bar Maximum pH : 9
 Maximum Temperature : 60 °C
 Comment :



Area Percent Report with Performance

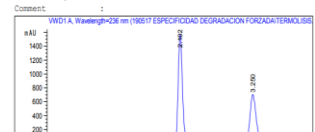
Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=236 nm

RetTime [min]	k'	Area mAU	%	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
0.586	-	153.04870	8.19045	7.05	0.0484	8	-	-	-
0.721	-	1.60170e4	4585.10449	0.69	0.0495	1175	0.26	-	-
1.117	0.49	148.82913	16.98358	0.65	-	-	-	-	-
1.289	0.72	60.40732	9.27028	0.31	-	-	-	-	1.47
1.434	0.92	118.67067	9.89012	0.35	-	-	-	-	1.27
1.499	1.27	32.71415	6.86792	1.05	-	-	-	-	1.39
1.864	1.49	85.07237	6.78832	0.46	-	-	-	-	1.17
2.113	1.83	7460.96973	1527.64417	0.75	0.0696	5111	-	-	1.22
2.270	2.70	45.64629	3.97271	0.33	-	-	-	-	1.48

Termólisis

Column Description : Eclipse XDB-C18
 Product# : 993967-902 Batch#: B09116
 Serial# : USKH058287
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
 Maximum Pressure : 600 bar Maximum pH : 9
 Maximum Temperature : 60 °C
 Comment :



Area Percent Report with Performance

Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=236 nm

RetTime [min]	k'	Area mAU	%	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
2.102	1.81	7869.63428	1582.02292	0.81	0.0679	5304	-	-	-
2.250	3.35	7531.73730	719.98395	1.15	0.1043	5375	7.83	1.85	-