



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA
ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE MEZCLAS DE ÁCIDO ACETILSALICÍLICO Y
ÁCIDO ASCÓRBICO DE USO VETERINARIO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN FARMACIA

P R E S E N T A :

CLAUDIA GUZMÁN OROPEZA

ASESORA:

RAQUEL LÓPEZ ARELLANO

CUAUTITLÁN IZCALLI ESTADO DE MÉXICO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Tesis y Examen Profesional**

Desarrollo y validación del método analítico para estudios de estabilidad de mezclas de ácido acetilsalicílico y ácido ascórbico de uso veterinario.

Que presenta la pasante: **Claudia Guzmán Oropeza**

Con número de cuenta: **308167540** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Farmacia**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Mayo de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Raquel López Arellano	
VOCAL	Dra. Alma L. Revilla Vázquez	
SECRETARIO	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
1er. SUPLENTE	M en C. Miriam Aide Castillo Rodríguez	
2do. SUPLENTE	M en C. Gabriela Rodríguez Patiño	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/cga*

AGRADECIMIENTOS.

A Dios, por los momentos felices y por darme fuerza en aquellos momentos difíciles.

A mi asesora la Dra. Raquel López Arellano por brindarme la oportunidad de formar parte de LEDEFAR, por todo su apoyo, por la confianza y enseñanzas.

Al profesor Juan José Díaz Esquivel por la beca otorgada para cursar el Diplomado de Desarrollo Robusto de Medicamentos.

A la empresa ATISA por los insumos proporcionados para la realización de este trabajo.

Al PAPIIT. Esta tesis se realizó gracias al apoyo del proyecto PAPIIT Clave: IN218115

A la Q.F.B. Dalia Tolledo de Químicos Lyontec, S. de R.L. de C.V. por la donación de muestras de Compritol E ATO y Compritol 888 ATO.

A la Dra. Alma Revilla, la Dra. Patricia Ramírez, a la M. en C. Miriam Castillo y la M. en C. Gabriela Rodríguez por la revisión de este trabajo.

A mi familia.

A mis padres Gloria y Gerardo por quienes tengo un gran cariño, admiración y respeto, por su generosidad, por enseñarme que el amor se demuestra con acciones y ser una muestra del que el amor es reciprocidad, empatía y compromiso. Por soportar mi mal genio, pero sobre todo por brindarme todo su amor.

A mi querido y único hermano Gera de quien he aprendido mucho, como su clásica frase “Hazlo a tu manera” por ser un buen hermano.

A “lala” por brindarme todo su cariño, por cada platillo que me cocinó.

A mis amigos.

A Nadia por estar siempre a mi lado, por brindarme sus palabras de aliento, por ser mi conciencia (esa que siempre quiero escuchar).

A Nidia por demostrarme que no importa la distancia ni el tiempo, siempre tendremos un momento para volvernos a encontrar y degustar una rica taza de café.

A David, por ser mi amigo, mi confidente, por todas las risas y las pláticas tan amenas, simplemente agradezco su compañía.

A Maed, por enseñarme ese lado guerrero de la vida y que a veces es mejor esperar, todo llega a su tiempo.

A Frida (Azúcar) por su optimismo, su empatía, su amistad, por sus malos chistes y por cada detalle.

A Cris por ser un excelente amigo, por cada canción que disfrutamos juntos.

A LEDEFAR

A Mariana y Adi por brindarme todo su apoyo, conocimientos, por resolver mis dudas, por la capacitación y sobre todo por ser unas excelentes amigas.

A Hugo Cuate, Gaby, Mimis, Diana y Zoch, por cada partido de básquet, por su amistad por su compañía, por brindarme tan hermosos recuerdos.

A Carlos por ser el mejor “Chávez” por ser mi compañero de frustraciones, por ayudarme como mi segundo analista y por todas sus ocurrencias.

ÍNDICE GENERAL.

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	OBJETIVOS.....	3
III.	MARCO TEÓRICO.....	4
1.	Generalidades del ácido acetilsalicílico.....	4
1.1.	Nombre y estructura.....	4
1.2.	Propiedades fisicoquímicas.....	4
1.3.	Estabilidad.....	5
2.	Generalidades del ácido salicílico.....	6
2.1.	Nombre y estructura.....	6
2.2.	Propiedades fisicoquímicas.....	6
3.	Generalidades del ácido ascórbico.....	7
3.1.	Nombre y estructura.....	7
3.2.	Propiedades fisicoquímicas.....	7
3.3.	Estabilidad.....	8
4.	Mezclas de uso veterinario.....	8
4.1.	Generalidades de los productos farmacéuticos veterinarios.....	8
4.2.	Importancia de las premezclas veterinarias.....	9
4.3.	Principales productos de mezclas veterinarias que contienen ASA y AA.....	10
4.4.	Almacenamiento de productos veterinarios.....	11
5.	Conceptos de estabilidad.....	12
5.1.	Definición de estabilidad.....	12
5.2.	Factores que influyen en la estabilidad.....	12
5.3.	Zonas climáticas.....	13
5.4.	Tipos de estabilidad.....	13
5.5.	Definición de estudios de estabilidad.....	15
5.6.	Tipos de estudios de estabilidad.....	15
5.7.	Condiciones de estudio de estabilidad para medicamentos conocidos según la NOM-073-SSA1-2005.....	16
5.8.	Aplicación de métodos indicativos de estabilidad a estudios de estabilidad.....	16

6. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	17
6.1. Generalidades	17
6.2. Tipos de cromatografía.....	18
6.3. Parámetros cromatográficos.....	22
IV. METODOLOGÍA.....	25
A. Diagrama metodológico.....	25
B. Reactivos, equipo y materiales.....	26
C. Desarrollo del método analítico.....	27
D. Validación del método analítico.....	31
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
VI. CONCLUSIONES.....	59
VII. REFERENCIAS.....	60
VIII. ANEXOS.....	62
Anexo 1. Preparación de soluciones.....	62
Anexo 2. Datos del rango del sistema.....	64
Anexo 3. Datos de la linealidad del sistema.....	65
Anexo 4. Datos de la precisión y exactitud.....	66
Anexo 5. Datos de la linealidad del método.....	68
Anexo 6. Datos de la reproducibilidad.....	69
Anexo 7. Datos de la robustez.....	71
Anexo 8. Datos de la evaluación de AS.....	73

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1 Clasificación de productos veterinarios.....	8
Tabla 2 Medicamentos registrados en el PEV que contienen ASA.	10
Tabla 3 Medicamentos registrados en el PEV que contienen AA.	10
Tabla 4 Factores que influyen en la estabilidad de un producto farmacéutico.....	12
Tabla 5 Zonas climáticas según la NOM-073-SSA1-2005.	13
Tabla 6 Condiciones de almacenamiento para estabilidad acelerada según la NOM-073-SSA1-2005.....	16
Tabla 7 Características de columna.....	28
Tabla 8 Composición de Fase móvil.	28
Tabla 9 Proporción de Fase móvil.	29
Tabla 10 Condiciones cromatográficas para la validación del método.....	30
Tabla 11 Parámetros y criterios de aceptación para la validación del método analítico indicativo de estabilidad.	31
Tabla 12 Preparación de las muestras de Rango.	32
Tabla 13 Preparación de las muestras de linealidad del sistema.....	32
Tabla 14 Preparación de las muestras para evaluar precisión y exactitud.	33
Tabla 15 Preparación de las muestras de linealidad del método.	33
Tabla 16 Identificación de muestras para la evaluación de reproducibilidad.	34
Tabla 17 Condiciones a evaluar para la especificidad del método.	34
Tabla 18 Modificaciones para evaluar la robustez del método.	35
Tabla 19 Preparación de las muestras para la evaluación de AS.	35
Tabla 20 Resultados de la verificación del sistema para la cuantificación de AA y ASA.	36
Tabla 21 Concentración de AA y ASA y áreas correspondientes para la evaluación del rango.	37
Tabla 22 Análisis de varianza para determinar la linealidad del rango.....	38
Tabla 23 Concentraciones de AA y ASA y áreas correspondientes para evaluar la linealidad del sistema.	39
Tabla 24 Análisis de varianza para determinar la linealidad del sistema.....	41
Tabla 25 Concentración de AA adicionada y estimada para evaluar la exactitud y precisión del método.	41
Tabla 26 Análisis de variancia para determinar la relación lineal entre la concentración adicionada y estimada de AA.....	42
Tabla 27 Evaluación de exactitud y precisión (repetibilidad) del método para ASA.	43
Tabla 28 Análisis de variancia para determinar la relación lineal entre la concentración adicionada y estimada de ASA.....	44
Tabla 29 Evaluación de la linealidad del método correspondiente a AA.....	45
Tabla 30 Evaluación de la linealidad del método correspondiente a ASA.	46
Tabla 31 Porcentajes de recobro de AA y ASA obtenidos en dos días y por analistas diferentes... ..	48
Tabla 32 Pureza de pico para la determinación de especificidad de AA en muestras control.	52
Tabla 33 Pureza de pico para la determinación de especificidad de ASA en muestras control.	52

Tabla 34 Evaluación del porcentaje de recobro empleando diferentes proporciones de solventes en la fase móvil.....	54
Tabla 35 Evaluación del porcentaje de recobro empleando diferentes columnas.....	55
Tabla 36 Concentraciones de AS y áreas correspondientes para evaluar la linealidad.	56
Tabla 37 Análisis de varianza para determinar la linealidad del rango.....	57
Tabla 38 Concentración de AS adicionada y estimada para evaluar la exactitud y precisión.	58

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1 Estructura del ácido acetilsalicílico	4
Figura 2 Espectro de absorción del ácido acetilsalicílico	4
Figura 3 Espectro de infrarrojo del ácido acetilsalicílico.....	5
Figura 4 Hidrolisis del ácido acetilsalicílico	5
Figura 5 Estructura del ácido salicílico	6
Figura 6 Espectro de absorción del ácido salicílico	6
Figura 7 Espectro de infrarrojo del ácido salicílico	6
Figura 8 Estructura del ácido ascórbico	7
Figura 9 Espectro de absorción del ácido ascórbico	7
Figura 10 Espectro de infrarrojo del ácido ascórbico.....	7
Figura 11 Proceso de separación en cromatografía.....	17
Figura 12 Descripción esquemática de un sistema simple de HPLC	18
Figura 13 Cromatografía de adsorción.....	18
Figura 14 Cromatografía de reparto.	19
Figura 15 Cromatografía de intercambio iónico.	19
Figura 16 Cromatografía de exclusión molecular.	20
Figura 17 Cromatografía de afinidad.	20
Figura 18 Representación de tiempo de retención cuando llega a su máximo.....	22
Figura 19 Representación de la presencia de coe en el cromatograma.	23
Figura 20 Componentes de un cromatograma, determinación de la resolución entre dos picos... 24	
Figura 21 Espectros de absorción de soluciones de, ASA, AS, AA a 32 µg/mL.....	27
Figura 22 Condiciones para el método analítico.....	29
Figura 23 Curva de calibración de AA para la evaluación del rango.	37
Figura 24 Curva de calibración de ASA para la evaluación del rango.	38
Figura 25 Curva de calibración de AA para la prueba de linealidad del sistema.	40
Figura 26 Curva de calibración de ASA para la prueba de linealidad del sistema.	40
Figura 27 Curva de calibración de placebos adicionados en tres niveles de concentración de AA para determinar el error sistemático del método.	42
Figura 28 Curva de calibración de placebos adicionados en tres niveles de concentración de ASA para determinar el error sistemático del método.	44

Figura 29 Concentración adicionada promedio de AA en función de la concentración estimada de linealidad del método.	45
Figura 30 Gráfico de residuales de la relación de la concentración adicionada de AA en función de la concentración estimada.	46
Figura 31 Concentración adicionada promedio de ASA en función de la concentración estimada de linealidad del método.	47
Figura 32 Gráfico de residuales de la relación de la concentración adicionada de ASA en función de la concentración estimada.	47
Figura 33 Comparación de la variabilidad del porcentaje de recobro de AA entre analistas con intervalo de confianza del 95%	49
Figura 34 Comparación de la variabilidad del porcentaje de recobro de AA entre días con intervalo de confianza del 95%.....	49
Figura 35 Comparación de la variabilidad del porcentaje de recobro de ASA entre analistas con intervalo de confianza del 95%	50
Figura 36 Comparación de la variabilidad del porcentaje de recobro de ASA entre días con intervalo de confianza del 95%	50
Figura 37 Cromatogramas de muestras control para la determinación de especificidad.	51
Figura 38 Degradación Forzada.....	53
Figura 39 Cromatograma y barrido espectral de la muestra sometida a temperatura y humedad.	54
Figura 40 Curva de calibración de AS para la prueba de linealidad del sistema.....	57

Abreviaturas

ASA	=	Ácido acetilsalicílico
AA	=	Ácido ascórbico
AS	=	Ácido salicílico
AT	=	Ácido teraftálico
ANOVA	=	Analysis Of Variance (Análisis de la varianza)
cm	=	Centímetro
r	=	Coeficiente de correlación
r ²	=	Coeficiente de determinación
CV	=	Coeficiente de variación
[]	=	Concentración
S	=	Desviación estándar
d _i	=	Diferencia absoluta
k'	=	Factor de capacidad
°C	=	Grados Celsius
g	=	Gramos
g/mol	=	Gramos por molécula
HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución) Reverse Phase - High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía de Líquidos de
RP-HPLC	=	Alta Resolución de fase reversa)
H _a	=	Hipótesis alterna
H ₀	=	Hipótesis nula
ICH	=	International Conference on Harmonisation (Conferencia Internacional en Armonización)
IC (β ₀)	=	Intervalo de confianza para la ordenada al origen
IC (β ₁)	=	Intervalo de confianza para la pendiente
γ	=	Media aritmética
μ	=	Micras
μg	=	Microgramos
μg/mL	=	Microgramos por mililitro
μm	=	Micrometro
mbar	=	Milibar
mg	=	Miligramo
mL	=	Mililitro
mm	=	Milimetro
mol	=	Molécula
nm	=	Nanometro
N	=	Número de Platos Teóricos
PDA	=	Photodiode Array (Matriz de fotodiodos)
%	=	Porcentaje
% HR	=	Porcentaje de humedad relativa
PEV	=	Prontuario de Especialidades Veterinarias

I. INTRODUCCIÓN.

El estudio y la determinación de la estabilidad de los medicamentos se han convertido en una necesidad de la industria farmacéutica, a fin de poder asegurar la identidad, efectividad, potencia, inocuidad y pureza de los productos hasta el momento de su uso.

La estabilidad se define como la capacidad de un producto farmacéutico, para conservar sus propiedades químicas, físicas, microbiológicas y biofarmacéuticas dentro de límites especificados, a lo largo de su tiempo de conservación.

Es por ello que los estudios de estabilidad tienen la finalidad de proporcionar evidencia documentada de cómo la calidad de un fármaco o medicamento varía con el transcurso del tiempo, bajo la influencia de factores ambientales y por medio de los cuales es posible establecer las condiciones de almacenamiento, períodos de reanálisis y periodo de vida útil. [1]

Se debe contar con métodos que determinen cuantitativa y selectivamente el fármaco en presencia y/o ausencia de los posibles productos de degradación. Por lo anterior, el método analítico a emplear, tiene como requisito fundamental su especificidad. Esto ocasiona que sea poco común encontrar dichos métodos en las farmacopeas de uso general y que en repetidas ocasiones se necesite desarrollarlo. [2]

El desarrollo de métodos para el análisis de preparaciones farmacéuticas implica una elección apropiada de los métodos a utilizar, basada en su aplicación, sus ventajas y sus limitantes, para ello hay una serie de criterios que deben tomarse en cuenta como son, las características fisicoquímicas del fármaco y de los demás componentes de la formulación, así como, la disponibilidad de instrumentos, equipos, materiales, la rapidez con la que se obtienen los resultados, la sencillez y el costo. [3]

Para asegurar la confiabilidad de los métodos analíticos se someten a un proceso de validación. Mediante un proceso de validación, se comprueba si el método es lo suficientemente confiable y si los resultados previstos se obtienen dentro de las condiciones establecidas. En general la validación proporciona de manera específica las características del método analítico como son la especificidad, linealidad, exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación, sensibilidad, selectividad, repetitividad, robustez y reproducibilidad. [4]

El ácido acetilsalicílico (ASA) y ácido ascórbico (AA) se emplean ampliamente en formulaciones farmacéuticas y son probablemente los principales fármacos consumidos en el mundo, en la última década se han comercializado en formulaciones que combinan la acción del ácido acetilsalicílico para el alivio de dolores de cabeza y fiebre, con el poder del ácido ascórbico para aumentar la resistencia del organismo contra los microorganismos.

Con el aumento de la fabricación y consumo de medicamentos que emplean una combinación de ácido ascórbico y ácido acetilsalicílico, se convierte en altamente interesante desarrollar nuevos métodos analíticos para su determinación simultánea. [5]

Existen diversos métodos reportados en la literatura para el análisis de estos fármacos basados en espectrofotometría diferencial, espectrofluorometría, voltametría, potenciometría, espectrofotometría derivada, mínimos cuadrados parciales y cromatografía líquidos.

Sin embargo, los métodos espectrofotométricos tienen algunas limitaciones para la determinación simultánea de estos fármacos, tales como, la superposición espectral de los máximos. Los mínimos cuadrados parciales y otros métodos quimiométricos necesitan usar un contenido matemático abstracto y no son fáciles de aplicar y entender estas técnicas quimiométricas.

Teniendo en cuenta las propiedades de los fármacos, tales como baja volatilidad, polaridad media, así como termolabilidad, los métodos de HPLC han sido frecuentemente explorados. [6]

Por lo tanto, se ha propuesto un nuevo método basado en HPLC-PDA para cuantificar el contenido de ácido ascórbico, ácido acetilsalicílico y ácido salicílico. El método propuesto resulta conveniente para la separación de dichos analitos.

II. OBJETIVOS.

Objetivo general.

- Desarrollar y validar un método analítico indicativo de estabilidad de ácido acetilsalicílico y ácido ascórbico en premezclas de uso veterinario, mediante HPLC.

Objetivos particulares.

- Realizar una amplia búsqueda bibliográfica para la comprensión del tema encomendado y la buena elección de condiciones para el método.
- Proponer condiciones iniciales de operación para el desarrollo del método analítico indicativo de estabilidad del ácido ascórbico, ácido acetilsalicílico y su principal producto de degradación (ácido salicílico)
- Desarrollar un método mediante HPLC, capaz de distinguir a cada fármaco, de sus productos de degradación, de manera que el fármaco pueda ser cuantificado con exactitud y precisión.
- Validar el método analítico desarrollado y optimizado en base a guías nacionales e internacionales, como son, la guía de validación emitida por el colegio nacional de QFB y la guía ICH Q2 validación de métodos analíticos.

III. MARCO TEÓRICO.

1. Generalidades del ácido acetilsalicílico.

1.1. Nombre y estructura.

Ácido acetilsalicílico.

Benzoic acid 2-(acetyloxy)

Acetato de Ácido salicílico

Formula: (C₉H₈O₄)

P. M: 180.2 g/mol

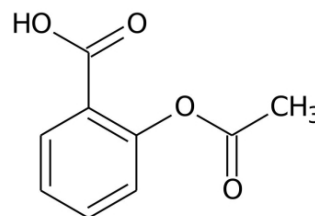


Figura 1 Estructura del ácido acetilsalicílico

1.2. Propiedades fisicoquímicas.

Apariencia: El ácido acetilsalicílico se presenta como cristales blancos o incoloros, polvo cristalino o gránulos.

Solubilidad. Soluble 1:300 de agua, 1:5 en etanol, 1:17 en cloroformo y 1:10 en éter. Soluble en soluciones de acetatos y citratos, presenta descomposición en soluciones de hidróxidos alcalinos y carbonatos.

pKa: 3.5 (25°C)

Coefficiente de partición: Log *P* (octanol/bufer 7.4), -1.1.

Espectro ultravioleta. Solución acida—230 (A₁¹=466a), 278 (A₁¹=68a); Solución alcalina—231 (A₁¹=409b), 298 nm (A₁¹=190b).

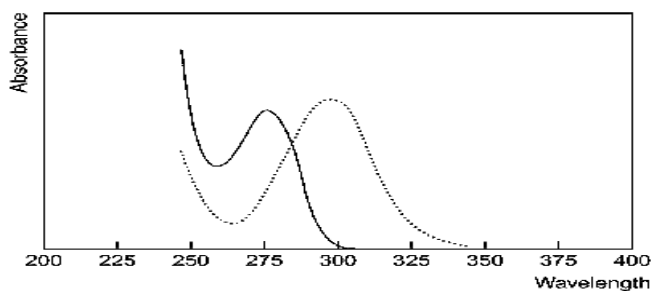


Figura 2 Espectro de absorción del ácido acetilsalicílico. (Moffat,2011)

Espectro infrarrojo. Picos principales en números de onda 1183, 1688, 1305, 1755, 925, 1219 cm⁻¹ (KBr disco). [7]

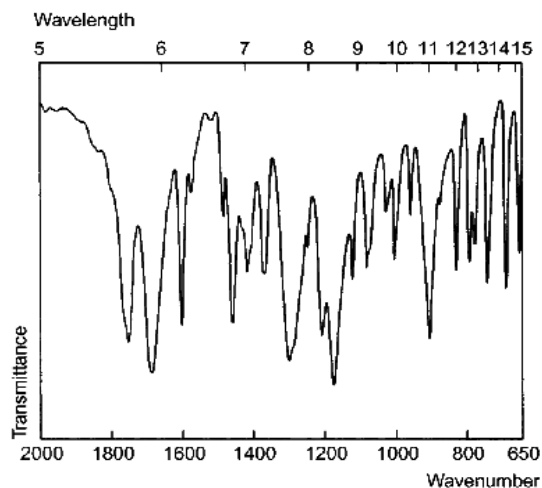


Figura 3 Espectro de infrarrojo del ácido acetilsalicílico. (Moffat,2011)

1.3. Estabilidad.

El ácido acetilsalicílico se hidroliza en contacto con la humedad generando ácido acético y ácido salicílico. [2]

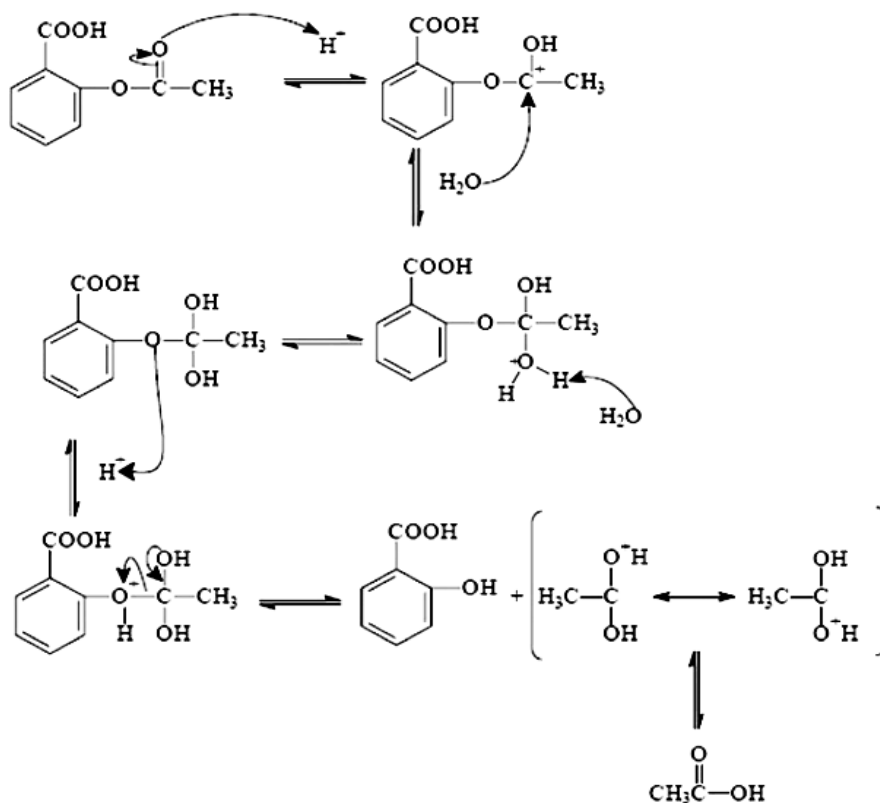


Figura 4 Hidrolisis del ácido acetilsalicílico. (Dolores, 2011)

La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos establece que las tabletas de Aspirina contienen no más de 3 % de ácido salicílico como producto de degradación del ácido acetilsalicílico. [8]

2. Generalidades del ácido salicílico.

2.1. Nombre y estructura.

Ácido Salicílico.

Acido 2-hidroxi benzoico.

Formula: $C_7H_6O_3$

P.M: 138.1 g/mol.

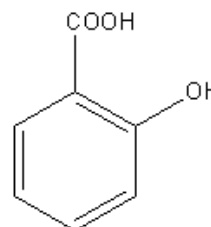


Figura 5 Estructura del ácido salicílico

2.2. Propiedades fisicoquímicas.

Solubilidad: Un gramo de ácido salicílico se disuelve en: 460 ml de agua a 25°C, 15mL de agua hirviendo, 2.7 mL de etanol, 3mL de éter, 42mL de cloroformo, 13 mL de benceno.

Constante de disociación: pK_a 3.0, 13.4 (25°).

Coefficiente de partición: Log P (octanol/agua), 2.3.

Espectro ultravioleta: Solución acida—236 ($A_1^1=647a$), 303; a Solución alcalina—298 ($A_1^1=259a$).

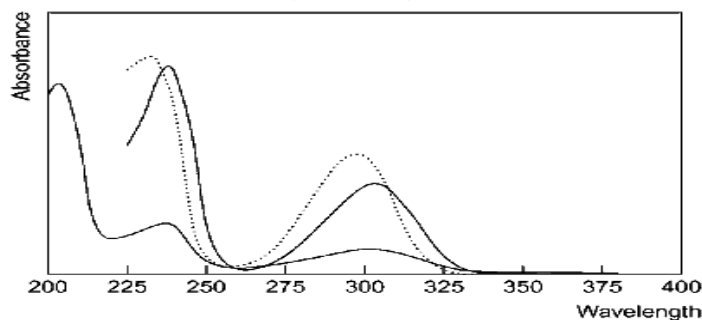


Figura 6 Espectro de absorción del ácido salicílico. (Moffat,2011)

Espectro de infrarrojo: Picos principales en números de onda 758, 1657, 1288, 1210, 1250, 1150 (saciado salicílico, KBr disco); 1587, 1724, 1176, 1515, 699, 1041 cm^{-1} [7]

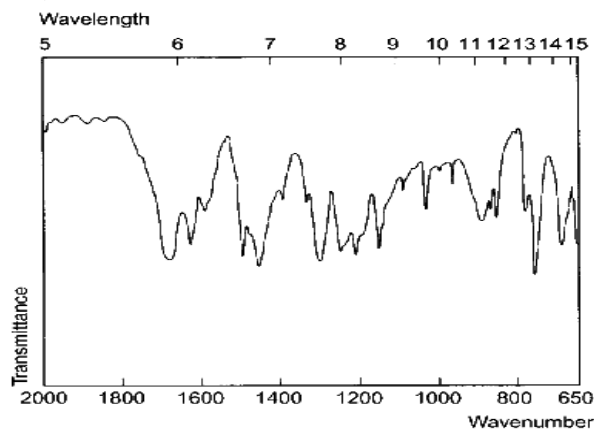


Figura 7 Espectro de infrarrojo del ácido salicílico. (Moffat,2011)

3. Generalidades del ácido ascórbico.

3.1. Nombre y estructura.

Ácido ascórbico.

Acido L-ascórbico.

Vitamina C.

Formula: $C_6H_8O_6$

P.M: 176.1 g/mol.

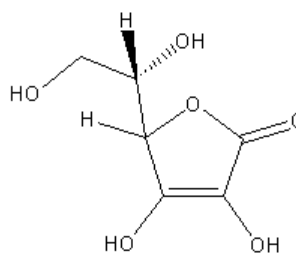


Figura 8 Estructura del ácido ascórbico

3.2. Propiedades fisicoquímicas.

Apariencia. El ácido ascórbico se presenta como un polvo cristalino de color blanco a amarillo claro, no higroscópico, inodoro o cristales incoloros con un sabor ácido agudo. Se oscurece gradualmente tras la exposición a la luz.

Solubilidad. Soluble 1:3 de agua, 1:30 de etanol, 1:10 de metanol y 1:20 de propilenglicol; soluble en acetona; insoluble en benceno, cloroformo, aceites y otros disolventes oleosos.

pka: 4.2, 11.6 (25°C)

Espectro ultravioleta: Solución ácida—236 ($A_1^1=647a$), 303; a Solución alcalina—298 ($A_1^1=259a$).

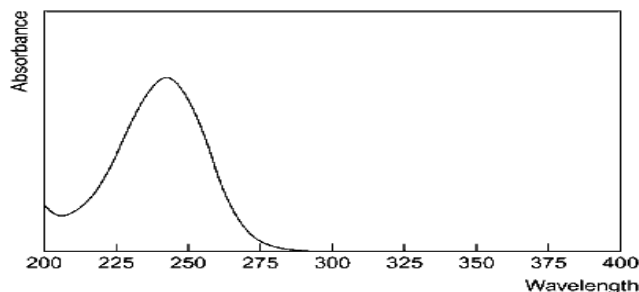


Figura 9 Espectro de absorción del ácido ascórbico. (Moffat,2011)

Espectro de infrarrojo: Picos principales en números de onda 758, 1657, 1288, 1210, 1250, 1150 (saciado salicílico, KBr disco); 1587, 1724, 1176, 1515, 699, 1041 cm^{-1} [7]

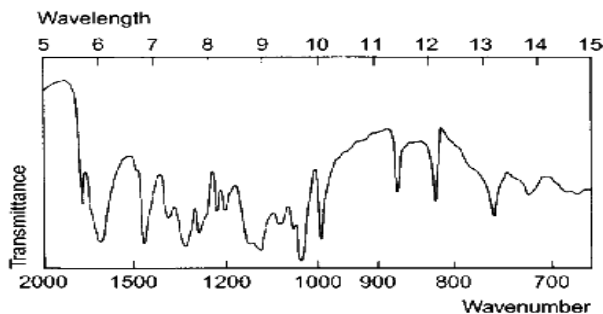


Figura 10 Espectro de infrarrojo del ácido ascórbico. (Moffat,2011)

3.3. Estabilidad.

En forma de polvo es relativamente estable, en ausencia de oxígeno y de otros agentes oxidantes, también es estable al calor. Sin embargo, el ácido ascórbico es inestable en solución, especialmente alcalina, y es de fácil oxidación por exposición al aire. Los procesos de oxidación se aceleran por luz y calor y es catalizada por trazas de cobre y hierro. [9]

4. Mezclas de uso veterinario.

4.1. Generalidades de los productos farmacéuticos veterinarios.

Los medicamentos de uso veterinario son sustancias que se destinan para prevenir, controlar, diagnosticar y tratar enfermedades y por ende fomentar la producción animal, por lo tanto, deberán estar regulados y autorizados por la SAGARPA (Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) a través del SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.) para garantizar la calidad, efectividad y seguridad de los productos.

Los productos deben contar con la siguiente información: uso, dosis, vía de administración intervalo de tratamientos, duración, especie y fin zootécnico de los animales; así como la composición del producto farmacéutico (principios activos y concentración), tiempo de retiro advertencias, laboratorio elaborador o distribuidor, número de lote y fecha de caducidad, de manera que esta sea leída y empleada.

A través de la NOM-064-ZOO-2000, "Lineamientos para la Clasificación y Prescripción de Productos Farmacéuticos Veterinarios por el nivel de Riesgo de sus Ingredientes Activos" se establece la clasificación los productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus ingredientes activos. [10]

Tabla 1 Clasificación de productos veterinario según la NOM-064-ZOO-2000.

Grupo	Características
I	Productos con principios activos cuyo efecto pueda ser psicotrópico, estupefaciente, anabólico, hormonal; así como aquello que por su alta toxicidad y residualidad en productos y subproductos de origen animal, puedan producir efectos indeseables. Su venta requiere receta médica cuantificada.
II	Productos con ingredientes activos que requieran vigilancia de un tiempo de retiro predeterminado, los que puedan llegar a ser tóxicos para una determinada especie animal. Edad o estado fisiológicos, si no se supervisa su dosificación y su posible interacción con otros ingredientes activos, además ingredientes que puedan generar reacciones de hipersensibilidad. Su venta requiere una receta médica simple.
III	Productos formulados con ingredientes activos cuya inocuidad al paciente y seguridad para el usuario hayan sido demostradas científicamente, por lo que se consideran de libre venta.

4.2. Importancia de las premezclas veterinarias.

Las premezclas para piensos son mezclas de uno o más principios activos, normalmente presentados en una base adecuada, que se preparan para facilitar la administración de los principios activos a animales a través de su alimentación. Se emplean exclusivamente en la preparación de alimentos medicamentosos por simple mezcla con otros ingredientes.

Se presentan en forma granulada o en polvo, fluyen fácilmente y los aglomerados eventuales se deshacen durante manipulación normal. El tamaño de las partículas y otras propiedades son tales que garanticen una distribución uniforme del principio o principios activos en el alimento que finalmente se administra. [11]

Los ingredientes de las dietas para los animales con frecuencia son deficientes, por lo que, es necesaria la suplementación, diversas premezclas veterinarias que incluyen microminerales, vitaminas y aditivos que corrigen estas deficiencias dependiendo de la especie, condiciones y etapas del animal para el que sean utilizados.

Los medicamentos utilizados en el alimento son una práctica cuyo objetivo es mantener la salud animal y promover el crecimiento, la eficiencia alimentaria y lograr máximos rendimientos, debido a que permiten mejorar diversos aspectos relacionados con la salud y el bienestar de los animales y, a su vez, la calidad de los productos finales (carne, huevos, etc.).

El uso de premezclas y aditivos facilitan la dinámica de la fabricación de alimentos y asegura una distribución óptima en la mezcla final de aquellos ingredientes que entran en cantidades pequeñas.

Las premezclas se elaboran incluyendo, niveles superiores al 1% de minerales (Calcio, Fósforo, Magnesio, Sodio), aminoácidos sintéticos, microminerales (Zinc, Hierro, Cobre y Selenio), vitaminas y aditivos. Numerosas vitaminas y algunos microminerales se degradan con el tiempo. Períodos largos de caducidad ofrecidos por empresas éticas dan mayor seguridad, pues indica que se están añadiendo niveles extras de ingredientes o utilizando presentaciones estabilizadas para asegurar la riqueza a niveles etiquetados aún meses después de la fabricación.

Se tiende a fabricar las premezclas en instalaciones independientes a los fabricantes de alimento. En suma, las empresas de alimentos compuestos siguen el criterio de la especialización: unas hacen alimento y otras fabrican los aditivos, obteniéndose beneficios mutuos. Es importante que estos componentes del alimento sean adquiridos a empresas con registro y que cumplan con las normas establecidas por la SAGARPA. [12]

4.3. Principales productos de mezclas veterinarias que contienen ASA y AA.

La mayoría de los productos de uso veterinario que contienen ácido acetilsalicílico están indicados en bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, aves de engorda y aves de remplazo, para facilitar el restablecimiento de los parámetros fisiológicos normales de los animales, al actuar como analgésico, antitrombótico, antipirético y antiinflamatorio.

Se utiliza como tratamiento sintomático de cuadros clínicos que causen dolor, y fiebre, indicado también para el estrés generado por transporte de los animales, reacciones pos vacunación, cortes de rabos, colmillos, despiques de aves y cambios de temperatura.

Dentro de los productos que contienen ácido ascórbico se encuentran alrededor de 30 medicamentos registrados en el Prontuario de Especialidades Veterinarias (PEV) la mayoría utilizados como suplementos alimenticios. Sin embargo, la mezcla de ácido acetilsalicílico y ácido ascórbico se encuentra en presentación de polvo oral para uso principal en aves, ya que está indicado para la prevención del golpe de calor, estrés por altas temperaturas y coadyuvante en el tratamiento de procesos febriles. [13]

Tabla 2 Medicamentos registrados en el PEV que contienen ASA.

Marca	Laboratorio	Presentación
Antifebril	PRODE	Solución Oral
Pecsalisyl	PECUARIUS	Polvo
Combinados		
Apirex (Ácido ascórbico)	VETOQUINOL	Polvo
Amoxi-30-plus (Ampicilina /Bromhexina)	AGROVET	Polvo
Hemoflor (Ambroxol/Flor fenicol)	FARVET	Solución
Prodeflox 10% (Norfloxacina)	PRODE	Premezcla.

Tabla 3 Medicamentos registrados en el PEV que contienen AA.

Ácido ascórbico			
Inyectables	Tabletas	Polvo o Granulado	Otros
			Solución oral
			Beibi M.C.
			Suspensión
			Puppy boost
			Jarabe
			Super Chevinall Triple A
Antoplex Ascorbol Eeee horsy boost	Arti-protec reforzado Caninos Artro-optimus Ascorbol plus Equilibrium Fortex Refferhy boost	Apivit Arti-protec reforzado Equinos Biotavit Horse power Mayvit WSP Vita Flori Vitafort-P-Plus Vitater	

4.4. Almacenamiento de productos veterinarios.

En el caso de los medicamentos veterinarios, algo tan básico como utilizar productos antes de su fecha de expiración o el hecho de mantener y respetar las condiciones de almacenamiento señaladas para el producto, es considerado de extrema importancia dado que, desde el punto de vista sanitario, es imprescindible obtener los efectos terapéuticos contra las enfermedades que afectan a los animales, los cuales deben mantenerse durante todo el período de vida útil del medicamento. [14]

Los medicamentos veterinarios deben ser almacenados en un lugar adecuado. Las condiciones de almacenamiento deberán ser conformes a lo indicado en la etiqueta y el inserto. Proveer, en particular, un lugar de almacenamiento seguro, como un armario en un local cerrado en el que los medicamentos se mantengan a una temperatura no superior a los 30°C y protegidos de la luz. Biológicos y algunos otros medicamentos que requieren de condiciones especiales de refrigeración deben mantenerse en una temperatura entre 2 a 8°C. Además, es necesario separar los medicamentos etiquetando los estantes de acuerdo al tipo de medicamento. [15]

Las etiquetas de los medicamentos deben contener la siguiente información:

- Nombre comercial Ingredientes activos.
- Indicaciones y Dosis.
- Vía de administración o direcciones de uso.
- Precauciones y contradicciones.
- Cuidados y/o advertencias.
- Tiempo de desecho para mercadeo.
- Número de lote y fecha de expiración.

Es muy importante tomar ciertas precauciones en el manejo de los medicamentos utilizados en las granjas para disminuir el riesgo de contaminación y subutilización de los mismos. Se debe recordar que la efectividad de un medicamento almacenado puede disminuir rápidamente dependiendo de la temperatura de su almacenamiento, exposición a la luz del sol y otros factores que se indican por el fabricante. [12]

Los productos pueden verse afectados en mayor o menor medida, dependiendo de su naturaleza y composición. Si no se respetan las condiciones de almacenamiento se observarán diferentes fallas o problemas, de acuerdo a su forma farmacéutica.

Un polvo se mantiene estable cuando no varía su coloración, olor, sabor y permanece libre de manchas y de aglutinaciones. Por lo general, éstos son almacenados en bolsas plásticas y pueden verse afectados por la humedad del ambiente, lo que puede producir la inestabilidad del medicamento. [14]

5. Conceptos de estabilidad.

5.1. Definición de estabilidad.

La NOM-073-SSA1-2005 “Estabilidad de fármacos y medicamentos” define a la estabilidad como la capacidad de un fármaco o un medicamento de permanecer dentro de las especificaciones de calidad establecidas, en el envase que lo contiene durante su periodo de vida útil. [16]

La estabilidad es la capacidad de un fármaco o medicamento para permanecer dentro de las especificaciones establecidas, para asegurar su identidad, potencia, calidad y pureza durante el período de reanálisis o de caducidad. [17]

La estabilidad también se puede definir como el lapso de tiempo desde la preparación inicial hasta el acondicionamiento del producto, durante el cual la forma dosificada continúa cumpliendo con las especificaciones presentadas en la monografía con respecto a la identidad, pureza, calidad y potencia. [1]

5.2. Factores que influyen en la estabilidad.

Las causas que condicionan la estabilidad de los medicamentos son de dos tipos. Por una parte, está la labilidad propia de las sustancias activas y de los excipientes o coadyuvantes, que viene condicionada en último término por su estructura y propiedades químicas y fisicoquímicas. Por otra parte, están los factores externos, como temperatura, humedad, aire y luz, que inducen o aceleran reacciones que devalúan la calidad o la actividad del medicamento.

Los factores ambientales (calor, luz, humedad), pueden influir en la estabilidad de los fármacos y de los medicamentos debido a que “cuando un paquete y su contenido llegan al mercado, dejan de estar en un ambiente controlado. La exposición al calor, el frío, la luz, la humedad, los golpes y la vibración pueden afectar de manera adversa al producto, especialmente cuando las condiciones exceden los límites de protección señalados en el empaque”. [1]

Tabla 4 Factores que influyen en la estabilidad de un producto farmacéutico.

Ambientales	Relacionados con el producto
Temperatura Humedad Luz Oxígeno Otras (Vibraciones/Congelación)	Propiedades Fisicoquímicas del fármaco y de los excipientes. (Impurezas, polimorfismo, tamaño de partícula, etc.) Forma farmacéutica y composición. Proceso de Fabricación. Naturaleza del contenedor o envase.

5.3. Zonas climáticas.

Al organizar un programa de pruebas de estabilidad es preciso tener en cuenta el mercado destinatario y las condiciones climáticas en la zona en que se usarán los productos, para estos fines se establecen 4 zonas climáticas, México corresponde a la zona climática II, las características de las zonas se muestran a continuación. [17]

Tabla 5 Zonas climáticas según la NOM-073-SSA1-2005.

Zona	Definición (Clima)	Condiciones de Almacenamiento	Temperatura Promedio anual medida al aire libre	Temperatura Promedio anual calculada	Promedio anual de la presión parcial del vapor de agua.
I	Templado	21°C / 25 % HR	Hasta 15°C	Hasta 20.5°C	Hasta 11 mbar
II	Subtropical/ mediterráneo	25°C / 60 % HR	>15-22°C	>20.5-24°C	> 11-18 mbar
III	Caluroso/ seco	30°C / 35 % HR	>22°C	>24°C	Hasta 15 mbar
IV	Caluroso/ húmedo	30°C / 70 % HR	>22°C	>24°C	> 15 mbar

5.4. Tipos de estabilidad.

Tomando en cuenta los factores que afectan la estabilidad de un producto, ésta puede clasificarse de la manera siguiente:

- Física
- Química.
- Microbiológica.
- Biológica.

Estabilidad Física. En este caso se estudia si ha ocurrido algún cambio en las propiedades físicas tales como color, uniformidad, resuspendibilidad, transparencia, solubilidad, etc. Estas modificaciones, que aparentemente son inofensivos cambios físicos, pueden tener importancia fundamental en la efectividad terapéutica del medicamento.

El conocimiento de la estabilidad física de una fórmula es muy importante por tres razones primordiales:

- 1) Un producto farmacéutico tiene que tener un aspecto agradable, elegante y profesional todo el tiempo que permanezca en los estantes. Toda alteración del aspecto físico, puede hacer que el consumidor pierda su confianza en el producto.

- 2) Como algunos productos se expenden en recipientes de dosis múltiples, hay que asegurar la uniformidad del contenido de componente en función del tiempo. La solución turbia o una emulsión con separación de fases puede acarrear un patrón posológico disparado.
- 3) El producto farmacéutico debe cumplir con un determinado período de vida de almacenamiento para que el consumidor pueda aceptarlo. Toda alteración del sistema físico puede hacer que el medicamento pierda su disponibilidad.

Estabilidad Química. Las alteraciones químicas afectan tanto a fármacos como excipientes, a pesar de que los estudios de estabilidad se dirijan exclusivamente al contenido en principios activos. Las alteraciones químicas son provocadas por hidrólisis, oxidación, reducción, descarboxilación, esterificación, polimerización, despolimerización, fotólisis, catálisis por oligoelementos metales, etc.

La hidrólisis y la oxidación son los mecanismos más probables de la inestabilidad de un fármaco. Las reacciones hidrolíticas implican un ataque nucleofilo de enlaces lábiles (como lactama>ester>amida>imida) del agua sobre el fármaco en solución y son de primer orden, para catalizar la degradación son necesarias varias condiciones: la presencia de OH^- , H_3O^+ , iones metálicos divalentes, calor, luz, polaridad y las concentraciones elevadas de fármaco.

La estabilidad química es, generalmente, la más estudiada y consiste en la determinación, a través del tiempo, del mantenimiento de la integridad química de un medicamento, así como su potencia establecida en la etiqueta durante el tiempo de vencimiento señalado, empleando para ello métodos de análisis fisicoquímicos específicos.

Estabilidad microbiológica.

Debido a la presencia constante de microorganismos los preparados farmacéuticos pueden ser contaminados a través del aire, por los fármacos y excipientes, así como, por los equipos que se utilicen para su preparación.

Dependiendo de la composición y del estado físico de los preparados farmacéuticos, la contaminación microbiana será más o menos probable, así se encuentra que, las formas farmacéuticas líquidas y semisólidas son más propensas al ataque microbiano, sobre todo por su contenido en agua, así como, por la presencia de excipientes que a menudos son buenos medios de cultivo.

Los microorganismos generan varias alteraciones no deseadas en las formas farmacéuticas, entre las cuales se encuentran: la turbidez de las soluciones, los malos olores, la posibilidad de una infección directa por microorganismos la pérdida de actividad farmacológica por la degradación microbiana de los fármacos o la inestabilidad de las formas farmacéuticas por la degradación microbiana de los excipientes.

En resumen, se puede decir que la estabilidad microbiológica, estudia si la esterilidad o resistencia al crecimiento microbiano es efectivo durante el periodo de vigencia señalado.

Estabilidad biológica.

Está relacionada principalmente con aquellos productos de fuerte actividad biológica tales como enzimas, hormonas, etc. Puede también relacionarse con la estabilidad química en los estudios de la toxicidad de determinados productos de descomposición a fin de establecer límites adecuados para los mismos.

5.5. Definición de estudios de estabilidad.

Los estudios de estabilidad pueden definirse como aquellas pruebas o ensayos que se le realizan a un medicamento o materia prima para determinar cómo se modifican las características físicas, químicas y terapéuticas bajo la influencia de diversos factores ambientales como son temperatura, humedad y luz, con el objeto de determinar el período útil y las condiciones de almacenamiento en que sus características permanecen dentro de los límites especificados.

5.6. Tipos de estudios de estabilidad.

Los estudios de estabilidad están diseñados en diversas formas, pero básicamente todos estos estudios se pueden agrupar en tres metodologías generales:

- 1) Método de vida de estante o vida de anaquel; siendo estos los estudios de estabilidad a largo plazo (tiempo real). Son aquellos estudios en los que se evalúan las características físicas, químicas fisicoquímicas, biológicas o microbiológicas, del medicamento durante el periodo de caducidad bajo condiciones de almacenamientos normales o particulares.
- 2) Métodos cinéticos isotérmicos; entre los cuales se encuentran los estudios de estabilidad acelerada que están diseñados para incrementar la velocidad de degradación química y/o biológica o el cambio físico de un medicamento, por medio del empleo de condiciones exageradas de almacenamiento.
- 3) Métodos cinéticos no isotérmicos; entre los cuales se encuentran los estudios de ciclado. Estos últimos proporcionan evidencia acerca de la inestabilidad de los fármacos o medicamentos cuando no hay pruebas isotérmicas disponibles. [1]

5.7. Condiciones de estudio de estabilidad para medicamentos conocidos según la NOM-073-SSA1-2005.

Las condiciones del estudio y su duración deben ser suficientes para cubrir el almacenamiento, distribución y uso del fármaco [16]; aplicar los cuadros siguientes:

Tabla 6 Condiciones de almacenamiento para estabilidad acelerada según la NOM-073-SSA1-2005.

Tipo de estudio	Condiciones de almacenamiento	Periodo mínimo	Frecuencia de análisis
Estabilidad acelerada	40°C ±2°C/75%±5%HR	6 Meses	0, 3, 6 Meses.
Estabilidad a condiciones intermedias	30°C ±2°C/65%±5%HR	3 Meses	0, 3, 6 Meses.
Estabilidad a largo plazo	25°C ±2°C/60%±5%HR o 30°C ±2°C/65%±5%HR	12 Meses	0, 3, 6, 9 y 12 Meses.

5.8. Aplicación de métodos indicativos de estabilidad a estudios de estabilidad.

Aunque en todos los casos es importante conocer la vida útil de cada medicamento, la metodología a aplicar varía según la forma farmacéutica a la que se le aplique el estudio, ya que los fármacos no se comportan de igual forma en solución, que en una forma sólida o en forma de suspensión.

En el caso de los sólidos, la aplicación de los métodos cinéticos es complicada y hacer predicciones es bastante difícil, aunque no imposible; existen trabajos que lo confirman, debido a que aquel es un sistema heterogéneo en el cual los factores ambientales como la luz, humedad, temperatura y el aire no influyen uniformemente.

La luz es uno de los factores más a considerar debido a que en muchos casos se producen reacciones fotoquímicas importantes, las cuales siguen un mecanismo de radicales libres, siendo este el más común a encontrar en sólidos, por lo que debe estudiarse su influencia en el producto terminado.

Otro factor que puede influir enormemente es la humedad, para ello se almacenan las tabletas en cámaras que proporcionan humedad definida a ciertas temperaturas. Entonces se puede denotar la acción combinada de estos factores mediante el análisis del contenido. [1]

6. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

6.1. Generalidades.

La cromatografía designa a varias técnicas similares que permiten la separación de diferentes especies moleculares de una mezcla, estas especies moleculares se conocen como analitos y matriz. Los analitos se refieren a las especies moleculares de interés, mientras que la matriz representa el resto de los componentes de la muestra. Para la separación cromatográfica, la solución problema se introduce en una fase móvil que fluye a través de una fase estacionaria.

En HPLC, la fase estacionaria es típicamente una columna rellena con partículas muy pequeñas y porosas, la fase móvil es líquida y se mueve a través de la columna mediante una bomba a presión elevada. Un diagrama esquemático del proceso de separación se muestra en la siguiente figura.

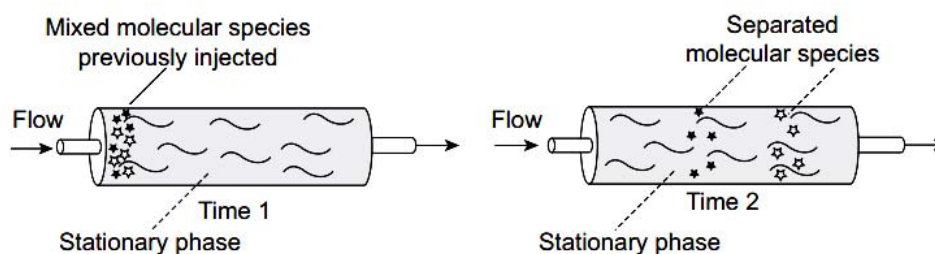


Figura 11 Proceso de separación en cromatografía. (Moldoveanu,2012)

Las moléculas eluidas pueden ser detectadas mediante diversos procedimientos. Estas moléculas se diferencian de los componentes de la fase móvil por ciertas propiedades fisicoquímicas (absorción UV, índice de refracción, fluorescencia, masa molecular y fragmentación en un espectrómetro de masas, u otros), que los hacen detectables. Por último, una señal eléctrica se asocia típicamente con la detección, y la salida gráfica de esta señal se conoce como un cromatograma.

Un instrumento de HPLC consiste en varios componentes que se muestran esquemáticamente en la Figura 12. El sistema puede incluir: (1) Sistema de disolvente de alimentación (recipiente de disolvente y degasificador), (2) Sistema de bombeo de alta presión (que se muestra como una bomba mecánica de doble pistón), (3) Inyector (se muestra con una jeringa que contiene a la muestra), (4) Columna cromatográfica (posiblemente con una columna de seguridad o pre columna), (5) Uno o más detectores (detector espectrofotométrico) y (6) Una unidad de proceso de datos del controlador. [18]

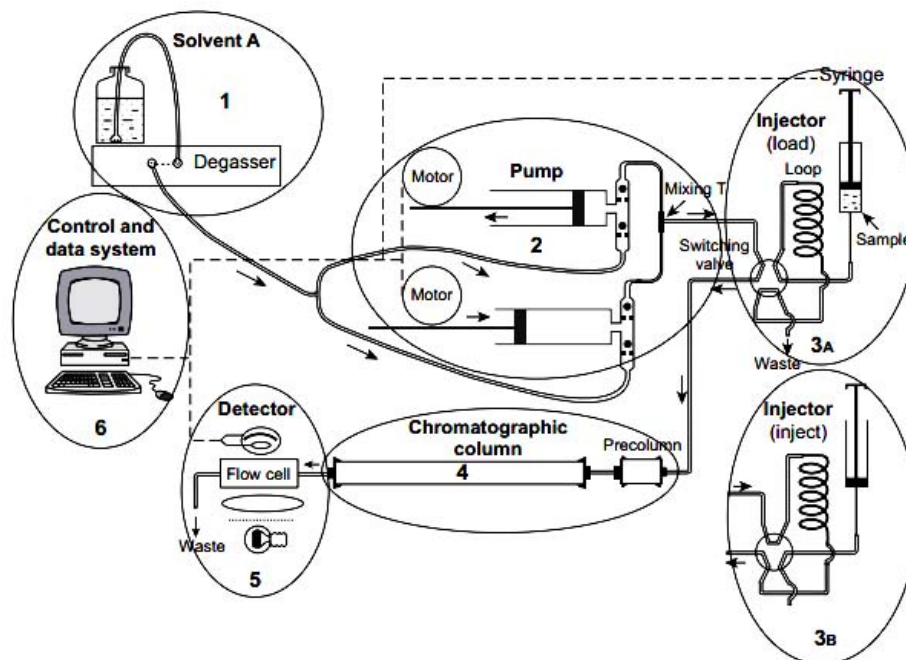


Figura 12 Descripción esquemática de un sistema simple de HPLC. (Moldoveanu,2012)

6.2. Tipos de cromatografía.

La cromatografía se divide en varias categorías en función del mecanismo de interacción del soluto con la fase estacionaria.

Cromatografía de adsorción. Usa una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida o gaseosa. El soluto se adsorbe en la superficie de las partículas sólidas. Cuanto más fuertemente se adsorbe un soluto, más lentamente atraviesa la columna.

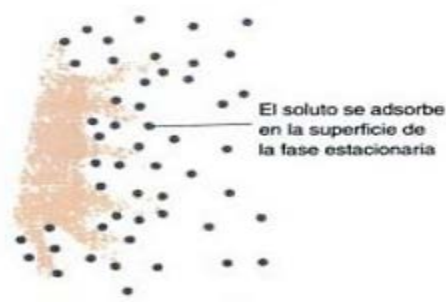


Figura 13 Cromatografía de adsorción. (Harris,2011)

Cromatografía de reparto. Utiliza una fase estacionaria líquida en forma de una fina película de alto punto de ebullición sobre la superficie de un soporte sólido, que en cromatografía de gases es, típicamente, la cara interna de una columna de sílice. El soluto está en equilibrio entre el líquido estacionario y la fase móvil, que en cromatografía de gases es el gas acarreador.

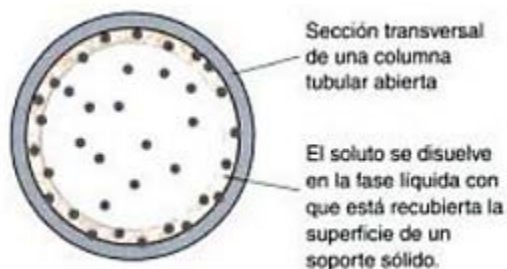


Figura 14 Cromatografía de reparto. (Harris,2011)

Cromatografía de intercambio iónico. En este tipo de cromatografía existen aniones como SO_3^- o Cationes como $\text{N}-(\text{CH}_3)_3^+$, unidos covalentemente a la fase estacionaria sólida, que comúnmente es una resina. Los iones en disolución, de carga opuesta son atraídos a la fase estacionaria por fuerzas electrostáticas. La fase móvil es un líquido.

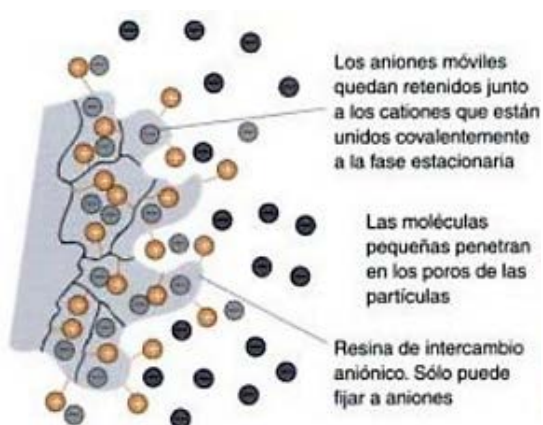


Figura 15 Cromatografía de intercambio iónico. (Harris,2011)

Cromatografía de exclusión molecular. Esta técnica también llamada cromatografía de filtración por gel o de permeación por gel, separa moléculas por su tamaño. Las moléculas de mayor tamaño pasan más rápidamente que las de menor tamaño. A diferencia de otras formas de cromatografía, no hay una interacción atractiva entre la fase estacionaria y el soluto en el caso ideal de una exclusión molecular. En su lugar la fase móvil líquida pasa a través del gel poroso. Los poros son lo bastante pequeños para excluir a los solutos más grandes, pero no a los pequeños. Las moléculas pasan de largo sin entrar en los poros. Las moléculas pequeñas tardan más tiempo en pasar a través de la columna por que penetran dentro del gel, por consiguiente, deben atravesar más volumen antes de abandonar la columna.

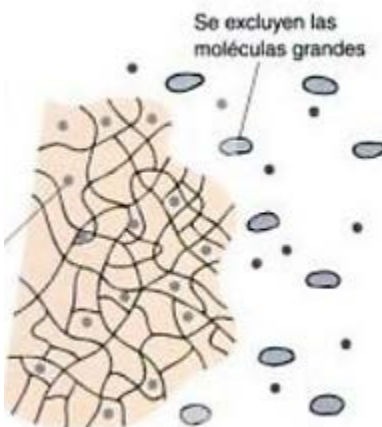


Figura 16 Cromatografía de exclusión molecular. (Harris,2011)

Cromatografía de afinidad. Esta forma de cromatografía, que es la más selectiva emplea interacciones específicas entre una clase de moléculas de soluto y una segunda molécula que está unida covalentemente (inmovilizada) en la fase estacionaria. Por ejemplo, la molécula inmovilizada podría ser un anticuerpo unido a una proteína determinada. Si se pasa a través de la columna una mezcla que contienen un millar de proteínas, solo la proteína que reacciona con el anticuerpo se fija a la columna. Después de lavar los demás solutos de la columna, se libera la proteína deseada modificando el pH o la fuerza iónica. [19]

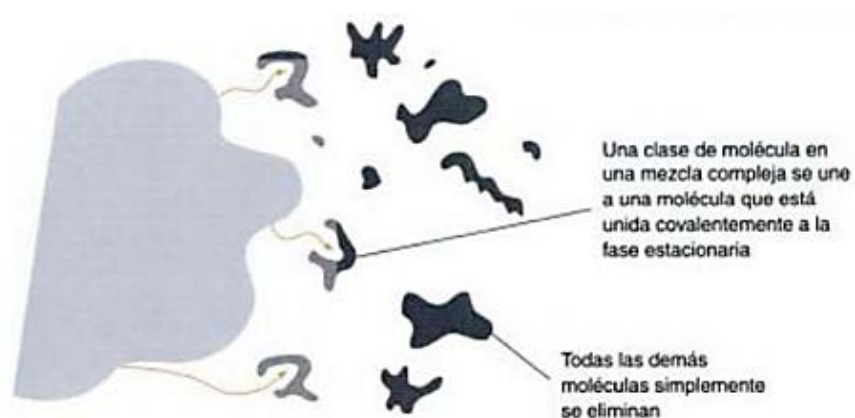


Figura 17 Cromatografía de afinidad. (Harris,2011)

Otras características también se utilizan para diferenciar los tipos de HPLC. Una de estas características está relacionada con la composición de la fase móvil. La cromatografía que se realiza en una composición constante de la fase móvil se conoce como isocrática, mientras que, si hay cambios en la composición de la fase móvil, durante la separación se conoce como gradiente. La separación por gradiente permite un cambio en la polaridad y/o pH de la fase móvil durante la separación y aumenta significativamente la versatilidad. Especialmente cuando el tiempo de retención de algunos de los solutos se vuelve demasiado largo, para acelerar la separación. [18]

Un criterio más para la clasificación es el tamaño de las partículas usadas en la columna cromatográfica. El tamaño de las partículas que llenan la columna cromatográfica afecta el ancho de pico y por lo tanto la separación. En HPLC el tamaño de las partículas es generalmente de 3 a 10 μm . Las técnicas que utilizan partículas más pequeñas (menores a 2.5 μm) se refieren como UPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography).

Al utilizar partículas más pequeñas se requiere una mayor presión de operación para la fase móvil. El uso de pequeñas partículas puede conducir no sólo a mejores separaciones, sino también a tiempos más rápidos.

Debido a los diferentes tipos de cromatografía, se tienen diferentes características y aplicaciones, es importante entender estas diferencias y seleccionar el tipo de cromatografía para la solución de un problema específico de separación.

La cromatografía de fase inversa (RP-HPLC) es la técnica de HPLC más común, se lleva a cabo en una fase estacionaria no polar con una fase móvil polar. La fase estacionaria puede obtenerse, por la unión química de cadenas largas de hidrocarburos sobre una superficie sólida tal como sílice. La cadena más común unida a sílice es C18 (que contiene 18 átomos de carbono), que tiene un carácter hidrófobo alto. La hidrofobicidad puede variar dependiendo de la naturaleza del sustituyente, por ejemplo, una columna C18 tiene una hidrofobicidad mayor que una columna C8.

La fase móvil en RP HPLC es típicamente una mezcla de un disolvente orgánico (Acetonitrilo, Metanol, Isopropanol, etc.) y agua. Pequeñas cantidades de tampones también se pueden añadir a la fase móvil.

Las interacciones en RP-HPLC se consideran ser las fuerzas hidrófobas. Estas fuerzas son causadas por las energías resultantes de la alteración de la estructura dipolar del disolvente. El llamado efecto solvofóbico es causada por la fuerza de la "cavidad de reducción" en el agua alrededor del analito y la fase estacionaria cuando los dos están interactuando.

La retención del analito depende de la superficie de contacto entre la parte no polar de la molécula y la fase estacionaria, tanto como sumergido en el eluyente acuoso. Un analito con una superficie hidrofóbica más grande está más conservado en la fase estacionaria, lo que resulta en un tiempo de retención más largo en comparación con un analito con una superficie hidrófoba menor.

La separación se considera típicamente que se basa en la partición del analito entre la fase estacionaria y la fase móvil, aunque algunos experimentos se pueden explicar por el equilibrio de adsorción. La utilidad de RP-HPLC se basa en el hecho de que la mayoría de los compuestos tienen al menos algún fragmento hidrófobo en su estructura. [18]

6.3. Parámetros cromatográficos.

Todo tipo de cromatografía tiene en común las definiciones y cálculos de parámetros y requerimientos generales para comprobar la aptitud del sistema.

Estos parámetros se determinan con respecto al cromatograma, el cual es un gráfico de la respuesta del detector en función del tiempo. Este gráfico es útil tanto para el análisis cualitativo como cuantitativo, ya que la posición de los picos en el eje del tiempo puede ayudar para identificar los componentes de la muestra; las áreas bajo los picos proporcionan una medida cuantitativa de la cantidad de cada componente.

Las mediciones de retención en cromatografía, se pueden presentar como el tiempo de retención (t_R) se define por la posición del máximo del pico en el cromatograma. A partir de éste, se puede calcular el volumen de retención (V_R) que se define como el volumen de fase móvil necesario para transportar la banda de soluto desde el punto de inyección a través de la columna, hasta el detector (en el máximo del pico del soluto).

$$V_R = v \times t_R$$

t_R = tiempo de retención

v = velocidad de flujo de la fase móvil.

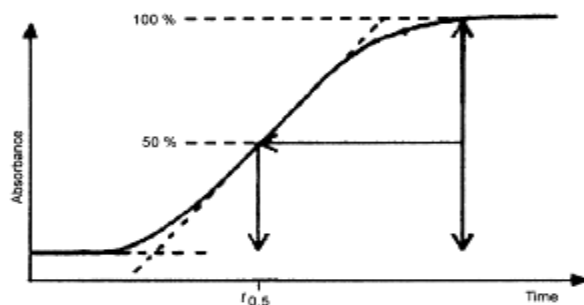


Figura 18 Representación de tiempo de retención cuando llega a su máximo. (Gómez, 2013)

El factor de retención o factor de capacidad es un parámetro importante que con frecuencia se utiliza para describir las velocidades de migración de los solutos en las columnas, que se expresa:

$$K' = \frac{\text{cantidad de sustancia en fase estacionaria}}{\text{cantidad de sustancia en fase móvil}} = \frac{t_R}{t_M} - 1$$

El factor de Coleo o Asimetría es una medida de la simetría del pico, para un pico perfectamente simétrico este valor corresponde a 1 y su valor aumenta a medida que la simetría es más pronunciada. Éste parámetro se expresa:

$$A_s = \frac{\omega_{0.05}}{2d}$$

Dónde:

$\omega_{0.05}$ = anchura del pico a una vigésima parte de la altura del pico.

d = distancia entre la perpendicular trazada desde el pico máximo y el borde delantero del pico a una vigésima parte de la altura del pico.

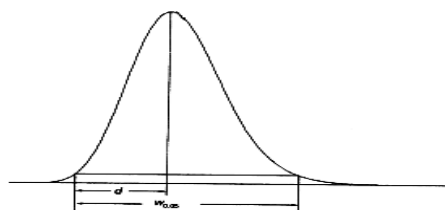


Figura 19 Representación de la presencia de coleo en el cromatograma. (Gómez, 2013)

El rendimiento de la columna (eficiencia aparente) se puede calcular a partir de datos obtenidos bajo ciertas condiciones, dependiendo de la técnica, como el aparente número de platos teóricos (N) a partir de la siguiente expresión, donde los valores de t_R y w_H , tienen que se expresa en las mismas unidades (tiempo, volumen o distancia).

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{w_H} \right)^2$$

O

$$N = \frac{\omega_{0.05}}{2d}$$

t_R = tiempo de retención o la distancia a lo largo de la línea de base desde el punto de inyección a la perpendicular al suelo en el máximo del pico correspondiente al componente.

w_H = anchura del pico a media altura.

$\omega_{0.05}$ = Ancho del pico al 5% de la altura.

d = distancia entre el máximo del pico y el borde inicial del pico, al 5% de la altura del pico desde la línea base.

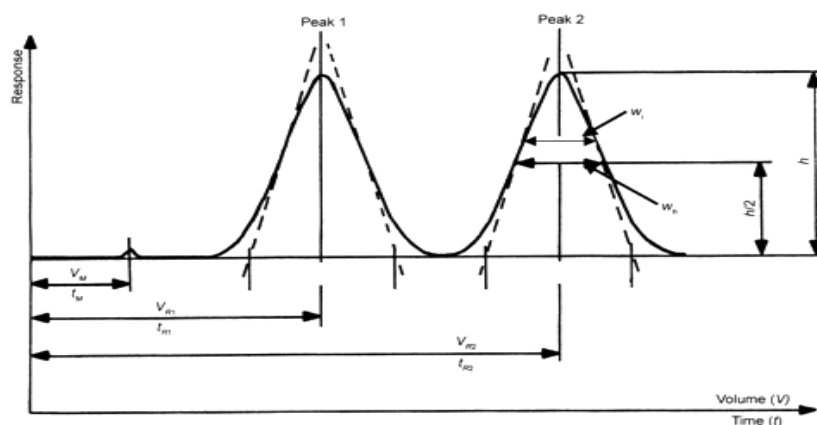


Figura 20 Componentes de un cromatograma, determinación de la resolución entre dos picos. (Gómez, 2013)

El número aparente de platos teóricos varía con el componente, así como con la columna y el tiempo de retención.

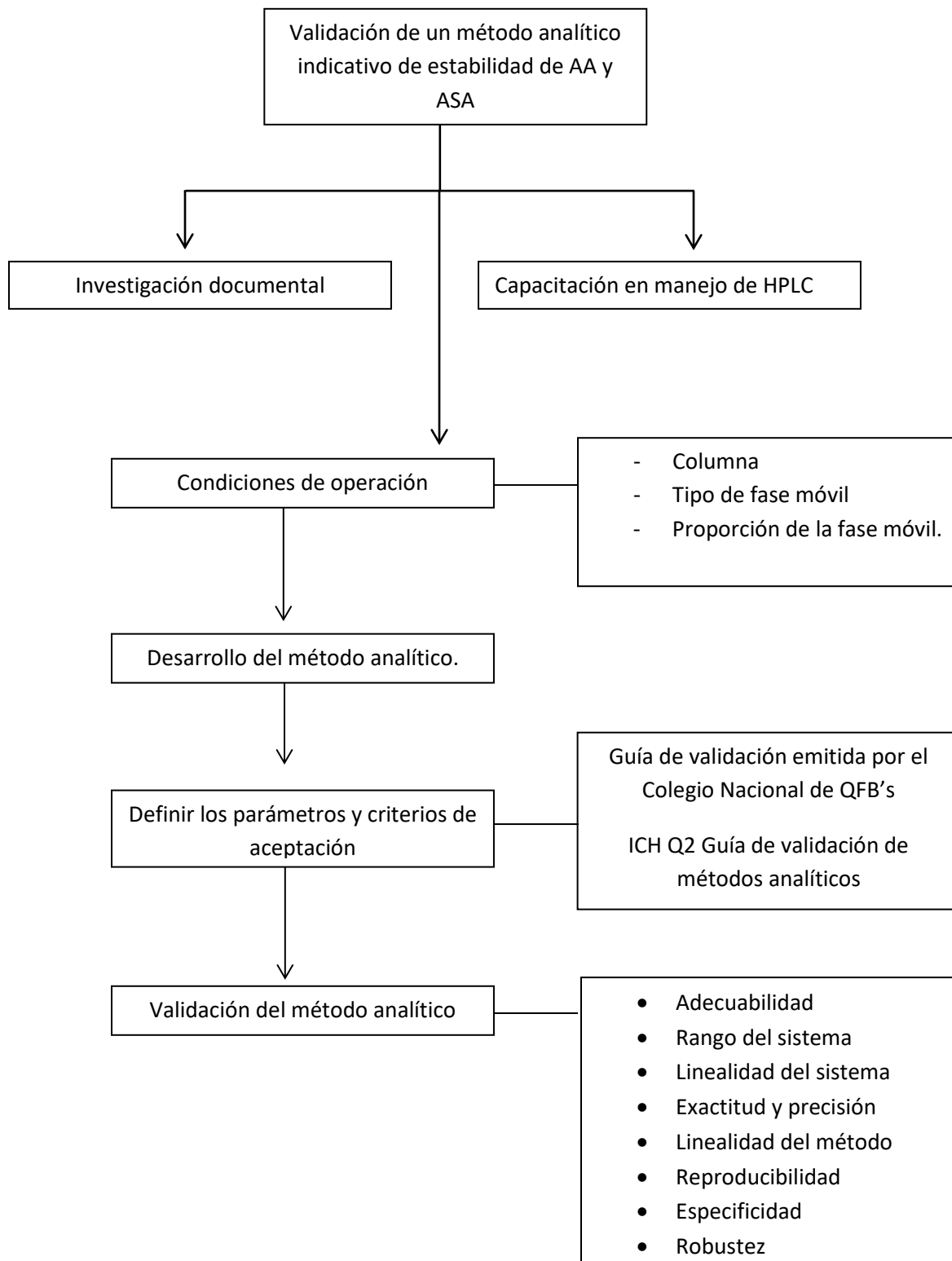
La resolución R , de una columna constituye una medida cuantitativa de su capacidad para separar dos analitos. [18,20]

$$R_s = \frac{1.18(t_{R2} - t_{R1})}{\omega_{h1} + \omega_{h2}}$$

t_{R1} y t_{R2} = tiempos de retención o las distancias a lo largo de la línea de base desde el punto de inyección a las perpendiculares cayeron de los máximos de 2 picos adyacentes,

ω_{h1} y ω_{h2} = anchura de los picos a media altura.

IV. METODOLOGÍA.
A. Diagrama metodológico.



B. Reactivos, equipo y materiales.

Reactivos.

- Ácido acetilsalicílico estándar secundario.
- Ácido ascórbico estándar secundario.
- Ácido salicílico estándar secundario.
- Ácido Fosfórico. (J. Baker Grado Reactivo)
- Acetonitrilo. (J. Baker Grado HPLC)
- Metanol. (J. Baker Grado HPLC)
- Etanol Absoluto Anhidro. (J. Baker Grado Reactivo)
- Agua purificada. (Milli Q)

Materiales.

- Potenciómetro.
- Balanza analítica
- Parrilla de agitación mecánica.
- Barras de agitación para volumen de 1000 mL.
- Matraces volumétricos de 10, 25, 50, 100 y 250 mL.
- Probeta de 10 mL.
- Vaso de precipitado de 1000 mL.
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 mL.
- Acrodiscos de Nylon de 0.45 μm
- Sistema de microfiltración para disolventes:
 - Membrana Millipore, tipo HVLP de 0.45 μm de tamaño de poro.
- Columna de acero inoxidable de 15 cm de longitud por 4.6 mm de diámetro interno, empacada con partículas de sílica de 5 μm de diámetro recubiertas con grupos octadecilsilano (C18). Tipo Aqua, marca Phenomenex.

Equipo.

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución.
 - Bomba: Waters TM 600 controller.
 - Inyector automático: Waters TM 717 plus Autosampler.
 - Detector: Waters TM 996 PDA.
 - Integrador y procesador de datos.

C. Desarrollo del método analítico.

Comportamiento espectral.

Para comenzar con el desarrollo del método analítico indicativo de estabilidad fue necesario conocer el comportamiento espectral de los principios activos: ácido acetilsalicílico (ASA) y ácido ascórbico (AA), así como, del ácido salicílico (AS) principal producto de degradación del ácido acetilsalicílico.

Se realizó un barrido para cada uno de las sustancias antes mencionadas en un intervalo de longitud de onda de 200-400 nm a una concentración de 32 µg/mL. Se utilizó etanol absoluto anhidro debido a que en la literatura se reporta como buen medio de disolución.

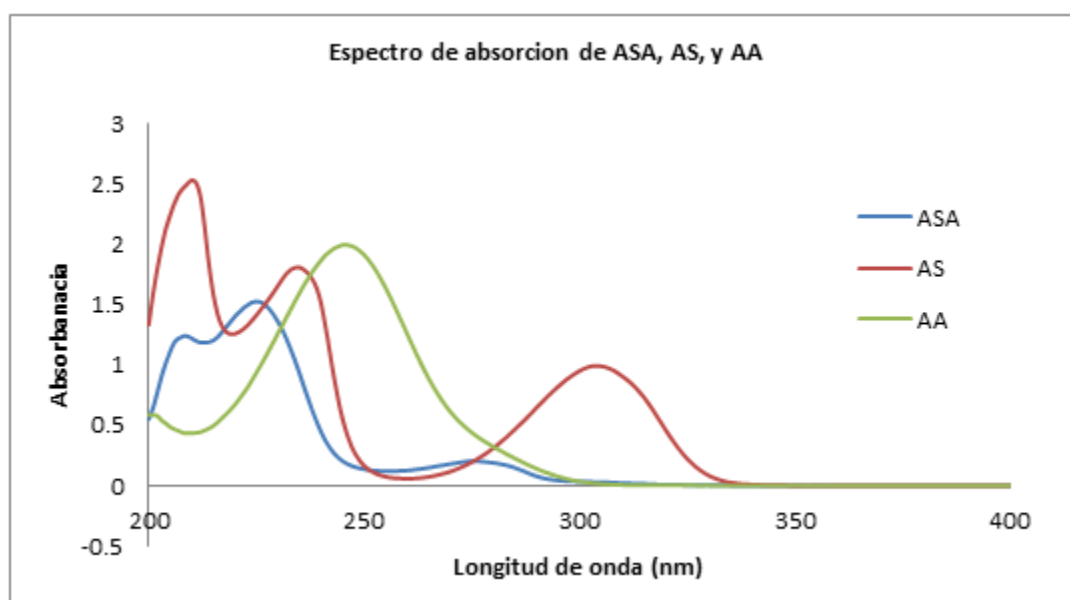


Figura 21 Espectros de absorción de soluciones de, ASA, AS, AA a 32 µg/mL.

Características de la muestra.

El producto a evaluar fue una premezcla que contenía ácido ascórbico y ácido acetilsalicílico, a una proporción del 10% de la formulación.

Los excipientes utilizados no se mencionan por motivos de confidencialidad. Sin embargo, solo se hará mención del ácido teraftálico, excipiente que se incluye en la formulación y que muestra una señal.

Selección de la columna.

Se evaluaron 3 columnas diferentes, cuyas características se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 7 Características de columna.

ID	Marca	Características
A	Symmetry [®] C18 5 μ	Dimensiones (3.9 x 150 mm) Tamaño de partícula (5 μ)
B	Symmetry Shield [™] RP18 5 μ	Dimensiones (4.6 x 150 mm) Tamaño de partícula (5 μ)
C	Phenomenex Aqua 5u C18 125A	Dimensiones (4.6 x 150 mm) Tamaño de partícula (5 μ)

Se utilizó como fase móvil una mezcla de acetonitrilo/agua (25:75 v/v con ajuste de pH a 2.5 con ácido fosfórico) un flujo isocrático a velocidad de 1mL/min y un volumen de inyección de 10 μ L.

La solución a inyectar contenía ácido ascórbico, ácido acetilsalicílico y ácido salicílico, cada uno a concentración de 50 μ g/mL. La respuesta se determinó a longitud de onda de 228 nm. Se encontró que el orden de elución a las condiciones antes mencionadas es: ácido ascórbico (AA), ácido acetilsalicílico (ASA) y finalmente ácido salicílico (AS). Para elegir la columna adecuada se analizó la forma de los picos y la definición de los mismos.

La columna Phenomenex Aqua 5u C18 125A presenta una mejor resolución de los picos, mientras que en las otras columnas el pico de ASA se muestra partido y el de AS presenta una forma de meseta. (Figura 22).

Selección de la fase móvil.

Se evaluaron dos tipos de fase móvil, su composición se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 8 Composición de Fase móvil.

ID	Tipo de fase móvil.	Referencia
D	FM1: Agua/Acetonitrilo (25:75) pH = 2.5 con ácido fosfórico.	21
E	FM2: Agua/Metanol (65:35) pH = 3.5 con ácido fosfórico.	22

Para el análisis se mantuvo constante la velocidad de flujo (1mL/min), el volumen de inyección (10 μ L) así como la concentración de AA, ASA y AS (50 μ g/mL).

Al comparar los cromatogramas, la fase móvil 1 muestra una mejor resolución de los picos, sin embargo, el tiempo de análisis es extenso, mientras que al utilizar la fase móvil 2 los picos no se encuentran tan separados. (Figura 22)

Para disminuir los tiempos de análisis se evaluaron dos proporciones de fase móvil, su composición se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 9 Proporción de Fase móvil.

ID	Proporción de la fase móvil
F	Mezcla de Agua/Acetonitrilo (65:35 v/v) pH = 2.5 con ácido fosfórico.
G	Mezcla de Agua/Acetonitrilo (60:40 v/v) pH = 2.5 con ácido fosfórico.

Adicionalmente se evaluó la posible interacción del ácido teraftálico (AT) excipiente presente en la premezcla. Por lo que la solución a inyectar contenía AA, ASA, AT y AS.

Se puede observar que aun al incluir AT en el ensayo los picos se muestran separados, por lo que no interfiere ni con AA ni ASA.

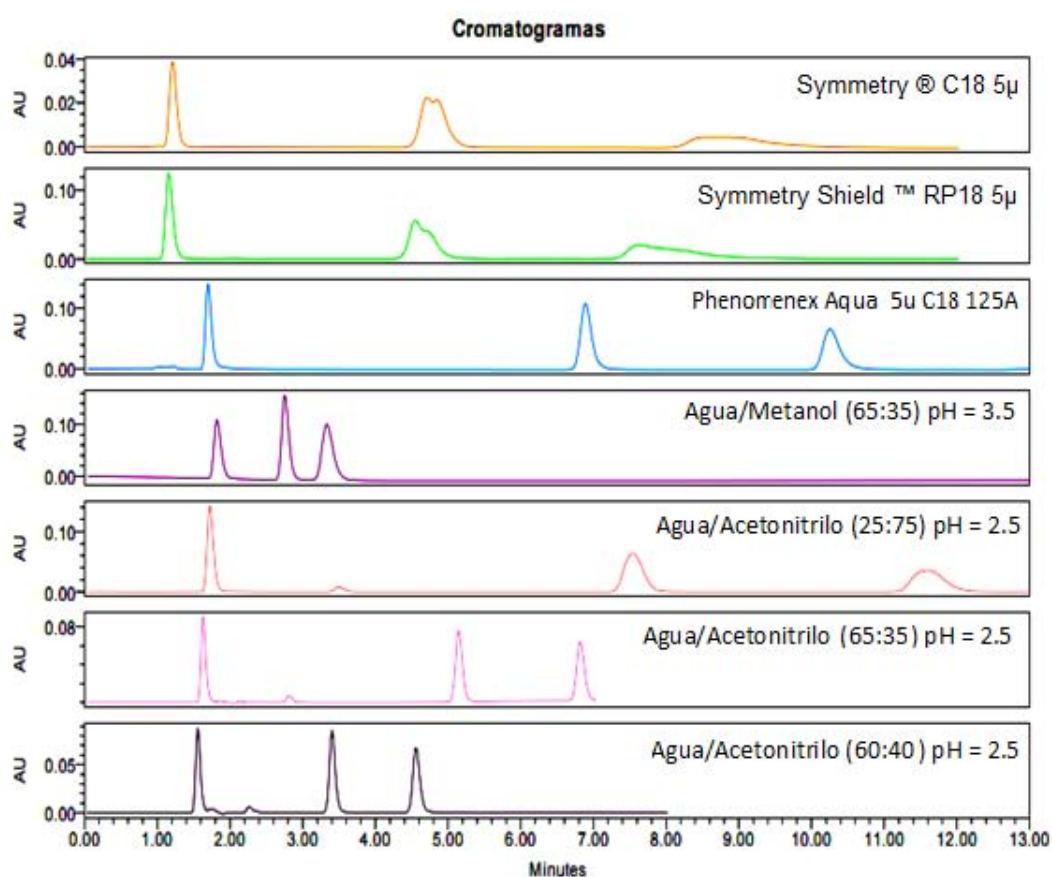


Figura 22 Condiciones para el método analítico.

Por lo tanto, al final de estas pruebas se eligió la columna Phenomenex Aqua 5u C18 125A y como fase móvil una mezcla de agua/acetonitrilo (60:40 v/v) Ajuste de pH a 2.5 con ácido fosfórico.

Las condiciones cromatográficas para la validación del método analítico indicativo de estabilidad se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 10 Condiciones cromatográficas para la validación del método.

Condiciones cromatográficas	
Columna	Phenomenex Aqua 5u C18 125 ^a Dimensiones (4.6 x 150 mm) Tamaño de partícula (5 μ)
Temperatura de la columna	Temperatura ambiente.
Velocidad de flujo	1.00 mL / min.
Detector	U.V. a 228 nm.(AA y ASA) y 300 nm (AS)
Vol. de inyección	10 μ L.
Tiempo de retención	AA 1.57 min, ASA 3.40 min y AS 4.51 min.

La cantidad de cada analito de interés se obtuvo con la siguiente formula:

$$\frac{A_m}{A_r} \times \frac{P_r}{P_m} \times FD \times P \times 100 = \% \text{ Analito}$$

Dónde:

A_m = Área del pico obtenida en la solución muestra.

A_r = Área promedio del pico obtenida en las soluciones de referencia

P_r = Peso de sustancia de referencia en mg.

P_m = Peso de la muestra en mg.

FD = Factor de dilución.

P = Pureza de la sustancia de referencia/100.

100 = Factor de conversión a porcentaje.

D. Validación del método analítico.

Los parámetros de desempeño que se ejecutaron para la validación, fueron los que se enlistan a continuación. [4,23]

Tabla 11 Parámetros y criterios de aceptación para la validación del método analítico indicativo de estabilidad.

Parámetro	Muestra	Repeticiones	Cálculos	Criterios
Adecuabilidad	Estándar equivalente al 100%	Estándar por quintuplicado	%CV del TR y de las áreas	% CV del TR y de las áreas < 2.0
Rango	Estándares 7 niveles de concentración	Nivel por duplicado	Grafica de la respuesta analítica (y) vs. la concentración (x)	$r > 0.998$ $r^2 > 0.995$ IC (β_0) Incluye a 0
Linealidad del sistema	Estándares 5 niveles de concentración	Nivel por triplicado	Grafica de la respuesta analítica (y) vs. la concentración (x)	$r > 0.998$ $r^2 > 0.995$ IC (β_0) Incluye a 0
Exactitud y precisión	Placebo adicionado 3 niveles de concentración	Nivel por sextuplicado	% Recobro % CV del recobro	% Recobro de 98.0-102.0 o IC (β_1) Incluye a 1 % CV < 2.0
Linealidad del método	Placebo adicionado 5 niveles de concentración	Nivel por triplicado	Grafica de la concentración adicionada (y) vs. la concentración estimada (x) % Recobro % CV	$r > 0.998$ $r^2 > 0.995$ % Recobro de 98.0-102.0 IC (β_0) Incluye a 0 IC (β_1) Incluye a 1 % CV < 2.0
Reproducibilidad	Placebo adicionado equivalente al 100% (2 días, 2 analistas)	Muestra por Sextuplicado	% Recobro % CV del recobro	% Recobro global del 98.0-102.0 % CV global < 2.0
Especificidad	Blanco, estándares, placebo adicionado y muestras a condiciones estresantes	Muestra por Triplicado	Cromatogramas Pureza de pico	La respuesta solo se debe al analito
Robustez	Placebo adicionado equivalente al 100%	Muestra por Triplicado condiciones control y modificadas	% Recobro Diferencia absoluta	% Recobro del 98.0-102.0 $ d_i < 2.0$

ADECUABILIDAD.

Para esta evaluación se inyectó por quintuplicado 10 µL de la solución de referencia R1 y se obtuvieron los cromatogramas correspondientes. Las especificaciones a considerar fueron: factor de coeio menor a 2.0 % y coeficiente de variación menor a 2.0 %.

Una vez que se cumplió la adecuabilidad del sistema, se inyectó por duplicado 10 µL de las soluciones de referencia R1 y R2 (**ANEXO 1**). El coeficiente de variación entre las áreas de las dos soluciones de referencia no debe ser mayor a 2.0 %.

RANGO.

Preparación de muestras para la curva de análisis: El intervalo para evaluar el rango se realizó de 40 – 160 % preparando una curva a partir de una solución patrón de estándares (**ANEXO 1**) considerando alícuotas y volúmenes finales de acuerdo a lo indicado a continuación:

Tabla 12 Preparación de las muestras de Rango.

[ASA y AA] del stock	Alícuota (mL)	Dilución a (mL)	[ASA y AA] (µg/mL)	[ASA y AA] (%)	Identificación de la solución
125 µg/mL	8	25	40	160	R 160 C1/C2
	7	25	35	140	R 140 C1/C2
	6	25	30	120	R 120 C1/C2
	5	25	25	100	R100 C1/C2
	4	25	20	80	R 80 C1/C2
	3	25	15	60	R 60 C1/C2
	2	25	10	40	R 40 C1/C2

LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Preparación de muestras para la curva de análisis: Para evaluar la linealidad se elaboró una curva de calibración por triplicado con 5 niveles de concentración (15, 20, 25, 30 y 35) µg/mL de ácido acetilsalicílico y ácido ascórbico. La curva se preparó a partir de una solución patrón de estándares (**ANEXO 1**), se consideraron las alícuotas y volúmenes finales indicados a continuación:

Tabla 13 Preparación de las muestras de linealidad del sistema.

Solución patrón [ASA y AA]	Alícuota (µL)	Dilución a (mL)	[ASA y AA] (µg/mL)	[ASA y AA] (%)	Identificación de la solución
125 µg/mL	7	25	35	140	LS 140 C1/C2/C3
	6	25	30	120	LS 120 C1/C2/C3
	5	25	25	100	LS 100 C1/C2/C3
	4	25	20	80	LS 80 C1/C2/C3
	3	25	15	60	LS 60 C1/C2/C3

EXACTITUD Y PRECISIÓN.

Preparación de muestras para el análisis. Para la evaluación de la precisión y exactitud se consideraron de 3 niveles de concentración (20, 25 y 30) $\mu\text{g/mL}$ de ácido acetilsalicílico y ácido ascórbico por sextuplicado. Las muestras se prepararon a partir de una solución patrón de placebo adicionado (**ANEXO 1**), se consideraron las alícuotas y volúmenes finales indicados a continuación:

Tabla 14 Preparación de las muestras para evaluar precisión y exactitud.

Solución patrón [ASA y AA]	Alícuota (μL)	Dilución a (mL)	[ASA y AA] ($\mu\text{g/mL}$)	[ASA y AA] (%)	Identificación de la solución
125 $\mu\text{g/mL}$	6	25	30	120	EP 120 C1/C2/C3
	5	25	25	100	EP 100 C1/C2/C3
	4	25	20	80	EP 80 C1/C2/C3

LINEALIDAD DEL MÉTODO (Efecto de la matriz por placebos adicionados).

Preparación de muestras para la curva de análisis: Se evaluó mediante la elaboración de una curva de calibración por triplicado con 5 niveles de concentración (15, 20, 25, 30 y 35) $\mu\text{g/mL}$ de ácido acetilsalicílico y ácido ascórbico. La curva se preparó a partir de una solución patrón de placebo adicionado (**ANEXO 1**), se consideraron las alícuotas y volúmenes finales indicados a continuación:

Tabla 15 Preparación de las muestras de linealidad del método.

Solución patrón [ASA y AA]	Alícuota (μL)	Dilución a (mL)	[ASA y AA] ($\mu\text{g/mL}$)	[ASA y AA] (%)	Identificación de la solución
125 $\mu\text{g/mL}$	7	25	35	140	LM 140 C1/C2/C3
	6	25	30	120	LM 120 C1/C2/C3
	5	25	25	100	LM 100 C1/C2/C3
	4	25	20	80	LM 80 C1/C2/C3
	3	25	15	60	LM 60 C1/C2/C3

PRECISIÓN INTERMEDIA (Reproducibilidad).

De forma independiente, cada analista preparó seis soluciones muestra en dos días diferentes, como se indica a continuación:

Tabla 16 identificación de muestras para la evaluación de reproducibilidad.

Día	Muestra	
	Analista 1	Analista 2
1	D1 A1 M1	D1 A2 M1
	D1 A1 M2	D1 A2 M2
	D1 A1 M3	D1 A2 M3
	D1 A1 M4	D1 A2 M4
	D1 A1 M5	D1 A2 M5
	D1 A1 M6	D1 A2 M6
2	D2 A1 M1	D2 A2 M1
	D2 A1 M2	D2 A2 M2
	D2 A1 M3	D2 A2 M3
	D2 A1 M4	D2 A2 M4
	D2 A1 M5	D2 A2 M5
	D2 A1 M6	D2 A2 M6

ESPECIFICIDAD

La especificidad se determinó mediante la evaluación de soluciones, como son un blanco, soluciones en las que se encontraba ausente el analito de interés (placebo), muestras en las que se encontraba el analito de forma deliberada y muestras a partir de un placebo cargado, con el fin de demostrar que la respuesta cuantificable no era afectada por la presencia de los excipientes.

Tabla 17 Condiciones a evaluar para la especificidad del método.

Solución	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Identificación
Blanco	NA	Blanco
Placebo	NA	PLA
Estándar	25	R1 / R2
Materia Prima	25	MP
Placebo adicionado	25	PLA_ADI
Degradación Forzada		
Prueba	Condiciones	ID
Hidrolisis acida	HCl	HA
Hidrolisis básica	NaOH	HB
Oxidación	H ₂ O ₂	OXI
Fotolisis	Exposición a luz UV	UV
Temperatura y humedad	60 °C y 75 % HR	TH

Robustez.

Para evaluar la robustez se tomaron en consideración 2 factores: la proporción de solventes en la fase móvil y el tipo de columna cromatográfica y se realizó un análisis univariable demostrando la influencia de las modificaciones.

Tabla 18 Modificaciones para evaluar la robustez del método.

Factor	Control	Modificación
Proporción de la Fase Móvil	60:40	65:35
Columna	Phenomenex Aqua C18	Phenomenex Luna C8

Evaluación del producto de degradación.

Para evaluar al ácido salicílico (AS) se preparó una curva de calibración con un intervalo del 2.5 al 40% (0.625 µg/mL a 10 µg/mL) con cinco niveles de concentración, de los cuales tres de ellos se prepararon por sextuplicado y los otros dos por triplicado.

Preparación de muestras para la curva de análisis: La curva se preparó a partir de una solución patrón de ácido salicílico (**ANEXO 1**), se consideraron las alícuotas y volúmenes finales indicados a continuación:

Tabla 19 Preparación de las muestras para la evaluación de AS.

Solución patrón [ASA y AA]	Alícuota (µL)	Dilución a (mL)	[ASA y AA] (µg/mL)	[ASA y AA] (%)	Identificación de la solución
125 µg/mL	0.5	25	0.625	2.5	N1 C1-C6
	1	25	0.125	5	N2 C1-C3
	2	25	0.250	10	N3 C1-C6
	4	25	5	20	N4 C1-C3
	8	25	10	40	N5 C1-C6

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La NOM-073-SSA1-2005 define a un método analítico indicativo de estabilidad como aquel método analítico cuantitativo basado en las características químicas estructurales o en las propiedades biológicas de cada fármaco de un medicamento, capaz de distinguir cada ingrediente activo de otras sustancias y de sus productos de degradación, de manera que el fármaco pueda ser cuantificado con exactitud y precisión.

Evaluación de los fármacos AA y ASA.

Adecuabilidad.

Esta evaluación permite verificar que el sistema cromatográfico es apto para realizar el análisis mediante la determinación de la reproducibilidad del equipo. Se reporta el resultado promedio de todas las evaluaciones que se realizaron antes de cada prueba.

Tabla 20 Resultados de la verificación del sistema para la cuantificación de AA y ASA.

Parámetro	Resultado	
	AA	ASA
Factor de coleo	1.3	1.2
Numero de platos teóricos	1907	6145
% CV. Tiempo de retención	0.6	0.7
% C.V. Áreas	1.4	1.1

Cada una de las pruebas realizadas para la evaluación de la adecuabilidad, antes de la evaluación de cada parámetro, cumplió con los criterios de aceptación, es decir, factor de coleo menor a 2.0 % y el coeficiente de variación del tiempo de retención y de las áreas obtenidas fue menor al 2.0 %.

Rango.

El parámetro de rango se evaluó con el fin de definir el intervalo en que el método analítico es lineal, a partir de su estudio se confirma el intervalo de concentraciones aplicables al parámetro de desempeño de linealidad.

Se evaluó mediante una curva de calibración con 7 niveles de concentración por duplicado que comprende concentraciones de 10 a 40 µg/mL.

Tabla 21 Concentración de AA y ASA y áreas correspondientes para la evaluación del rango.

Nivel %	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)		Área	
	AA	ASA	AA	ASA
40	10.048	10.032	179284	240305
40	10.048	10.032	180763	244326
60	15.072	15.048	269570	362076
60	15.072	15.048	274032	369064
80	20.096	20.064	362055	487369
80	20.096	20.064	363356	490816
100	25.12	25.08	455215	610963
100	25.12	25.08	450346	610197
120	30.144	30.096	545296	740841
120	30.144	30.096	544127	740869
140	35.168	35.112	636598	856117
140	35.168	35.112	631645	858937
160	40.192	40.128	727263	984090
160	40.192	40.128	725201	977906
Parámetro	Criterio de aceptación		Resultado AA	Resultado ASA
r	Mayor a 0.998		0.9999	0.9999
r^2	Mayor a 0.995		0.9999	0.9998
CV	Menor a 2.0 %		0.5	0.8
IC	Incluye a 0		-4277.27 a 1644.38	-9109.72 a 1190.58

En la tabla 21 se aprecia que el coeficiente de determinación para AA y ASA fue de 0.9999 y 0.9998 respectivamente, el coeficiente de variación para ambos casos fue menor a 2.0% , además, se observa que el intervalo de confianza de la ordenada al origen considera al cero para ambos fármacos.

Las figuras 23 y 24 muestran el comportamiento de la respuesta analítica de AA y ASA junto con sus respectivas ecuaciones, las cuales presentan una tendencia lineal.

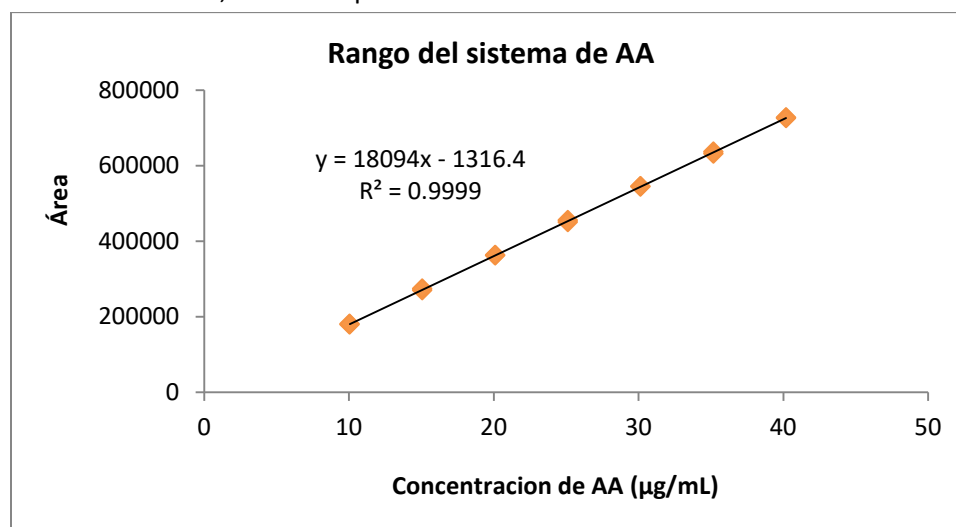


Figura 23 Curva de calibración de AA para la evaluación del rango.

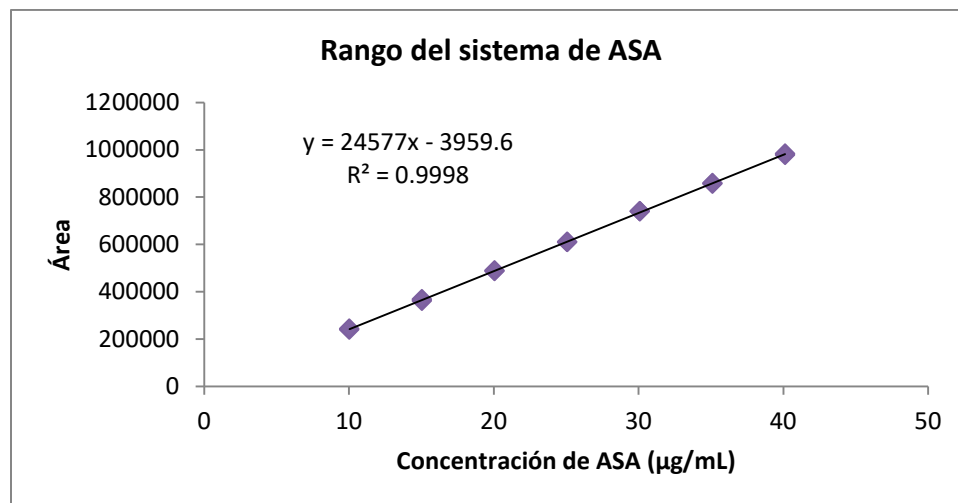


Figura 24 Curva de calibración de ASA para la evaluación del rango.

La tabla 22 presenta el análisis de varianza con un factor para determinar la relación lineal entre la concentración real de los fármacos y su respuesta analítica con un nivel de significancia del 5.0 %.

Para este parámetro se establecieron las siguientes hipótesis:

- H_0 : No existe una relación lineal entre la concentración y el resultado analítico.
- H_a : Existe una relación lineal entre la concentración y el resultado analítico.

Criterio de aceptación:

- Si $F_{cal} < F_{critica}$ no se rechaza H_0
- Si $F_{cal} > F_{critica}$ se rechaza H_0

Tabla 22 Análisis de varianza para determinar la linealidad del rango.

		Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor critico de F
AA	Regresión	1	4.62744E+11	4.62744E+11	129767.16	1.4099E-25
	Residuos	12	42791448.05	3565954.004		
	Total	13	4.62787E+11			
ASA	Regresión	1	8.51028E+11	8.51028E+11	78877.61	2.79453E-24
	Residuos	12	129470721.7	10789226.81		
	Total	13	8.51158E+11			

De acuerdo a los resultados obtenidos, el valor de $F_{cal} > F_{critica}$, es decir, se rechaza H_0 para ambos casos. Se concluye que existe una relación lineal entre la concentración de los fármacos y su respuesta analítica dentro del intervalo de 10- 40 $\mu\text{g/mL}$.

Linealidad del sistema.

La linealidad del sistema demuestra la relación que tiene la respuesta y la concentración de los principios activos. Se evaluó a través de una curva de calibración con 5 niveles de concentración por triplicado que comprende de un 60 a un 140 %.

Tabla 23 Concentraciones de AA y ASA y áreas correspondientes para evaluar la linealidad del sistema.

%	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)		Área	
	AA	ASA	AA	ASA
60	15	15.024	264045	358324
60	15	15.024	265458	358393
60	15	15.024	263372	358706
80	20	20.032	353008	477146
80	20	20.032	354973	480265
80	20	20.032	353894	480743
100	25	25.04	442699	595376
100	25	25.04	446171	604045
100	25	25.04	442528	601636
120	30	30.048	528368	719426
120	30	30.048	529442	715463
120	30	30.048	533108	719092
140	35	35.056	623073	845894
140	35	35.056	622416	838818
140	35	35.056	623432	843405
Parámetro	Criterio de aceptación		Resultado AA	Resultado ASA
r	Mayor a 0.998		0.9999	0.9999
r^2	Mayor a 0.995		0.9998	0.9997
% CV	Menor a 2.0 %		0.5	0.5
IC	Incluye a 0		-7605.91 a 25.84	-9715.65 a 2208.25

La tabla 23 muestra que el coeficiente de correlación (r) para AA y ASA fue de 0.9999 y 0.9999 respectivamente, el coeficiente de determinación (r^2) para AA y ASA fue de 0.9998 y 0.9997 respectivamente, el coeficiente de variación es menor a 2.0 %, además, el intervalo de confianza de la ordenada al origen para ambos fármacos considera al cero.

Las figuras 25 y 26 muestran el comportamiento de la respuesta analítica de AA y ASA junto con sus respectivas ecuaciones, las cuales, siguen un modelo matemático lineal.

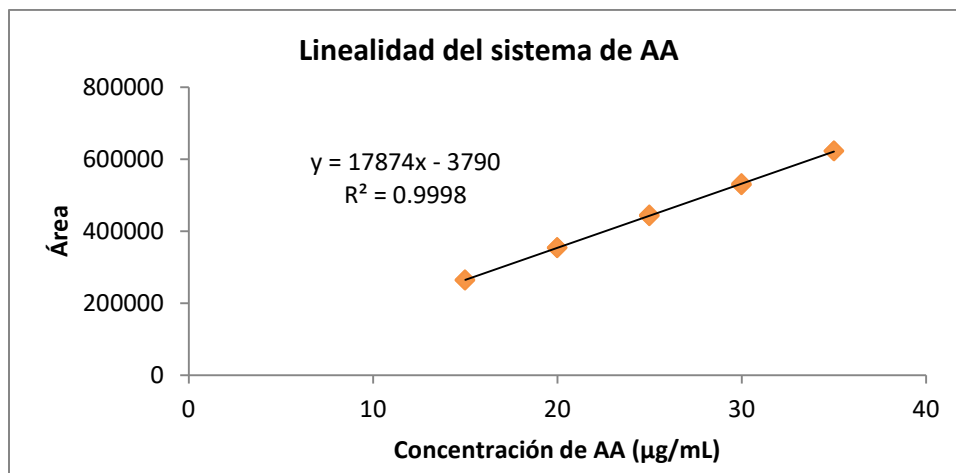


Figura 25 Curva de calibración de AA para la prueba de linealidad del sistema.

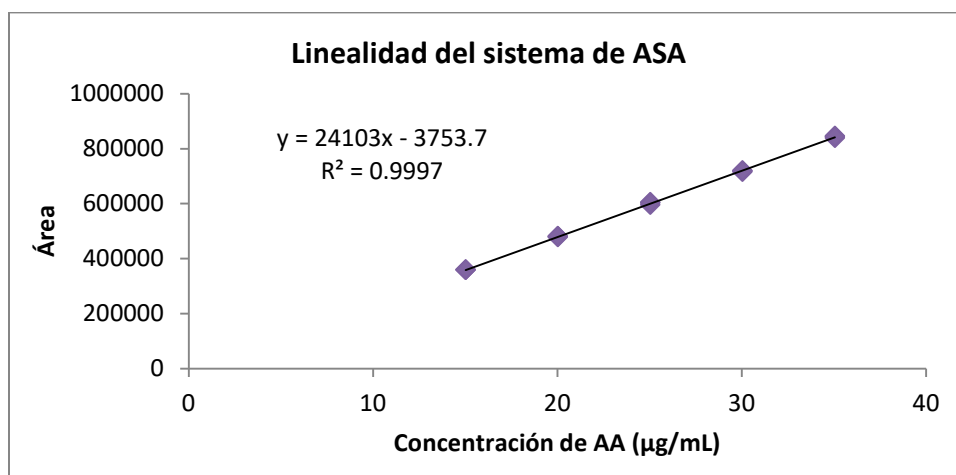


Figura 26 Curva de calibración de ASA para la prueba de linealidad del sistema.

La tabla 24 presenta el análisis de varianza con un factor para determinar la relación lineal entre la concentración real de los fármacos y su respuesta analítica con un nivel de significancia del 5.0 %.

Para este parámetro se establecieron las siguientes hipótesis:

- H_0 : No existe una relación lineal entre la concentración y el resultado analítico.
- H_a : Existe una relación lineal entre la concentración y el resultado analítico.

Criterio de aceptación:

- Si $F_{cal} < F_{critica}$ no se rechaza H_0
- Si $F_{cal} > F_{critica}$ se rechaza H_0

Tabla 24 Análisis de varianza para determinar la linealidad del sistema.

		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
AA	Regresión	1	4.37107E+11	4.37107E+11	51654.53	8.73754E-25
	Residuos	13	110007512.9	8462116.377		
	Total	14	4.37217E+11			
ASA	Regresión	1	4.37107E+11	4.37107E+11	51654.53	8.73754E-25
	Residuos	13	110007512.9	8462116.377		
	Total	14	4.37217E+11			

El valor de $F_{cal} > F_{critica}$, se concluye que existe una relación lineal entre la concentración de los fármacos y su respuesta analítica dentro del intervalo de 15-35 $\mu\text{g/mL}$.

Precisión y exactitud del método.

La precisión del método determina el grado de concordancia entre los resultados obtenidos y está determinada por el coeficiente de variación. La exactitud de un método analítico es la proximidad de los resultados obtenidos por el método en estudio, en relación al valor verdadero o valor de la referencia, dicho parámetro se calcula a partir de los porcentajes de recobro obtenidos mediante el análisis de placebos adicionados.

Tabla 25 Concentración de AA adicionada y estimada para evaluar la exactitud y precisión del método.

% AA	Concentración de AA ($\mu\text{g/mL}$)		% Recobro	% CV
	Adicionada	Estimada		
80	19.90	19.99	100.45	0.9
	19.90	19.52	98.05	
	19.90	19.88	99.88	
	19.90	19.59	98.43	
	19.90	19.71	99.01	
	19.90	19.61	98.54	
100	24.88	25.10	100.90	0.6
	24.88	25.13	100.99	
	24.88	25.08	100.79	
	24.88	24.95	100.26	
	24.88	24.84	99.84	
	24.88	24.74	99.42	
120	29.86	29.65	99.32	0.7
	29.86	29.94	100.29	
	29.86	29.81	99.85	
	29.86	29.68	99.42	
	29.86	29.89	100.13	
	29.86	29.35	98.32	
Resumen del análisis estadístico del porcentaje de recobro				
Parámetro		Criterio de aceptación	Resultado obtenido	
Promedio global		98.0 - 102.0 %	99.7	
CV global		Menor al 2.0 %	0.9	

La tabla 25 muestra que el coeficiente de variación global del porcentaje de recobro de AA fue de 0.9, dicho valor es menor a 2.0 %. Mientras que promedio global del porcentaje de recobro fue de 99.7 %, dicho valor, se encuentra en el intervalo de 98.0 a 102.0 % por lo que se concluye que el método es preciso y exacto para la cuantificación de AA.

El valor de referencia aceptado se estima a partir de la curva de calibración compuesta por tres niveles de concentración al 80, 100 y 120 % por sextuplicado. La figura 27 presenta el comportamiento de la relación de la concentración adicionada vs la concentración estimada.

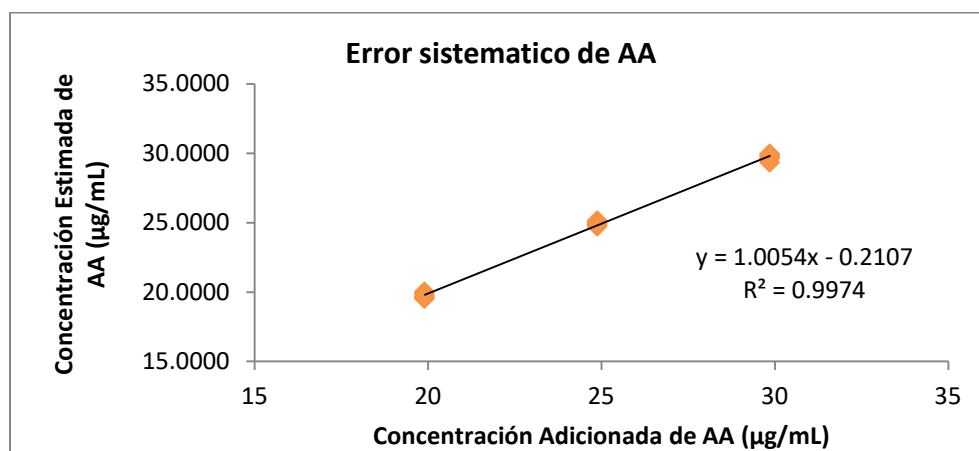


Figura 27 Curva de calibración de placebos adicionados en tres niveles de concentración de AA para determinar el error sistemático del método.

La tabla 26 presenta el análisis de varianza con un factor para determinar la relación lineal entre la concentración adicionada y estimada de AA con un nivel de significancia del 5.0 %, se tiene que el intervalo de confianza para la pendiente incluye a la unidad y que el intervalo de confianza para la ordenada al origen incluye a cero.

Tabla 26 Análisis de variancia para determinar la relación lineal entre la concentración adicionada y estimada de AA.

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	-0.2107	0.3220	-0.6542	0.5223	-0.8938	0.4720
AA [µg/mL]	1.0054	0.0128	78.7026	3.82E-22	0.9783	1.0325

Tabla 27 Evaluación de exactitud y precisión (repetibilidad) del método para ASA.

% ASA	Concentración de ASA ($\mu\text{g/mL}$)		% Recobro	% CV
	Adicionada	Estimada		
80	19.97	19.93	99.79	0.3
	19.97	19.96	99.97	
	19.97	19.96	99.98	
	19.97	19.96	99.96	
	19.97	19.90	99.65	
	19.97	19.83	99.32	
100	24.96	24.89	99.71	0.2
	24.96	24.95	99.97	
	24.96	24.96	100.02	
	24.96	24.88	99.68	
	24.96	24.93	99.87	
	24.96	24.85	99.54	
120	29.95	29.96	100.02	0.4
	29.95	29.86	99.68	
	29.95	29.84	99.64	
	29.95	29.73	99.25	
	29.95	30.07	100.38	
	29.95	29.81	99.53	
Parámetro		Criterio de aceptación	Resultado obtenido	
% Recobro global		98.0 -102.0	99.8	
% CV global		Menor a 2.0	0.2	

La tabla 27 muestra que el coeficiente de variación global del porcentaje de recobro de ASA fue de 0.2 %, dicho valor es menor al 2.0 %. De igual manera se muestra que el promedio global del porcentaje de recobro fue de 99.8 %, se encuentra dentro del intervalo de 98.0 a 102.0 %, por lo que se concluye que el método es preciso y exacto para la determinación de ASA.

El valor de referencia aceptado se estima a partir de la curva de calibración compuesta por tres niveles de concentración 80, 100 y 120 % por sextuplicado. La figura 28 presenta el comportamiento de la relación de la concentración adicionada vs la concentración estimada.

La tabla 28 presenta el análisis de varianza con un factor para determinar la relación lineal entre la concentración adicionada y estimada de ASA con un nivel de significancia del 5.0 %, y se tiene que el intervalo de confianza para la pendiente incluye a la unidad, el intervalo de confianza para la ordenada al origen incluye a cero.

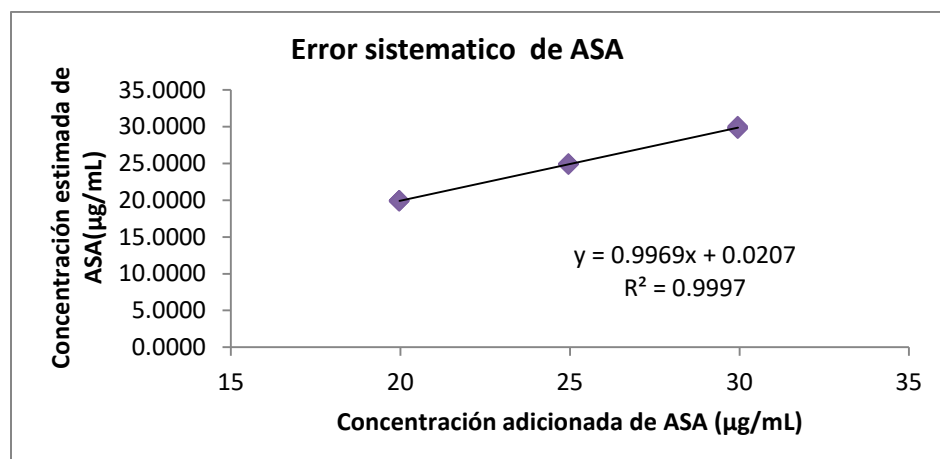


Figura 28 Curva de calibración de placebos adionados en tres niveles de concentración de ASA para determinar el error sistemático del método.

Tabla 28 Análisis de variancia para determinar la relación lineal entre la concentración adicionada y estimada de ASA.

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	0.0207	0.1126	0.1841	0.8563	-0.2180	0.2595
ASA [µg/mL]	0.9969	0.0045	223.8693	2.11E-29	0.9875	1.0063

Linealidad del método.

Esta prueba determina la capacidad del método para dar una respuesta, independientemente de la cantidad en la que se encuentre el analito con respecto a los componentes de la matriz.

La tabla 29 muestra que el coeficiente de correlación (r) para AA fue de 0.9991, el coeficiente de determinación (r^2) fue de 0.9982, el intervalo de confianza de la ordenada al origen considera al cero, el intervalo de confianza para la pendiente incluye a la unidad, el promedio del porcentaje de recobro fue de 100.3 % y el coeficiente de variación para el porcentaje de recobro fue de 1.1 %.

La figura 29 muestra el comportamiento de la respuesta analítica de AA junto con su respectiva ecuación, la cual sigue un modelo matemático lineal. Adicionalmente la figura 30 muestra el comportamiento de los residuales de la cantidad adicionada de AA en la que se demuestra la homocedasticidad, es decir, la varianza de los residuos es constante y no varía en los diferentes niveles del factor.

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que el método analítico es lineal para la cuantificación de AA en el intervalo de 15 a 35 µg/mL aun considerando los componentes de la matriz.

Tabla 29 Evaluación de la linealidad del método correspondiente a AA.

% AA	Concentración de AA ($\mu\text{g/mL}$)		% Recobro de AA
	Adicionada	Estimada	
60	15	15.24	101.58
	15	15.14	100.92
	15	15.03	100.21
80	20	19.83	99.13
	20	20.12	100.59
	20	20.34	101.69
100	25	25.15	100.61
	25	25.00	100.00
	25	25.15	100.60
120	30	30.38	101.26
	30	30.30	101.01
	30	29.31	97.70
140	35	34.41	98.31
	35	34.97	99.91
	35	35.33	100.95
Parámetro		Criterio de aceptación	Resultado obtenido
r		Mayor a 0.998	0.9991
r^2		Mayor a 0.995	0.9982
% Recobro		98.0 -102.0	100.3
% CV y/x		Menor a 2.0	1.1
IC (β_0)		Incluye a 0	-0.33 a 0.98
IC (β_1)		Incluye a 1	0.96 a 1.01

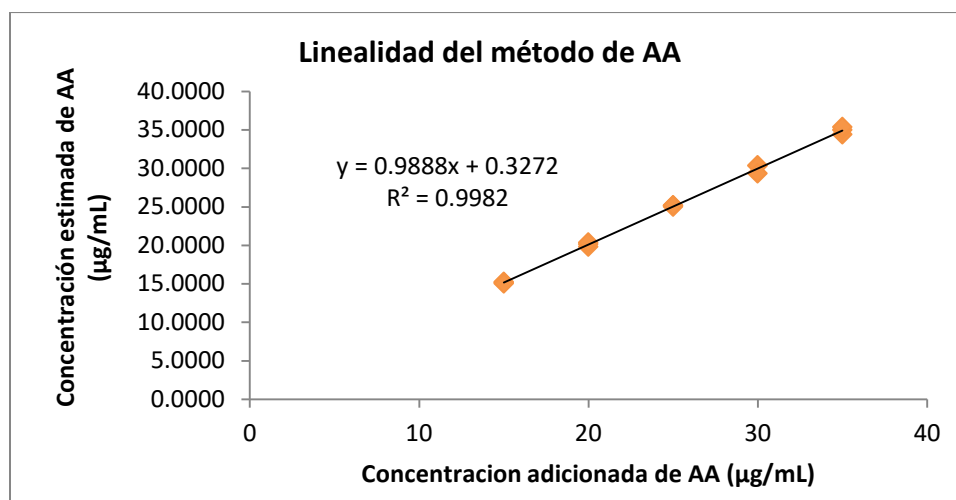


Figura 29 Concentración adicionada promedio de AA en función de la concentración estimada de linealidad del método.

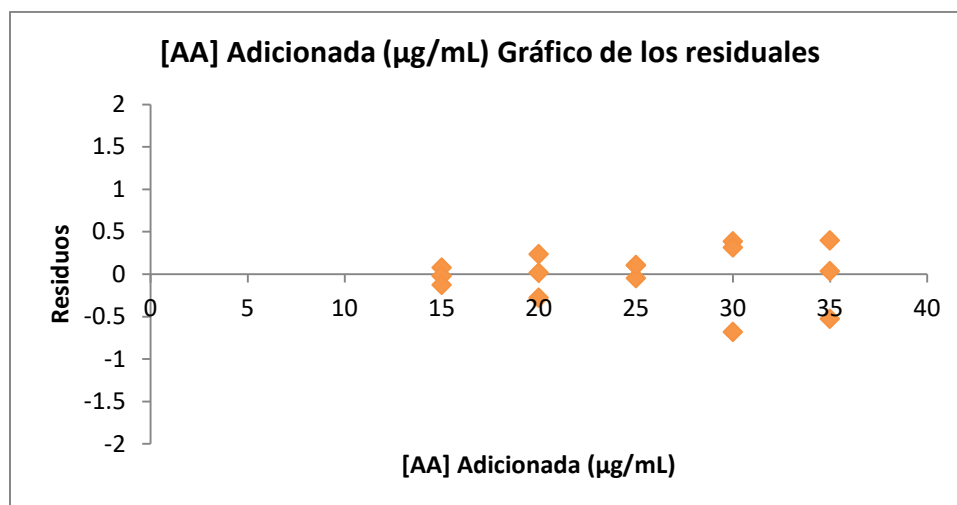


Figura 30 Gráfico de residuales de la relación de la concentración adicionada de AA en función de la concentración estimada.

Tabla 30 Evaluación de la linealidad del método correspondiente a ASA.

% ASA	Concentración de ASA (µg/mL)		% Recobro de ASA
	Adicionada	Estimada	
60	14.93	14.91	99.85
	14.93	15.00	100.48
	14.93	14.86	99.52
80	19.90	19.71	99.04
	19.90	19.66	98.79
	19.90	19.92	100.06
100	24.88	24.93	100.20
	24.88	24.98	100.42
	24.88	24.74	99.43
120	29.86	29.75	99.65
	29.86	30.12	100.89
	29.86	29.50	98.79
140	34.83	34.80	99.91
	34.83	35.14	100.88
	34.83	34.73	99.70
Parámetro		Criterio de aceptación	Resultado obtenido
r		Mayor a 0.998	0.9997
r ²		Mayor a 0.995	0.9994
% Recobro		98.0 -102.0	99.8
% CV _{y/x}		Menor a 2.0	0.7
IC (β ₀)		Incluye a 0	-0.50 a 0.24
IC (β ₁)		Incluye a 1	0.99 a 1.02

La tabla 30 muestra los resultados obtenidos para ASA, coeficiente de correlación (r) de 0.9997, coeficiente de determinación (r^2) de 0.9994, el intervalo de confianza de la ordenada al origen considera al cero, el intervalo de confianza para la pendiente incluye a la unidad, el promedio del porcentaje de recobro fue de 99.8 % y el coeficiente de variación para el porcentaje de recobro fue de 0.7 %.

La figura 31 muestra el comportamiento de la respuesta analítica de AA junto con su respectiva ecuación. Mientras que la figura 32 muestra el comportamiento de los residuales de la cantidad adicionada de AA en la que se demuestra la homocedasticidad.

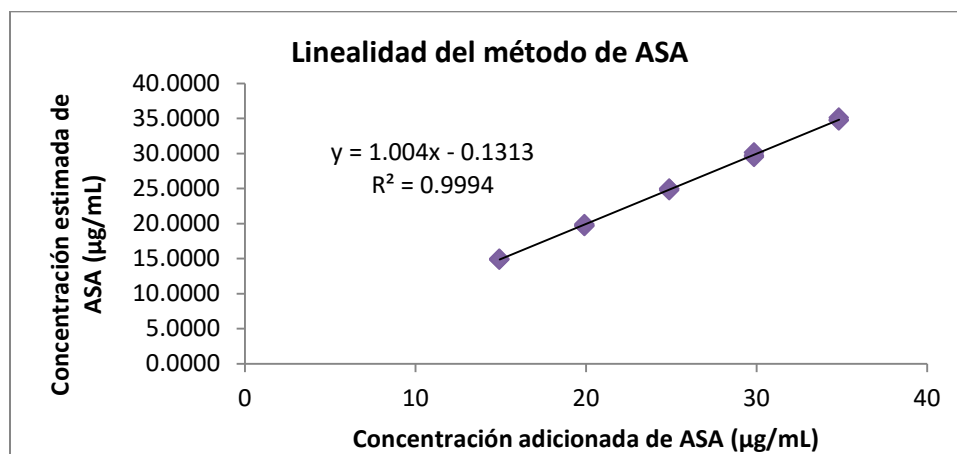


Figura 31 Concentración adicionada promedio de ASA en función de la concentración estimada de linealidad del método.

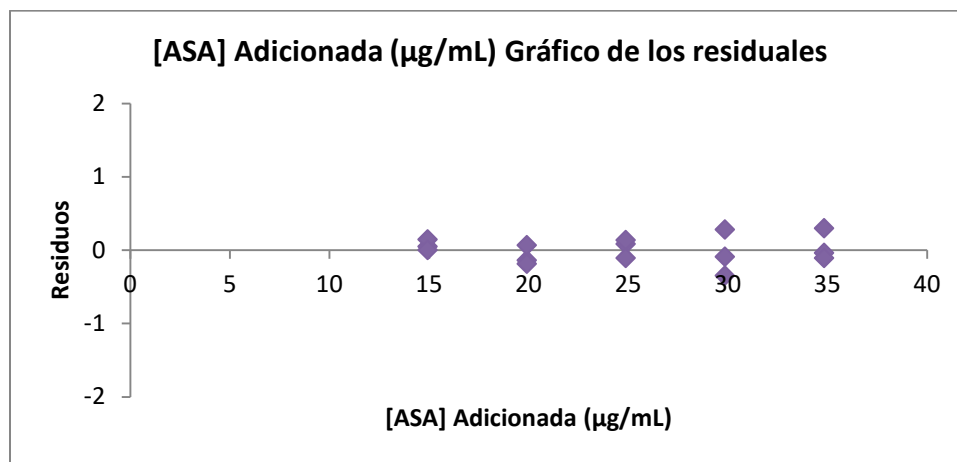


Figura 32 Gráfico de residuales de la relación de la concentración adicionada de ASA en función de la concentración estimada.

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que el método analítico es lineal para la cuantificación de ASA en el intervalo de 15 a 35 $\mu\text{g/mL}$ aun considerando los componentes de la matriz.

Precisión intermedia (Reproducibilidad).

A través de la precisión intermedia se verifica la concordancia entre resultados de un mismo laboratorio, obtenidos en diferentes días con diferentes analistas.

Tabla 31 Porcentajes de recobro de AA y ASA obtenidos en dos días y por analistas diferentes.

Condición		% Recobro	
		AA	ASA
Día 1 Analista 1		101.08	101.25
		100.87	100.91
		100.82	100.68
		100.05	100.10
		99.35	99.53
		100.69	100.61
Día 2 Analista 1		101.87	101.43
		99.53	100.01
		101.37	101.01
		101.76	100.77
		101.51	101.52
		101.20	101.06
Día 1 Analista 2		100.94	100.00
		101.76	100.55
		101.69	100.85
		102.16	100.83
		101.58	100.66
		101.00	100.94
Día 2 Analista 2		98.53	98.55
		98.71	98.41
		98.68	98.69
		98.93	98.72
		98.12	98.37
		98.50	98.94
Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado AA	Resultado ASA
% Recobro	98.0 -102.0	100.5	100.2
% CV	Menor a 2.0	1.3	1.0

La tabla 31 muestra la evaluación de los porcentajes de recobro mediante un análisis de las 24 muestras, entre dos analistas y dos días diferentes. El promedio de los porcentajes de recobro de AA y ASA, fueron 100.5 % y 100.2 % respectivamente, y los coeficientes de variación fueron de 1.3 % y 1.0 % respectivamente. Los datos obtenidos indican que el método cumple con los criterios de aceptación por lo que se concluye que es reproducible.

Las figuras 33 y 34 muestran el análisis de la influencia de los factores establecidos (Analistas y días). Se denota que no hay una diferencia significativa entre los recobros obtenidos de AA entre un analista y otro, de igual manera se exhibe que no existe una diferencia entre las mediciones de AA del día 1 y 2.

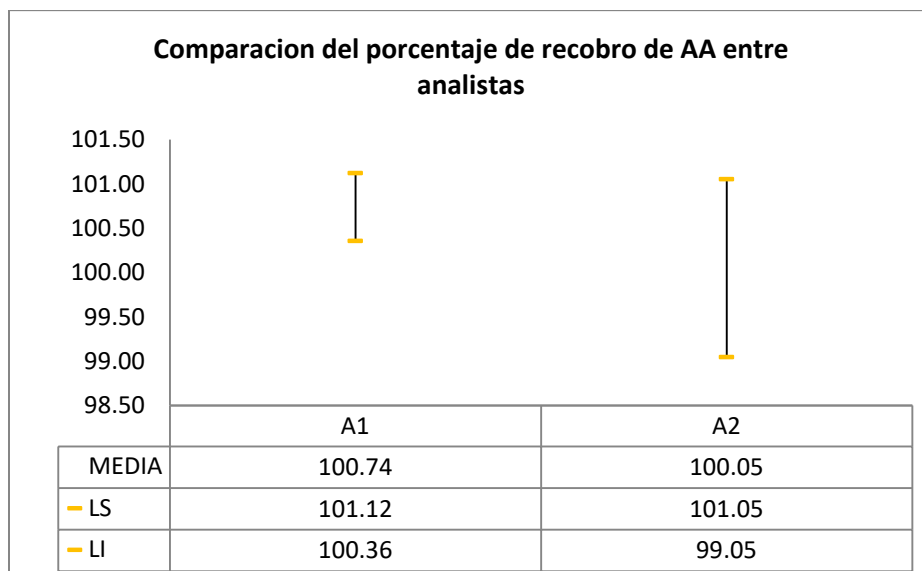


Figura 33 Comparación de la variabilidad del porcentaje de recobro de AA entre analistas con intervalo de confianza del 95%

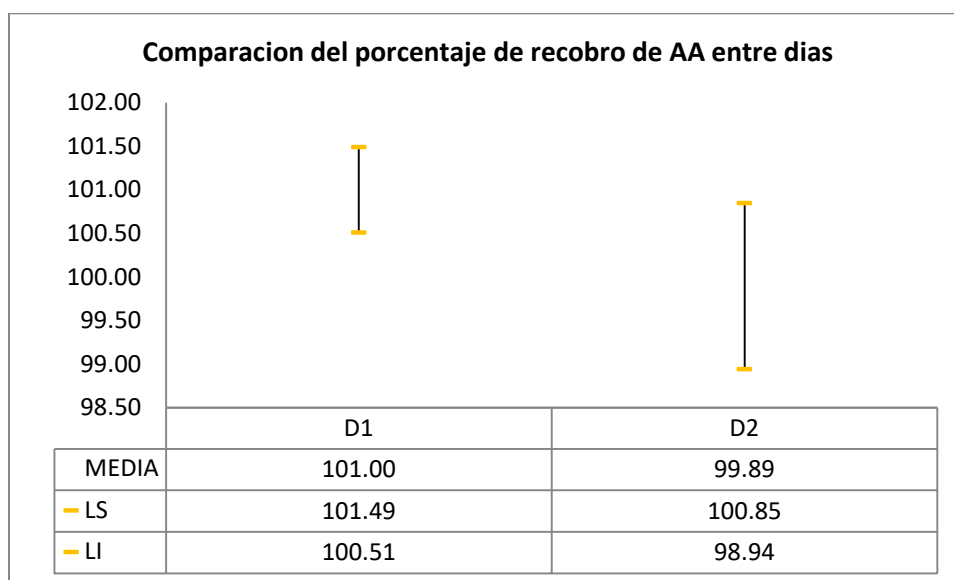


Figura 34 Comparación de la variabilidad del porcentaje de recobro de AA entre días con intervalo de confianza del 95%

Las figuras 35 y 36 muestran que existe una diferencia significativa entre los recobros obtenidos de ASA entre analistas, y que no hay una diferencia entre las mediciones de AA del día 1 y 2.

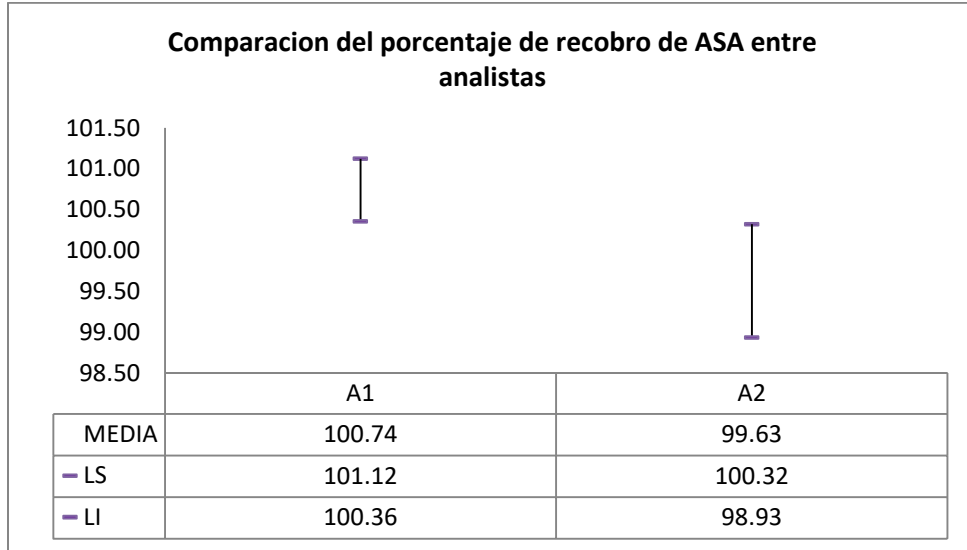


Figura 35 Comparación de la variabilidad del porcentaje de recobro de ASA entre analistas con intervalo de confianza del 95%

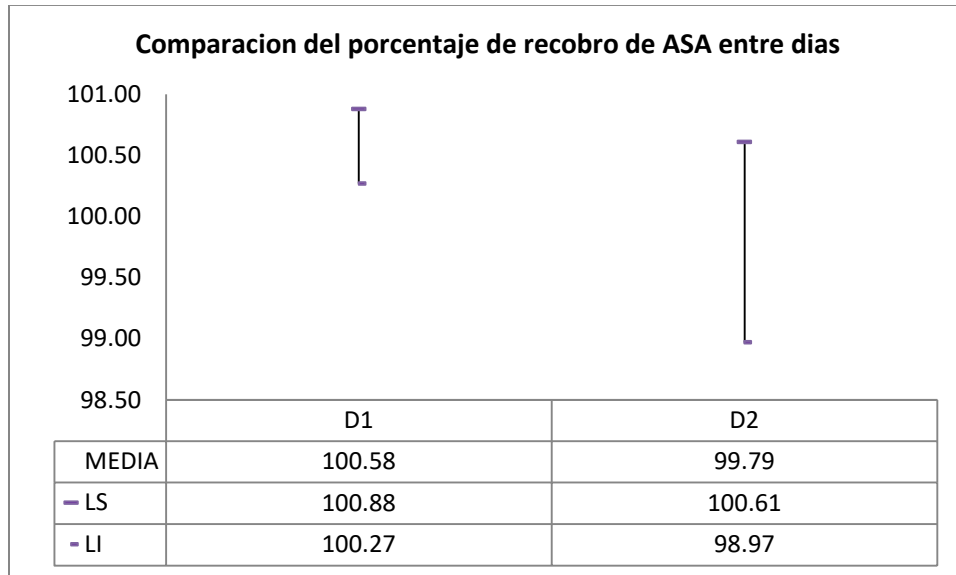


Figura 36 Comparación de la variabilidad del porcentaje de recobro de ASA entre días con intervalo de confianza del 95%

ESPECIFICIDAD

La prueba de especificidad determina que el método sea capaz de identificar solo al analito a determinar para esto realizó un conjunto de soluciones cargadas con AA Y ASA al 100%, y soluciones con los posibles componentes de la matriz sin activo para determinar que la señal es debida al analito.

Se realizó la inyección de muestras control, blanco (agua a pH=2.5 ajustada con ácido fosfórico), soluciones de referencia, materia prima, placebo analítico y placebo adicionado. En los cromatogramas obtenidos se identifica que el placebo contiene un excipiente (ácido Teraftálico) que genera una señal adicional, sin embargo, se encuentra separado de los analitos de interés por lo que no interfiere con la cuantificación de los mismos. (Figura 37)

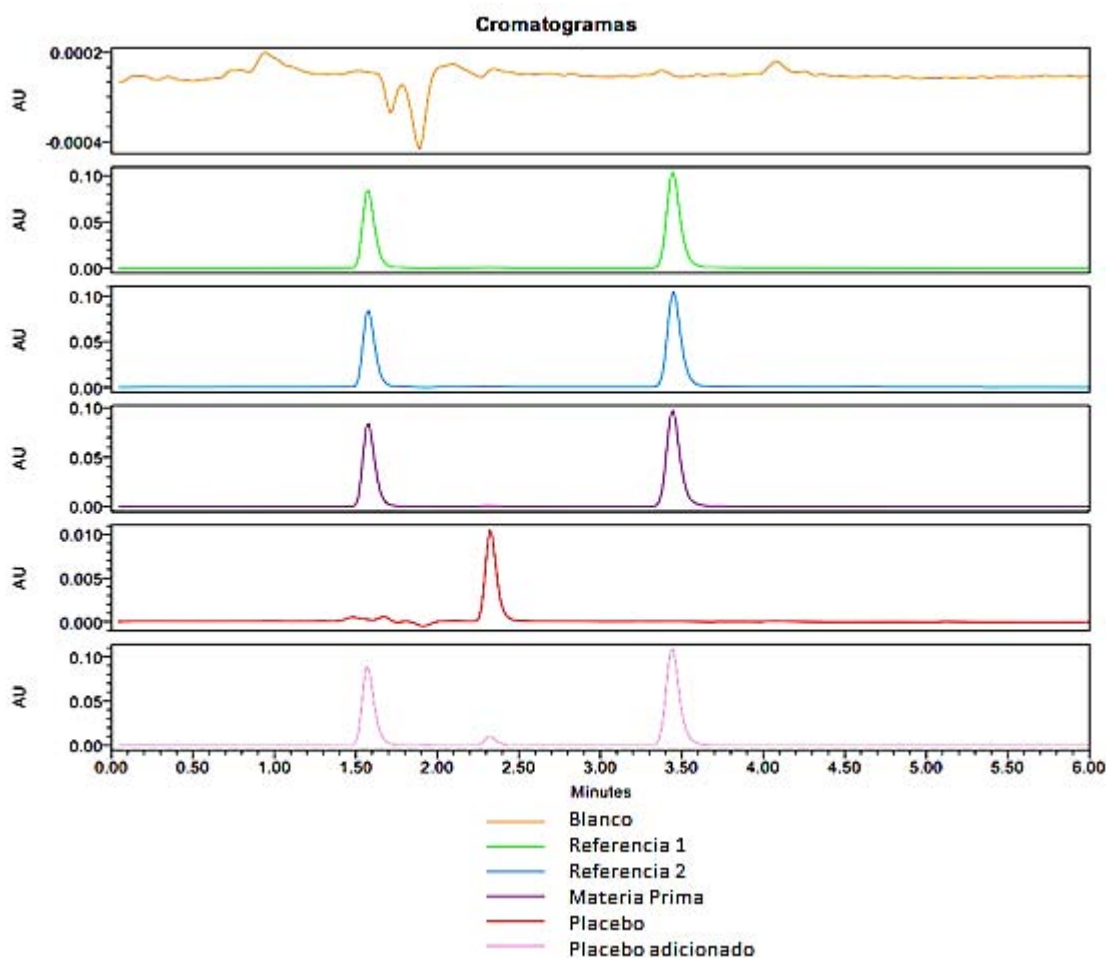


Figura 37 Cromatogramas de muestras control para la determinación de especificidad.

Tabla 32 Pureza de pico para la determinación de especificidad de AA en muestras control.

AA				Purity 1		Purity 2		Purity 3		Purity 4	
ID	TR	ÁREA	COLEO	Angle	Threshold	Angle	Threshold	Angle	Threshold	Angle	Threshold
R1	1.58	443850	1.26	0.125	0.225	0.078	0.225	0.051	0.224	0.037	0.224
R2	1.58	438746	1.26	0.154	0.222	0.078	0.222	0.055	0.221	0.04	0.221
MP	1.58	441519	1.25	0.132	0.221	0.068	0.221	0.041	0.222	0.03	0.222
P_ADI	1.57	465498	1.3	0.210	0.216	0.102	0.216	0.064	0.215	0.047	0.217
BLANCO											
PLA											

Tabla 33 Pureza de pico para la determinación de especificidad de ASA en muestras control.

ASA				Purity 1		Purity 2		Purity 3		Purity 4	
ID	TR	ÁREA	COLEO	Angle	Threshold	Angle	Threshold	Angle	Threshold	Angle	Threshold
R1	3.45	621515	1.25	0.074	0.264	0.065	0.268	0.063	0.273	0.059	0.271
R2	3.45	626777	1.25	0.109	0.262	0.079	0.265	0.073	0.267	0.072	0.27
MP	3.44	580440	1.24	0.093	0.264	0.088	0.269	0.089	0.276	0.075	0.273
P_ADI	3.44	648074	1.21	0.08	0.244	0.076	0.249	0.077	0.252	0.052	0.25
BLANCO											
PLA											

Las tablas 32 y 33 muestran el análisis de pureza de pico, el ángulo de la señal del analito fue menor al ángulo formado por el ruido electrónico y la fase móvil. Por lo tanto, se cumple con la especificación y se concluye que el método analítico es capaz de identificar y cuantificar la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes en las muestras, confirmado a través del análisis de pureza de pico.

Se prepararon placebos adicionados y se sometieron a condiciones estresantes:

- HA: Hidrólisis ácida con HCl [0.5N]
- HB: Hidrólisis básica con NaOH [0.5N]
- OXI: Oxidación con H₂O₂ al 3%
- UV: Fotólisis, exposición con lámpara UV a longitud de onda de 254 nm.
- TH: Temperatura y humedad, exposición a 60 °C y 75 % HR.

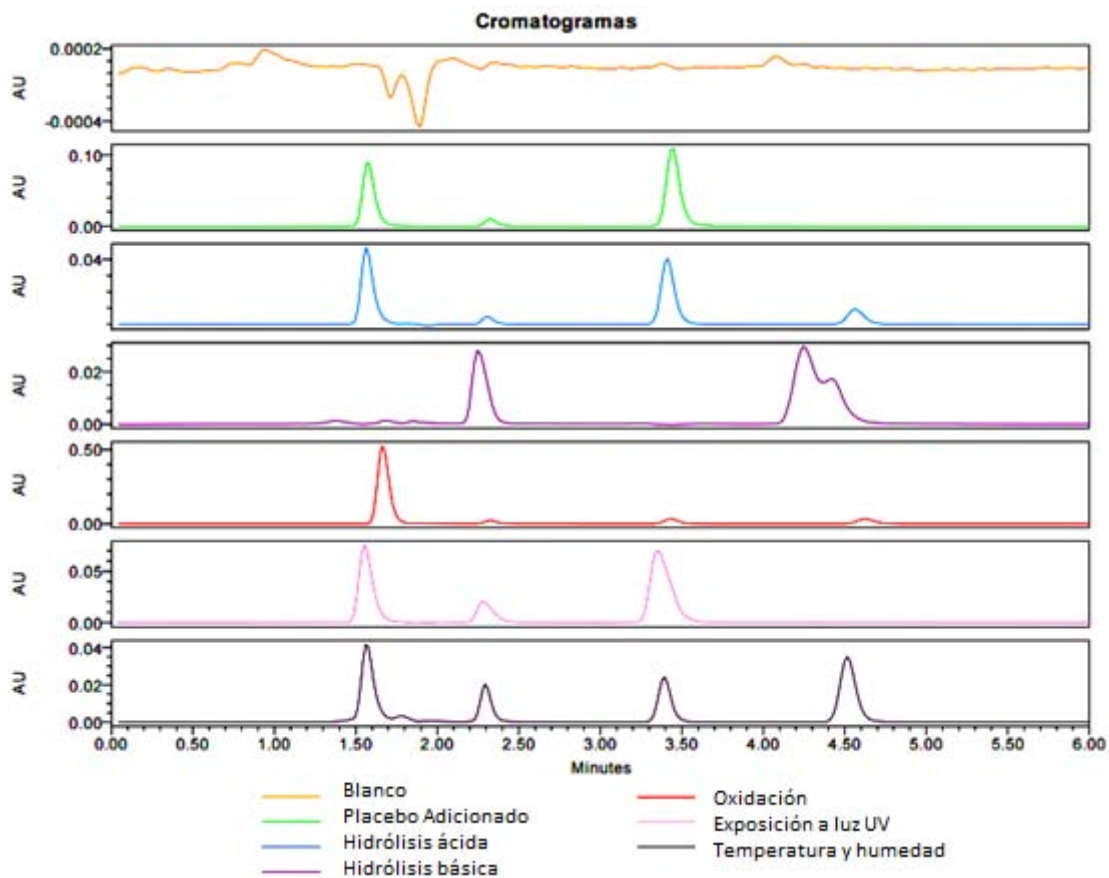


Figura 38 Degradación Forzada.

En la figura 39 el cromatograma que representa a la hidrolisis básica, denota al pico correspondiente a AS partido, esto debido al pH utilizado. Por otra parte, el cromatograma correspondiente a oxidación muestra un pico a un tiempo de retención parecido al del ácido ascórbico, sin embargo, dicha señal tiene una magnitud casi 5 veces mayor por lo que al realizar un barrido espectral se determina que dicha señal no corresponde al ácido ascórbico. (Figura 38)

La muestra sometida a temperatura y humedad muestra al pico correspondiente a ácido ascórbico partido, sin embargo, se comprobó que era la misma sustancia a través de un barrido espectral. (Figura 39)

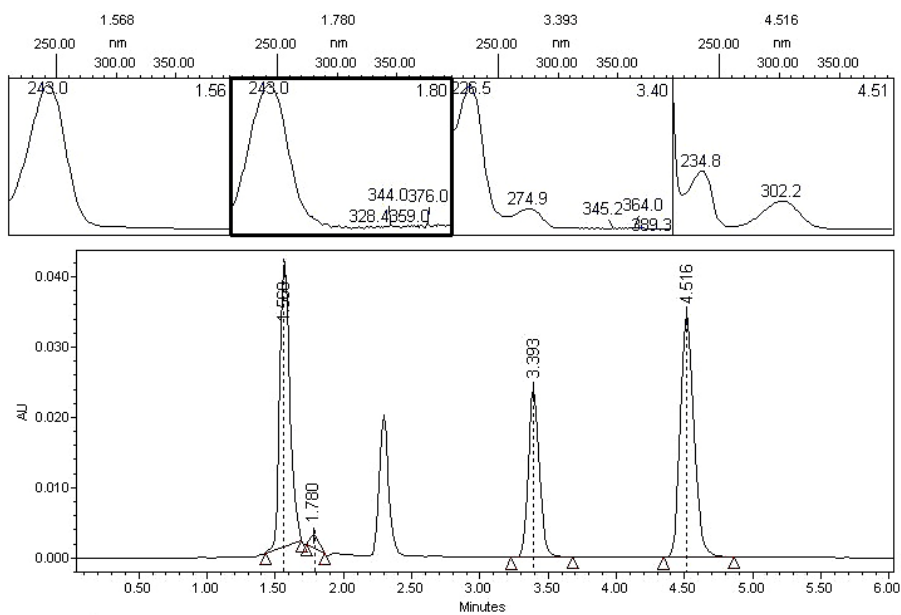


Figura 39 Cromatograma y barrido espectral de la muestra sometida a temperatura y humedad.

El método sigue siendo específico, dado que no se usa NaOH [0.5N] ni H₂O₂ como solución diluyente para la preparación de las muestras o como componente de la fase móvil. Se concluye que el método analítico es capaz de identificar y cuantificar las sustancias de interés.

Robustez.

La Robustez mide la capacidad del método para permanecer inalterado por pequeñas variaciones experimentales. Para evaluar la robustez se tomaron en consideración 2 factores: la proporción de solventes en la fase móvil y el tipo de columna cromatográfica y se realizó un análisis univariable demostrando la influencia de las modificaciones.

1. Proporción de solventes en la fase móvil.
 - Fase móvil control. Proporción de 60:40 Agua ajustada a pH de 2.5 y Acetonitrilo (v/v).
 - Fase móvil 1. Proporción de 65:35 Agua ajustada a pH de 2.5 y Acetonitrilo (v/v).

Tabla 34 Evaluación del porcentaje de recobro empleando diferentes proporciones de solventes en la fase móvil.

Muestra	Porcentaje de recobro (%)			
	Control		FM 1	
	60/40		65/35	
	AA	ASA	AA	ASA
1	101.44	100.68	100.89	100.62
2	100.06	99.49	99.72	99.87
3	99.45	99.11	99.30	99.42
Media	100.3	99.8	100.0	100.0
Diferencia absoluta $ d_i $ de la media aritmética respecto al análisis control			0.4	0.2

La tabla 34 muestra que el recobro promedio obtenido utilizando las condiciones control fue de 100.3 % de AA y 99.8 % de ASA, ambos valores se encuentran dentro del intervalo del 98-102%. Por otra parte, los recobros obtenidos con la Fase móvil 1 fueron de 100.0 % de AA y 100.0 % para ASA.

Se presenta que la diferencia absoluta de ambas condiciones y es menor a 2.0 para ambos casos. El cambio de proporción de solvente no repercute significativamente el recobro de los analitos.

2. Tipo de columna cromatográfica.

- Columna Phenomenex Aqua 5u C18 125A (150 X 4.6 mm)
- Columna Phenomenex Luna 5u C8(2) 100A (150 X 4.6 mm)

Tabla 35 Evaluación del porcentaje de recobro empleando diferentes columnas.

Muestra	Porcentaje de recobro (%)			
	Control		Modificación	
	C18		C8	
	AA	ASA	AA	ASA
1	99.16	98.56	101.62	99.79
2	100.04	99.70	101.61	99.46
3	100.01	99.41	97.67	99.57
Media	99.7	99.4	100.3	99.6
Diferencia absoluta d_i de la media aritmética respecto al análisis control			0.6	0.2

La tabla 35 muestra que el recobro promedio obtenido utilizando las condiciones control fue de 99.7% de AA y 99.4 % de ASA, ambos valores se encuentran dentro del intervalo del 98-102%. Por otra parte, los recobros obtenidos con la Fase móvil 1 fueron de 100.3 % de AA y 99.6 % para ASA.

Se presenta la diferencia absoluta de ambas condiciones y es menor a 2 para ambos casos. El cambio de utilizar una columna C18 y C8 marca Phenomenex no afecta significativamente el recobro de los analitos.

Evaluación del producto de degradación (AS).

Linealidad del sistema de AS.

Se evaluó la linealidad de AS a través de una curva de calibración con 5 niveles de concentración por triplicado que comprende de 2.5 a un 40 %.

Tabla 36 Concentraciones de AS y áreas correspondientes para evaluar la linealidad.

Concentración de AS ($\mu\text{g/mL}$)		Área
0.625		8663
0.625		8705
0.625		8582
1.25		16495
1.25		16806
1.25		17295
2.50		33797
2.50		33727
2.50		33932
5.00		67021
5.00		67884
5.00		68359
10.00		134022
10.00		135404
10.00		134965
Parámetro	Criterio de aceptación	Resultados obtenidos
r	Mayor a 0.998	0.9999
r^2	Mayor a 0.995	0.9999
% CV	Menor a 2.0 %	1.5
IC (β_0)	Incluye a 0	-193.13 a 551.27

La tabla 36 muestra que el coeficiente de correlación (r) fue de 0.9999 mientras que el coeficiente de determinación (r^2) fue de 0.9999, el coeficiente de variación fue de 1.5% y el intervalo de confianza de la ordenada al origen considera al cero.

La figura 40 presenta el comportamiento de la respuesta analítica de AS junto con su respectiva ecuación, la cual sigue un modelo matemático lineal.

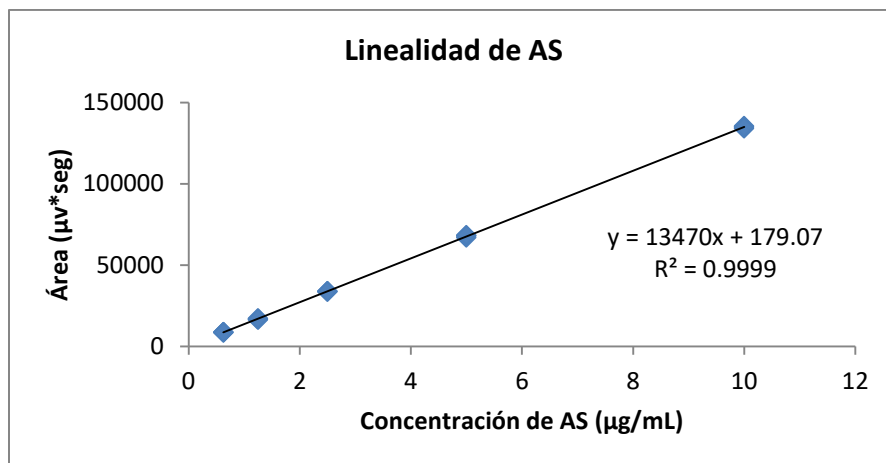


Figura 40 Curva de calibración de AS para la prueba de linealidad del sistema.

La tabla 37 presenta el análisis de varianza con un factor para determinar la relación lineal entre la concentración real de los fármacos y su respuesta analítica con un nivel de significancia del 5%.

Para este parámetro se establecieron las siguientes hipótesis:

- H_0 : No existe una relación lineal entre la concentración y el resultado analítico.
- H_a : Existe una relación lineal entre la concentración y el resultado analítico.

Criterio de aceptación:

- Si $F_{\text{cal}} < F_{\text{critica}}$ no se rechaza H_0
- Si $F_{\text{cal}} > F_{\text{critica}}$ se rechaza H_0

Tabla 37 Análisis de varianza para determinar la linealidad del rango.

		Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor critico de F
AS	Regresión	1	31640955953	31640955953	162860.5543	5.01468E-28
	Residuos	13	2525672.525	194282.5019		
	Total	14	31643481626			

De acuerdo a los resultados obtenidos, el valor de $F_{\text{cal}} > F_{\text{critica}}$, es decir, se rechaza H_0 . Se concluye que existe una relación lineal entre la concentración de AS y su respuesta analítica dentro del intervalo de 0.625- 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Precisión y exactitud de AS.

El valor de referencia aceptado se estima a partir de la curva de calibración compuesta por tres niveles de concentración (2.5, 10.0, 40.0 %) por sextuplicado.

Tabla 38 Concentración de AS adicionada y estimada para evaluar la exactitud y precisión.

% AS	Concentración de AS ($\mu\text{g/mL}$)		% Recobro	% CV
	Adicionada	Estimada		
2.5	0.625	0.630	100.77	1.00
	0.625	0.633	101.27	
	0.625	0.624	99.81	
	0.625	0.627	100.32	
	0.625	0.636	101.80	
	0.625	0.619	98.99	
10	2.5	2.496	99.83	0.55
	2.5	2.491	99.62	
	2.5	2.506	100.23	
	2.5	2.491	99.62	
	2.5	2.470	98.80	
	2.5	2.508	100.33	
40	10	9.936	99.36	0.70
	10	10.039	100.39	
	10	10.006	100.06	
	10	9.866	98.66	
	10	9.946	99.46	
	10	9.872	98.72	
Resumen del análisis estadístico del porcentaje de recobro				
Parámetro		Criterio de aceptación	Resultado obtenido	
Promedio global		98.0 - 102.0 %	99.9	
CV global		Menor a 2.0 %	0.9	

La tabla 38 muestra que el coeficiente de variación global del porcentaje de recobro de AS fue de 0.9 %, dicho valor es menor a 2.0 %, por otra parte, el porcentaje de recobro promedio fue de 99.9 %, dicho valor se encuentra en el intervalo de 98.0 – 102.0 %.

Se concluye que el método es preciso y exacto para la cuantificación de AS. Además, se estable como límite de cuantificación a la concentración de 0.625 $\mu\text{g/mL}$, que es la mínima concentración que se puede cuantificar con exactitud y precisión.

VI. CONCLUSIONES.

Se estableció una estrategia para validar un método analítico indicativo de estabilidad de ácido acetilsalicílico y ácido ascórbico en mezclas de uso veterinario, mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

Se desarrolló y validó un método indicativo de estabilidad para ácido acetil salicílico, ácido ascórbico y los productos de degradación en mezclas de uso veterinario usando HPLC, demostrando que cumple con los criterios establecidos en guías internacionales y nacionales.

El método demostró ser capaz de distinguir al ácido ascórbico y ácido acetilsalicílico, así como, al ácido salicílico (producto de degradación) de tal manera que ambos fármacos puedan ser cuantificados con exactitud y precisión.

Se cumplió con los criterios de aceptación, que se establecen en la guía de validación emitida por el colegio nacional de QFB y la guía ICH Q2 validación de métodos analíticos.

Se demostró con el análisis estadístico que los resultados son confiables.

VII. REFERENCIAS.

1. Sarabia M.M. &, López A.R., Rivera G.P., Díaz E., J., J., Cervantes. (2004). Estabilidad de fármacos y medicamentos. UNAM (Cuautitlán).
2. Dolores Hernández. M. (2011) Desarrollo y validación de un método analítico indicador de estabilidad de aspirina en tabletas por UV aplicando la técnica de mínimos cuadrados parciales. (Tesis de Licenciatura) Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.
3. Cárdenas Olvera E. (2011). Desarrollo y validación del método analítico para evaluación de perfiles de disolución y determinación del contenido de ácido acetilsalicílico en tabletas por espectrofotometría UV. (Tesis de Licenciatura) Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.
4. Guía de validación de métodos analíticos, Colegio Nacional de químicos Farmacéuticos Biólogos (CNQFB), ed.,2002
5. Khan, M. R., Alothman, Z. A., Naushad, M., Ghfar, A. A., & Wabaidur, S. M. (2012). Simultaneous analysis of vitamin C and aspirin in aspirin C effervescent tablets by high performance liquid chromatography–photodiode array detector. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 35(17), 2454-2461.
6. Wabaidur, S. M., Alothman, Z. A., & Khan, M. R. (2013). A rapid method for the simultaneous determination of L-ascorbic acid and acetylsalicylic acid in aspirin C effervescent tablet by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 108, 20–5.
7. Moffat, A. C., Osselton, M. D., & Widdop, B. (2011). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. London: Pharmaceutical Press.
8. Secretaría de Salud, Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 2014.
9. Rowe, R. C., Sheskey, P. J., & Quinn, M. E. (2009). *Handbook of pharmaceutical excipients*. Pharmaceutical press.
10. Guía para el buen uso de productos farmacéuticos veterinarios. SAGARPA. Recuperada de: file:///C:/Users/LEDEF_000/Downloads/GUIA%20PARA%20EL%20BUEN%20USO%20DE%20PRODUCTOS%20FARMAC%3%89UTICOS%20web.pdf
11. Real Farmacopea Española. Formas Farmacéuticas. Recuperada de: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Lecturageneralidades-3_15034.pdf

12. Manual de buenas prácticas de producción en granjas porcinas. SAGARPA. Recuperada de:
http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Manuales%20de%20Buenas%20Prcticas/Attachments/6/manual_porcino.pdf
13. Prontuario de Especialidades Veterinarias. Farmacéuticas, Biológicas y Nutricionales. (2014) Edición 34. Editorial Edamsa impresiones, S. A. México.
14. Atenas, H. B., & Araneda, J. G. Importancia de respetar las condiciones de almacenamiento de los medicamentos de uso veterinario.
15. Uso racional de medicamentos veterinarios en ganado bobino. CORFOGA. Recuperada de:
<http://www.corfoga.org/pdf/UsorRacionalMedicamentos.pdf>
16. NOM-073-SSA1-2005 “Estabilidad de medicamentos”, Diario Oficial de la Federación, México.
17. ICH Q1 (R2) Stability testing of new drug substances and products. Recuperada de:
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2__Guideline.pdf
18. Moldoveanu, S. C., & David, V. (2012). Essentials in modern HPLC separations. Newnes.
19. Harris, D. C. (2011). *Análisis químico cuantitativo*. Reverté.
20. Gómez Cervantes M. (2013) Validación del método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa para la cuantificación de un fármaco en tabletas. (Tesis de Licenciatura) Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.
21. Akay, C., Değim, İ. T., Sayal, A., Aydin, A., ÖZKAN, Y., & Gül, H. (2008). Rapid and simultaneous determination of acetylsalicylic acid, paracetamol, and their degradation and toxic impurity products by HPLC in pharmaceutical dosage forms. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 38(2), 167-173.
22. Franeta, J. T., Agbaba, D., Eric, S., Pavkov, S., Aleksic, M., & Vladimirov, S. (2002). HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets. *Il Farmaco*, 57(9), 709-713.
23. ICH Q2 (R1) Validation of analytical procedures: Text and methodology. Recuperada de:
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf

VIII. ANEXOS.

Anexo 1. Preparación de soluciones.

Solución diluyente: Agua a pH de 2.5 ajustada con ácido fosfórico.

Solución de referencia (R1/R2).

Pesar en un vaso de precipitados de 50 mL en el siguiente orden:

- 12.5 mg de ácido ascórbico.
- 12.5 mg de ácido acetilsalicílico.

Adicionar 2 mL de Etanol, agitar con una varilla de vidrio hasta la disolución de los gránulos de aspirina, posteriormente, verter el contenido en un matraz de 50 mL. Realizar tres enjuagues del vaso de precipitados con 10 mL de solución diluyente y transferir cada enjuague al matraz de 50 mL. Llevar a volumen de aforo con la solución diluyente. Tomar una alícuota de 1 mL de la solución anterior y trasvasarla a un matraz de 10 mL, llevar a la marca de aforo con la solución diluyente.

Solución patrón de estándares adicionados.

Pesar 31.25 mg de AA y 31.25 mg ASA en un vaso de precipitados de 50 mL. Disolver con 5 mL de Etanol y verter el contenido en un matraz volumétrico de 250 mL. Realizar tres enjuagues del vaso de precipitados con 10 mL de solución diluyente y transferir cada enjuague al matraz de 250 mL. Llevar a la marca de aforo con agua ajustada a un pH de 2.5. (Solución patrón; concentración ± 125 $\mu\text{g/mL}$ de AA y ASA).

Solución patrón de placebo adicionado.

Pesar 31.25 mg de AA, 31.25 mg de ASA además 250 mg de placebo en un vaso de precipitados de 50 mL. Disolver con 15 mL de Etanol a baño maría (Temperatura igual a 60°C) durante 2 minutos agitando con una varilla de vidrio.

Posteriormente, colocar el vaso de precipitados como se muestra a continuación y dejar sedimentar el moyuelo, verter el contenido en un matraz de 50 mL.



Realizar tres enjuagues del vaso de precipitados con 10 mL de solución diluyente y transferir cada enjuague al matraz de 50 mL. Llevar a volumen de aforo con la solución diluyente. Tomar una alícuota de 1 mL de la solución anterior y trasvasarla a un matraz de 10 mL, llevar a la marca de aforo con la solución diluyente.

Soluciones de muestra.

Pesar en un vaso de precipitados de 50 mL el equivalente a 12.5 mg de ácido ascórbico y ácido acetilsalicílico (125 mg de polvo). Adicionar 2 mL de Etanol y disolver a baño maría (Temperatura igual a 60°C) agitando con una varilla de vidrio durante 2 minutos. Posteriormente, dejar sedimentar el moyuelo, verter el contenido en un matraz de 50 mL. Realizar tres enjuagues del vaso de precipitados con 10 mL de solución diluyente y transferir cada enjuague al matraz de 50 mL. Llevar a volumen de aforo con la solución diluyente. Tomar una alícuota de 1 mL de la solución anterior y trasvasarla a un matraz de 10 mL, llevar a la marca de aforo con la solución diluyente.

Solución patrón de ácido salicílico.

Pesar 31.25 mg de AS en un vaso de precipitados de 50 mL. Disolver con 5 mL de Etanol y trasvasar el contenido a un matraz volumétrico de 100 mL. Realizar tres enjuagues del vaso de precipitados con 10 mL de solución diluyente y transferir cada enjuague al matraz de 100 mL. Llevar a la marca de aforo con agua ajustada a un pH de 2.5. (Solución 1; concentración \pm 312.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AS).

Tomar una alícuota de 10 mL de la solución 1 y transferirla a un matraz volumétrico de 100 mL. Llevar a la marca de aforo con agua ajustada a un pH de 2.5. (Solución stock; concentración \pm 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AS).

Nota: Filtrar las soluciones de referencia y muestras a través de acrodiscos de nylon de 0.45 μm , eliminar los primeros mililitros y recibir el filtrado en viales.

Anexo 2. Datos del rango del sistema.

Fármaco	ID	TR	Área	Altura	Coleo	K'	N
AA	RAN 40 C1	1.57	179284	30694	1.28	0.12	1692
AA	RAN 40 C2	1.57	180763	31019	1.28	0.12	1683
AA	RAN 60 C1	1.57	269570	46588	1.27	0.12	1665
AA	RAN 60 C2	1.56	274032	47494	1.29	0.12	1712
AA	RAN 80 C1	1.56	362055	62967	1.28	0.12	1717
AA	RAN 80 C2	1.57	363356	63137	1.28	0.12	1681
AA	RAN 100 C1	1.57	455215	78488	1.26	0.12	1681
AA	RAN 100 C2	1.57	450346	78253	1.28	0.12	1707
AA	RAN 120 C1	1.56	545296	94984	1.28	0.12	1704
AA	RAN 120 C2	1.57	544127	94186	1.26	0.12	1696
AA	RAN 140 C1	1.57	636598	110040	1.26	0.12	1688
AA	RAN 140 C2	1.57	631645	109767	1.26	0.12	1692
AA	RAN 160 C1	1.57	727263	126359	1.26	0.12	1663
AA	RAN 160 C2	1.57	725201	126230	1.27	0.12	1677
Promedio		1.57	453196	78586			
% CV		0.1	41.6	41.8			

Fármaco	ID	TR	Área	Altura	Coleo	K'	N
ASA	RAN 40 C1	3.4	240305	31427	1.16	1.43	4598
ASA	RAN 60 C1	3.4	362076	47170	1.16	1.43	4385
ASA	RAN 120 C1	3.4	740841	96786	1.16	1.43	4445
ASA	RAN 80 C1	3.39	487369	63776	1.16	1.42	4471
ASA	RAN 60 C2	3.39	369064	48089	1.16	1.42	4454
ASA	RAN 100 C1	3.4	610963	79788	1.17	1.43	4577
ASA	RAN 40 C2	3.4	244326	31987	1.17	1.43	4560
ASA	RAN 160 C1	3.39	984090	128414	1.16	1.42	4469
ASA	RAN 140 C1	3.39	856117	112371	1.17	1.42	4578
ASA	RAN 100 C2	3.4	610197	79973	1.16	1.43	4423
ASA	RAN 140 C2	3.39	858937	112714	1.17	1.42	4583
ASA	RAN 80 C2	3.39	490816	64293	1.16	1.42	4474
ASA	RAN 160 C2	3.4	977906	128478	1.16	1.43	4463
ASA	RAN 120 C2	3.4	740869	96752	1.17	1.43	4567
Promedio		3.4	612420	80144			
% CV		0.1	41.8	41.9			

Anexo 3. Datos de la linealidad del sistema.

Fármaco	ID	TR	Área	Altura	Coleo	K'	N
AA	LS 60 C1	1.55	264045	55388	1.25	0.11	2469
AA	LS 60 C2	1.55	265458	55632	1.25	0.11	2537
AA	LS 60 C3	1.55	263372	54791	1.28	0.11	2512
AA	LS 80 C1	1.55	353008	73972	1.26	0.11	2480
AA	LS 80 C2	1.55	354973	74514	1.25	0.11	2548
AA	LS 80 C3	1.55	353894	72890	1.24	0.11	2540
AA	LS 100 C1	1.55	442699	92597	1.26	0.11	2458
AA	LS 100 C2	1.55	446171	93534	1.26	0.11	2465
AA	LS 100 C3	1.55	442528	92658	1.26	0.11	2506
AA	LS 120 C1	1.55	528368	111045	1.26	0.11	2547
AA	LS 120 C2	1.55	529442	111199	1.25	0.11	2494
AA	LS 120 C3	1.55	533108	111614	1.26	0.11	2533
AA	LS 140 C1	1.55	623073	130591	1.26	0.11	2560
AA	LS 140 C2	1.55	622416	130300	1.26	0.11	2458
AA	LS 140 C3	1.55	623432	130460	1.26	0.11	2464
Promedio		1.55	443066	92746			
%CV		0.2	29.5	29.7			

Fármaco	ID	TR	Área	Altura	Coleo	K'	N
ASA	LS 60 C1	3.35	358324	62158	1.17	1.39	7911
ASA	LS 60 C2	3.34	358393	62293	1.18	1.39	8098
ASA	LS 60 C3	3.35	358706	62308	1.16	1.40	8041
ASA	LS 80 C1	3.35	477146	83540	1.18	1.39	7894
ASA	LS 80 C2	3.34	480265	83802	1.18	1.39	8135
ASA	LS 80 C3	3.35	480743	84088	1.18	1.39	8103
ASA	LS 100 C1	3.35	595376	104195	1.18	1.39	7904
ASA	LS 100 C2	3.35	604045	105380	1.18	1.39	7875
ASA	LS 100 C3	3.33	601636	105870	1.18	1.38	7819
ASA	LS 120 C1	3.32	719426	125931	1.17	1.37	7913
ASA	LS 120 C2	3.35	715463	124666	1.17	1.39	7924
ASA	LS 120 C3	3.34	719092	125655	1.18	1.39	8173
ASA	LS 140 C1	3.35	845894	146921	1.16	1.39	7986
ASA	LS 140 C2	3.35	838818	146786	1.18	1.39	7859
ASA	LS 140 C3	3.37	843405	147507	1.17	1.40	7897
Promedio		3.35	599782	104740			
% CV		0.3	29.5	29.5			

Anexo 4. Datos de la precisión y exactitud.

Fármaco	ID	TR	Área	Altura	% Recobro	Coleo	K'	N
AA	EP 80 C1	1.58	362555	68920	100.45	1.34	0.13	2101
AA	EP 80 C2	1.58	353901	67558	98.05	1.34	0.13	2070
AA	EP 80 C3	1.58	360523	68716	99.88	1.34	0.13	2048
AA	EP 80 C4	1.58	355275	67481	98.43	1.34	0.13	2046
AA	EP 80 C5	1.58	357377	67842	99.01	1.32	0.13	2056
AA	EP 80 C6	1.58	355684	67188	98.54	1.33	0.13	1992
AA	EP 100 C1	1.58	455235	85974	100.90	1.31	0.13	2156
AA	EP 100 C2	1.58	455646	86711	100.99	1.32	0.13	2042
AA	EP 100 C3	1.58	454748	86531	100.79	1.32	0.13	2036
AA	EP 100 C4	1.58	452367	85218	100.26	1.31	0.13	2015
AA	EP 100 C5	1.58	450454	85643	99.84	1.34	0.13	2169
AA	EP 100 C6	1.58	448572	84962	99.42	1.31	0.13	2124
AA	EP 120 C1	1.58	537748	102293	99.32	1.33	0.13	2033
AA	EP 120 C2	1.58	542960	102990	100.29	1.34	0.13	2166
AA	EP 120 C3	1.58	540619	102246	99.85	1.34	0.13	2179
AA	EP 120 C4	1.58	538262	102425	99.42	1.34	0.13	2030
AA	EP 120 C5	1.58	542090	102688	100.13	1.34	0.13	2180
AA	EP 120 C6	1.58	532316	100892	98.32	1.33	0.13	2142
Promedio		1.58	448572	84962	99.7			
% CV		0.1	17.0	16.9	0.9			

Fármaco	ID	TR	Área	Altura	% Recobro	Coleo	K'	N
ASA	EP 80 C1	3.36	482937	86338	99.79	1.18	1.40	8186
ASA	EP 80 C2	3.36	483790	86492	99.97	1.18	1.40	8225
ASA	EP 80 C3	3.36	483878	85969	99.98	1.16	1.40	8578
ASA	EP 80 C4	3.35	483738	85668	99.96	1.17	1.40	8369
ASA	EP 80 C5	3.36	482260	85307	99.65	1.16	1.40	8640
ASA	EP 80 C6	3.35	480669	85055	99.32	1.18	1.39	8569
ASA	EP 100 C1	3.36	603194	107394	99.71	1.18	1.40	8667
ASA	EP 100 C2	3.36	604735	108261	99.97	1.18	1.40	8395
ASA	EP 100 C3	3.36	605063	107360	100.02	1.17	1.40	8598
ASA	EP 100 C4	3.35	602998	106855	99.68	1.18	1.40	8612
ASA	EP 100 C5	3.35	604158	107720	99.87	1.17	1.39	8231
ASA	EP 100 C6	3.36	602185	106537	99.54	1.16	1.40	8560
ASA	EP 120 C1	3.36	726053	128771	100.02	1.17	1.40	8465
ASA	EP 120 C2	3.36	723600	129408	99.68	1.17	1.40	8448
ASA	EP 120 C3	3.36	723317	129280	99.64	1.17	1.40	8389
ASA	EP 120 C4	3.35	720461	127528	99.25	1.16	1.40	8529
ASA	EP 120 C5	3.35	728689	129848	100.38	1.17	1.39	8139
ASA	EP 120 C6	3.36	722511	128363	99.53	1.17	1.40	8240
Promedio		3.36	603569	107342	99.8			
% CV		0.1	16.8	16.9	0.2			

Anexo 5. Datos de la linealidad del método.

Fármaco	ID	TR	Área	Altura	% Recobro	Coleo	K'	N
AA	LM 60 C1	1.57	275438	51623	101.58	1.34	0.12	2123
AA	LM 60 C2	1.57	273659	51525	100.92	1.34	0.12	2136
AA	LM 60 C3	1.57	271736	50846	100.21	1.31	0.12	2013
AA	LM 80 C1	1.57	358383	67429	99.13	1.34	0.12	2100
AA	LM 80 C2	1.57	363690	68362	100.59	1.34	0.12	2118
AA	LM 80 C3	1.57	367660	69307	101.69	1.33	0.12	2157
AA	LM 100 C1	1.57	454694	85179	100.61	1.29	0.12	2104
AA	LM 100 C2	1.57	451946	84741	100.00	1.3	0.12	2012
AA	LM 100 C3	1.57	454626	85644	100.60	1.33	0.12	2110
AA	LM 120 C1	1.57	549151	103844	101.26	1.33	0.12	2074
AA	LM 120 C2	1.57	547812	103381	101.01	1.3	0.12	2035
AA	LM 120 C3	1.57	529857	100739	97.70	1.27	0.12	2234
AA	LM 140 C1	1.57	622006	117339	98.31	1.33	0.12	2104
AA	LM 140 C2	1.57	632131	119657	99.91	1.33	0.12	2119
AA	LM 140 C3	1.57	638705	121375	100.95	1.32	0.12	2133
Promedio		1.57	452766	85399	100.3			
% CV		0.1	28.9	29.3	1.1			

Fármaco	ID	TR	Área	Altura	% Recobro	Coleo	K'	N
ASA	LM 60 C1	3.39	355117	62437	99.85	1.15	1.42	8387
ASA	LM 60 C2	3.39	357387	62911	100.48	1.15	1.42	8567
ASA	LM 60 C3	3.39	353963	62344	99.52	1.17	1.42	8214
ASA	LM 80 C1	3.39	469670	81886	99.04	1.15	1.42	8645
ASA	LM 80 C2	3.39	468473	82236	98.79	1.17	1.42	8578
ASA	LM 80 C3	3.39	474493	83104	100.06	1.15	1.42	8574
ASA	LM 100 C1	3.39	593953	104341	100.20	1.17	1.42	8200
ASA	LM 100 C2	3.39	595259	104758	100.42	1.17	1.42	8424
ASA	LM 100 C3	3.39	589417	103406	99.43	1.17	1.42	8599
ASA	LM 120 C1	3.39	708856	124256	99.65	1.17	1.42	8650
ASA	LM 120 C2	3.39	717642	126030	100.89	1.17	1.42	8215
ASA	LM 120 C3	3.39	702742	124672	98.79	1.16	1.42	8325
ASA	LM 140 C1	3.39	829108	144882	99.91	1.16	1.42	8414
ASA	LM 140 C2	3.39	837148	146519	100.88	1.17	1.42	8553
ASA	LM 140 C3	3.39	827424	146121	99.70	1.16	1.42	8601
Promedio		3.39	592044	103994	99.8			
% CV		0.1	29.4	29.5	0.7			

Anexo 6. Datos de la reproducibilidad.

Fármaco	ID	TR	Área	Altura	% Recobro	Coleo	K'	N
AA	D1A1M1	1.57	446657	83677	101.08	1.27	0.12	2158
AA	D1A1M2	1.57	445759	84652	100.87	1.28	0.12	2000
AA	D1A1M3	1.57	445507	84351	100.82	1.30	0.12	2123
AA	D1A1M4	1.57	442144	83783	100.05	1.30	0.12	2138
AA	D1A1M5	1.57	439022	82108	99.35	1.27	0.12	2148
AA	D1A1M6	1.57	444937	84359	100.69	1.3	0.12	2129
Promedio		1.57	444004	83821	100.5			
% CV		0.1	0.7	1.1	0.7			

Fármaco	ID	TR	Área	Altura	% Recobro	Coleo	K'	N
AA	D2A1M1	1.58	449346	82567	101.87	1.28	0.13	2097
AA	D2A1M2	1.58	439047	81666	99.53	1.29	0.13	1935
AA	D2A1M3	1.57	447156	83175	101.37	1.32	0.12	1949
AA	D2A1M4	1.57	448886	82862	101.76	1.29	0.12	1985
AA	D2A1M5	1.57	447761	83359	101.51	1.33	0.12	2027
AA	D2A1M6	1.57	446400	82610	101.20	1.29	0.12	2018
Promedio		1.57	446433	82706	101.2			
% CV		0.4	0.9	0.7	0.9			

Fármaco	ID	TR	Área	Altura	% Recobro	Coleo	K'	N
AA	D1A2 M1	1.57	454725	79598	100.94	1.29	0.12	1787
AA	D1A2 M2	1.57	458436	80768	101.76	1.34	0.12	1832
AA	D1A2 M3	1.57	458097	80287	101.69	1.29	0.12	1774
AA	D1A2 M4	1.58	460255	80185	102.16	1.29	0.13	1792
AA	D1A2 M5	1.58	457641	79858	101.58	1.29	0.13	1797
AA	D1A2 M6	1.57	455017	80174	101.00	1.35	0.12	1831
Promedio		1.57	457362	80145	101.5			
% CV		0.1	0.5	0.5	0.5			

Fármaco	ID	TR	Área	Altura	% Recobro	Coleo	K'	N
AA	D2A2 M1	1.57	446779	76171	98.53	1.32	0.12	1726
AA	D2A2 M2	1.57	447586	76329	98.71	1.31	0.12	1716
AA	D2A2 M3	1.57	447475	77182	98.68	1.3	0.12	1669
AA	D2A2 M4	1.57	448588	77326	98.93	1.3	0.12	1677
AA	D2A2 M5	1.57	444932	76571	98.12	1.3	0.12	1676
AA	D2A2 M6	1.57	446634	77203	98.50	1.31	0.12	1693
Promedio		1.57	446999	76797	98.6			
% CV		0.1	0.3	0.7	0.3			

Fármaco	ID	TR	Área	Altura	% Recobro	Coleo	K'	N
ASA	D1A1M1	3.39	598559	102269	101.25	1.16	1.42	7925
ASA	D1A1M2	3.39	596569	102848	100.91	1.17	1.42	7884
ASA	D1A1M3	3.39	595178	101969	100.68	1.16	1.42	8024
ASA	D1A1M4	3.39	591731	101641	100.10	1.15	1.42	8014
ASA	D1A1M5	3.39	588355	101014	99.53	1.15	1.42	7999
ASA	D1A1M6	3.39	594740	102119	100.61	1.17	1.42	8192
Promedio		3.39	594189	101977	100.5			
% CV		0.1	0.6	0.6	0.6			

Fármaco	ID	TR	Área	Altura	% Recobro	Coleo	K'	N
ASA	D2A1M1	3.40	601618	99418	101.43	1.19	1.43	7435
ASA	D2A1M2	3.40	593221	98253	100.01	1.20	1.43	7371
ASA	D2A1M3	3.36	599141	98803	101.01	1.18	1.40	7290
ASA	D2A1M4	3.36	597684	99657	100.77	1.19	1.40	7387
ASA	D2A1M5	3.36	602144	99021	101.52	1.18	1.40	7258
ASA	D2A1M6	3.35	599445	99851	101.06	1.18	1.39	7372
Promedio		3.37	598876	99167	101.0			
% CV		0.7	0.5	0.6	0.5			

Fármaco	ID	TR	Área	Altura	% Recobro	Coleo	K'	N
ASA	D1A2 M1	3.43	612044	86867	100.00	1.21	1.45	5421
ASA	D1A2 M2	3.43	615445	86686	100.55	1.21	1.45	5333
ASA	D1A2 M3	3.43	617287	87328	100.85	1.21	1.45	5358
ASA	D1A2 M4	3.43	617122	87422	100.83	1.21	1.45	5377
ASA	D1A2 M5	3.43	616080	87233	100.66	1.21	1.45	5372
ASA	D1A2 M6	3.43	617827	87149	100.94	1.21	1.45	5371
Promedio		3.43	615967	87114	100.6			
% CV		0.1	0.3	0.3	0.3			

Fármaco	ID	TR	Área	Altura	% Recobro	Coleo	K'	N
ASA	D2A2 M1	3.39	590153	79981	98.55	1.16	1.42	4839
ASA	D2A2 M2	3.39	589315	79539	98.41	1.16	1.42	4827
ASA	D2A2 M3	3.39	590970	80020	98.69	1.18	1.42	4771
ASA	D2A2 M4	3.39	591180	80066	98.72	1.18	1.42	4805
ASA	D2A2 M5	3.39	589036	79559	98.37	1.17	1.42	4764
ASA	D2A2 M6	3.39	592455	80143	98.94	1.17	1.42	4880
Promedio		3.39	590518	79884	98.6			
% CV		0.0	0.2	0.3	0.2			

Anexo 7. Datos de la robustez.

Fármaco	ID	TR	Área	Altura	% Recobro	Coleo	K'	N
AA	RO_CONTROL M1	1.56	458204	75745	101.44	1.33	0.11	1536
AA	RO_CONTROL M2	1.56	452001	73765	100.06	1.34	0.11	1532
AA	RO_CONTROL M3	1.56	449231	74077	99.45	1.35	0.11	1557
Promedio		1.56	453145	74529	100.3			
% CV		0.1	1.0	1.4	1.0			

Fármaco	ID	TR	Área	Altura	% Recobro	Coleo	K'	N
AA	RO_FM1_M1	1.59	444077	71840	100.89	1.35	0.14	1490
AA	RO_FM1_M2	1.59	438931	71048	99.72	1.33	0.14	1539
AA	RO_FM1_M3	1.59	437056	70992	99.30	1.32	0.14	1551
Promedio		1.59	440021	71293	100.0			
% CV		0.0	0.8	0.7	0.8			

Fármaco	ID	TR	Área	Altura	% Recobro	Coleo	K'	N
ASA	RO_CONTROL M1	3.43	607400	70070	100.68	1.44	1.45	3415
ASA	RO_CONTROL M2	3.43	600262	69580	99.49	1.45	1.45	3413
ASA	RO_CONTROL M3	3.44	597921	69369	99.11	1.45	1.46	3471
Promedio		3.43	601861	69673	99.8			
% CV		0.2	0.8	0.5	0.8			

Fármaco	ID	TR	Área	Altura	% Recobro	Coleo	K'	N
ASA	RO_FM1_M1	4.12	606402	59921	100.62	1.5	1.94	3740
ASA	RO_FM1_M2	4.12	601855	59889	99.87	1.51	1.94	3744
ASA	RO_FM1_M3	4.13	599173	59423	99.42	1.51	1.95	3734
Promedio		4.12	602477	59744	100.0			
% CV		0.2	0.6	0.5	0.6			

Fármaco	ID	TR	Área	Altura	% Recobro	Coleo	K'	N
AA	CONTROL M1	1.57	453689	72355	99.16	1.31	0.12	1475
AA	CONTROL M2	1.57	457719	76181	100.04	1.29	0.12	1605
AA	CONTROL M3	1.57	457553	76236	100.01	1.3	0.12	1598
Promedio		1.57	456320	74924	99.7			
% CV		0.1	0.5	3.0	0.5			

Fármaco	ID	TR	Área	Altura	% Recobro	Coleo	K'	N
AA	RO_C_C8 M1	1.51	410418	64621	101.62	1.49	0.08	1320
AA	RO_C_C8 M2	1.51	410382	64293	101.61	1.49	0.08	1312
AA	RO_C_C8 M3	1.51	394468	62452	97.67	1.53	0.08	1316
Promedio		1.51	405089	63789	100.0			
% CV		0.1	2.3	1.8	2.2			

Fármaco	ID	TR	Área	Altura	% Recobro	Coleo	K'	N
ASA	CONTROL M1	3.37	593330	69082	98.56	1.15	1.41	3460
ASA	CONTROL M2	3.37	600199	72223	99.70	1.18	1.41	3719
ASA	CONTROL M3	3.37	601788	73259	99.97	1.18	1.41	3788
Promedio		3.37	598439	71521	99.4			
% CV		0.1	0.8	3.0	0.8			

Fármaco	ID	TR	Área	Altura	% Recobro	Coleo	K'	N
ASA	RO_C_C8 M1	3.31	588480	63619	99.79	1.56	1.36	2846
ASA	RO_C_C8 M2	3.30	586544	63161	99.46	1.53	1.35	2793
ASA	RO_C_C8 M3	3.29	587226	63469	99.57	1.55	1.35	2794
Promedio		3.30	587417	63416	99.6			
% CV		0.2	0.2	0.4	0.2			

Anexo 8. Datos de la evaluación de AS.

Fármaco	ID	TR	Área	Altura	% Recobro	Coleo	K'	N
AS	N1 C1	4.52	8663	856	100.77	0.99	2.23	4384
AS	N1 C2	4.52	8705	845	101.27	1.05	2.23	4209
AS	N1 C3	4.50	8582	888	99.81	1.09	2.21	5013
AS	N1 C4	4.50	8625	899	100.32	1.08	2.21	5042
AS	N1 C2	4.53	8749	808	101.80	1.01	2.24	3981
AS	N1 C6	4.50	8513	884	98.99	1.11	2.21	5006
AS	N2 C1	4.53	16495	1590		1.02	2.23	4125
AS	N2 C2	4.52	16806	1681		1.03	2.23	4554
AS	N2 C3	4.52	17295	1733		1.11	2.23	4793
AS	N3 C1	4.53	33797	3204	99.83	1.01	2.24	3948
AS	N3 C2	4.53	33727	3361	99.62	1.05	2.23	4531
AS	N3 C3	4.50	33932	3515	100.23	1.04	2.21	5014
AS	N3 C4	4.50	33726	3554	99.62	1.06	2.22	5180
AS	N3 C5	4.50	33450	3514	98.80	1.07	2.21	5114
AS	N3 C6	4.50	33964	3574	100.33	1.08	2.21	5150
AS	N4 C1	4.52	67021	6542		1.04	2.23	4260
AS	N4 C2	4.52	67884	6889		1.05	2.23	4718
AS	N4 C3	4.51	68359	6987		1.05	2.22	4794
AS	N5 C1	4.52	134022	13376	99.36	1.04	2.23	4547
AS	N5 C2	4.52	135404	13916	100.39	1.05	2.23	4917
AS	N5 C3	4.52	134965	13890	100.06	1.05	2.23	4961
AS	N5 C4	4.50	133070	14090	98.66	1.06	2.21	5228
AS	N5 C5	4.50	134153	14106	99.46	1.06	2.21	5102
AS	N5 C6	4.50	133156	14139	98.72	1.07	2.21	5247
Promedio		4.5	54711	5618	99.9			
% CV		0.3	91.8	93.1	0.9			