

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA-León

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Farmacia



¡A la libertad por la universidad!

Monografía para optar al título de Químico-Farmacéutico.

**Validación del Método Analítico para la cuantificación de Aspirina y Ácido Salicílico
libre en tabletas de 100 mg por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.**

Autores:

- Br. Solantyell Loyret Salgado Espinal.
- Br. Georlene Issamar Torres Rojas.
- Br. Yaoska Mercedes Treminio.

Tutor: Lic. Fania Valesca Valladares Silva.

Septiembre, 2014

“2014 por la pertinencia y excelencia académica”

AGRADECIMIENTO

Agradecemos de corazón a nuestro padre Dios, creador, proveedor de ideas y esperanza, por habernos dado la sabiduría y perseverancia para terminar nuestra carrera.

A nuestros padres, por ser la guía de nuestras vidas, por sus esfuerzos y por superar junto a nosotros las dificultades que se nos presentaron para culminar esta fase de nuestra formación, pero sobre todo agradecemos por brindarnos su amor y haber creído en nosotros.

A nuestra tutora Lic. Fania Valladares por compartir sus conocimientos con nosotros y apoyarnos para que este trabajo monográfico fuese una realidad.

Al Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos de la UNAN-León, por apoyarnos y permitirnos realizar este trabajo monográfico en sus instalaciones.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo monográfico primeramente a DIOS, quien con su infinito amor y bondad me ha permitido llegar hasta este punto, por ser el manantial de vida y esperanza brindarme lo necesario para seguir adelante día a día para lograr mis objetivos.

A mis padres quienes con amor y comprensión hicieron todo lo posible en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme constantemente, guiarme por la senda correcta y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba y en especial a mi padre quien con esfuerzo y sacrificio forjo la mujer que hoy soy.

A mis abuelitos quien con amor y ternura inculcaron valores éticos y morales siendo mis segundos padres y un pilar fundamental en mi formación tanto personal como espiritual.

Solantyell Loyret Salgado Espinal.

DEDICATORIA

A Dios nuestro creador, por sus infinitas bendiciones y misericordia.

A mis padres por su apoyo incondicional, su motivación constante y por ser mi ejemplo e inspiración para ser una mejor persona cada día.

A mis hermanos por estar siempre presentes con sus consejos y apoyo.

A mis profesores por compartir sus conocimientos, por su paciencia y su empeño en mi formación profesional.

Georlene Issamar Torres Rojas

DEDICATORIA

Dedico este trabajo monográfico a mi señor Jesucristo por ser quien ha estado a mi lado todo este tiempo y por sus infinitas bendiciones.

A mi madre, hermano y abuelo por ser el motor que me impulsa a salir adelante y ser mejor persona cada día.

A mi novio por el apoyo brindado a lo largo de estos años.

Yaoska Mercedes Treminio

ÍNDICE

I. Introducción.....	1
II. Planteamiento de problema.....	3
III. Objetivos general y específicos.....	4
IV. Marco Teórico.....	5
4.1 Consideraciones importantes en los métodos analíticos.....	5
4.2 Validación.....	6
4.2.1 Definición e importancia.....	6
4.2.2 Objetivos de una validación analítica.....	8
4.2.3 ¿Cuándo realizar una validación?.....	8
4.2.4 Métodos susceptibles de ser validados.....	9
4.2.5 Pasos para la Validación.....	9
4.3 Clasificación de Métodos Analíticos.....	10
4.3.1 Según la normalización y estado de desarrollo del método.....	10
4.3.2 Según categoría del método.....	11
4.3.3 Según la metódica de análisis.....	12
4.4 Parámetros de desempeño analítico.....	13
4.4.1 Selectividad.....	13
4.4.2 Linealidad y Rango.....	18
4.4.3 Precisión.....	22
4.4.4 Exactitud.....	27
4.4.5 Límite de detección y límite de cuantificación.....	30
4.4.6 Robustez.....	33
4.4.7 Incertidumbre.....	35
4.5 Cromatografía.....	37
4.5.1 Consideraciones generales.....	37
4.5.2 Características de la fase móvil y fase estacionaria.....	38
4.5.3 Clasificación de la cromatografía líquida de alta resolución.....	39
4.5.4 Instrumentación en HPLC.....	40
4.5.5 Cromatografía de Reparto.....	45

4.6 Propiedades organolépticas y fisicoquímicas de Aspirina.....	47
4.7 Propiedades organolépticas y fisicoquímicas de Ácido salicílico.....	48
4.8 Monografía terapéutica.....	49
4.8.1 Mecanismo de acción.....	49
4.8.2 Aplicaciones farmacológicas.....	49
4.8.3 Farmacocinética.....	51
4.8.4 Usos.....	52
4.9 Hidrolisis de Aspirina.....	53
V. Hipótesis.....	55
VI. Material y Método.....	56
6.1 Tipo de estudio.....	56
6.2 Población.....	56
6.3 Muestra.....	56
6.4 Alcance.....	56
6.5 Plan de análisis.....	56
6.6 Reactivos y materiales.....	56
6.7 Procedimiento analítico para la cuantificación de los estándares de referencia de ácido salicílico y Aspirina.....	61
6.8 Procedimiento de preparación de reactivos.....	62
6.9 Método de análisis para la cuantificación de Aspirina y ácido salicílico libre en tabletas.....	63
6.10 Procedimiento experimental para determinar los parámetros de validación en la cuantificación de Aspirina.....	66
6.10.1 Aptitud del sistema.....	67
6.10.2 Selectividad.....	67
6.10.2.1 Identificación del activo.....	67
6.10.2.2 Selectividad frente a productos de degradación.....	68
6.10.3 Linealidad.....	69
6.10.3.1 Linealidad del sistema.....	69
6.10.3.2 Linealidad del método.....	73
6.10.4 Precisión.....	77

6.10.4.1 Repetibilidad del sistema.....	77
6.10.4.2 Repetibilidad del método.....	77
6.10.4.3 Precisión intermedia del sistema.....	79
6.10.4.4 Precisión intermedia del método.....	80
6.10.5 Exactitud.....	81
6.10.6 Limite de detección.....	83
6.10.7 Limite de cuantificación.....	83
6.10.8 Robustez.....	83
6.10.9 Estabilidad de las soluciones analíticas.....	85
6.10.10 Incertidumbre.....	86
6.11 Procedimiento experimental para determinar los parámetros de validación en la cuantificación de ácido salicílico libre.....	86
6.11.1 Aptitud.....	86
6.11.2 Selectividad.....	87
6.11.2.1 Identificación del activo.....	87
6.11.3 Linealidad.....	88
6.11.3.1 Linealidad del sistema.....	88
6.11.4 Precisión.....	91
6.11.4.1 Repetibilidad.....	91
6.11.4.2 Precisión intermedia del sistema.....	92
6.11.5 Exactitud.....	93
6.11.6 Estabilidad de las soluciones analíticas.....	95
6.11.7 Límite de detección.....	95
6.11.8 Límite de cuantificación.....	95
6.11.9 Incertidumbre.....	96
VII. Resultados y análisis de resultados.....	97
VIII. Conclusiones.....	144
IX. Recomendaciones.....	145
X. Bibliografía.....	146
Anexos.....	149

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

BPM: Buena Prácticas de Manufactura

AINE: Antiinflamatorio no esteroideo

MIFIC: Ministerio de Fomento Industria y Comercio

ONA: Oficina Nacional de Acreditación

NTN: Norma técnica Nicaraguense

Arto: Artículo

ISO: International Organization for Standardization

IEC: International Electrotechnical Commission

USP: United States Pharmacopeia

FDA: Food and Drug Administration

NF: National Formulary

AOAC: Association of Official Analytical Chemists

ICH: International conference of harmonization

BP: British Pharmacopoeia

FI: Farmacopea internacional

PNT: Procedimientos Normalizados de Trabajo

MRC o CMR: materiales de referencia certificados

AQC: Ensayos de Control de Calidad

DAD: Detector de Diodos

GC: Cromatografía de gases

MS: Espectrometría de masas.

FT-IR: Espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier.

CV: coeficiente de variación

LD: Limite de Detección.

LC: Limite de Cuantificación

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

EURACHEM: Asociación Europea de Química Analítica

TLC: Cromatografía en capa fina

EC: Electroforesis capilar

UV: Ultravioleta

FM: Fase móvil

FE: Fase estacionaria

ASA: Ácido Acetil Salicílico

PG: Prostaglandinas

HPETE: ácido 5-hidroxi-peroxieicosatetraenoico

ATP: Adenosín Trifosfato, Nucleótido

AMPc: Adenosin Monofosfato Cíclico

COX 1: Ciclooxygenasa 1

COX 2: Ciclooxygenasa 2

15-HETE: Ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico

C_{máx}: concentración máxima

T_{máx}: Tiempo máximo

BIPM: Oficina Internacional de Pesas y Medidas

IFCC: Federación Internacional de Química Clínica

OIML: Organización Internacional de Metrología Legal



INTRODUCCIÓN

El control de calidad de un producto farmacéutico y de cada uno de los ingredientes o materias primas que entran en su composición, es indispensable para asegurar su eficacia y su inocuidad durante todo su tiempo de vida útil. Para garantizar de manera precisa su vida útil, se requiere igualmente de estudios de estabilidad del medicamento, siendo igualmente necesario controlar su nivel de impurezas. De acuerdo a la finalidad y objetivos del método analítico destinados para dicho control, los métodos empleados para evaluar los diferentes niveles de calidad deben cumplir con ciertos requisitos y poseer, además, características precisas de confiabilidad e idoneidad, por tal razón, se requiere que estos métodos sean validados.¹

Desde mediados de los años 90's, la acreditación en los laboratorios de ensayos ha venido tomando gran importancia para la exportación e importación de productos de intercambio comercial.

Dentro de esta categoría entran los laboratorios analíticos y microbiológicos, y para acreditarse deben tener la competencia técnica basada en la norma NTN 04 001 05 equivalente a la norma ISO/IEC 17025:2005.

Uno de los principales requisitos que exige la norma ISO/ IEC 17025:2005 es el de utilizar métodos normalizados, los cuales deben estar validados y/o previamente verificados, con el fin de garantizar a los clientes la trazabilidad, precisión y confiabilidad en los resultados, esta misma también indica la evaluación de la incertidumbre de los resultados basada en el conocimiento científico de los principios teóricos del método y en la experiencia práctica, para la estimación del desempeño de un método.⁷

El 25 de enero de 1999, en Nicaragua se aprobó la ley 292, Ley de Medicamentos y Farmacia publicada en la gaceta N^o 24 y 25 del 4 y 5 de febrero de 1999, en la cual en el capítulo IV: Registro de medicamentos arto 23 se exige información sobre especificaciones y métodos analíticos, incluida metodología utilizada para cada parámetro medido,



información de la linealidad, precisión, exactitud, reproductibilidad, especificidad y robustez del método analítico.⁸

Según las BPM (edición 99) la validación es la obtención de pruebas de que cualquier procedimiento, proceso, equipo, material, actividad o sistema produce en realidad el resultado previsto.²

En el presente estudio se realizó la validación del método analítico por HPLC para la cuantificación de Aspirina y ácido salicílico libre en tabletas de 100 mg. Dicha validación se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos de la UNAN-león y se analizaron los parámetros de selectividad, linealidad, exactitud, precisión, robustez, límite de detección, límite de cuantificación e incertidumbre, además se evaluó la estabilidad de la soluciones analíticas (muestra y estándares).

Hoy en día los laboratorios deben demostrar que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables es decir exactos y precisos, que sean reproducibles, adecuados para su finalidad y propósito perseguido, ya que muchas de las decisiones que se toman están basadas en la información que estos datos proporcionan; debido a ello se validó la metodología analítica de la cuantificación de Aspirina y ácido salicílico libre en tabletas de 100 mg, para ser implementado por el Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos de la UNAN-León como método de rutina; y así proporcionarle al cliente un alto grado de confianza y seguridad en el método utilizado para el análisis de su producto.



II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

¿La metodología analítica para la cuantificación de Aspirina y ácido salicílico libre en tabletas de 100 mg por HPLC cumple con las especificaciones descritas en los parámetros de validación?



III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Validar el método analítico para la cuantificación de Aspirina y ácido salicílico libre en tabletas de 100 mg por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir los lineamientos a seguir en la validación de la metodología analítica para la cuantificación de Aspirina y ácido salicílico libre en la forma farmacéutica dada.
- Demostrar mediante los criterios de validación que la metodología analítica por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de Aspirina y ácido salicílico libre en tabletas es exacta, precisa, selectiva y lineal.
- Medir la capacidad del método para permanecer inalterado ante pequeñas variaciones en ciertos factores durante su empleo en rutina.
- Estimar el límite de detección y límite de cuantificación de aspirina y ácido salicílico en la muestra.
- Determinar la incertidumbre del método analítico por HPLC para la cuantificación de Aspirina y ácido salicílico libre en tabletas de 100 mg.



IV. MARCO TEÓRICO

4.1 Consideraciones importantes en los métodos analíticos

Aunque muchas veces es el instrumento el elemento más visible e impresionante del método analítico sólo es uno de los componentes del análisis total. Antes de enfocar el papel de la instrumentación en un método analítico el analista debe considerar otras etapas importantes para la determinación. La siguiente descripción señala los pasos comunes a los métodos analíticos y ayuda así a poner en la perspectiva adecuada el papel de la instrumentación.

La primera tarea es definir el problema analítico. Cuando es posible, lo anterior se hace a través de una interacción directa con las personas que desean el análisis.

El analista debe determinar la naturaleza de la muestra, el uso final de los resultados analíticos, las especies que deben analizarse y la información requerida. La información cualitativa debe incluir la composición elemental, los estados de oxidación y la identificación completa de todas las especies presentes en la muestra. Los datos cuantitativos incluyen la exactitud y precisión requerida, el intervalo de concentraciones esperados para el analito y sus límites de detección. Otras consideraciones son las propiedades físicas y químicas únicas del analito, las propiedades de la matriz de la muestra, la presencia de interferencias probables que limitan el curso de ciertas propiedades del analito como indicadores de medición y, finalmente un costo estimado del análisis. Un componente principal en el costo es el tiempo requerido para efectuar el análisis; cuando resulta apropiado, deben compararse los costos de métodos manuales y de los métodos automatizados.

Una vez que el problema se ha definido, la siguiente tarea es seleccionar el (los) método (s) apropiado (s). Algunos factores a considerar son las posibilidades y limitaciones de la técnica, cuando se aplica el problema en consideración, las restricciones impuestas al método por las interferencias presentes en la muestra y la calidad de la información obtenida contra su costo de adquisición.



La próxima área a considerar es el muestreo. A menudo es el paso más importante en todo el análisis. ¿Qué medidas deben tomarse a fin de obtener las muestras requeridas para proporcionar la información deseada? En algunos casos se buscan muestras homogéneas representativas mientras que en otros la heterogeneidad de la muestra es el interés principal. ¿Los procedimientos de toma de muestra en el campo y en el laboratorio aseguran la integridad de los resultados analíticos? ¿Se han usado procedimientos adecuados para almacenar y preservar las muestras y los estándares? ¿Las muestras se han etiquetado y registrado correctamente?

A menudo es necesario realizar algunas operaciones sobre la muestra, físicas o químicas, previa al análisis final. Estas operaciones pueden reducir o eliminar las interferencias, llevar la concentración del analito al intervalo de análisis deseado, o producir a partir del analito especies con propiedades cuantitativamente medibles. Tales operaciones incluyen la disolución, la fusión, la separación, la dilución, la concentración y la formación de derivados químicos. La instrumentación compleja no elimina la necesidad de las destrezas de laboratorio fundamentales, más bien aumenta su importancia. La limpieza adecuada, el uso y el conocimiento de las tolerancias de las balanzas analíticas, del material volumétrico y de los aparatos de filtrado siguen siendo destrezas básicas necesarias para el análisis.

A veces se requiere el control del ambiente químico para asegurar que las actividades de los analitos permanezcan constantes durante la medición y para disminuir los efectos de las interferencias. La presentación clara y exacta de los resultados es un requisito importante para cualquier buen método analítico. El objetivo de cada análisis es obtener información deseada a partir de la muestra y presentarla en forma útil.

4.2 Validación

4.2.1 Definición e importancia

Según la USP XXXII la validación de un procedimiento analítico es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.¹⁰



Dos palabras claves reúnen los dos objetivos primordiales de una validación:

- Establecer un método.
- Confirmar su desempeño por medio de tratamientos estadísticos y apreciaciones cualitativas por parte del laboratorio en general.

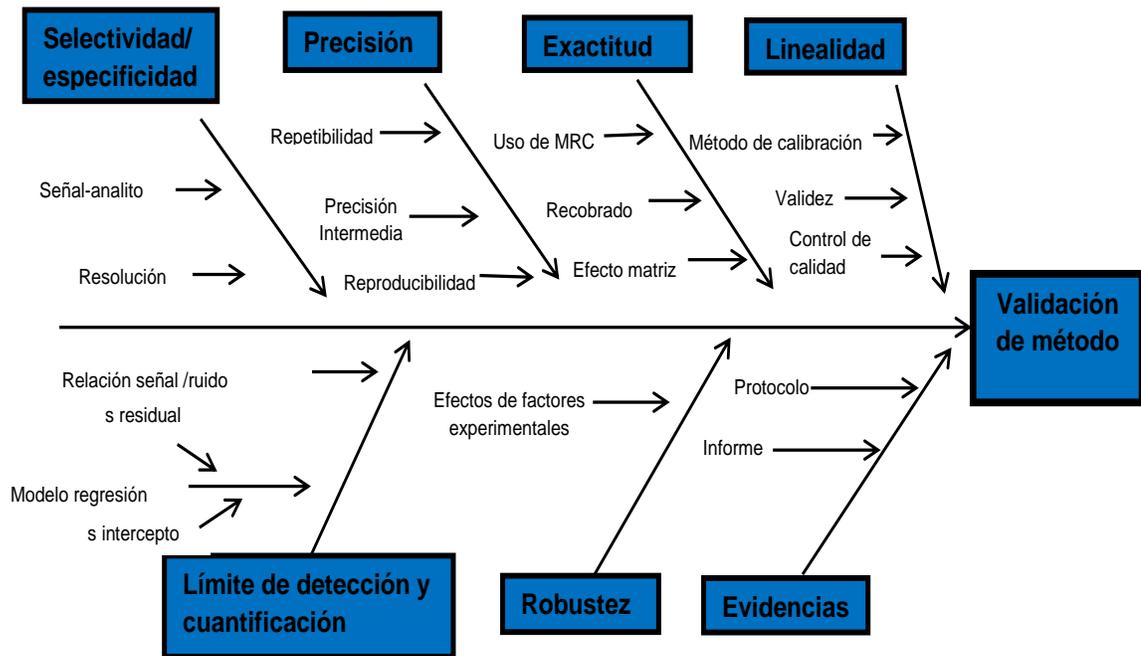
De ahí radica la importancia de una adecuada validación, ya que establece bajo qué circunstancias debe realizarse un análisis asegurando que los datos obtenidos cumplen en la totalidad la calidad deseada, brindando seguridad y respaldo. Además, proporciona criterios para el rechazo o re análisis de lecturas anómalas.

La validación de un método, generalmente, está íntimamente relacionada con el desarrollo del método. En efecto, a menudo es difícil saber de forma exacta, cuando termina el desarrollo del método y cuando comienza la validación.

En la figura siguiente se esquematiza el ciclo de una validación, en teoría este se repite indefinidamente debido a los continuos avances instrumentales y/o al desarrollo de nuevas técnicas.³



Las características de desempeño analítico habituales que deben considerarse en la validación de los métodos analíticos son:⁷



4.2.2 Objetivos de una validación analítica

- Garantizar la coherencia entre los resultados obtenidos según las necesidades.
- Asegurar la calidad y constancia de la información obtenida.
- Caracterizar métodos y herramientas analíticas.
- Facilitar las auditorías de la calidad.
- Fundamentar la transferencia (de métodos y herramientas) y la armonización de los resultados entre los laboratorios, con el objetivo de conseguir el reconocimiento mutuo.⁹

4.2.3 ¿Cuándo realizar una validación?

Los métodos que necesitan estar validados o revalidados son los siguientes:

- Cuando se trate de un método nuevo desarrollado enteramente en un laboratorio, o de un método basado en la modificación significativa de otro ya existente, el laboratorio debe someter el nuevo método a una validación exhaustiva.⁹
- Siempre que las condiciones en las que el método ha sido validado cambien (por ejemplo, instrumentos con características diferentes).



- Antes de su introducción como método de rutina.
- Siempre que se cambie el método y el cambio se encuentra fuera del ámbito original del método.
- Cuando control de calidad indica que un método establecido está cambiando con el tiempo.
- Con el fin de demostrar la equivalencia entre los dos métodos (por ejemplo, un nuevo método y un estándar).¹¹

4.2.4 Métodos susceptibles de ser validados

Son validables los métodos analíticos clasificados en la siguiente forma:

- Ensayos de identificación.
- Ensayos para la determinación del analito de interés de una materia prima o de una especialidad farmacéutica.
- Ensayos para la determinación de características farmacotécnicas inherentes (Ej. test de disolución).
- Ensayos de límite de impurezas y de cuantificación de impurezas.
- Ensayos para la determinación de analitos en fluidos biológicos y en productos naturales.
- Ensayos microbiológicos.¹¹

4.2.5 Pasos para la validación

1. Desarrollar un protocolo de validación o procedimiento operacional para la validación.
2. Definir la aplicación, propósitos y alcance del método.
3. Definir los parámetros de idoneidad y los criterios de aceptación.
4. Definir los experimentos de validación.
5. Verificar las características relevantes de desempeño de los instrumentos.
6. Calificar los materiales, es decir, estándares y reactivos.
7. Llevar a cabo los experimentos de pre validación.
8. Ajustar los parámetros del método y/o los criterios de aceptación si es necesario.
9. Realizar los diferentes experimentos de validación (internos y externos)



10. Desarrollar los PNT para el empleo del método en análisis de rutina.
11. Definir los criterios para la revalidación.
12. Definir el tipo y la frecuencia de las pruebas de idoneidad del sistema y/o de los ensayos de control de calidad analítico (AQC) de rutina.
13. Documentar los experimentos de validación y los resultados en el reporte de validación.¹¹

4.3 Clasificación de los métodos analíticos

4.3.1 Según la normalización y estado de desarrollo del método:

Métodos estándar o normalizados.

Los métodos estándar son aquellos publicados por organizaciones internacionales, regionales o nacionales; por organizaciones técnicas respetables; referencias legales; métodos publicados por la FDA (Food and Drug Administration), y que se ejecutan tal como se describen en la norma.

Estos métodos incluyen aquellos publicados por:

- ✓ United States Pharmacopeia (USP)
- ✓ National Formulary (NF)
- ✓ Homeopathic Pharmacopeia of the United States
- ✓ Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC)
- ✓ International conference of harmonization (ICH)
- ✓ Pharmacopea Británica (BP)
- ✓ Farmacopea internacional (FI)

Se prefiere usar los métodos estándar, sin embargo es necesaria la verificación de la capacidad analítica dentro de los laboratorios en los cuales es usado. Un método estándar puede estar complementado con detalles adicionales sobre como los laboratorios deben proceder para asegurar una aplicación consistente.



Métodos desarrollados por el laboratorio.

En ocasiones cada laboratorio elabora sus propios métodos, esto puede deberse a que el análisis es muy específico y se evalúa, por ejemplo, cierta matriz especial que sólo interesa al laboratorio; o que debido a restricciones de tipo comercial no se puede disponer de métodos análogos usados en otras empresas o compañías. El laboratorio, por consiguiente, debe evaluar la capacidad de los analistas, equipos y otros recursos relacionados con el método en cuestión. Los métodos deben estar debidamente validados, documentados y autorizados para su uso.

Para la evaluación de la capacidad del método se sugiere realizar comparaciones con otros métodos normalizados. En lo posible se debe usar materiales de referencia, estándares o muestras fortificadas.

Métodos no normalizados.

Los métodos no normalizados son aquellos que no han sido publicados por fuentes autorizadas y/o validadas. Es muy probable que los métodos sin normalización no dispongan de datos de validación o estudios colaborativos fiables o suficientes, por esto se recomienda realizar una validación cuanto sea posible. Si el método sufre cambios se requerirá una re-validación del método.³

4.3.2 Según categoría de método:

Categoría I: pruebas cuantitativas del contenido del (los) principio(s) activo(s), constituyen procedimientos químicos o microbiológicos que miden el (los) analito(s) presente(s) en una muestra determinada.

Categoría II: pruebas para la determinación del contenido de impurezas o de valores límites para el control de impurezas. Pueden ser pruebas cuantitativas o una prueba cualitativa para determinar si la impureza está presente en la muestra por encima o por debajo de un valor límite especificado.



Categoría III: pruebas físicoquímicas de desempeño. Constituyen procedimientos de ensayo que miden características propias del desempeño del medicamento, por ejemplo la prueba de disolución.

Categoría IV: pruebas de identificación.¹²

Tabla N° 1. Parámetros de desempeño de los procedimientos analíticos.

Categoría de prueba Parámetro de desempeño	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
	Principio (s) Activo (s)	Prueba de límite cuantitativa	Prueba de límite cualitativa	Físico químico desempeño	Identificación
Exactitud	SI	SI	*	*	NO
Precisión	SI	SI	NO	SI	NO
Especificidad	SI	SI	SI	*	SI
Límite de detección	NO	NO	SI	*	NO
Límite de cuantificación	NO	SI	NO	*	NO
Linealidad	SI	SI	NO	*	NO
Intervalo	SI	SI	*	*	NO

*Puede requerirse dependiendo de la naturaleza del ensayo

4.3.3. Según la metodología de análisis que se realice, las validaciones pueden ser:

Prospectivas: para metodologías nuevas (sacar un nuevo producto).

Retrospectivas: para metodologías muy utilizadas que no han sido validadas de las cuales se posee suficiente información para ser validadas.



Revalidaciones: para metodías validadas en las cuales se han introducido cambios. El grado de validación dependerá de la naturaleza e importancia de los cambios.⁹

4.4 Parámetros de desempeño analítico

4.4.1 Selectividad

La **selectividad** es la capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultáneamente o separadamente los analitos de interés, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que puedan estar presentes en la muestra.²

Estas sustancias pueden ser precursores de la síntesis o subproductos de la misma, impurezas, excipientes o productos de degradación.¹

Frecuentemente el término especificidad se utiliza como sinónimo de selectividad, aunque debería de reservarse para aquellas situaciones donde la respuesta obtenida sólo se puede producir con una única entidad química, algo que no es posible cuando se refiere a procedimientos analíticos que emplean instrumentación no específica. Como existen muy pocos métodos que den respuesta sólo a un único analito, el término selectividad es normalmente más apropiado.

La presencia de interferencias puede tener distintos efectos en la determinación del analito como:

- Imposibilitar su inequívoca identificación (aparición de falsos positivos).
- Distorsionar la respuesta del analito (afectan normalmente a la pendiente y ordenada en el origen de la recta de calibrado). Este efecto puede delatar la presencia de interferencias desconocidas, aunque también puede ser consecuencia de recuperaciones no lineales.²

La selectividad en cromatografía líquida se obtiene mediante la elección de la columna óptima y el establecimiento de las condiciones cromatográficas, como la composición de la fase móvil, temperatura de la columna y longitud de onda del detector.¹¹



La selectividad de un método analítico se debería determinar antes de iniciar el estudio de cualquier otro parámetro de validación, dado que debe conocerse en qué grado la respuesta del método es únicamente proporcionada por el analito, sin interferencia de otras sustancias relacionadas con él de una u otra forma.²

Ámbito de aplicación.

En el análisis farmacéutico la tendencia mayoritaria es la utilización de métodos lo más selectivos posibles, en los que la presencia de otros componentes tienen escasa influencia en los resultados, por ejemplo métodos cromatográficos.

Para efectuar estudios de selectividad se precisa la máxima información sobre impurezas y productos de degradación potencialmente presentes en la muestra, así como sobre posibles interferencias debidas a excipientes u otros componentes.²

A grandes rasgos el estudio de la selectividad variará su planteamiento según el objetivo y la técnica analítica empleada.

Según objetivo del ensayo:

- **Identificación**

Se debe demostrar que el método es capaz de discriminar sin interferencias entre el analito, sustancias de composición similar y otros productos que puedan estar presentes en la muestra.

Durante el desarrollo de una molécula, la identificación requerirá la comprobación de la estructura de la molécula mientras que en un método para el control de calidad rutinario no será necesario la confirmación completa de la estructura química o composición del producto y bastará con la comparación con una sustancia de referencia. En estos casos el objetivo es confirmar, con un grado de seguridad aceptable, que el producto se corresponde con lo esperado.



- **Ensayos de impurezas**

Se debe garantizar que el método permite una evaluación de las impurezas y los productos de degradación definidos en estudios previos, sin interferencias de otras sustancias que puedan estar presentes en la muestra.

Para estos ensayos se presupone que se han realizado estudios previos y se han definido las impurezas y productos de degradación susceptibles de aparecer. Si el método es selectivo para determinados productos de degradación puede utilizarse para controlar la estabilidad del producto.

- **Determinación cuantitativa de un compuesto o riqueza de un principio activo**

El método debe evitar la presencia de excipientes, productos de degradación y/o impurezas en la respuesta proporcionada por el compuesto o el principio activo objeto de la evaluación analítica.

Según la técnica analítica aplicada:

- **Ensayos específicos**

Se considera apropiado reservar este término para aquellos métodos analíticos que proporcionen un 100% de selectividad. Este tipo de métodos representaría la situación ideal aunque en el análisis farmacéutico actual su utilización no es muy común. Se podrían considerar ensayos específicos algunos inmunoensayos, la espectroscopía de absorción atómica o un acoplamiento masas/masas.

- **Ensayos absolutos**

El uso de métodos de valoración no específicos se debe combinar con la utilización de otros procedimientos analíticos para demostrar la idoneidad del análisis, como por ejemplo, una valoración potenciométrica combinada con un test de impurezas.

- **Ensayos separativos**

Son los ensayos de más amplia aplicación en la industria farmacéutica actual aunque hay que recordar que no están libres de interferencias.



Este tipo de análisis proporciona una segunda vía de información que confirma la primera.

Entre las combinaciones posibles podemos citar las siguientes:

- Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de diodos (DAD).
- HPLC /Espectrometría de masas (MS).
- HPLC con confirmación por columnas de diferente polaridad.
- Cromatografía de gases (GC)/MS.
- GC/ Espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier (FT-IR).²

Procedimiento de determinación de la selectividad

En el estudio de la selectividad, como norma general, se comparan los resultados del análisis de muestras con y sin analito en presencia o ausencia de impurezas, productos de degradación, sustancias relacionadas y/o excipientes. Se pueden plantear diferentes alternativas para proceder a la demostración documental de la selectividad del método:

Por adición de las interferencias:

La primera aproximación sería de aplicación para aquellos analitos para los que se tienen identificadas las posibles interferencias y éstas se encuentran disponibles de forma aislada. Se evaluará a qué nivel se producen y si es preciso modificar el método o añadir alguna técnica complementaria. Para una forma farmacéutica y una materia prima los grupos de muestras que se preparan son los siguientes:

Determinaciones para la forma farmacéutica	Determinaciones para la materia prima
Matriz	Blanco
Analito	Analito
Matriz + Analito	Otras sustancias similares
Matriz + Analito + Impurezas (Disolventes residuales, Trazas Metálicas) + Productos de Degradación	Analito, Producto de Degradación Impurezas (Disolventes Residuales, Trazas Metálicas, Reactivos de Síntesis



La elección de la concentración en la que se realiza el estudio podría ser la teórica de trabajo para el principio activo u otros compuestos de interés (ej. conservantes) y las interferencias a su límite máximo establecido. En caso de que se observen interferencias, su nivel puede evaluarse a partir del análisis de seis replicados y el grado de discrepancia entre las determinaciones en presencia o ausencia de las posibles interferencias mediante la fórmula siguiente:

$$\% \text{ de Discrepancia} = \frac{(D_i - D_s)}{D_s} \times 100$$

Dónde:

D_i : respuesta media con interferencias D_s : respuesta media sin interferencias

También sería de aplicación una prueba t de Student para comprobar la existencia o no de diferencias significativas entre los dos grupos. En métodos muy precisos dicha prueba puede indicar la existencia de diferencias significativas cuando realmente la influencia de las interferencias es aceptable. En estos casos conviene determinar el intervalo de confianza de la diferencia entre los grupos.

Aplicación de técnicas confirmatorias con muestras sometidas a estrés

Otra posible aproximación se puede realizar mediante el estudio de muestras sometidas a estrés para generar los compuestos potencialmente interferentes. Este tipo de estudios adquiere especial importancia para los métodos en que se desea evaluar la estabilidad de un principio activo o forma farmacéutica. Se debe comprobar, a ser posible, la identidad del analito y que la señal proviene sólo de él. Las condiciones de estrés para lograr una degradación del orden del 10-20% en la mayoría de los principios activos son:

Condiciones para la forma farmacéutica	Condiciones para la materia prima
Calor (40 - 70 °C)	Calor (40 - 100 °C)
Luz	Luz
Humedad relativa (85%)	Ácido (HCl 0.1 N)
	Base (NaOH 0.1 N)
	Oxidante (H ₂ O ₂ 3%)



Los productos así tratados son analizados y se evalúa la pureza cromatográfica y su resolución respecto a los picos más próximos. Un criterio de selectividad para los métodos cromatográficos sería para el pico principal y el conjunto de impurezas superiores al 0.1%, para obtener una resolución cromatográfica superior a 1.5 (los picos están resueltos hasta la línea de base). Puede ser necesario ampliar este criterio si aparecen colas en los picos que no permite su clara separación. Si no es posible una perfecta separación debe demostrarse que el valor de la interferencia no es superior al 0.5%.

La evaluación de la degradación se puede determinar comparando los perfiles obtenidos del producto estresado y no estresado. Con esta finalidad puede ser de interés la superposición de los distintos cromatogramas obtenidos.²

La siguiente tabla indica los criterios de aceptación recomendables. No todos los parámetros son de aplicación en todos los casos.²

Parámetro	Criterio de aceptación propuesto
Capacidad de discriminación del procedimiento	El método ha de permitir distinguir entre todas las especies químicas que puedan generarse.
Resolución cromatográfica entre picos cercanos	> 1.5
Factor de cola cromatográfico	< 2
N ⁰ de platos teóricos cromatográficos	> 2000
Identidad del pico cromatográfico	Pureza de pico ausencia de coelución

4.4.2 Linealidad y Rango

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido. Siempre que sea posible se buscará una respuesta de tipo lineal que facilitará su trazado, interpolación e interpretación.²



La linealidad puede ser del sistema o del método:

Del sistema: cuando la recta de regresión se realiza con el analito puro.

Del método: cuando la recta de regresión se obtiene mediante ensayos realizados sobre la matriz adicionada del analito.¹

El rango se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior del analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito.²

Ámbito de aplicación

Según la guía ICH Q2A se recomienda estudiar la linealidad en todos los métodos de tipo cuantitativo:

- Valoración del contenido de principio activo.
- Uniformidad de contenido
- Velocidad de disolución
- Cuantificación de impureza.²

4.4.2.1 Procedimiento de determinación de la linealidad para la cuantificación de un principio activo: Para evaluar la linealidad existen unos criterios mínimos aplicables a cualquier procedimiento:

- Dentro del rango establecido se recomiendan estudiar al menos cinco niveles de concentración y analizarlas por triplicado ($K=5$, n° de réplicas = 3) con un total de 15 determinaciones ($n=15$). Por ejemplo: 80, 90, 100, 110 y 120% del contenido teórico. Estadísticamente lo correcto sería analizar las muestras de forma aleatoria, no obstante, se establece como criterio práctico analizarlas en sentido creciente de concentración para minimizar posibles efectos memoria en el equipo.
- Para realizar los análisis se recomienda hacer pesadas independientes (por ejemplo 15 pesadas), ya que así se elimina el posible error sistemático que se podría arrastrar partiendo de una sola pesada y realizando diluciones.



- El número de repeticiones de cada muestra (por ejemplo el número de inyecciones en HPLC) dependerá de la precisión del sistema instrumental empleado, y de lo que se decida incluir como rutina en el procedimiento a validar.²

Con los resultados del estudio de la linealidad se prepara una tabla relacionando las cantidades o concentraciones x (variable independiente) y la respuesta y (variable dependiente, por ejemplo áreas, alturas, absorbancias). La relación entre ambas variables se expresa matemáticamente como una recta de regresión del tipo $y = bx + a$, obtenida por un método de ajuste (por lo general el de mínimos cuadrados). En algunos casos podría ser necesaria alguna transformación matemática previa (uso de logaritmos, recíprocos de las variables, etc.) para obtener funciones lineales.

La representación gráfica de la recta de regresión en un sistema de coordenadas junto con los valores experimentales, permite visualizar la bondad del ajuste. Se pueden representar además las hipérbolas indicativas de los intervalos de confianza.

Si la recta no pasa cerca del origen de coordenadas significa que el método a evaluar está afectado por un error sistemático por defecto o por exceso en intervalo estudiado. Si existen diferencias apreciables entre los valores experimentales y los puntos de la recta significa que la linealidad no es buena (existe falta de ajuste) o bien que el error experimental es importante y los intervalos de confianza serán amplios (hipérbolas anchas).²

4.4.2.2 Evaluación estadística de la linealidad

Además de la representación gráfica la linealidad implica una comprobación estadística:

Ecuación de la recta. Pendiente y ordenada en el origen

En la recta de regresión $y = bx + a$, x es la concentración, y la respuesta, b el valor de la pendiente y, a el término independiente.

La pendiente b se encuentra relacionada con la sensibilidad del método de forma que a mayor pendiente mayor sensibilidad (respuesta del método frente a los cambios de la



concentración del analito). El término independiente **a**, u ordenada en el origen, es la intersección de la recta con el eje de ordenadas y es indicativo del error sistemático, no difiriendo estadísticamente de cero en caso de no existir sesgo.

Coefficiente de correlación (r) y coeficiente de determinación (r²)

El coeficiente de correlación nos indica el grado de relación entre la variable **x** (concentración), y la variable **y** (respuesta). Su valor máximo es 1. Si **r** es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Un valor nulo indica ausencia de relación lineal entre las variables.

El valor recomendado para el coeficiente de correlación es ≥ 0.999 , aunque en el caso de impurezas se admite ≥ 0.990 . La información obtenida mediante el cálculo de **r** es limitada y no justifica por sí sola la linealidad, siendo **r²** coeficiente de determinación el que aporta una mayor significación estadística ya que expresa la proporción de la variación total de **y** explicada por el modelo.

Variación residual constante (homoscedasticidad)

La representación de los residuales **e_i** aporta mucha información acerca de la validez del modelo. De entre las diversas formas de hacerlo la más habitual consiste en representar los residuales (eje de ordenadas) frente a los valores estimados (eje de abscisas). La distribución de los puntos debería ser aleatoria y no reflejar ninguna tendencia.

Análisis de la Variación: ANOVA

Para poder realizar una ANOVA se deben cumplir los siguientes supuestos:

- a) Homogeneidad de variancias
- b) Normalidad de los residuales

a) **Homogeneidad de variancias:** esta se puede comprobar aplicando, por ejemplo, un test de Cochran (**G_{exp}**) que indicará si el factor de concentración tiene alguna influencia en la variabilidad de los resultados.



El valor de G_{exp} se calcula de la siguiente forma:

$$G_{exp} = \frac{s^2_{m\acute{a}xima}}{\sum s_i^2} = \frac{s^2_{m\acute{a}xima}}{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2 + s_4^2 + s_5^2}$$

S_i^2 : variancia de cada grupo k

$S^2_{m\acute{a}xima}$: variancia máxima de los k grupos.

Las variancias no deben ser estadasticamente diferentes entre sí, para el grado de significación escogido, generalmente $\alpha=0.5$.

b) **Normalidad de los residuales** se puede comprobar mediante la representación gráfica que algunos programas estadasticos realizan de los mismos o bien aplicando un test de normalidad.

Una vez comprobado estos supuestos se calcularan los estadasticos F_1 y F_2 .

$F_{1exp} > F_{1\ tabla}$ demuestra una pendiente distinta de cero.

$F_{2exp} < F_{2\ tabla}$ demuestra la linealidad entre los resultados obtenidos.

Los valores tabulados para F se obtienen en las tablas estadasticas de acuerdo a los grados de libertad correspondientes y a un grado de significación α normalmente igual a 0.05.²

4.4.3 Precisión

La precisión expresa el grado de concordancia (grado dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas.

El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad o el más-menos del método de ensayo. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Como consecuencia de la existencia de estos errores, los análisis efectuados sobre muestras idénticas, en las mismas circunstancias, no conducen generalmente a resultados idénticos. Los factores susceptibles de influir sobre los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados (analista, equipo instrumental, reactivos, tiempo, etc.) de aquí la importancia del estudio de la precisión.²



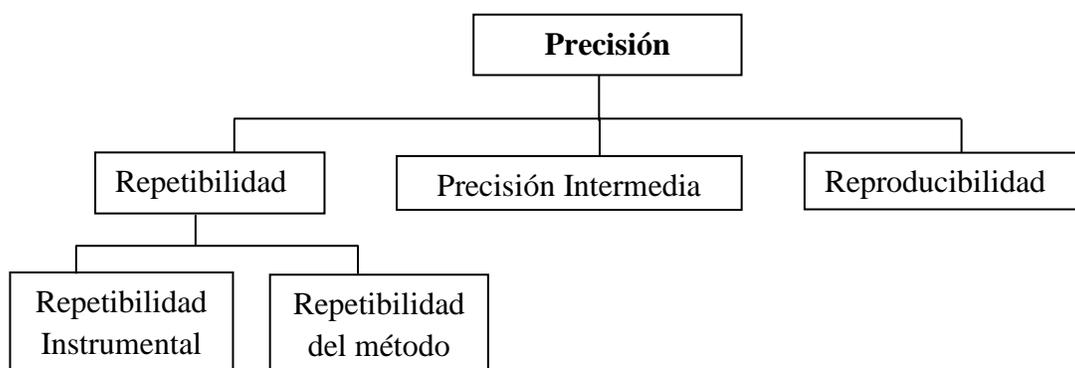
La precisión generalmente se evalúa a nivel de:

- Precisión del sistema
- Precisión del método

Precisión del sistema: se determina evaluando la dispersión obtenida al aplicar el método a una preparación del estándar y lista para el análisis directo del analito (sin tratamiento adicional).

Precisión del método: se determina aplicando el método completo a muestras homogéneas o aún a placebos que contengan una cantidad conocida del analito equivalente a la del producto farmacéutico.

La precisión engloba diferentes puntos de estudio: ¹



Repetibilidad: estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, por los mismos aparatos y reactivos, etc.), en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.

Precisión Intermedia: estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra pero en condiciones operativas diferentes (diferentes analistas, aparatos, vías, etc.) y en un mismo laboratorio.

Reproducibilidad: estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios.



	Repetibilidad	Precisión Intermedia	Reproducibilidad
Instrumento	igual	diferente	diferente
Día de análisis	igual	diferente	diferente
Analista	igual	diferente	diferente
Otros factores (p.ej. columna cromatográfica, reactivos, condiciones ambientales, etc.)	igual	diferente	diferente
Laboratorio	igual	igual	diferente

La precisión de un método analítico se expresa generalmente como el coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas.²

Ámbito de aplicación

Según la ICH Q2B el estudio de la precisión se debe realizar únicamente para la determinación cuantitativa de principios activos y cuantificación de impurezas.²

4.4.3.1 Repetibilidad

La repetibilidad se expresa matemáticamente por el coeficiente de variación (desviación estándar relativa) de una serie de medidas.

Uno de los factores que más pueden influir en la repetibilidad del método de análisis es la concentración del analito, ya que la desviación estándar de las respuestas obtenidas aumenta al disminuir la concentración del analito. Por otro lado, el valor aceptado del coeficiente de variación depende del intervalo de aceptación (especificaciones) especificado en el método de análisis. El número de replicados se deduce a partir del CV de repetibilidad del método.²



4.4.3.1.1 Repetibilidad del sistema instrumental

Este parámetro estudia la variabilidad debida únicamente al instrumento, y se determina analizando repetidamente una misma muestra de forma consecutiva de 6 a 10 veces. En el caso que se desee analizar el principio activo de una materia prima o de una especialidad farmacéutica se prepara la muestra a la concentración nominal, y en el caso de analizar impurezas a la concentración de límite especificado.

La estimación de la repetibilidad instrumental se realiza con el cálculo del coeficiente de variación de las respuestas obtenidas. Para especialidades farmacéuticas y materia prima suelen aceptarse valores inferiores al 1-2 %.²

4.4.3.1.2 Repetibilidad del método

El ensayo de repetibilidad del método se efectúa sobre una serie de alícuotas de una muestra homogénea que se analiza independientemente desde el principio (preparación de muestra) hasta el final (lectura de resultados) por el mismo instrumento y el mismo analista.

Se proponen dos alternativas para realizar este estudio:

- Un mínimo de 6 muestras a la concentración nominal.
- Un mínimo de 3 muestras a tres niveles de concentración cubriendo el intervalo especificado (un total de 9 muestras).

La estimación de la repetibilidad del método se realiza con el cálculo del coeficiente de variación de las respuestas obtenidas y con los intervalos de confianza a cada nivel de concentración estudiado.²

Los valores aceptables del coeficiente de variación del sistema instrumental deben ser inferiores a los valores que se aceptan para el coeficiente de variación del método. La expresión matemática que permite relacionar ambos coeficientes de variación es: ²

$$CV \text{ método} = CV \text{ sistema} * \sqrt{2}$$



Intervalos de confianza

La guía ICH Q2B recomienda introducir los intervalos de confianza en el estudio de la precisión. Estos intervalos deben determinarse para cada nivel de concentración estudiado.

Los intervalos de confianza se calculan a partir de:

- Los resultados individuales $X \pm t * s$
- Los resultados promedio $X_p \pm t * s/\sqrt{n}$

Donde:

X_p = media de una serie de resultados obtenidos en un mismo nivel de concentración.

t = valor de la t Student de tablas para $n-1$ grados de libertad y α : 0.05

n = número de análisis

s = desviación estándar.²

4.4.3.2 Precisión intermedia

El objetivo del estudio de la precisión intermedia es determinar la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, en un mismo laboratorio pero en condiciones operativas diferentes.

En el estudio de la precisión intermedia se deben considerar aquellas circunstancias en las que se pretende desarrollar el método de ensayo. El analista debe evaluar los efectos causados al variar una serie de factores. Típicos factores a estudiar incluyen el día, analista, el instrumento, etc. No es necesario estudiar cada uno de estos factores individualmente sino que es suficiente comprobar que la variabilidad aportada por el conjunto de factores está dentro de los límites establecidos.

Para estudiar los factores de una manera aleatoria se recomienda un estudio matricial y, para cada combinación de éstos, las muestras deben ser preparadas independientemente como mínimo por triplicado.



La estimación de la precisión intermedia se realiza con el cálculo del coeficiente de variación global de las respuestas obtenidas, es decir, considerando cada resultado independientemente.

Generalmente se aceptan valores de coeficiente de variación de la precisión intermedia inferiores al doble del coeficiente de variación de la repetibilidad del método. En caso de que no se cumpla es necesario evaluar cuál es el factor responsable de esta variabilidad. Se recomienda, además, determinar el coeficiente de variación para cada grupo de análisis para comprobar que se cumplen las especificaciones establecidas en la repetibilidad del método.²

4.4.3.3 Reproducibilidad

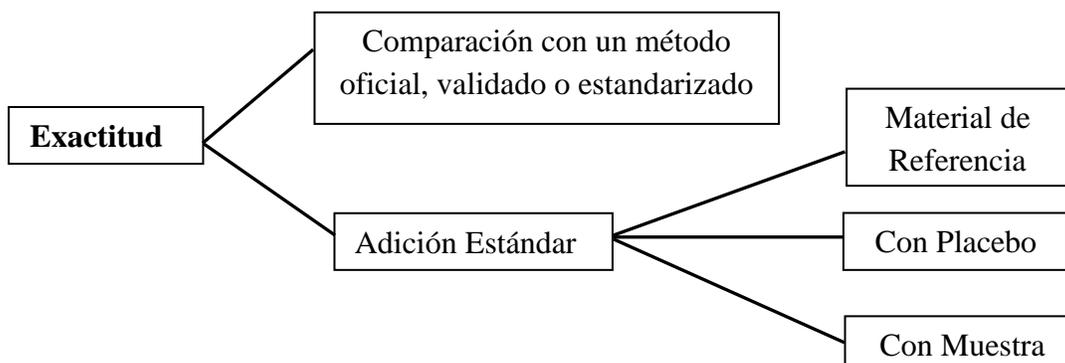
La reproducibilidad estudia la variabilidad de los resultados inter-laboratorio. El objetivo de este estudio es verificar que el método de análisis proporciona los mismos resultados en diferentes laboratorios. La reproducibilidad de dicho método de análisis se determina analizando una serie de alícuotas procedentes de lotes homogéneos en diferentes laboratorios, diferentes analistas y utilizando condiciones operativas y ambientales distintas.

Este estudio no es de obligado cumplimiento y se debe realizar solamente en aquellos casos en que se quiera transferir el método a otros laboratorios o incluirlo en guías oficiales (las farmacopeas).²

4.4.4 Exactitud

La exactitud de un método analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado.

Existen diferentes maneras de determinar la exactitud, los siguientes son los más frecuentes en la literatura, y pueden ser utilizados en todos los tipos de análisis.⁹



La no exactitud (inexactitud) puede presentarse:

- a) Por defecto: suelen darse en métodos analíticos muy elaborados.
- b) Por exceso: generalmente se suceden cuando existen interferencias analíticas y la selectividad del método no es adecuada.¹

Ámbito de Aplicación

Según la guía (ICH, Q2A) debe ensayarse la exactitud en métodos de análisis para la valoración en materia prima, en producto acabado y en métodos de análisis de cuantificación de impurezas.²

Procedimiento de determinación de la exactitud

La exactitud debe demostrarse en todo el rango especificado para el método analítico. Se recomienda un mínimo de 9 determinaciones sobre 3 niveles de concentración del analito que cubran el rango especificado.

En función del tipo de método a validar y de cada caso concreto se deberá de tener en cuenta el rango de concentraciones de trabajo:

- Riqueza de un principio activo en materia prima o en producto acabado: 80-120%.
- Impurezas: desde el 50% del nivel de especificación hasta el 120% de dicho nivel.
- Ensayo de disolución: si se trata de un producto de liberación inmediata sería de $Q \pm 20\%$; si se trata de un producto de liberación controlada, sobre cada límite de disolución en cada período de tiempo se aplicaría $(\pm 2\%)$.²



La exactitud se expresa como porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito añadida sobre la muestra o como la diferencia entre la media obtenida y el valor aceptado como verdadero junto a los niveles de confianza.²

Aplicación del método analítico a una muestra de concentración conocida

La muestra de concentración conocida se prepara a partir de un placebo cargado con cantidades conocidas de analito, o bien, cuando es difícil o imposible obtener un placebo que no contenga el analito en cuestión, se puede usar el método de adición de patrón sobre el problema.

- **Método del placebo cargado:** se prepara un placebo del problema que contiene todos los ingredientes excepto el analito a determinar. Sobre dicho placebo se añaden cantidades conocidas de un analito patrón a tres niveles de concentración dentro del rango a estudiar. El ensayo de recuperación se realiza como mínimo con tres replicados para cada nivel. El analito se determina en cada muestra utilizando el mismo método analítico a evaluar y se calcula la recuperación.
- **Método de adición de patrón:** se añaden sobre una o varias muestras cantidades conocidas de un analito patrón a tres niveles de concentración dentro del rango a estudiar. Se realizan como mínimo tres replicados para cada nivel y se analizan las muestras adicionadas y no adicionadas según el método analítico calculando finalmente la recuperación.
- **Comparación con un método de referencia validado:** se comparan los resultados obtenidos con el método analítico que se quiere validar con los obtenidos con un método de referencia cuya exactitud está bien determinada o definida. Ambos métodos deben de ser independientes.²

Criterios de aceptación.

La recuperación esperada depende de la matriz de la muestra, del procedimiento de preparación de la muestra y de la concentración del analito en la misma.²



Criterios de aceptación que pueden orientar en la estimación de la recuperación: ²

A. Valores orientativos aceptables en la industria farmacéutica.

Tipo	% Recuperación
Materia prima	99 – 101
Formulado farmacéutico	97 - 103
Trazas (0.1 a 10ppm)	Min. 90%
Trazas (menor a 0.1ppm)	Min. 75%

B. Valores orientativos aceptables según la AOAC en función de la concentración del analito (AOAC, 1993, Huber, 1999).

% Analito	Relación	Unidades	Factor de recuperación %
100	1	100%	98-102
Mayor o igual a 10	10^{-1}	10%	98-102
Mayor o igual a 1	10^{-2}	1%	97-103
Mayor o igual 0.1	10^{-3}	0.1%	95-105
0.01	10^{-4}	100ppm	90-107
0.001	10^{-5}	10ppm	80-110
0.0001	10^{-6}	1ppm	80-110
0.00001	10^{-7}	100ppb	80-110
0.000001	10^{-8}	10ppb	60-115
0.0000001	10^{-9}	1ppb	40-120

4.4.5 Límite de detección y límite de cuantificación.

Se entiende por límite de cuantificación de un método, la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo las condiciones experimentales descritas, con una adecuada exactitud y precisión; y por límite de detección la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar bajo dichas condiciones experimentales.

El límite de cuantificación es por tanto un término cuantitativo mientras que el límite de detección es cualitativo, encontrándose entre ambos términos un rango de concentraciones



en el que si bien no puede cuantificarse el analito en cuestión con razonable certeza, si puede detectarse su presencia sin incurrir en falsos positivos.²

Ámbito de aplicación

La guía tripartita ICH establece como necesaria la determinación del límite de detección en métodos de análisis destinados a la evaluación de impurezas mediante ensayos límite. Por el contrario se considera necesario establecer únicamente el límite de cuantificación en métodos destinados a la determinación numérica de impurezas.

Siempre que el método de análisis se emplee en la determinación de impurezas o trazas de principio activo, sería muy recomendable de entrada establecer no sólo el límite de detección sino también el límite de cuantificación.²

Procedimientos de determinación del LD y LC

- **Método basado en el examen visual**

En este caso, según ICH Q2B, tanto el LD como el LC podrían determinarse a partir del análisis de muestras con concentraciones conocidas y decrecientes de analito, estableciéndose visualmente la mínima concentración detectable así como aquella concentración límite que permite cuantificar con razonable precisión y exactitud la señal obtenida.

Este método es el más indicado en el caso de métodos de análisis no instrumentales en los que no se tiene una señal numérica.

- **Método basado en la relación señal/ ruido**

Requiere que el procedimiento de análisis sea instrumental, se establece la señal ruido que proporciona un blanco o placebo a partir del análisis reiterado de dicho blanco (se recomienda un mínimo de 6-10 análisis consecutivos). En el caso de métodos espectrofotométricos el analista puede obtener fácilmente la lectura de absorbancia de soluciones placebo usando las condiciones instrumentales descritas, para métodos



cromatográficos el cálculo de dicha señal-ruido es más costoso pero una vez establecido este valor puede concluirse de forma teórica y aproximada que el LC será igual a la concentración de analito que proporcione una señal 10 veces mayor (en ocasiones se admite hasta un valor de 20) a dicho ruido de fondo, y que el LD será igual a la concentración de analito que proporcione una señal 3 veces superior a éste.

Es posible que no sea necesario alcanzar el verdadero límite del método siempre y cuando el LC encontrado sea inferior al 50% del valor límite de las especificaciones de impurezas.²

- **Método basado en la desviación estándar de la respuesta del blanco y la pendiente de la recta de calibrado**

De acuerdo con la IUPAC, puede calcularse el LD y el LC de un método analítico a partir del conocimiento de la desviación estándar atribuible a la respuesta de una muestra placebo y la pendiente de la recta de calibrado del analito.

- **Métodos instrumentales que no corrigen la señal frente a un blanco**

Utilizados típicamente en métodos cromatográficos GC o HPLC. En éstos se ha de tener en cuenta también la señal media obtenida del análisis correspondiente al placebo, es decir, el ruido de fondo del sistema (Y_{bl}) con lo que la expresión final sería:

$$C_l = \frac{Y_{bl} + (K * S_{bl})}{b} \quad \text{o} \quad C_l = \frac{Y_{bl} + (K * S_{bl})}{b * \sqrt{n}}$$

- **Método basado en la extrapolación de la recta de calibrado a concentración cero**

Se trata de un procedimiento aplicable también a métodos analíticos instrumentales que proporcionan resultados numéricos y dirigido a evitar el cálculo, en ocasiones costoso en tiempo, de la señal media del blanco y su desviación estándar. Para ello el método utiliza la pendiente de una recta de calibrado realizada a niveles de concentración cercanos a los límites esperados, pero sustituye el valor real de la señal del blanco por el resultante de la extrapolación de dicha recta. La intersección con el eje "Y" corresponderá teóricamente al valor de la respuesta a concentración cero del analito. De la misma manera se sustituye en



la fórmula, la desviación estándar del blanco por la obtenida de estimar a partir de esta recta la de un hipotético blanco.

Experimentalmente, consiste pues en analizar muestras con concentraciones conocidas próximas al límite de cuantificación y calcular la ecuación de la recta Respuesta frente a concentración, y aplicar las mismas fórmulas que las expuestas en el apartado anterior.

- **Método experimental de cálculo para el LC (Método EURACHEM)**

Cuando no existe la posibilidad de tener una muestra placebo o cuando se especifica un criterio concreto de precisión y exactitud, un método experimental, sencillo y eficaz, para el cálculo de LC es el método EURACHEM.

Consiste en preparar una serie de muestras con cantidades decrecientes de analito y analizar cada una de ellas 6 veces consecutivas, representando CV (%) de la precisión frente a la concentración de cada muestra.

Normalmente se fija un criterio de precisión de un CV igual a 10% en el límite de cuantificación, aunque se puede llegar a aceptar hasta un 20 %, en función de las características del método.²

4.4.6 Robustez.

La robustez de un método analítico se define como la medida de su capacidad para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando idea de su fiabilidad o "estabilidad" durante su empleo en rutina. Es por tanto la capacidad que demuestra el procedimiento de análisis para proporcionar resultados válidos en presencia de pequeños cambios respecto de las condiciones descritas en el método, susceptibles de producirse durante su utilización.²

Ámbito de aplicación

Todos los métodos, sea cual sea la técnica empleada, son susceptibles de ser sometidos a un estudio de robustez.²



Procedimientos de determinación de la robustez:

1. Identificar los factores que se verificarán.
2. Definir los diferentes niveles para los factores.
3. Seleccionar el diseño experimental.
4. Definir el diseño experimental.
5. Definir las respuestas a ser determinadas.
6. Realizar el experimento y determinar las respuestas del método.
7. Calcular el o los efectos.
8. Análisis gráfico o estadístico de los efectos.
9. Obtener las conclusiones de acuerdo al análisis estadístico y si es necesario, tomar las medidas necesarias para mejorar el desempeño del método.¹

Factores y niveles de influencia

Antes de definir los factores de variación, hay que establecer dónde se quieren estudiar su influencia. Dicho de otra forma, que parámetros se van a medir en cada ensayo. En el caso de un análisis cuantitativo resulta evidente que se debe analizar la influencia de cada variable sobre la concentración de analito calculada. Pero en el caso de la cromatografía, por ejemplo si hay presente más de un analito interesará estudiar la influencia de cada factor sobre los parámetros que después definirán el test de idoneidad del método.

El estudio de la influencia sobre varios parámetros NUNCA implica la realización de más ensayos, sino que se puede hacer a partir de los mismos.²

Los factores a evaluar en cualquier método de análisis pueden ser tanto factores cuantitativos como cualitativos.²

Factores para HPLC

- Composición de la fase móvil:
 - Porcentaje de orgánico
 - Concentración de sales en el tampón (fuerza iónica)
 - Concentración de aditivos



- En gradientes: composición inicial y final de la fase móvil y pendiente del gradiente
- Volumen de inyección
- pH de la fase móvil
- Flujo
- Tipo de columna:
 - Fabricante de la fase estacionaria
 - Lote de columna
 - Antigüedad de la columna
- Detector: variación de longitud de onda o voltaje
- Sensibilidad de integración ²

Selección del diseño experimental

Los factores se estudian en un diseño experimental, el cual se selecciona de acuerdo al número de factores que se quieren investigar.

Todos los diseños posibles se establecen estudiando cada factor a dos niveles y permiten explorar un número relativamente grande de factores mediante un número relativamente pequeño de experimentos. Los tipos de diseños son:

- Diseños factoriales completos y fraccionados
- Plackett-Burman (Youden Steiner).¹

Para ambos casos existen dos posibilidades:

1. Diseño mínimo
2. Interpretación estadística según factores simulados.¹

4.4.7 Incertidumbre

La incertidumbre de un resultado es un parámetro que describe un intervalo dentro del cual se espera que se encuentre la cantidad medida, teniendo en cuenta todas las fuentes de error.¹³



Para expresar la incertidumbre se emplean tres símbolos:

1. La **incertidumbre estándar** (u) expresa el concepto como una desviación estándar.
2. **Incertidumbre estándar combinada:** incertidumbre estándar de una medida cuando dicho resultado se obtiene a partir de los valores de otras magnitudes. Se calcula a partir de las incertidumbres estándar de dichas magnitudes, aplicando la propagación de la ley de errores aleatorios. Se expresa por $u_c(y)$
3. La **incertidumbre expandida** (U) define un intervalo que abarca una fracción grande de valores dentro de los cuales caerá la cantidad que se está midiendo y se obtiene multiplicando u_c por un factor de cobertura, k , elegido según el grado de confianza exigido para el rango es decir, $U = u_c(y) * k$. Puesto que u es análoga a una desviación estándar, si k es 2 (este es el valor por defecto generalmente tomado si no se da otra información), entonces U proporciona aproximadamente una mitad del intervalo de confianza del 95%.⁹

Tipos de Incertidumbre

De acuerdo al documento Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, una guía general, avalada por los organismos BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, OIML, señala que existe dos tipos de incertidumbre, que designa con las letras A y B, dependiendo de la forma como se han obtenido sus valores para incorporarlos en los cálculos de la incertidumbre combinada o expandida.

- **Incertidumbre tipo A:** representa componentes que pueden ser evaluados a partir de distribuciones estadísticas de serie de resultados (por tanto, experimentalmente en un laboratorio y generalmente expresada por desviaciones estándar).
- **Incertidumbre tipo B:** también pueden caracterizarse por desviaciones estándar, son aquellas que se evalúan a partir de distribuciones de probabilidad supuestas, basadas en la experiencia o en otro tipo de información. Son valores que generalmente no se han obtenido en el propio laboratorio; por ejemplo a través de certificados que acompañan al material volumétrico, a los materiales de referencia, etc.⁹



Procedimiento para evaluar y expresar incertidumbres

En el año de 1995, EURACHEM, publicó un documento sobre el cálculo de incertidumbres en las medidas analíticas (Quantifying uncertainty in analytical measurement). En dicho documento se matizan las etapas a seguir para estimar incertidumbres en los laboratorios analíticos:

1. Etapa. *Especificación* (identificación clara), tanto del mesurado como del procedimiento experimental de medida.
2. Etapa. *Identificación de las fuentes de incertidumbre*. Se trata de enumerar las fuentes potenciales de incertidumbre de un proceso analítico concreto (por ejemplo, el muestreo, la extracción, los equipos de medida, la pureza de los reactivos, etc.). Algunas de estas fuentes de incertidumbre pueden no ser totalmente independientes y sería necesario establecer covarianza.
3. Etapa. *Cuantificación de la incertidumbre*. Se trata de simplificar al máximo el problema. Para ello se hace primero una estimación preliminar del orden de magnitud de cada componente de la lista para eliminar aquellos no significativos y agrupar otros componentes que puedan estimarse globalmente. Se señalan cuatro formas básicas para estimar los componentes individuales :
 - Cuantificación experimental.
 - Empleo de materiales de referencia.
 - Estimaciones basadas en resultados o datos previos.
 - Estimaciones basadas en el criterio del analista.
4. Etapa. *Calculo de la incertidumbre combinada*, a través de las leyes de propagación de incertidumbres.
5. Etapa. *Calculo de la incertidumbre expandida* para un cierto nivel de confianza (generalmente, el 95%, en cuyo caso el factor de cobertura es $k= 2$).⁹

4.5 Cromatografía

4.5.1 Consideraciones generales



La cromatografía es la ciencia y arte de separar entre sí los componentes de una sustancia. La separación se consigue a través de una gran variedad de técnicas cuyas bases moleculares tienen diferencias muy diversas. Por ejemplo, se pueden separar moléculas en función de sus cargas moleculares, sus tamaños moleculares, sus masas moleculares, la polaridad de sus enlaces, sus potenciales redox, sus constantes de ionización o bien en función de la disposición de sus enlaces, que determina su estructura isómera o su quiralidad. Como resultado hay una gran variedad de técnicas para llevar a cabo la separación de una sustancia.¹⁴

La separación se realiza debido a las diferencias de afinidad de los componentes a separar por la fase móvil y la fase estacionaria. Los componentes separados pueden ser cuantificados por medio de la determinación de alguna propiedad fisicoquímica y su comparación contra la misma propiedad en un estándar de composición y purezas conocidas.¹⁵

4.5.2 Características de la fase móvil y estacionaria en cromatografía líquida de alta eficacia.

Fase móvil

- a. La fase móvil es la que se traslada a través de la fase estacionaria.
- b. Es la responsable de contener y trasladar al analito o sustancia a ser analizada, a través de la fase estacionaria.
- c. En general el traslado de la fase móvil se realiza mediante mecanismos de presión y/o gravedad.
- d. Para que el analito pueda ser trasladado por la fase móvil, es necesario que sea soluble en ésta.
- e. La fase móvil es un líquido.¹⁵

Fase estacionaria

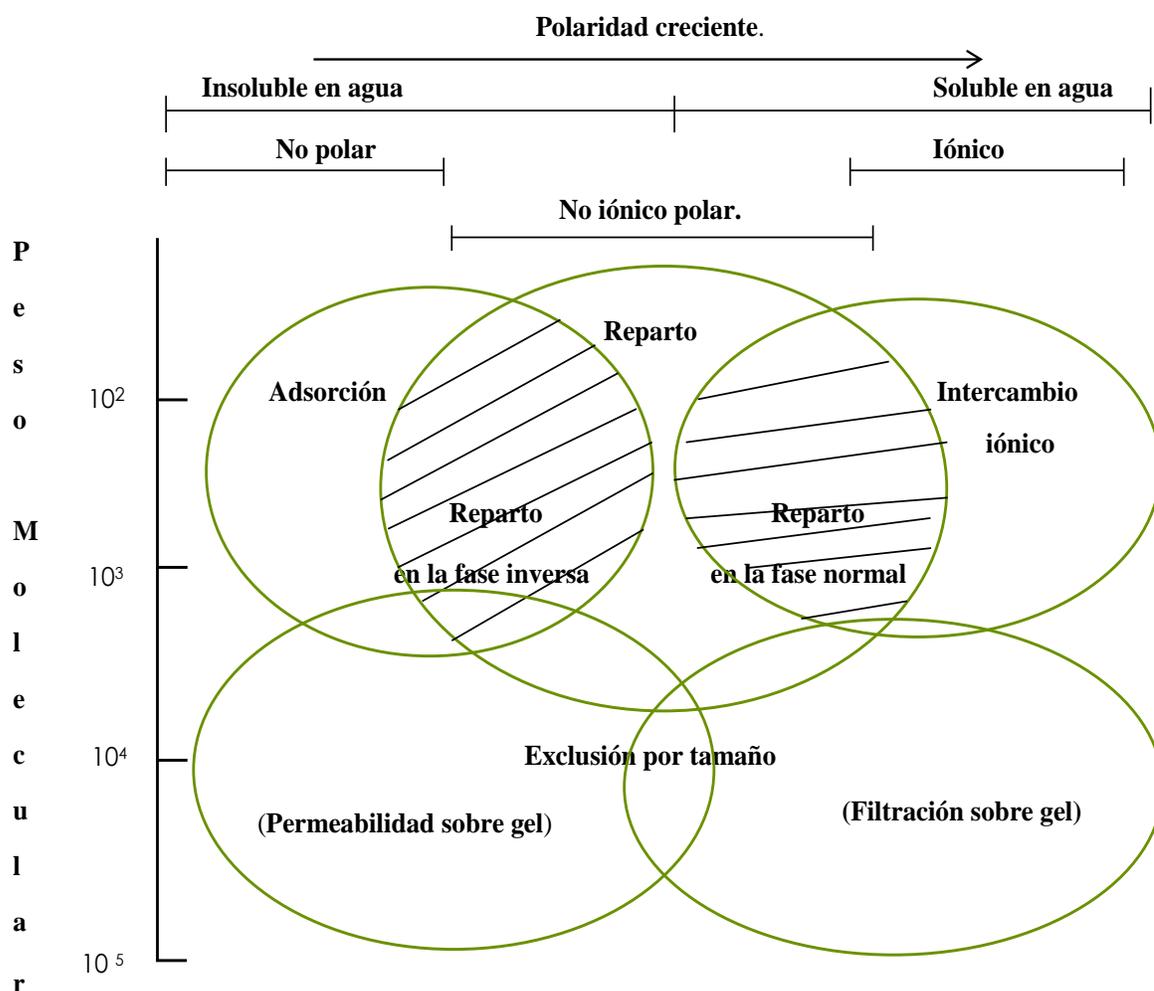
- a. La fase estacionaria es un lecho estacionario de gran superficie y es la responsable de la separación cromatográfica del analito.



- b. Está compuesta de un material insoluble con la fase móvil, que permite la separación del analito o sustancia a ser analizada mediante diversos mecanismos de interacción y/o afinidad, que se establecen entre ambos.
- c. En general la fase estacionaria es un sólido finamente dividido o un líquido dispuesto sobre un sólido como soporte (superficie plana, columna).¹⁵

4.5.3 Clasificación de la cromatografía líquida de resolución

- 1) Cromatografía de reparto
- 2) Cromatografía de adsorción o cromatografía líquido-sólido
- 3) Cromatografía iónica
- 4) Cromatografía de exclusión por tamaño o cromatografía en geles⁴





La figura pone de manifiesto que los distintos procedimientos que utilizan la cromatografía de líquidos tienden a ser complementarios por lo que a sus campos de aplicación se refiere. Así, para solutos con masas moleculares superiores a 10000 a menudo se utiliza la cromatografía de exclusión por tamaño, aunque ahora también es posible tratar estos compuestos con cromatografía de reparto en fase inversa. Para especies iónicas de masa molecular más pequeña, se utiliza con frecuencia la cromatografía de intercambio iónico. Los métodos de reparto se aplican a las especies pocos polares pero no iónicas. La cromatografía de adsorción se elige con frecuencia para separar especies no polares, isómeros estructurales y grupos de compuestos como, por ejemplo, los hidrocarburos alifáticos de los alcoholes alifáticos.⁴

4.5.4 Instrumentación en HPLC

- a) Un recipiente para el solvente.
- b) Una bomba capaz de bombear el solvente hasta una presión de 6000 psi y a un flujo de hasta 10 ml/min.
- c) Un bucle inyector el cual puede ser equipado con un loop de volumen fijo entre 1 a 200 μ l (20 μ l es usado frecuentemente como estándar).
- d) Una columna, la cual es un tubo de acero inoxidable empacado, usualmente con sílica gel recubierta con octadecilsilano de diámetro medio de partícula (3.5 o 10 μ m).
- e) Una precolumna.
- f) Un detector, el cual es usualmente un detector UV/visible. Para aplicaciones especializadas un amplio rango de detectores están disponibles.
- g) Un sistema de captura de datos, el cual puede ser un integrador informático o una PC con software adecuado para el procesamiento de datos cromatográficos.
- h) La columna es conectada al inyector y detector con tubería de angosto diámetro interno 0.2 mm para minimizar el tiempo muerto.
- i) Instrumentos más avanzados pueden tener un inyector de muestra automático y un horno para columna, además son capaces de mezclar dos o más solventes en proporciones variables con el tiempo para producir un gradiente de fase móvil.¹⁶



a) Recipiente para la fase móvil y sistemas para el tratamiento de los disolventes

Un aparato moderno de HPLC está equipado con uno o más recipientes de vidrio o de acero inoxidable, cada uno de los cuales contiene de 200 a 1000 mL de un disolvente. Los recipientes a menudo se equipan con un sistema para eliminar los gases disueltos –en general oxígeno y nitrógeno- que interfieren formando burbujas en la columna y en los sistemas de detección. Un desgasificador puede consistir en un sistema de bombeo por vacío, un sistema de destilación, dispositivos para calentar y agitar los disolventes o un sistema de purga que permite arrastrar los gases disueltos fuera de la solución mediante finas burbujas de un gas inerte de baja solubilidad. Con frecuencia estos sistemas también contienen un dispositivo para la filtración del polvo y de las partículas sólidas en suspensión en los disolventes para evitar que estas partículas dañen la bomba o los sistemas de inyección u obturen la columna. No es necesario que los desgasificadores y los filtros sean partes integrantes de los sistemas HPLC. Una forma conveniente de tratar los disolventes antes de introducirlos en el recipiente, consiste en filtrarlos a vacío a través de un filtro (millipore) de tamaño de poro pequeño. Este tratamiento elimina gases así como la materia en suspensión.⁴

El mezclado interno y la desgasificación en línea mejoran significativamente la reproducibilidad durante la corrida y entre corridas. Se pueden utilizar hasta cuatro canales lo cual permite el uso de gradiente para mejorar la separación.¹⁵

Una separación que utiliza un solo disolvente de composición constante se denomina *elución isocrática*. Con frecuencia, la eficacia de la separación se aumenta notablemente por una *elución con gradiente*. En este caso se utilizan dos o tres sistemas disolventes con una polaridad significativamente distinta. Una vez que comienza la elución, se varía la relación de los disolventes de forma programada, a veces continuamente y a veces mediante una serie de etapas escalonadas.⁴

b) Sistemas de bombeo

Los requisitos para un sistema de bombeo en HPLC son rigurosos e incluye:

- i.** La generación de presiones por encima de 6000 psi.



- ii. Un flujo libre de pulsaciones.
- iii. Un intervalo de caudales de 0.1 a 10mL/min.
- iv. El control y la reproducibilidad del caudal menor de 0.5 por cien relativo.
- v. Componentes resistentes a la corrosión (juntas de acero inoxidable o Teflón).
- vi. Se utilizan tres tipos de bomba, cada una con sus propias ventajas y desventajas:
 - Bombas recíprocas.
 - Bombas de jeringa o de desplazamiento.
 - Bombas neumáticas o de presión constantes.⁴

c) Sistemas de inyección de muestras

Los primeros inyectores eran manuales y funcionaban mediante un loops que se llenaba manualmente con una jeringa.¹⁵

Las inyecciones automáticas incrementan significativamente la productividad y reproducibilidad en los resultados y reduce los errores por fatiga.⁴

d) La columna

Es el núcleo del sistema HPLC. Es donde se lleva a cabo la separación de los componentes de la muestra¹⁶. Se construyen de ordinarios con tubo de acero inoxidable de diámetro interno uniforme, aunque en algunas ocasiones se encuentran tubos de vidrio de paredes resistentes; estas últimas solo se utilizan a presiones menores de unos 600 psi.⁴

La mayoría de las columnas para cromatografía de líquidos tiene una longitud entre 10 y 30 cm, por lo común, las columnas son rectas y se pueden alargar si es necesario, acoplando 2 o más columnas. El diámetro interno de las columnas es a menudo de 4 a 10 mm y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son 5 a 10 μm . Tal vez la columna más frecuentemente utilizada es la de 25 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno, y rellena con partículas de 5 μm . Este tipo de columna tiene de 40000 a 60000 platos/metro. Recientemente, se han empezado a fabricar columnas de alta eficacia más rápidas, las cuales tienen menores dimensiones que las anteriormente descritas.⁴



Las columnas pueden tener sus propios conectores de entrada y salida, la conservación y cuidado de las mismas son críticos en el buen funcionamiento de un sistema de HPLC.¹⁵

e) Precolumnas

En muchas ocasiones para aumentar la vida de la columna analítica, se coloca delante una precolumna que elimina no sólo la materia en suspensión y los contaminantes de los disolventes sino también componentes de la muestra que se unen irreversiblemente a la fase estacionaria además, en cromatografía líquido-líquido, la precolumna sirve para saturar la fase móvil con la fase estacionaria y así minimizar las pérdidas de ésta en la columna analítica. La composición del relleno de la precolumna debería ser semejante al de la columna analítica; sin embargo, el tamaño de partícula es por lo común mayor para minimizar la caída de presión.⁴

f) Detectores

El detector es un dispositivo que contiene una celda de flujo por donde pasa la muestra y que está monitoreando de manera continua una propiedad fisicoquímica de la muestra, alimentando los valores encontrados a la unidad de proceso de datos.¹⁵

Tipos de detectores

Los detectores en cromatografía de líquidos son de dos tipos básicos:

- Los detectores que se basan en la medida de una propiedad de la disolución responden a una propiedad del efluente, tal como:
 - Índice de refracción
 - Constante dieléctrica
 - Densidad

Los cuales se modifican por la presencia de los analitos.

- Detectores basados en una propiedad absoluta responden a algunas de las propiedades del soluto, como:
 - Absorbancia en el UV
 - Fluorescencia
 - Detectores de arreglo de diodos¹⁵



g) Unidad de proceso de datos

Es un dispositivo electrónico capaz de almacenar los sucesivos registros de respuesta Vs tiempo enviados por el detector.

Tiene capacidad de realizar la integración de los cromatogramas obtenidos, que permite cuantificar los distintos componentes de una mezcla y con detector de arreglo de diodos, el espectro UV de cada componente.

Se utiliza un software de cómputo con grandes capacidades de almacenamiento y proceso de datos.⁴

h) Columnas termostalizadas

En muchas aplicaciones no se necesita un control estricto de la temperatura, y las columnas trabajan a temperatura ambiente. Sin embargo, muchas veces si se controla la temperatura de la columna en unas pocas décimas de grados centígrados, se obtienen mejores cromatogramas. La mayoría de los instrumentos comerciales llevan actualmente hornos para las columnas que controlan la temperatura de la columna a las decimas de grados, desde la temperatura ambiente hasta 100 o 150 °C.⁴

La viscosidad de la fase móvil se ve fuertemente influenciada por los cambios de temperatura.

Pequeños cambios en la viscosidad se traducen en grandes cambios en el modo de interacción de la fase móvil con la fase estacionaria y por tanto afecta de manera significativa a la reproducibilidad de las separaciones.

Es importante asegurar una temperatura de trabajo constante (20 °C si no se indica otra cosa) independiente de las condiciones ambientales.¹⁵

A causa de que la cromatografía de reparto es la más ampliamente utilizada de las cuatro modalidades de cromatografías de líquidos se abordaran detalles de esta a continuación.



4.5.5 Cromatografía de Reparto

En el pasado la mayoría de las aplicaciones se han referido a compuestos polares, no iónicos de baja a moderada masa molecular (habitualmente < 3000). Sin embargo, recientemente se han desarrollado algunos métodos (derivatización y formación de pares iónicos) que han extendido las separaciones de reparto a los compuestos iónicos.

La cromatografía de reparto se subdivide en dos, basándose en la forma en que se retiene la fase estacionaria sobre las partículas soporte de relleno:

- **Cromatografía líquido-líquido:** la fase estacionaria líquida se retiene sobre la superficie de soporte por adsorción física
- **Cromatografía de fase unida químicamente:** la fase estacionaria se une químicamente a la superficie de soporte.⁴

En relación con las polaridades relativas de las fases móvil y estacionaria se distinguen dos tipos de cromatografía de reparto.

- **Cromatografía en fase normal:** en esta se utilizan fases estacionarias de elevada polaridad y fases móviles relativamente apolar.
- **Cromatografía en fase inversa:** la fase estacionaria es no polar, con frecuencia se trata de un hidrocarburo y la fase móvil es relativamente polar (como el agua, metanol o el acetonitrilo).⁴

Los rellenos de fase unida químicamente se clasifican como de fase inversa cuando el recubrimiento enlazado tiene un carácter no polar y de fase normal cuando el recubrimiento contiene grupos funcionales polares. Las columnas con relleno de fase inversa. Por lo general el grupo R del siloxano en estos recubrimientos es una cadena C₈ (n-octilo) o una cadena C₁₈ (n-octadecilo). En estas fases, los grupos de hidrocarburo de cadena larga se alinean el uno junto al otro y en perpendicular a la superficie de la partícula dando una estructura semejante a una brocha o a un cepillo.



Las cadenas más largas originan relleno que muestran una mayor retención además una mayor longitud de la cadena permite una mayor cantidad de muestras. Por ejemplo, el tamaño máximo de muestra para un relleno de C_{18} es casi el doble que para uno de C_4 en condiciones similares.

En la mayoría de las aplicaciones de la cromatografía en fase inversa, la elución se lleva a cabo con una fase móvil de elevada polaridad como es el caso de una disolución acuosa conteniendo concentraciones diversas de disolventes como metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano. De este modo, se ha de poner especial cuidado en que el valor del pH no sea mayor que 7.5 porque si no puede tener lugar la hidrólisis del siloxano, lo que originaría la degradación o destrucción del relleno.

Con rellenos comerciales de fase normal unida químicamente, R en la estructura del siloxano es un grupo funcional polar como es el caso de los grupos ciano, diol, amino y los dimetilaminopropil. Las polaridades de estos materiales de relleno varían en un gran intervalo, siendo el tipo ciano el menos polar y el tipo amino el más polar. Los rellenos de diol son de una polaridad intermedia. Con los rellenos de fase normal, la elución se realiza con disolventes relativamente no polares, tales como el etiléter, el cloroformo y el n-hexano.⁴

Aplicaciones características de la cromatografía de reparto ⁴

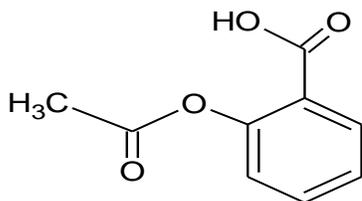
Campo	Mezclas Típicas
Fármacos	Antibióticos, sedantes, esteroides, analgésicos.
Bioquímica	Aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos.
Productos de alimentación	Edulcorantes artificiales, antioxidantes, aflatoxinas, aditivos.
Productos de la industria química	Aromáticos condensados, tensioactivos, propulsores, colorantes.



Contaminantes	Pesticidas, herbicidas, PCB, fenoles
Química forense	Drogas, venenos, alcohol, alcohol en sangre, narcóticos.
Medicina clínica	Ácidos biliares, metabolitos de drogas, extractos de orina, estrógenos.

4.6 Propiedades organolépticas y fisicoquímicas de la Aspirina

Estructura química:



Nombre IUPAC sistemático: ácido benzoico, 2-(acetiloxi).

Fórmula química: C₉H₈O₄.

Peso molecular: 180.16 g/mol.

Almacenamiento: almacenar en recipientes herméticos.

Familia química: éster.¹⁷

Punto de fusión: 135 °C.

Punto de ebullición: 140 °C.⁶

Solubilidad: soluble 1 en 300 de agua, 1 de cada 5 de alcohol, 1 en 17 de cloroformo, y 1 en 10 a 15 del éter; escasamente soluble en éter absoluto.¹⁷

pKa: 3.49 a 25 °C.⁶

Características organolépticas:

Estado físico: sólido.

Color: cristales blancos.

Olor: inodoro o tiene un ligero olor.¹⁷

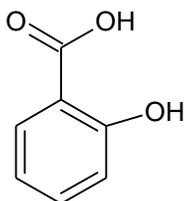


Estabilidad y reactividad:

Es estable en aire seco, en el aire húmedo se hidroliza gradualmente a ácido salicílico y ácido acético.⁶

4.7 Propiedades organolépticas y fisicoquímicas del ácido salicílico

Estructura química:



Nombre IUPAC sistemático: 2-hidroxibenzoico.

Fórmula química: C₇H₆O₃.

Peso molecular: 138.1 g/mol.

Almacenamiento: almacenar en recipientes herméticos.¹⁷

Familia química: fenoles.

Punto de fusión: 158-161 °C.

Punto de ebullición: 211 °C.²⁰

Solubilidad: soluble 1 en 460 de agua, 1 en 15 de agua hirviendo, 1 en 3 de alcohol, 1 en 45 de cloroformo, 1 en 3 de éter, y 1 en 135 de benceno.¹⁷

pKa: 2.97.²⁰

Características organolépticas:

Estado físico: sólido.

Color: cristales blancos, generalmente en agujas finas o polvo blanco cristalino esponjoso.

Olor: la forma sintética es sin olor, pero si se prepara a partir de metil salicilato natural puede tener un tinte ligeramente amarillo o rosa, y un débil olor a menta.¹⁷

Estabilidad y reactividad: sensible a la luz.¹⁷



4.8 Monografía terapéutica de la Aspirina.

4.8.1 Mecanismo de acción

Los principales efectos terapéuticos y muchas de las reacciones adversas de ASA pueden explicarse por su efecto inhibitorio de la actividad de las ciclooxigenasas, enzimas que convierten el ácido araquidónico que se encuentra en las membranas celulares en endoperóxidos cíclicos inestables, los cuales se transforman en prostaglandinas (PG) y tromboxanos. Algunos de estos eicosanoides participan, en grado diverso, en los mecanismos patógenos de la inflamación, el dolor y la fiebre, por lo que la inhibición de su síntesis por la ASA sería responsable de su actividad terapéutica, aunque, dada su participación en determinados procesos fisiológicos, dicha inhibición sería también responsable de diversas reacciones adversas características de los AINE .

Es preciso destacar que los eicosanoides son sólo una parte de los mediadores celulares involucrados en la modulación de una determinada función o proceso patológico y que los AINE no inhiben el conjunto de la cascada biosintética que tiene su origen en el ácido araquidónico (p. ej., no afectan la actividad enzimática de las lipooxigenasas que originan leucotrienos y HPETE, ni otras vías no enzimáticas que dan lugar a los isoprostanos). Se comprende así la limitación que poseen estos fármacos en el control de procesos caracterizados por la intervención de numerosos mediadores.

El ASA es un inhibidor irreversible de ambas ciclooxigenasas, mediante la acetilación covalente de un residuo de serina, en posición 530 en la COX-1 y en 516 en la COX-2, en el centro activo de la enzima. Como resultado, la COX-1 resulta permanentemente inactivada, mientras que la COX-2, acetilada, y aunque pierda también su actividad ciclooxigenásica, es capaz de sintetizar 15-HETE.¹⁸

4.8.2 Aplicaciones farmacológicas

- **Acciones analgésicas, antitérmicas y antiinflamatoria**



La potencia analgésica y antitérmica del ASA guarda relación con su actividad anticiclooxigenásica, pero la actividad antiinflamatoria requiere dosis más elevadas, se deduce que en esta última acción intervienen también otros mecanismos independientes de la síntesis de prostaglandinas.

- **Acciones metabólicas**

A las dosis utilizadas en la mayoría de sus indicaciones clínicas, los salicilatos no interfieren significativamente con los procesos metabólicos esenciales. Sin embargo, a concentraciones elevadas, en el límite superior de las utilizadas en el tratamiento de la artritis reumatoidea, afectan intensamente el metabolismo intermediario y aunque no se conoce en qué grado esto puede contribuir al efecto antirreumático, ciertamente contribuye a provocar el cuadro tóxico por sobredosificación.

A dosis tóxicas, los salicilatos desacoplan la fosforilación oxidativa, disminuyen la producción de ATP, interfieren con el metabolismo aerobio de la glucosa, inhiben las deshidrogenasas y la 6-fosfofructocinasa de la glucólisis, y la vía de las pentosas. La reducción de la producción de ATP repercute en la producción de AMPc y en determinadas reacciones anabólicas (p. ej., la síntesis de glucosa aminoglucanos, glucoproteínas y colágeno del tejido conjuntivo). Asimismo, pueden originar depleción del glucógeno hepático, hiperglucemia y glucosuria.

- **Acciones sobre la respiración y el equilibrio ácido- base**

A concentraciones elevadas, los salicilatos estimulan directamente el centro respiratorio: aumentan la ventilación, disminuyen la PCO_2 y, por consiguiente, favorecen la aparición de alcalosis respiratoria, que se observa en adultos, pero rara vez en niños. Como compensación aumenta la eliminación renal de HCO_3 . Esta acción puede coincidir con un aumento del consumo de O_2 , de la producción de CO_2 y de metabolitos ácidos (pirúvico y láctico), como consecuencia indirecta de la interferencia con el metabolismo de carbohidratos, lo cual tiende a producir acidosis metabólica. Al progresar el cuadro tóxico, la estimulación del centro respiratorio va seguida de depresión, lo que impide la



eliminación del CO₂ producido en los tejidos. En consecuencia, aparece un cuadro de acidosis metabólica y respiratoria, que constituye una urgencia médica.

- **Otras acciones**

El ASA muestra una marcada actividad antiagregante plaquetaria a dosis inferiores a las analgésicas. A concentraciones elevadas interfiere en la síntesis de protrombina.¹⁸

4.8.3 Farmacocinética

La aspirina y otros salicilatos se absorben rápidamente del tracto gastrointestinal cuando se toman por vía oral pero la absorción después de dosis rectal es menos fiable (es más lenta y errática). La aspirina y otros salicilatos también pueden ser absorbidos por la piel.¹⁷

El ASA se absorbe muy bien en el estómago y el duodeno; puesto que su pKa es de 3,5, en el medio ácido del estómago se encuentra predominantemente en forma no ionizada, lo cual facilita su absorción por difusión simple; el t_{máx} es de 1 hora. A su paso por la mucosa y, especialmente, en el primer paso hepático, parte del ASA se hidroliza a salicilato; cuanto más rápida es la absorción, menor es la hidrólisis y mayor la C_{máx} plasmática, pero existe también gran variabilidad interindividual en la velocidad de hidrólisis del AAS y, por lo tanto, en la C_{máx} alcanzable. El alimento reduce la velocidad de absorción, pero no la cantidad total absorbida.¹⁸

Una vez absorbida, la aspirina se convierte rápidamente a salicilato, pero durante los primeros 20 minutos después de una dosis de aspirina por vía oral es la principal forma de la droga en el plasma. La aspirina se une de 80 a 90% a proteínas plasmáticas y es ampliamente distribuida; su volumen de distribución es 170 mL/ kg en adultos. Cuando las concentraciones plasmáticas de la droga aumentan, los sitios de unión en las proteínas se saturan y el volumen de distribución aumenta. Tanto la aspirina y el salicilato tienen actividad farmacológica aunque sólo la aspirina tiene efecto antiplaquetario. El salicilato es ampliamente unido a proteínas plasmáticas y se distribuye rápidamente a todas las partes del cuerpo. El Salicilato aparece en la leche materna y atraviesa la placenta.¹⁷



El salicilato se elimina principalmente por metabolismo hepático; los metabolitos son el ácido salicílico (75%), glucoronido salicilfenólico (10%), glucoronido salicilacilo (5 %), y ácido gálico (< 1 %).¹⁸

La formación de los mayores metabolitos, ácido salicílico y glucuronido salicilfenólico, se saturan fácilmente y siguen la cinética de Michaelis-Menten; las otras rutas metabólicas son procesos de primer orden. Como resultado, en estado estacionario plasma – salicilato las concentraciones aumentan desproporcionadamente con la dosis. Después de una dosis de 325 mg de aspirina, la eliminación es un proceso de primer orden y la vida media plasmática de salicilato es alrededor de 2 a 3 horas; en dosis altas de aspirina, la vida media aumenta a 15 a 30 horas. El Salicilato también se excreta sin cambios en la orina (10%) de promedio, la cantidad excretada por esta ruta aumenta con la dosis y también depende del el pH urinario, aproximadamente el 30 % de una dosis se excreta en la orina alcalina en comparación con 2 % de una dosis en orina ácida. La excreción renal implica filtración glomerular, secreción renal tubular activa y reabsorción tubular pasiva.

El tratamiento prolongado con dosis elevadas produce cierto grado de inducción hepática, que tiende a reducir los niveles plasmáticos.

El salicilato se elimina por hemodiálisis.¹⁷

4.8.4 Usos

La aspirina se usa para el alivio del dolor leve a moderado tales como dolor de cabeza, dismenorrea, mialgias, y dolor dental. También se ha utilizado en el manejo del dolor y la inflamación en trastornos reumáticos agudos y crónicos tales como artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, osteoartritis y espondilitis anquilosante. En el tratamiento de condiciones febriles menores, tales como los resfriados o la gripe, la aspirina puede reducir la temperatura y aliviar el dolor de cabeza y dolores musculares y articulares.

La aspirina también se utiliza por su actividad antiplaquetaria en el tratamiento inicial de trastornos cardiovasculares tales como angina de pecho y el infarto de miocardio y para la



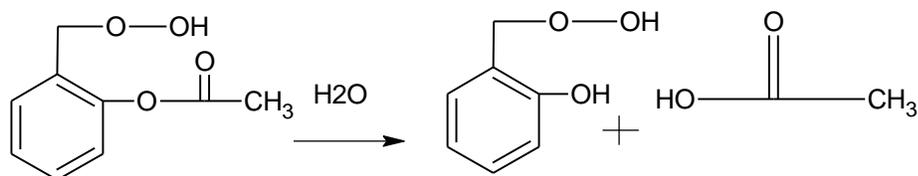
prevención de eventos cardiovasculares en pacientes de riesgo. Otros de sus usos incluyen el tratamiento y la prevención de los trastornos cerebrovasculares como el ictus.

Indicaciones de la aspirina en terapia con niños son extremadamente limitadas debido al riesgo del síndrome de Reye, pero incluyen enfermedad de Kawasaki y artritis idiopática juvenil.¹⁷

4.9 Hidrólisis de la Aspirina

La hidrólisis de ésteres como la aspirina representa uno de los tipos más comunes de inestabilidad de drogas. La hidrólisis de ésteres es catalizada ya sea por el ion hidrógeno o el ion hidróxido, aunque la catálisis que es importante desde el punto de vista de la estabilidad de la droga depende del compuesto específico y del pH de la solución.

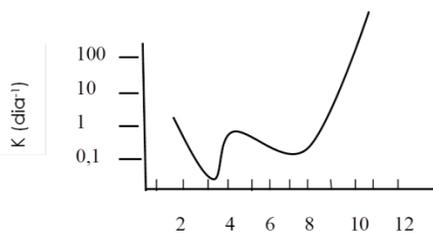
El clivaje hidrolítico de la aspirina a ácido salicílico y ácido acético fue estudiado por Edwards:



Aspirina

Edwards obtuvo el interesante perfil de pH, este perfil obtenido para la aspirina fue atribuido a una reacción de la forma:

$$-d [\text{aspirina}]_{\text{total}} / dt = k_1 [\text{H}^+] [\text{HA}] + k_2 [\text{H}^+] [\text{A}^-] + k_3 [\text{OH}^-] [\text{A}^-] + K_0 [\text{A}^-]$$

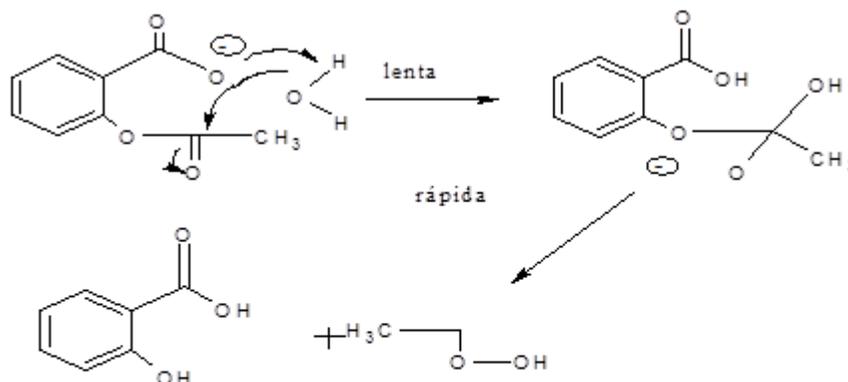


Velocidad de aparente primer orden de hidrólisis de la aspirina en función de pH a 17 °C.



En donde [HA] representa la aspirina no disociada y $[A^-]$ representa el anión aspirina. La hidrólisis aniónica independiente del [pH] indicada por la región de pH 5 y 9 ha sido atribuida a la catálisis intramolecular por el anión ortocarboxilato, más que a la catálisis ácido-base general por agua.

Esta catálisis intramolecular es la principal responsable de la alta inestabilidad de las soluciones acuosas de aspirina en el espectro de pH de utilidad farmacéutica.



Fersht y kirby representaron la reacción intramolecular del ion carboxilato como una catálisis básica general de ataque por una molécula de agua. En el caso de nucleófilos como el etanol, el hidroxilo terminal del polietilenglicol (PEG) y la función ϵ -amino de lisina de la albúmina sérica pueden participar en esta reacción en la misma forma que el agua. Así, a partir de la aspirina en solución de etanol, el acetato de etilo aparece como producto; en polietilenglicol se forma un acetato de polietilenglicol y en una solución que contenga albúmina sérica, la aspirina produce una albúmina sérica acetilada.

Al utilizar PEG 400 acetilado como solvente para la aspirina lograron demostrar que en dicho solvente había una pérdida de aspirina menor del 1% después de 30 días a 45°C .¹⁹



V. HIPÓTESIS

El método por HPLC planteado cumple con los parámetros de validación y es apto para la cuantificación de Aspirina y ácido salicílico libre en muestras de tabletas de Aspirina de 100 mg.



VI. MATERIAL Y MÉTODO

6.1 Tipo de estudio:

Experimental. Validación de tipo prospectiva.

6.2 Población:

Tabletas de Aspirina de 100 mg.

6.3 Muestra:

50 tabletas de Aspirina de 100 mg del lote 134 de Laboratorios Divina.

6.4 Alcance:

Cuantificación de Aspirina y ácido salicílico libre en tabletas de 100 mg por la técnica instrumental de cromatografía líquida de alta resolución.

6.5 Plan de análisis:

Se utilizó Excel 2010 para el procesamiento de los datos obtenidos, la creación de tablas y gráficos necesarios así como para la estimación de incertidumbres asociadas al método analítico.

6.6 Reactivos y materiales:

TABLA DE REACTIVOS			
Nombre	Grado	Descripción	Fórmula química
Acetonitrilo	Reactivo Grado HPLC	Líquido incoloro, de olor característico. Marca: MERC. Pureza: 99.8 %.	CH ₃ CN
Ácido acético glacial	Reactivo	Líquido transparente incoloro. Marca: J.T Baker. PE: 40 ⁰ C. Pureza: 99.8 %.	CH ₃ COOH



Ácido acetil salicílico	Estándar secundario	Cristales blancos. Lote: 201003110.	$C_6H_4(OCOCH_3)COOH$
Ácido clorhídrico	Reactivo	Líquido incoloro y con vapores. Olor irritante, característico de ácido Clorhídrico. D: 1.18 g/ml. PM: 36.5 g/mol. Pureza: 37.1%.	HCl
Ácido fórmico	Reactivo	Líquido claro, olor picante penetrante. Marca: JT baker chemical Co. Pureza: 89.2 %.	CH_2O_2
Ácido salicílico.	Estándar secundario	Cristales blanco inodoro. Lote 0409302.	$C_7H_6O_3$
Ácido sulfúrico	Reactivo	Es un líquido aceitoso, sin color y sin olor. Es muy corrosivo. Pureza: 96.1%. Densidad: 1.84 g/ml.	H_2SO_4
Agua	Destilada	Líquido incoloro e inodoro.	H_2O
Biftalato de potasio	Patrón primario	Polvo cristalino blanco. PM: 204.23 g/mol. Pureza: 98.98%.	$C_8H_5KO_4$
Etanol	Reactivo	Líquido incoloro claro, de olor característico. Pureza: 99.9%.	CH_3CH_2OH
Fenolftaleína	Indicador de pH	Sólido amarillo pálido, inodoro.	$C_{20}H_{14}O_4$



Hidróxido de sodio	Reactivo	Sólido blanco delicuescente. PM: 40 g/mol. Pureza: 98.2%.	NaOH
Peróxido de hidrógeno	Reactivo	Agua oxigenada 3 % p/v; Marca: Discarsa.	H ₂ O ₂
Rojo fenol	Indicador de pH	Cristales rojos PM: 354.3 g/mol.	C ₁₉ H ₁₄ O ₅ S
Sal sódica del ácido 1-heptanosulfónico	Reactivo grado HPLC	Polvo cristalino blanco. Marca: Fisher Scientific.	C ₇ H ₁₅ O ₃ S.Na

TABLA DE MATERIALES	
Nombre	Descripción
Agitador eléctrico	Agitador magnético. Marca: SYBRON; modelo: Thermolyne type 7200 stir-light; modelo N ^o : SL-7225; serial N ^o : 275.
Balanza analítica	Balanza analítica marca: A&D; modelo: GH-120; capacidad: máx. : 120 g, min.: 0.0001 g; desviación: 0.1 mg; e= 1 mg; serie: 13506973. Balanza analítica marca: A&D; modelo: HM-120; capacidad: máx. : 120 g, min.: 0.0001 g; desviación: 0.1 mg; serie: 15102356.
Balones	Balones de 100 ml, 50 ml y 25 ml marca KIMAX KIMBLE clase A. Balones de 1000 ml marca Pyrex clase A.
Beaker	Beaker marca Kimax USA de 100 ml. Beaker marca Kimax kimble de 1000 ml, Beaker marca PYREX USA de 20 ml ±5% y 250 ml ±5%.



Bomba de vacío	Bomba para filtrar y desgasificar fase móvil y solventes. Marca: DRYFAST ULTRA; modelo N ^o : 2021B-01 REV.
Bureta	Bureta de 25 ml. Marca: KIMAX KIMBLE TD; clase A. Bureta de 50 ml. Marca: Borosil ®.
Campana de extracción de gases	Marca: LABCONCO.
Cocina	Marca: Isotemp ® Fisher Scientific.
Columna cromatográfica	Pursuit XRs 5-C18 250 mm * 4.6 mm P/N A6000250X046; S/N 310248. Marca: Varian
Cromatógrafo líquido de alta resolución	Cromatógrafo líquido; marca: Varian; modelo: 920-L-C; serie: EL08053903.
Destilador	Marca: Fistreem; modelo: Barnstead.
Embudo	Para filtrar soluciones y para trasvasar polvos a balón. Marca: KIMAX USA.
Erlenmeyer	Erlenmeyer de 250 ± 5%. Marca: Pyrex.
Espátula	Espátula de acero inoxidable utilizada para pesar reactivos y patrones.
Filtrador Millipore	Marca: Milipore * stainless-steel Área de filtración: 13 mm.
Filtro para fase móvil y solventes	Usado en el kit de microfiltración. Filtro de membrana de nylon; marca: Whatman®; porosidad: 0.45 µm; diámetro: 47mm.
Jeringa	Jeringa de plástico de 10 ml para la toma de muestras, utilizada para llenar viales.
Kit de micro filtración	Para filtrar disolventes y fase móvil. Marca: KONTES Ultra-ware.
Magneto	Magneto agitador.
Mortero y pilón	Para triturar las tabletas. Marca: Coors USA II.



Papel de aluminio	Papel de aluminio para pesar reactivo; marca: Mirave.
Papel filtro	Marca Whatman®; porosidad: 0.45 µm; diámetro: 70mm.
Pera de succión	Utilizada junto con la pipeta para transvasar líquidos de un recipiente a otro evitando succionar con la boca líquidos venenosos, corrosivos o que emitan vapores. Marca: FISHERBRAND.
pH metro	Marca: METTLER TOLEDO; número de serie: 1229135195.
Pipeta serológica	Pipeta de 5 ml, marca: KIMAX-51 ® KIMBLE USA, clase: A ± 0.02 ml.
Pipeta volumétrica	Pipeta de 2 ml (±0.006); marca: KIMAX KIMBLE USA. Pipeta de 5 ml (±0.01) y 10 ml (±0.02) marca Fisherbrand clases A.
Pizeta	Pizeta de polietileno 500 ml de capacidad. Marca FISHER Brand.
Probeta	Probeta de 10 ml, 500 ml y 1000 ml, marca PYREX® USA. Probeta de 50 ml, marca: KIMAX USA.
Soporte de embudo	Soporte especial de madera horadada, para colocar embudos corrientes.
Soporte metálico	Utilizado en determinaciones volumétricas. Marca: FISHER CASTALOY-R.
Ultrasonic Cleaner	Ultrasonic cleaner marca: Branson; modelo: B3-R. Baño ultrasónico para aclarar solución.
Vial Kit	Viales para HPLC: recipiente que contiene las muestras a inyectar; marca: VARIAN. Septa de 9 mm.



6.7 Procedimiento analítico para la cuantificación del estándar de referencia de ácido salicílico y Aspirina.

6.7.1 Pureza de Ácido Salicílico

Disolver aproximadamente 0.12 g en 30 ml de etanol, agregar 20 ml de agua y valorar con NaOH 0.1 M SV, usando solución de rojo fenol como indicador hasta obtener un color rojizo violeta. Cada ml de NaOH 0.1 M SV equivale a 13.81 mg de $C_7H_6O_3$.²¹

Determinar el contenido de ácido salicílico mediante la siguiente fórmula:

$$m_{\text{ácido salicílico}} = \text{titre} * ml_{\text{NaOH}} * f$$
$$\% \text{ Pureza} = (m_{\text{experimental}} / m_{\text{teórica}}) * 100$$

6.7.2 Pureza de Aspirina

Colocar aproximadamente 100 mg de aspirina, pesados con exactitud en un matraz, agregar 30 ml de NaOH 0.1 N SV, y calentar a ebullición moderada durante 10 minutos. Agregar fenolftaleína S.R y valorar el exceso de NaOH con H_2SO_4 0.1 N SV. Realizar una determinación con un blanco. Cada ml de NaOH 0.1 N es equivalente a 9.008 mg de $C_9H_8O_4$.¹⁰

Determinar el contenido de aspirina mediante la siguiente fórmula:

$$ml_{\text{NaOH muestra}} = \frac{ml_{H_2SO_4} * N_{H_2SO_4}}{N_{NaOH}}$$
$$m_{\text{aspirina}} = \text{titre} * (ml_{\text{NaOH blanco}} - ml_{\text{NaOH muestra}}) * f$$
$$\% \text{ Pureza} = (m_{\text{experimental}} / m_{\text{teórica}}) * 100$$

Donde:

ml H_2SO_4 : Volumen gastado de ácido sulfúrico en la valoración.

N H_2SO_4 : Normalidad del ácido sulfúrico.

N NaOH: Normalidad del Hidróxido de sodio.

ml NaOH _{muestra}: Volumen de Hidróxido de sodio que reacciona con el ácido sulfúrico en la valoración.

ml NaOH _{blanco}: Volumen de Hidróxido de sodio utilizado en el blanco.



6.8 Procedimiento de preparación de reactivos.

6.8.1 Preparación y estandarización de NaOH 0.1 N o 0.1 M

Disolver 4 g de NaOH en 200 ml de agua, transferir a un balón de 1000 ml y aforar a volumen. Agitar.

Pesar con exactitud aproximadamente 300 mg de biftalato de potasio, transferirlo a un erlenmeyer y disolverlo en 50 ml de agua. Agregar 2 gotas de fenolftaleína SR y valorar con la solución de NaOH hasta obtener un color rosado permanente. Cada 20.423 mg de biftalato de potasio equivale a un ml de NaOH 0.1 N.¹⁰

Determinar la normalidad del NaOH mediante la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\text{mg de biftalato de potasio}}{204.23 \text{ mg} \cdot \text{ml NaOH}}$$

6.8.2 Preparación y estandarización de Ácido sulfúrico 0.1 N

Medir 2.8 ml de H₂SO₄ y transferirlo en un balón de 1000 ml que contenga 300 ml de agua, dejar enfriar y aforar a volumen. Agitar.

Con una bureta medir con exactitud 30 ml de una solución de NaOH 0.1 N (previamente estandarizada) adicionar 2 gotas de solución de fenolftaleína SR, agitar suavemente. Valorar con la solución de ácido sulfúrico 0.1 N hasta obtener una solución incolora. Realizar por triplicado.

Determinar la normalidad del H₂SO₄ mediante la siguiente fórmula:

$$N = \frac{(\text{ml}_{\text{NaOH}} \times N_{\text{NaOH}})}{\text{ml H}_2\text{SO}_4}$$

6.8.3 Preparación de solución de fenolftaleína

Disolver 1 g de fenolftaleína en 100 ml de etanol.



6.8.4 Preparación de solución de rojo fenol (fenolsulfonftaleína)

Disolver 100 mg de fenolsulfonftaleína en 100 ml de etanol y filtrar si fuera necesario.

6.8.5 Preparación NaOH 1N

Pesar 4 g de NaOH, transferirlo a un balón de 100 ml, disolverlo con 30 ml de agua y aforar a volumen. Agitar.

6.8.6 Preparación HCl 1N

Medir 8.3 ml de HCl y transferir a un balón de 100 ml que contenga 50 ml de agua, enfriar y aforar a volumen.

6.9 Método de análisis para la cuantificación de Aspirina y ácido salicílico libre en tabletas.

6.9.1 Preparación de fase móvil: la fase móvil está compuesta por una mezcla de una solución de 1-heptanosulfonato de sodio a pH 3.5 y acetonitrilo en una proporción 70:30.

1. Disolver 1.6 g de 1-heptanosulfonato de sodio en aproximadamente 300 ml de agua, transferir a un balón de 1000 ml y aforar a volumen. Ajustar el pH de esta solución a 3.5 ± 0.05 con ácido acético glacial. Filtrar y desgasificar usando un filtro de nylon de tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ y 47 mm de diámetro.
2. Filtrar y desgasificar 500 ml de acetonitrilo, usando un filtro de nylon de tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ y 47 mm de diámetro.
3. Colocar en el reservorio A la solución a pH 3.5 y en el reservorio B el acetonitrilo.

6.9.2 Preparación de solución de dilución:

Preparar una mezcla de acetonitrilo y ácido fórmico (97:3). Filtrar y desgasificar usando un filtro de nylon de tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ y 47 mm de diámetro.



6.9.3 Preparación de la solución estándar de Aspirina a la concentración nominal (400 µg/ml):

Solución 1: Previa corrección de pureza, pesar el equivalente a 50 ± 1 mg de estándar de ácido acetil salicílico y transferir a un balón de 50 ml, disolver con 30 ml de solución de dilución, agitar manualmente por 30 segundos y posteriormente sonificar en el ultrasónico por 5 minutos, enfriar y aforar con solución de dilución. Agitar.

Solución 2: De la solución anterior, tomar 10 ml y transferir a un balón de 25 ml aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

6.9.4 Preparación de la solución estándar de ácido salicílico a la concentración nominal (32 µg/ml):

Solución 1: Previa corrección de pureza, pesar el equivalente a 20 ± 1 mg de estándar de ácido salicílico y transferir a un balón de 50 ml, disolver con 30 ml de solución de dilución, agitar manualmente por 30 segundos, y aforar con solución de dilución.

Solución 2: Tomar 2 ml de la solución anterior, transferir a un balón de 25 ml y aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

6.9.5 Preparación de solución de muestra a la concentración nominal (400 µg/ml):

Solución 1: Pesar y pulverizar finamente no menos de 20 tabletas de Aspirina de 100 mg. Transferir una cantidad de polvo pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 50 ± 1 mg de Aspirina, a un balón de 50 ml. Agregar 30 ml de solución de dilución agitar mecánicamente por 30 segundos y posteriormente sonificar por 5 minutos en agitador ultrasónico, dejar enfriar y aforar a volumen. Agitar y filtrar con papel de filtro.



Solución 2: Tomar 10 ml de la solución 1 filtrada, transferir a un balón de 25 ml y aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 μm por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

6.9.6. Preparación de una solución blanco:

La fase móvil es utilizada como solución blanco. Preparar 100 ml de fase móvil como se indica en el apéndice 6.9.1. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 μm por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

6.9.7 Condiciones cromatográficas:

Equipar el cromatógrafo con un detector a 280 nm y una columna Pursuit XRs 5-C18 250 mm x 4.6 mm y mantener a una temperatura de 45 ± 1 °C. La velocidad de flujo es de 1.2 ml por minuto.

6.9.8 Procedimiento:

Inyectar por separado en el cromatógrafo, volúmenes iguales (10 μL) de la soluciones estándares de Aspirina y ácido salicílico y de la solución muestra. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas correspondientes a los picos principales.

Calcular el porcentaje recuperado de aspirina ($\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$) en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$\%Asp = \left(\frac{A_m}{A_p}\right) \left(\frac{w_p V_2 P}{V_1 V_3}\right) \left(\frac{V_4 V_6}{V_5}\right) \frac{1}{w_m}$$

Donde:

$\% Asp$: Porcentaje de aspirina recuperado.

A_m : área promedio de aspirina de las inyecciones de la muestra.

A_p : área promedio de las inyecciones del estándar de aspirina.

w_p : cantidad del estándar de aspirina pesada en mg.

P : pureza del estándar de aspirina.



V_1 : volumen del balón en el cual se preparó el estándar de aspirina.

V_2 : volumen de la alícuota tomada del V_1 .

V_3 : volumen del balón en el cual se diluyó el V_2 .

V_4 : volumen del balón en el cual se diluyó el V_5 .

V_5 : volumen de la alícuota tomada del V_6 .

V_6 : volumen del balón en el cual se preparó la solución muestra de aspirina.

W_m : cantidad de muestra equivalente de aspirina pesada en mg.

Calcular el porcentaje de ácido salicílico libre en la porción de Tabletas tomada, por la fórmula:

$$\%AS = \left(\frac{A_m}{A_p}\right) \left(\frac{W_{as} P V_2}{V_1 V_3}\right) \left(\frac{V_4 V_6}{V_5}\right) \left(\frac{1}{W_{asa}}\right)$$

Donde:

$\%AS$: Porcentaje de ácido salicílico libre encontrado.

A_m : área promedio de ácido salicílico de las inyecciones de la muestra de aspirina.

A_p : área promedio de las inyecciones del estándar de ácido salicílico.

W_{as} : cantidad del estándar de ácido salicílico pesada en mg.

P : pureza de estándar de ácido salicílico.

V_1 : volumen del balón en el cual se preparó el estándar de ácido salicílico.

V_2 : volumen de la alícuota tomada del V_1 .

V_3 : volumen del balón en el cual se diluyó el V_2 .

V_4 : volumen del balón en el cual se diluyó el V_5 .

V_5 : volumen de la alícuota tomada del V_6 .

V_6 : volumen del balón en el cual se preparó la solución muestra de aspirina.

W_{asa} : cantidad de muestra equivalente de aspirina pesada en mg.

6.10 Procedimiento experimental para determinar los parámetros de validación en la cuantificación de Aspirina.

Verificación del equipo: Antes de la realización de los parámetros de la validación se efectuó la verificación del Cromatógrafo líquido de alta resolución, obteniéndose resultados satisfactorios (estos datos no se muestran por políticas del laboratorio).



6.10.1 Aptitud del Sistema

6.10.1.1 Procedimiento

Preparar una solución estándar de Aspirina a la concentración nominal como se indica en el apéndice 6.9.3. y realizar repetidamente 10 lecturas.

Determinar:

- Coeficiente de variación de los factores respuesta (áreas).
- Número de platos teóricos USP.
- Factor de asimetría.

6.10.1.2 Criterios de aceptación

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Coeficiente de variación	< 2%
Número de platos teóricos USP	> 2000
Factor de asimetría	< 2

6.10.2 Selectividad y/o especificidad

6.10.2.1 Identificación del activo

6.10.2.1.1 Procedimiento

Preparar una solución estándar de Aspirina a la concentración nominal como se indica en el apéndice 6.9.3. (Solución A).

Preparar una solución muestra a la concentración nominal como se indica en el apéndice 6.9.5. (Solución B).

Preparar una solución blanco como se indica en el apéndice 6.9.6. (Solución C).

Analizar por triplicado cada una de las soluciones.

Comparar los espectros obtenidos en la solución estándar con los espectros obtenidos en la solución muestra; y comparar los espectros obtenidos en la solución estándar con los espectros obtenidos en la solución blanco.

6.10.2.1.2 Criterios de Aceptación

El espectro de la solución A y el espectro de la solución B. **Identificación positiva.**

El espectro de la solución A y el espectro de la solución C. **Identificación negativa.**



6.10.2.2 Selectividad frente a productos de degradación

6.10.2.2.1 Procedimiento

Preparar una solución estándar a la concentración nominal como se indica en el apéndice 6.9.3 y soluciones estándares a diferentes condiciones de estrés como:

- Hidrólisis alcalina
- Hidrólisis ácida
- Oxidación

➤ **Hidrólisis alcalina:**

Solución 1: Transferir a un balón de 50 ml una cantidad de estándar que equivalga aproximadamente a 50 ± 1 mg de Aspirina, añadir 10 ml de NaOH 1 N y agitar manualmente por 30 segundos. Almacenar esta solución durante 2 horas a temperatura ambiente de trabajo ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$); transcurrido el tiempo de almacenamiento adicionar 30 ml de solución de dilución, sonificar por 5 minutos en agitador ultrasónico, dejar enfriar y aforar a volumen. Agitar y filtrar con papel de filtro.

Solución 2: De la solución anterior filtrada, tomar 10 ml y transferir a un balón de 25 ml, aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml. Leer por triplicado la solución.

➤ **Hidrólisis ácida:**

Solución 1: Transferir a un balón de 50 ml una cantidad de estándar que equivalga aproximadamente a 50 ± 1 mg de Aspirina, añadir 10 ml de HCl 1 N y agitar manualmente por 30 segundos. Almacenar esta solución durante 2 horas a temperatura ambiente de trabajo ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$); transcurrido el tiempo de almacenamiento adicionar 30 ml de solución de dilución, sonificar por 5 minutos en agitador ultrasónico, dejar enfriar y aforar a volumen. Agitar y filtrar con papel de filtro.



Solución 2: De la solución anterior filtrada, tomar 10 ml y transferir a un balón de 25 ml, aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 μm por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml. Leer por triplicado la solución.

➤ **Oxidación:**

Solución 1: Transferir a un balón de 50 ml una cantidad de estándar que equivalga aproximadamente a 50 ± 1 mg de Aspirina, añadir 10 ml de Peróxido de Hidrogeno 3 % y agitar manualmente por 30 segundos. Almacenar esta solución durante 2 horas a temperatura ambiente de trabajo ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$); transcurrido el tiempo de almacenamiento adicionar 30 ml de solución de dilución, sonificar por 5 minutos en agitador ultrasónico, dejar enfriar y aforar a volumen. Agitar y filtrar con papel de filtro.

Solución 2: De la solución anterior filtrada, tomar 10 ml y transferir a un balón de 25 ml, aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 μm por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml. Leer por triplicado la solución.

6.10.2.2.2 Criterio de Aceptación

Comparar los cromatogramas del estándar sin someter a stress con el cromatograma de la solución estándar sometidos a estrés químico y evaluar si el grado de respuesta del método analítico es únicamente proporcionado por el analito de interés sin interferencias de picos adyacentes sobre la banda de elución principal del pico de aspirina.

6.10.3 Linealidad

6.10.3.1 Linealidad del sistema

6.10.3.1.1 Procedimiento



Preparar en forma independiente 7 soluciones estándar de Aspirina a las siguientes concentraciones 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120% y 130% de la concentración nominal utilizada en el método de ensayo.

Preparación de la solución estándar al 70%:

Solución 1: Previa corrección de pureza, pesar el equivalente a 35 ± 1 mg de estándar de ácido acetil salicílico y transferir a un balón de 50 ml, disolver con 30 ml de solución de dilución, agitar manualmente por 30 segundos y sonificar posteriormente en el ultrasónico por 5 minutos, enfriar y aforar con solución de dilución. Agitar.

Solución 2: Tomar 10 ml de la solución 1, transferir a un balón de 25 ml y aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

Preparación de la solución estándar al 80%:

Solución 1: Previa corrección de pureza, pesar el equivalente a 40 ± 1 mg de estándar de ácido acetil salicílico y transferir a un balón de 50 ml, disolver con 30 ml de solución de dilución, agitar manualmente por 30 segundos y sonificar posteriormente en el ultrasónico por 5 minutos, enfriar y aforar con solución de dilución. Agitar.

Solución 2: Tomar 10 ml de la solución 1, transferir a un balón de 25 ml y aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

Preparación de la solución estándar al 90%:

Solución 1: Previa corrección de pureza, pesar el equivalente a 45 ± 1 mg de estándar de ácido acetil salicílico y transferir a un balón de 50 ml, disolver con 30 ml de solución de dilución, agitar manualmente por 30 segundos y sonificar posteriormente en el ultrasónico por 5 minutos, enfriar y aforar con solución de dilución. Agitar.



Solución 2: Tomar 10 ml de la solución 1, transferir a un balón de 25 ml y aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 μm por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

Preparación de la solución estándar al 100%:

Véase preparación de solución estándar de Aspirina a concentración nominal (apéndice 6.9.3).

Preparación de la solución estándar al 110%:

Solución 1: Previa corrección de pureza, pesar el equivalente a 55 ± 1 mg de estándar de ácido acetil salicílico y transferir a un balón de 50 ml, disolver con 30 ml de solución de dilución, agitar manualmente por 30 segundos y sonificar posteriormente en el ultrasónico por 5 minutos, enfriar y aforar con solución de dilución. Agitar.

Solución 3: Tomar 10 ml de la solución 1, transferir a un balón de 25 ml y aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 μm por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

Preparación de la solución estándar al 120%:

Solución 1: Previa corrección de pureza, pesar el equivalente a 60 ± 1 mg de estándar de ácido acetil salicílico y transferir a un balón de 50 ml, disolver con 30 ml de solución de dilución, agitar manualmente por 30 segundos y sonificar posteriormente en el ultrasónico por 5 minutos, enfriar y aforar con solución de dilución. Agitar.

Solución 2: Tomar 10 ml de la solución 1, transferir a un balón de 25 ml y aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 μm por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.



Preparación de la solución estándar al 130%:

Solución 1: Previa corrección de pureza, pesar el equivalente a 65 ± 1 mg de estándar de ácido acetil salicílico y transferir a un balón de 50 ml, disolver con 30 ml de solución de dilución, agitar manualmente por 30 segundos y sonificar posteriormente en el ultrasónico por 5 minutos, enfriar y aforar con solución de dilución. Agitar.

Solución 3: Tomar 10 ml de la solución 1, transferir a un balón de 25 ml y aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

Analizar por triplicado cada solución en sentido creciente de concentración, de acuerdo a las condiciones cromatográficas establecidas en el método de análisis. Tabular y graficar los resultados obtenidos.

Determinar:

- ✓ Coeficiente de variación de los factores respuesta.
- ✓ Coeficiente de determinación.
- ✓ Intervalo de confianza para el intercepto.
- ✓ Intervalo de confianza para la pendiente.
- ✓ Prueba t para la pendiente.
- ✓ Prueba t para el intercepto.
- ✓ Análisis de varianza ANOVA.
- ✓ Test de Cochran.
- ✓ Gráfico de residuales.
- ✓ Prueba F.

6.10.3.1.2 Criterios de aceptación

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Coeficiente de variación	< 2%
Coeficiente de determinación	> 0.995



Intervalo de confianza para el intercepto	El intervalo debe incluir el valor de cero
Intervalo de confianza de la pendiente	El intervalo no debe incluir el valor de cero
Análisis de varianza ANOVA	$F_{1exp} > F_{1tabla}$ $F_{2exp} < F_{2tabla}$
Test de Cochran	$G_{exp} < G_{tabla}$
Prueba t para la pendiente	$t_{exp} > t_{tabla}$
Prueba t para el intercepto	$t_{exp} < t_{tabla}$
Gráfico de residuales	La distribución de los puntos debe ser aleatoria y no debe reflejar ninguna tendencia
Prueba F	$F_{exp} > F_{tabla}$

6.10.3.2 Linealidad del método.

6.10.3.2.1 Procedimiento

Preparar en forma independiente 7 soluciones de muestra a las siguientes concentraciones: 70%, 80%, 90%, 100%, 110% ,120% y 130% de la concentración nominal utilizada en el método de ensayo.

Pesar y pulverizar finamente no menos de 20 tabletas de Aspirina de 100 mg.

Preparación de la solución muestra al 70%:

Solución 1: Transferir una cantidad de polvo pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 35 ± 1 mg de Aspirina, a un balón de 50 ml. Agregar 30 ml de solución de dilución, agitar manualmente por 30 segundos y sonificar posteriormente por 5 minutos en agitador ultrasónico, dejar enfriar y aforar a volumen. Agitar y filtrar con papel de filtro.

Solución 2: Tomar 10 ml de la solución 1 filtrada, transferir a un balón de 25 ml y aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.



Preparación de la solución muestra al 80%:

Solución 1: Transferir una cantidad de polvo pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 40 ± 1 mg de Aspirina, a un balón de 50 ml. Agregar 30 ml de solución de dilución, agitar manualmente por 30 segundos y sonificar posteriormente por 5 minutos en agitador ultrasónico, dejar enfriar y aforar a volumen. Agitar y filtrar con papel de filtro.

Solución 2: Tomar 10 ml de la solución 1 filtrada, transferir a un balón de 25 ml y aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

Preparación de la solución muestra al 90%:

Solución 1: Transferir una cantidad de polvo pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 45 ± 1 mg de Aspirina, a un balón de 50 ml. Agregar 30 ml de solución de dilución agitar manualmente por 30 segundos y sonificar posteriormente por 5 minutos en agitador ultrasónico, dejar enfriar y aforar a volumen. Agitar y filtrar con papel de filtro.

Solución 2: Tomar 10 ml de la solución 1 filtrada, transferir a un balón de 25 ml y aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

Preparación de la solución muestra al 100%:

Véase preparación de la solución muestra a la concentración nominal (apéndice 6.9.5).

Preparación de la solución muestra al 110%:

Solución 1: Transferir una cantidad de polvo pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 55 ± 1 mg de Aspirina, a un balón de 50 ml. Agregar 30 ml de solución de dilución agitar manualmente por 30 segundos y sonificar posteriormente por 5 minutos en agitador ultrasónico, dejar enfriar y aforar a volumen. Agitar y filtrar con papel de filtro.



Solución 2: Tomar 10 ml de la solución 1 filtrada, transferir a un balón de 25 ml y aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 μm por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

Preparación de la solución muestra al 120%:

Solución 1: Transferir una cantidad de polvo pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 60 ± 1 mg de Aspirina, a un balón de 50 ml. Agregar 30 ml de solución de dilución agitar manualmente por 30 segundos y sonificar posteriormente por 5 minutos en agitador ultrasónico, dejar enfriar y aforar a volumen. Agitar y filtrar con papel de filtro.

Solución 2: Tomar 10 ml de la solución 1 filtrada, transferir a un balón de 25 ml y aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 μm por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

Preparación de la solución muestra al 130%:

Solución 1: Transferir una cantidad de polvo pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 65 ± 1 mg de Aspirina, a un balón de 50 ml. Agregar 30 ml de solución de dilución agitar manualmente por 30 segundos y sonificar posteriormente por 5 minutos en agitador ultrasónico, dejar enfriar y aforar a volumen. Agitar y filtrar con papel de filtro.

Solución 2: Tomar 10 ml de la solución 1 filtrada, transferir a un balón de 25 ml y aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 μm por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

Analizar por triplicado cada solución en sentido creciente de concentración, de acuerdo a las condiciones cromatográficas establecidas en el método de análisis. Tabular y graficar los resultados obtenidos.



Determinar:

- ✓ Coeficiente de determinación.
- ✓ Coeficiente de variación de los factores respuesta.
- ✓ Intervalo de confianza para el intercepto.
- ✓ Intervalo de confianza para la pendiente.
- ✓ Prueba t para la pendiente.
- ✓ Prueba t para el intercepto.
- ✓ Análisis de varianza ANOVA.
- ✓ Test de Cochran.
- ✓ Gráfico de residuales.
- ✓ Prueba F.

6.10.3.2.2 Criterios de aceptación

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Coeficiente de variación	< 3%
Coeficiente de determinación	> 0.995
Intervalo de confianza para el intercepto	El intervalo debe incluir el valor de cero
Intervalo de confianza para la pendiente	El intervalo no debe incluir el valor de cero
Análisis de varianza ANOVA	$F_{1\text{exp}} > F_{1\text{tabla}}$ $F_{2\text{exp}} < F_{2\text{tabla}}$
Test de Cochran	$G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}}$
Prueba t para la pendiente	$t_{\text{exp}} > t_{\text{tab}}$
Prueba t para el intercepto	$t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$
Gráfico de residuales	La distribución de los puntos debe ser aleatoria y no debe reflejar ninguna tendencia.
Prueba F.	$F_{\text{exp}} > F_{\text{tab}}$



6.10.4 Precisión.

6.10.4.1 Repetibilidad del sistema

6.10.4.1.1 Procedimiento

Determinar analizando repetidamente una misma muestra de solución estándar de aspirina 10 veces a la concentración nominal. Véase preparación de solución estándar de ácido acetil salicílico a la concentración nominal (apéndice 6.9.3).

Determinar el coeficiente de variación de los factores respuesta (área).

6.10.4.1.2 Criterio de aceptación

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Coeficiente de variación	$\leq 2 \%$

6.10.4.2 Repetibilidad del método

6.10.4.2.1 Procedimiento

Preparar 3 soluciones muestras independientes a las siguientes concentraciones 80%, 100% y 120% de la concentración nominal utilizada en el método de ensayo y analizarlas por triplicado.

Pesar y pulverizar finamente no menos de 20 tabletas de Aspirina de 100 mg.

Preparación de la solución muestra al 80%:

Solución 1: Transferir una cantidad de polvo pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 40 ± 1 mg de aspirina, a un balón de 50 ml. Agregar 30 ml de solución de dilución agitar manualmente por 30 segundos y sonificar posteriormente por 5 minutos en agitador ultrasónico, dejar enfriar y aforar a volumen. Agitar y filtrar con papel de filtro.

Solución 2: Tomar 10 ml de la solución 1 filtrada, transferir a un balón de 25 ml y aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el



filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 μm por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

Preparación de la solución muestra al 100%

Véase preparación de solución muestra a concentración nominal (apéndice 6.9.5).

Preparación de la solución muestra al 120%

Solución 1: Transferir una cantidad de polvo pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 60 ± 1 mg de aspirina, a un balón de 50 ml. Agregar 30 ml de solución de dilución agitar manualmente por 30 segundos y sonificar posteriormente por 5 minutos en agitador ultrasónico, dejar enfriar y aforar a volumen. Agitar y filtrar con papel de filtro.

Solución 2: Tomar 10 ml de la solución 1 filtrada, transferir a un balón de 25 ml y aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 μm por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

Realizar el procesamiento estadístico de los resultados determinando:

- ✓ Porcentaje recuperado.
- ✓ Coeficiente de variación del porcentaje recuperado.
- ✓ Intervalos de confianza a cada nivel de concentración.

6.10.4.2.2 Criterios de aceptación

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Coefficiente de variación	$\leq 2\%$
Porcentaje recuperado	97% - 103%
Intervalos de confianza	El promedio del porcentaje recuperado para cada nivel de concentración está dentro del intervalo de confianza calculado.



6.10.4.3 Precisión intermedia del sistema

6.10.4.3.1 Procedimiento

Para la evaluación de la precisión intermedia trabajar con:

- ✓ Dos analistas
- ✓ Un equipo
- ✓ Tres días consecutivos

Cada analista debe preparar tres soluciones de estándar de aspirina a la concentración nominal como se indica en el apéndice 6.9.3, y analizar por triplicado. Repetir este procedimiento tres días consecutivos. Realizar un estudio matricial con los datos obtenidos.

Realizar el procesamiento de los resultados determinando:

- ✓ El coeficiente de variación de los resultados obtenidos (áreas) para cada grupo de análisis.
- ✓ El coeficiente de variación global de los resultados obtenidos (áreas).
- ✓ ANOVA de dos factores.
- ✓ Test de Bartlett entre analistas.
- ✓ Test de Bartlett entre días.

6.10.4.3.2 Criterios de aceptación

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
El coeficiente de variación para cada grupo de análisis	$\leq 2 \%$
Coeficiente de variación global	$\leq 3 \%$
ANOVA	$F_{\text{exp}} < F_{\text{crítico}}$ entre analistas, entre días y para la interacción.
Bartlett	$X^2_{\text{exp}} < X^2_{\text{tabla}}$ (entre analistas) $X^2_{\text{exp}} < X^2_{\text{tabla}}$ (entre días)



6.10.4.4 Precisión intermedia del método

6.10.4.4.1 Procedimiento

Para la evaluación de la precisión intermedia trabajar con:

- ✓ Dos analistas
- ✓ Un equipo
- ✓ Tres días consecutivos

Cada analista debe preparar tres soluciones de muestra a la concentración nominal como se indica en el apéndice 6.9.5, y analizar por triplicado. Repetir este procedimiento tres días consecutivos. Realizar un estudio matricial con los datos obtenidos.

Realizar el procesamiento de los resultados determinando:

- ✓ Porcentaje recuperado de Aspirina.
- ✓ El coeficiente de variación del % recuperado para cada grupo de análisis.
- ✓ El coeficiente de variación global del % recuperado.
- ✓ ANOVA de dos factores.
- ✓ Test de Bartlett entre analistas.
- ✓ Test de Bartlett entre días.

6.10.4.4.2 Criterios de aceptación

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Porcentaje recuperado	97 % - 103 %
El coeficiente de variación para cada grupo de análisis	$\leq 2\%$
Coeficiente de variación global	$\leq 3\%$
ANOVA	$F_{\text{exp}} < F_{\text{crítico}}$ entre analistas, entre días y para la interacción.
Bartlett	$X^2_{\text{exp}} < X^2_{\text{tabla}}$ (entre analistas) $X^2_{\text{exp}} < X^2_{\text{tabla}}$ (entre días)



6.10.5 Exactitud

6.10.5.1 Procedimiento

La exactitud se determina mediante el método de adición patrón. Preparar muestras a tres niveles de concentración 70%, 100% y 130% de la concentración nominal de la muestra.

Solución 1: Pesar y pulverizar finamente no menos de 20 tabletas de Aspirina de 100 mg. Transferir una cantidad de polvo pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 50 ± 1 mg de aspirina, a un balón de 50 ml. Agregar 30 ml de solución de dilución agitar manualmente por 30 segundos y sonificar posteriormente por 5 minutos en agitador ultrasónico, dejar enfriar y aforar a volumen. Agitar y filtrar con papel de filtro.

Solución 2: Previa corrección de pureza, pesar el equivalente a 50 ± 1 mg de estándar de ácido acetil salicílico y transferir a un balón de 50 ml, disolver con 30 ml de solución de dilución, agitar manualmente por 30 segundos y posteriormente sonificar en el ultrasónico por 5 minutos, enfriar y aforar con solución de dilución. Agitar.

Preparación de la solución blanco:

Filtrar la **solución 1** con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

Preparación de la solución patrón cargada al 70%:

Tomar 5 ml de la **solución 1** y 2 ml de la **solución 2**, transferir a un balón de 25 ml, aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

Preparación de la solución patrón cargada al 100%:

Tomar 5 ml de la **solución 1** y 5 ml de la **solución 2**, transferir a un balón de 25 ml, aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el



filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 μm por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

Preparación de la solución patrón cargada al 130%:

Tomar 5 ml de la **solución 1** y 8 ml de la **solución 2**, transferir a un balón de 25 ml, aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 μm por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

Analizar por triplicado la solución blanco y cada solución patrón cargada a los diferentes niveles de concentración.

Procesar los resultados obtenidos y determinar:

- ✓ Respuestas experimentales netas (muestra cargada - blanco de concentración x).
- ✓ Gráfica de la concentración en función de las respuestas experimentales.
- ✓ Áreas obtenidas por interpolación en la recta de calibración normal.
- ✓ Porcentaje recuperado a partir de la comparación entre las respuestas experimentales netas y los resultados obtenidos por interpolación.
- ✓ Coeficiente de variación.
- ✓ Test de Student.
- ✓ Se confrontan las varianzas de la curva de calibración normal y de adición patrón, a través de la prueba Fisher.

6.10.5.2 Criterios de aceptación

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
% Promedio recuperado	97 % - 103 %
Test de t	$t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$
Coeficiente de Variación	< 2 %
F	$F_{\text{exp}} < F_{\text{tab}}$



6.10.6 Límite de detección

El límite de detección se determina a través de la desviación estándar residual y la pendiente de la curva de calibración por adición patrón, se multiplica una constante con un valor equivalente a 3.3 por el cociente de la división de la desviación estándar residual entre la pendiente de la recta de calibrado de adición patrón. Utilizar la siguiente fórmula para calcular el límite de detección:

$$LD = 3.3 S_L/b$$

Donde:

S_L : Desviación estándar residual obtenida en la Linealidad del Sistema.

b: Pendiente de la recta de calibrado de adición patrón.

6.10.7 Límite de cuantificación

Se utiliza el mismo método descrito para el límite de detección modificando el valor de la constante por un valor de 10. Utilizar la siguiente fórmula para calcular el límite de cuantificación:

$$LD = 10 S_L/b$$

Donde:

S_L : Desviación estándar residual obtenida en la Linealidad del Sistema.

b: Pendiente de la recta de calibrado de adición patrón.

6.10.8 Robustez

6.10.8.1 Procedimiento

La determinación de la robustez se lleva a cabo mediante la realización de pequeños cambios en las condiciones nominales del método analítico. Realizar un diseño factorial completo de ocho experimentos (2^3) para evaluar la influencia de 3 factores.

Los factores de variación en el método analítico serán la temperatura de la columna (± 1 °C), el flujo (± 0.1 ml) y el pH de la solución de 1- heptanosulfonato de sodio (± 0.1).



Preparar una solución muestra y una solución estándar de ácido acetil salicílico a la concentración nominal (véase apéndice 6.9.3 y 6.9.5); y analizarlas en las condiciones nominales del método analítico (muestra control); esta misma muestra se analizar en las condiciones de cambio descritas en la tabla siguiente:

N ^o Experimento	FACTORES			INTERACCIONES			
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
1	-	-	-	+	+	+	-
2	+	-	-	-	-	+	+
3	-	+	-	-	+	-	+
4	+	+	-	+	-	-	-
5	-	-	+	+	-	-	+
6	+	-	+	-	+	-	-
7	-	+	+	-	-	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+

	Temperatura de la columna (A)	Flujo (B)	pH(C)
+	46	1.3	3.6
-	44	1.1	3.4

Inyectar la solución muestra por triplicado por cada factor de cambio. Realizar los ocho experimentos según indica cada línea de la matriz, con lo que se obtienen ocho resultados para contenido en principio activo (R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 y R8).

Una vez obtenidos los resultados el siguiente paso fue realizar la evaluación estadística que evidencie cuál de los factores o qué interacción entre ellos tiene una influencia significativa.

Calcular la influencia de cada factor mediante la siguiente fórmula:



Influencia del factor A: $A=1/4(-R1+R2-R3+R4-R5+R6-R7+R8)$

Influencia del factor B: $B=1/4(-R1-R2+R3+R4-R5-R6+R7+R8)$

Influencia del factor C: $C=1/4(-R1-R2-R3-R4+R5+R6+R7+R8)$

La influencia de cada interacción será:

$AB=1/4(+R1-R2-R3+R4+R5-R6-R7+R8)$

$AC=1/4(+R1-R2+R3-R4-R5+R6-R7+R8)$

$BC=1/4(+R1+R2-R3-R4-R5-R6+R7+R8)$

$ABC=1/4(-R1+R2+R3-R4+R5-R6-R7+R8)$

Calcular los efectos principales y las interacciones entre los distintos factores.

6.10.8.2 Criterios de aceptación

La influencia de cada factor y de sus interacciones no supera el límite inferior y superior a dos desviaciones estándares.

6.10.9 Estabilidad de la solución analítica

6.10.9.1 Procedimiento

Preparar una solución muestra a la concentración nominal (véase apéndice 6.9.5), una solución estándar de Aspirina (véase apéndice 6.9.3) y analizar cada una de las soluciones por triplicado según las condiciones del método. Esta lectura corresponde al tiempo cero de prueba.

Almacenar los viales de las soluciones analíticas a temperatura ambiente de trabajo (25 ± 1 °C), y analizar las mismas por triplicado a las 2, 4, 6, 24 y 48 horas de almacenamiento.

6.10.9.2 Criterio de aceptación

La muestra es estable en la condición de almacenamiento evaluada si el valor medio del porcentaje recuperado se encuentra dentro del rango 97%- 103%.



6.10.10 Determinación de la incertidumbre para la cuantificación de Aspirina.

En la estimación de la incertidumbre se realizan los siguientes pasos:

1. Identificar el mensurado.
2. Establecer el modelo matemático.
3. Identificar las fuentes de incertidumbre (diagrama de causa y efecto).
4. Cuantificar los componentes de la las incertidumbres.
5. Calcular los coeficientes de sensibilidad.
6. Calcular la incertidumbre combinada: ley de propagación de la incertidumbre.
7. Calcular la incertidumbre expandida para un nivel de confianza 95.4 % en cuyo caso el factor de cobertura es $k=2$.

6.11 Procedimiento experimental para determinar los parámetros de validación en la determinación de ácido salicílico libre.

6.11.1 Aptitud del Sistema

6.11.1.1 Procedimiento

Preparar una solución estándar de ácido salicílico a la concentración nominal como se indica en el apéndice 6.9.4. y realizar repetidamente 10 lecturas.

Determinar:

- Coeficiente de variación de los factores respuesta (área).
- Número de platos teóricos USP.
- Factor de asimetría.

6.11.1.2 Criterios de aceptación

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Coeficiente de variación	< 2 %
Número de platos teóricos USP	> 2000
Factor de asimetría	< 2



6.11.2 Selectividad

6.11.2.1 Identificación del activo

6.11.2.1.1 Procedimiento

Preparar una solución estándar de ácido salicílico a la concentración nominal como se indica en el apéndice 6.9.4. (Solución A).

Preparar una solución muestra cargada con estándar de ácido salicílico. (Solución B).

Preparar una solución blanco como se indica en el apéndice 6.9.6. (Solución C).

Preparación de la solución B:

Solución 1: Pesar y pulverizar finamente no menos de 20 tabletas de Aspirina de 100 mg. Transferir una cantidad de polvo pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 50 ± 1 mg de aspirina, a un balón de 50 ml. Agregar 30 ml de solución de dilución agitar manualmente por 30 segundos y posteriormente sonificar por 5 minutos en agitador ultrasónico, dejar enfriar y aforar a volumen. Agitar y filtrar con papel de filtro.

Solución 2: Previa corrección de pureza, pesar el equivalente a 20 ± 1 mg de estándar de ácido salicílico y transferir a un balón de 50 ml, disolver con 30 ml de solución de dilución, agitar manualmente por 30 segundos y aforar con solución de dilución. Agitar.

Tomar 10 ml de la **solución 1** y 2 ml de la **solución 2**, transferir a un balón de 25 ml, aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

Analizar por triplicado cada una de las soluciones (A, B y C).

Comparar los espectros obtenidos en la solución estándar con los espectros obtenidos en la solución muestra cargada; y comparar los espectros obtenidos en la solución estándar con los espectros obtenidos en la solución blanco.



6.11.2.1.2 Criterio de aceptación

El espectro de la solución A y el espectro de la solución B. **Identificación positiva.**

El espectro de la solución A y el espectro de la solución C. **Identificación negativa.**

6.11.3 Linealidad

6.11.3.1 Linealidad del sistema

6.11.3.1.1 Procedimiento:

Preparar en forma independiente 7 soluciones estándar de ácido salicílico a las siguientes concentraciones 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120% y 130% de la concentración nominal utilizada en el método de ensayo.

Preparación de la solución estándar al 70%:

Solución 1: Previa corrección de pureza, pesar el equivalente a 14 ± 1 mg de ácido salicílico y transferir a un balón de 50 ml, disolver con 30 ml de solución de dilución, agitar manualmente por 30 segundos y aforar con solución de dilución. Agitar.

Solución 2: Tomar 2 ml de la solución 1, transferir a un balón de 25 ml y aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

Preparación de la solución estándar al 80%:

Solución 1: Previa corrección de pureza, pesar el equivalente a 16 ± 1 mg de ácido salicílico y transferir a un balón de 50 ml, disolver con 30 ml de solución de dilución, agitar manualmente por 30 segundos y aforar con solución de dilución. Agitar.

Solución 2: Tomar 2 ml de la solución 1, transferir a un balón de 25 ml y aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.



Preparación de la solución estándar al 90%:

Solución 1: Previa corrección de pureza, pesar el equivalente a 18 ± 1 mg de ácido salicílico y transferir a un balón de 50 ml, disolver con 30 ml de solución de dilución, agitar manualmente por 30 segundos y aforar con solución de dilución. Agitar.

Solución 2: Tomar 2 ml de la solución 1, transferir a un balón de 25 ml y aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

Preparación de la solución estándar al 100%:

Véase preparación de solución estándar de ácido salicílico a la concentración nominal (apéndice 6.9.4).

Preparación de la solución estándar al 110%:

Solución 1: Previa corrección de pureza, pesar el equivalente a 22 ± 1 mg de ácido salicílico y transferir a un balón de 50 ml, disolver con 30 ml de solución de dilución, agitar manualmente por 30 segundos y aforar con solución de dilución. Agitar.

Solución 2: Tomar 2 ml de la solución 1, transferir a un balón de 25 ml y aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

Preparación de la solución estándar al 120%:

Solución 1: Previa corrección de pureza, pesar el equivalente a 24 ± 1 mg de ácido salicílico y transferir a un balón de 50 ml, disolver con 30 ml de solución de dilución, agitar manualmente por 30 segundos y aforar con solución de dilución. Agitar.

Solución 2: Tomar 2 ml de la solución 1, transferir a un balón de 25 ml y aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el



filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 μ m por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

Preparación de la solución estándar al 130%:

Solución 1: Previa corrección de pureza, pesar el equivalente a 26 ± 1 mg de ácido salicílico y transferir a un balón de 50 ml, disolver con 30 ml de solución de dilución, agitar manualmente por 30 segundos y aforar con solución de dilución. Agitar.

Solución 3: Tomar 2 ml de la solución 1, transferir a un balón de 25 ml y aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 μ m por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

Analizar por triplicado cada solución en sentido creciente de concentración, de acuerdo a las condiciones cromatográficas establecidas en el método de análisis. Tabular y graficar los resultados obtenidos.

Determinar:

- ✓ Coeficiente de variación de los factores respuesta (áreas).
- ✓ Coeficiente de determinación.
- ✓ Intervalo de confianza para el intercepto.
- ✓ Intervalo de confianza de la pendiente.
- ✓ Prueba t para la pendiente.
- ✓ Prueba t para el intercepto.
- ✓ Análisis de varianza ANOVA.
- ✓ Test de Cochran.
- ✓ Gráfico de residuales.
- ✓ Prueba F.



6.11.3.1.2 Criterios de aceptación

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Coeficiente de variación	< 2 %
Coeficiente de determinación	> 0.995
Intervalo de confianza para el intercepto	El intervalo debe incluir el valor de cero
Intervalo de confianza de la pendiente	El intervalo no debe incluir el valor de cero
Análisis de varianza ANOVA	$F_{1exp} > F_{1tab}$ $F_{2exp} < F_{2tab}$
Test de Cochran	$G_{exp} < G_{tab}$
Prueba t para la pendiente	$t_{exp} > t_{tab}$
Prueba t para el intercepto	$t_{exp} < t_{tab}$
Gráfico de residuales	La distribución de los puntos debe ser aleatoria y no debe reflejar ninguna tendencia
Prueba F.	$F_{exp} > F_{tab}$

6.11.4 Precisión.

6.11.4.1 Repetibilidad del sistema

6.11.4.1.1 Procedimiento

Determinar analizando repetidamente una misma muestra de solución estándar de ácido salicílico 10 veces a la concentración nominal.

Determinar el coeficiente de variación de los factores respuesta (área).

6.11.4.1.2 Criterios de aceptación

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Coeficiente de variación	$\leq 2 \%$



6.11.4.2 Precisión intermedia del sistema

6.11.4.2.1 Procedimiento

Para la evaluación de la precisión intermedia trabajar con:

- ✓ Dos analistas
- ✓ Un equipo
- ✓ Tres días consecutivos

Cada analista debe preparar tres soluciones de estándar de ácido salicílico a la concentración nominal como se indica en el apéndice 6.9.4, y analizar por triplicado. Repetir este procedimiento tres días consecutivos. Realizar un estudio matricial con los datos obtenidos.

Realizar el procesamiento de los resultados determinando:

- ✓ El coeficiente de variación de los resultados obtenidos (áreas) para cada grupo de análisis.
- ✓ El coeficiente de variación global de los resultados obtenidos (áreas).
- ✓ ANOVA de dos factores.
- ✓ Test de Bartlett entre analistas.
- ✓ Test de Bartlett entre días.

6.11.4.2.2 Criterios de aceptación

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
El coeficiente de variación para cada grupo de análisis	$\leq 2 \%$
Coefficiente de variación global	$\leq 3 \%$
ANOVA	$F_{\text{exp}} < F_{\text{crítico}}$ entre analistas, entre días y para la interacción.
Bartlett	$X^2_{\text{exp}} < X^2_{\text{tabla}}$ (entre analistas) $X^2_{\text{exp}} < X^2_{\text{tabla}}$ (entre días)



6.11.5 Exactitud

6.11.5.1 Procedimiento

La exactitud se determina mediante el método de adición patrón. Preparar muestras a tres niveles de concentración 70%, 100% y 130% de la concentración nominal de la muestra.

Solución 1: Pesar y pulverizar finamente no menos de 20 Tabletas de Aspirina de 100 mg. Transferir una cantidad de polvo pesada con exactitud, que equivalga aproximadamente a 50 ± 1 mg de aspirina, a un balón de 50 ml. Agregar 30 ml de solución de dilución agitar manualmente por 30 segundos y sonificar posteriormente por 5 minutos en agitador ultrasónico, dejar enfriar y aforar a volumen. Agitar y filtrar con papel de filtro.

Solución 2: Previa corrección de pureza, pesar el equivalente a 20 ± 1 mg de estándar de ácido salicílico y transferir a un balón de 50 ml, disolver con 30 ml de solución de dilución, agitar manualmente por 30 segundos y aforar con solución de dilución. Agitar.

Preparación de la solución blanco:

Filtrar la **solución 1** con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

Preparación de la solución patrón cargada al 70%:

Tomar 10 ml de la **solución 1** y 1.4 ml de la **solución 2**, transferir a un balón de 25 ml, aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

Preparación de la solución patrón cargada al 100%:

Tomar 10 ml de la **solución 1** y 2 ml de la **solución 2**, transferir a un balón de 25 ml, aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.



Preparación de la solución patrón cargada al 130%:

Tomar 10 ml de la **solución 1** y 2.6 ml de la **solución 2**, transferir a un balón de 25 ml, aforar con solución de dilución. Agitar manualmente por 30 segundos. Filtrar la solución con el filtrador Millipore usando un filtro de nylon de tamaño de poro de 0.45 μm por 13 mm de diámetro. Transferir la solución filtrada a un vial de 2 ml.

Analizar por triplicado la solución blanco y cada una de las soluciones cargadas a los diferentes niveles de concentración.

Procesar los resultados obtenidos y determinar:

- ✓ Respuestas experimentales netas (muestra cargada-blanco de concentración x).
- ✓ Graficar la concentración en función de las respuestas experimentales.
- ✓ Áreas obtenidas por interpolación en la recta de calibración normal.
- ✓ Porcentaje recuperado a partir de la comparación entre las respuestas experimentales netas y los resultados obtenidos por interpolación.
- ✓ Coeficiente de variación.
- ✓ Test de Student.
- ✓ Se confrontan las varianzas de la curva de calibración normal y de adición patrón, a través de la prueba Fisher.

6.11.5.2 Criterios de aceptación

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
% Promedio recuperado	97 % - 103 %
Test de t	$t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$
Coeficiente de Variación	< 2 %
F	$F_{\text{exp}} < F_{\text{tab}}$



6.11.6 Estabilidad de la solución analítica

6.11.6.1 Procedimiento

Preparar una solución muestra a la concentración nominal (véase apéndice 6.9.5), una solución estándar de ácido salicílico (véase apéndice 6.9.4) y analizar cada una de las soluciones por triplicado según las condiciones del método. Esta lectura corresponde al tiempo cero de prueba.

Almacenar los viales de las soluciones analíticas a temperatura ambiente de trabajo (25 ± 1 °C), y analizar las mismas por triplicado a las 2, 4, 6, 24 y 48 horas de almacenamiento.

Calcular el porcentaje de ácido salicílico libre en cada intervalo de tiempo evaluado.

6.11.6.2 Criterio de Aceptación

La muestra es estable en la condición de almacenamiento evaluada si el valor medio del porcentaje de ácido salicílico libre es menor del 0.3%.

6.11.7 Límite de detección.

El límite de detección se determina a través de la desviación estándar residual y la pendiente de la curva de calibración por adición patrón, se multiplica una constante con un valor equivalente a 3.3 por el cociente de la división de la desviación estándar residual entre la pendiente de la recta de calibrado de adición patrón. Utilizar la siguiente fórmula para calcular el límite de detección:

$$LD = 3.3 S_L/b$$

Donde:

S_L : Desviación estándar residual obtenida en la Linealidad del Sistema.

b: Pendiente de la recta de calibrado de adición patrón.

6.11.8 Límite de cuantificación

Se utiliza el mismo método descrito para el límite de detección modificando el valor de la constante por un valor de 10. Utilizar la siguiente fórmula para calcular el límite de cuantificación:



$$LD = 10 S_L/b$$

Donde:

S_L : Desviación estándar residual obtenida en la Linealidad del Sistema.

b: Pendiente de la recta de calibrado de adición patrón.

6.11.9 Determinación de la incertidumbre para la cuantificación de ácido salicílico.

En la estimación de la incertidumbre se realizan los siguientes pasos:

1. Identificar el mensurado.
2. Establecer el modelo matemático.
3. Identificar las fuentes de incertidumbre (diagrama de causa y efecto).
4. Cuantificar los componentes de la las incertidumbres.
5. Calcular los coeficientes de sensibilidad.
6. Calcular la incertidumbre combinada: ley de propagación de la incertidumbre.
7. Calcular la incertidumbre expandida para un nivel de confianza 95.4 % en cuyo caso el factor de cobertura es $k=2$.



VII. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS



7.1 APTITUD DEL SISTEMA

Tabla 1: Resultados de aptitud del sistema cromatográfico para Aspirina.

Réplica	Áreas	NPT USP	As USP
1	961.6	6975.72	0.75
2	956.0	7159.49	0.78
3	956.4	7244.07	0.81
4	972.7	6603.87	0.77
5	959.9	7184.41	0.82
6	973.7	7087.24	0.80
7	957.9	7160.83	0.78
8	961.8	7184.56	0.81
9	956.2	7199.76	0.79
10	966.8	6967.3	0.77
Promedio	962.3	7076.73	0.79
Desviación estándar	6.63		
Coefficiente de variación	0.69		

Tabla 2: Resultados de aptitud del sistema cromatográfico para Ácido salicílico.

Réplica	Áreas	NPT USP	As USP
1	171.3	3552.16	0.99
2	167.9	3588.46	1.10
3	166.0	3686.81	0.93
4	166.7	3579.75	0.93
5	167.8	3452.22	1.06
6	166.2	3639.52	0.90
7	170.3	3584.43	0.96
8	173.3	3569.71	1.14
9	168.9	3504.25	0.92
10	165.5	3667.62	1.19
Promedio	168.39	3582.49	1.012
Desviación estándar	2.56		
Coefficiente de variación	1.52		



Análisis de Resultados de aptitud del sistema cromatográfico:

En la evaluación de la aptitud del sistema cromatográfico para la cuantificación de Aspirina y la determinación de ácido salicílico, se obtuvieron resultados dentro de las especificaciones establecidas: Número de platos teóricos obtenidos es mayor a 2000, el factor de asimetría es menor a 2 y el coeficiente de variación de las áreas es menor al 2%; por tanto, el sistema cromatográfico fue idóneo para llevar a cabo la validación del método analítico para la cuantificación de Aspirina y la determinación de ácido salicílico libre.

7.2 SELECTIVIDAD

7.2.1 Identificación del activo

Para la identificación del activo de Aspirina y ácido salicílico, se procedió a comparar los cromatogramas obtenidos de las soluciones preparadas. Los resultados se muestran a continuación:

Figura N° 1: Cromatograma de la solución blanco de Aspirina

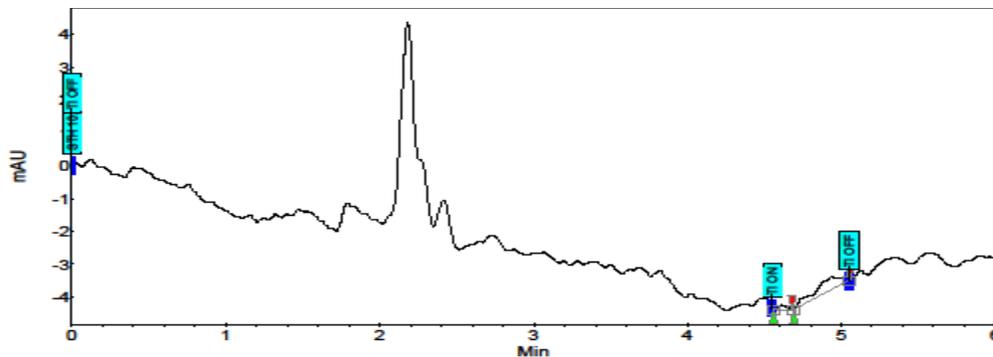


Figura N° 2: Cromatograma de la solución estándar de Aspirina

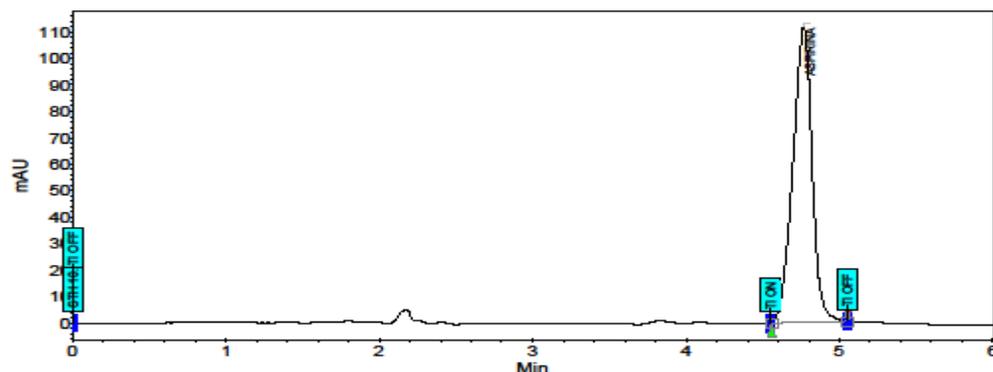




Figura N° 3: Cromatograma de la solución muestra de Aspirina

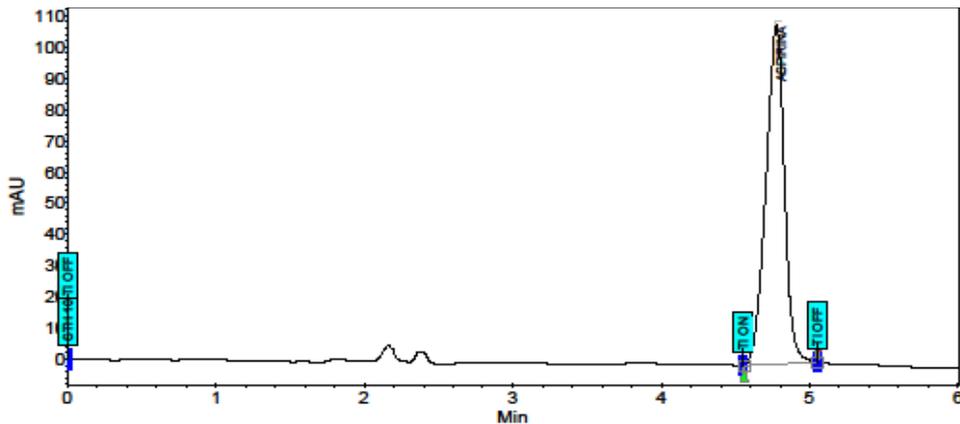


Figura N° 4: Cromatograma de la solución blanco de ácido salicílico

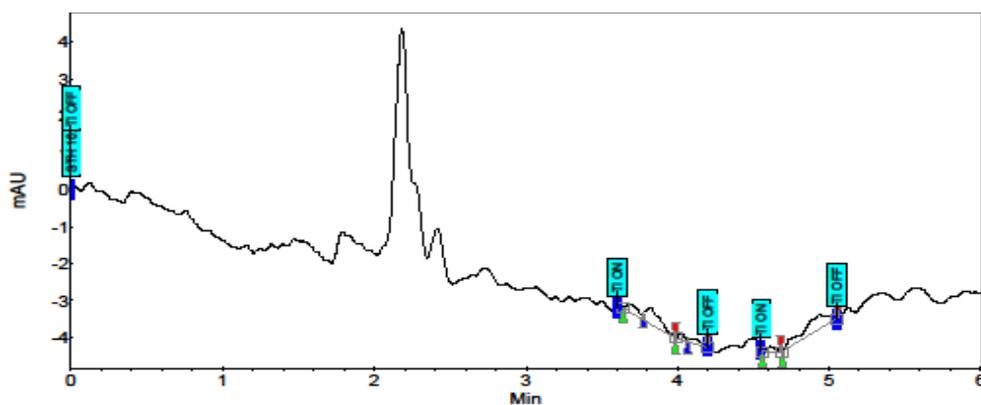


Figura N° 5: Cromatograma de la solución estándar de ácido salicílico

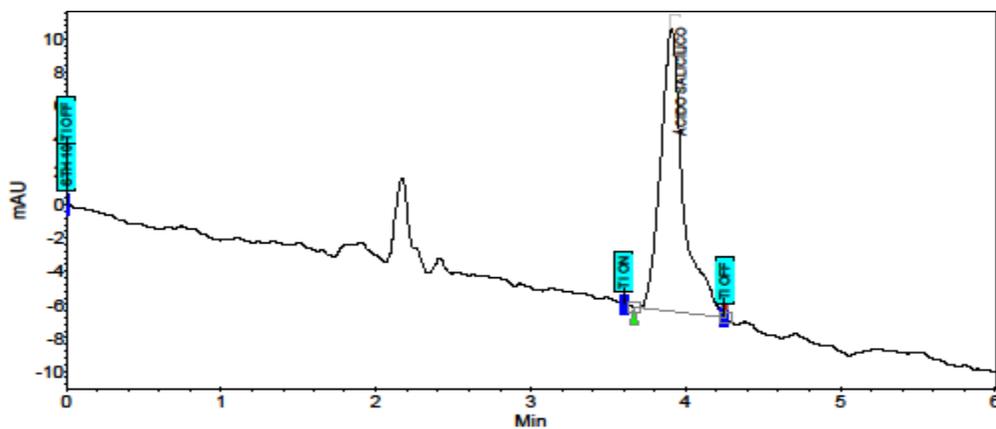
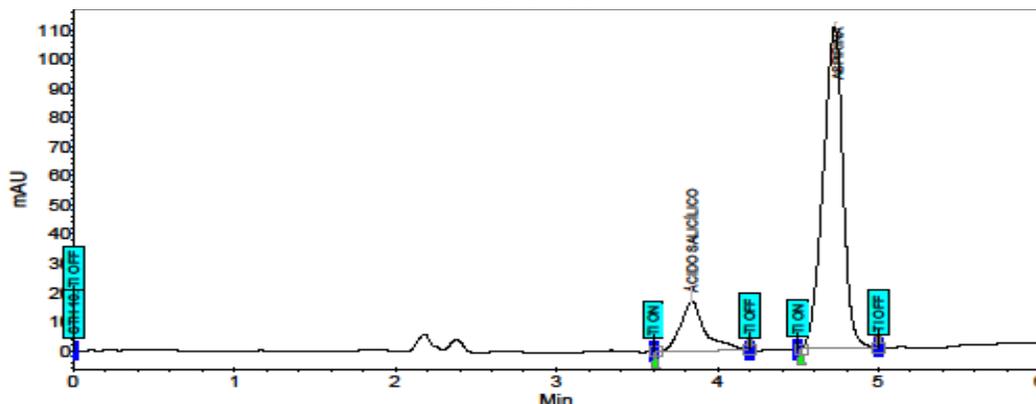




Figura N° 6: Cromatograma de la solución muestra de Aspirina cargada con ácido salicílico



Análisis de resultados de la selectividad (Identificación del activo):

Como se puede apreciar en la Figura 1 y Figura 2, se obtuvo una identificación negativa cuando se compara el cromatograma del blanco con el estándar de Aspirina, y se obtuvo una identificación positiva cuando se compara el cromatograma del estándar de Aspirina con la muestra (ver figura 2 y 3). También se obtuvo una identificación negativa cuando se compara el cromatograma del blanco con el estándar de ácido salicílico (ver Figura 4 y 5) y se obtuvo una identificación positiva cuando se comparan el cromatograma del estándar de ácido salicílico con la muestra cargada (ver figura 5 y 6). Por tanto, el método es selectivo para la identificación del activo.

7.2.2 Selectividad frente a productos de degradación

Figura N° 7: Cromatograma de la solución estándar de aspirina sin someter a estrés

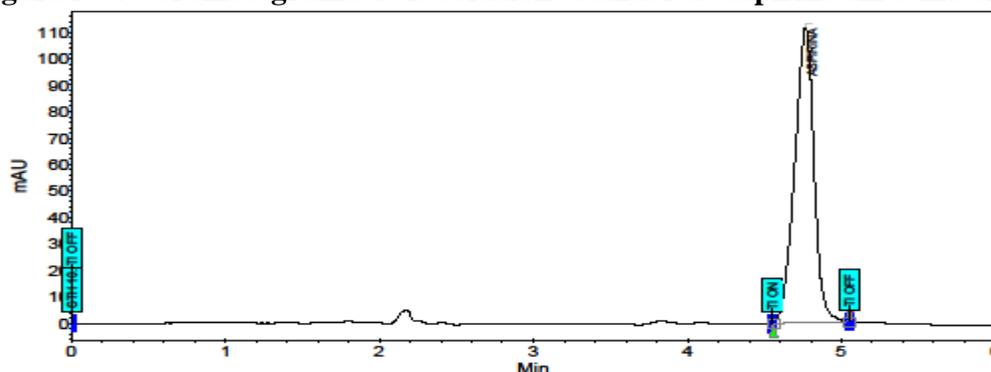




Figura N° 8: Cromatograma de solución estándar de aspirina (hidrólisis ácida)

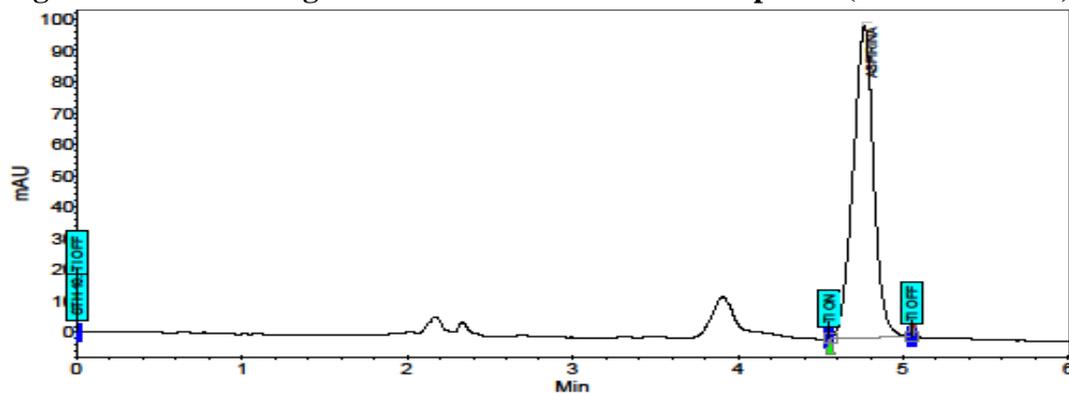


Figura N° 9: Cromatograma de solución estándar de aspirina (hidrólisis alcalina)

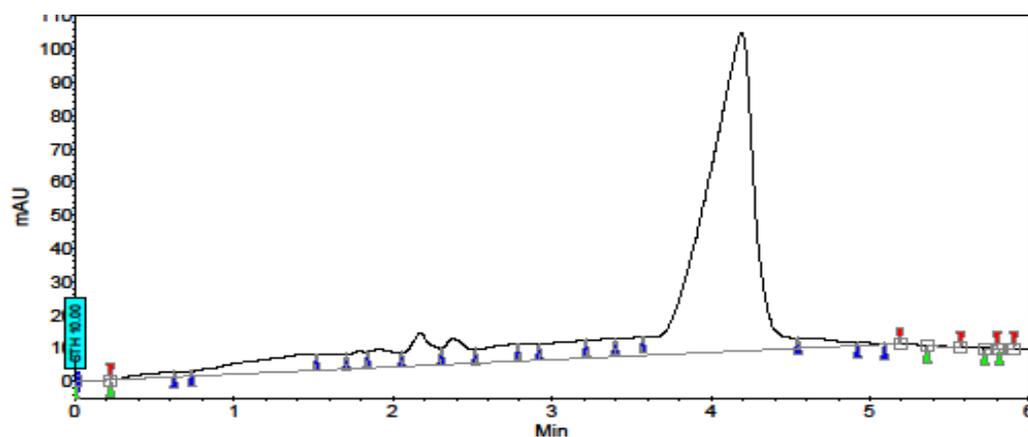
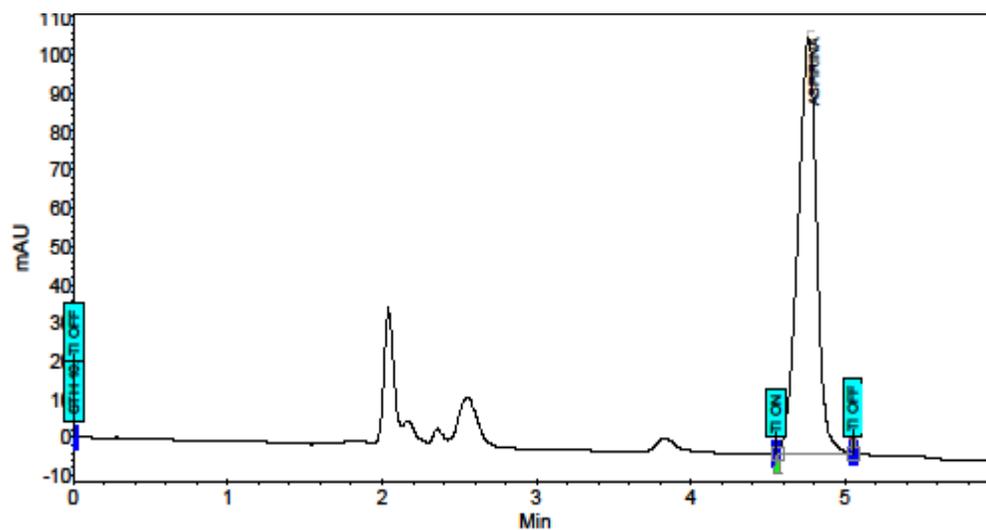


Figura N° 10: Cromatograma de solución estándar de aspirina (oxidación)





Análisis de resultados de selectividad frente a productos de degradación:

Al someter el estándar a degradación, se producen señales inequívocas de la presencia de Aspirina y ácido salicílico libre y no existen interferencias de otras sustancias que pueden estar presente en la muestra degradada. Por tanto, el método es selectivo frente a productos de degradación.

7.3 LINEALIDAD

7.3.1 Resultados de la linealidad del sistema de Aspirina

Tabla N° 3: Cálculos para la ecuación de la recta.

X (Concentración) µg/ml	Y (Área)	ymedia	xy	x ²	y ²	f(y/x)
279.52	690.2	683.67	192924.704	78131.4304	476376.04	2.469233
279.52	690.0		192868.800	78131.4304	476100.00	2.468517
279.52	670.8		187502.016	78131.4304	449972.64	2.399828
319.45	762.0	764.57	243420.900	102048.3025	580644.00	2.385350
319.45	769.3		245752.885	102048.3025	591822.49	2.408202
319.45	762.4		243548.680	102048.3025	581253.76	2.386602
359.38	865.7	870.63	311115.266	129153.9844	749436.49	2.408871
359.38	867.6		311798.088	129153.9844	752729.76	2.414158
359.38	878.6		315751.268	129153.9844	771937.96	2.444766
399.31	965.6	964.03	385573.736	159448.4761	932383.36	2.418171
399.31	965.1		385374.081	159448.4761	931418.01	2.416919
399.31	961.4		383896.634	159448.4761	924289.96	2.407653
439.24	1067.9	1066.60	469064.396	192931.7776	1140410.41	2.431245
439.24	1061.9		466428.956	192931.7776	1127631.61	2.417585
439.24	1070.0		469986.800	192931.7776	1144900.00	2.436026
479.17	1158.5	1158.33	555118.445	229603.8889	1342122.25	2.417722
479.17	1167.6		559478.892	229603.8889	1363289.76	2.436713
479.17	1148.9		550518.413	229603.8889	1319971.21	2.397688



519.11	1261.1	1260.37	654649.621	269475.1921	1590373.21	2.429350
519.11	1280.6		664772.266	269475.1921	1639936.36	2.466915
519.11	1239.4		643384.934	269475.1921	1536112.36	2.387548
Promedio						2.421384
s						0.025544
CV						1.05

Tabla N° 4: Resultados para la determinación del Test de Cochran.

f(y/x)	Promedio f(y/x)	Desviación estándar f(y/x)	Variancia f(y/x)
2.469233	2.445860	0.039866	0.001589
2.468517			
2.399828			
2.385350	2.386602	0.012847	0.000165
2.408202			
2.386602			
2.408871	2.422598	0.019379	0.000376
2.414158			
2.444766			
2.418171	2.414248	0.005745	0.000033
2.416919			
2.407653			
2.431245	2.428285	0.009570	0.000092
2.417585			
2.436026			
2.417722	2.417374	0.019515	0.000381
2.436713			
2.397688			
2.429350	2.427938	0.039702	0.001576
2.466915			
2.387548			
Varianza máxima			0.001589
G experimental			0.38
G tabla			0.56
t tabla para pendiente e intercepto			2.09



Gráfico N° 1: Curva de regresión lineal de Aspirina

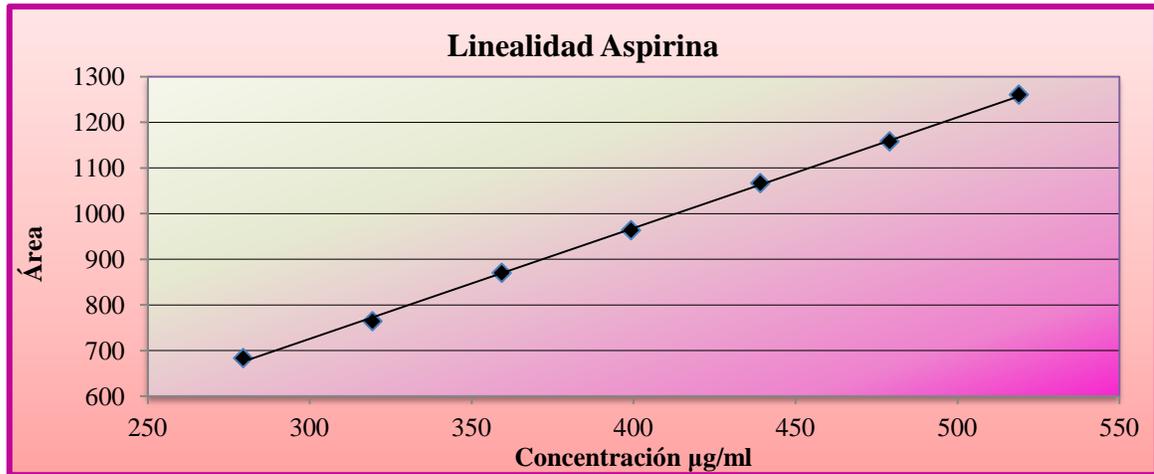


Tabla N° 5: Resultados del análisis de regresión lineal del sistema.

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.9988
Coefficiente de determinación R²	0.9976
R² ajustado	0.9974
Error típico	10.0623
Observaciones	21

Tabla N° 6: Resultados de análisis de varianza.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	788960.2149	788960.2149	7792.1965	2.6587E-26
Residuos	19	1923.7508	101.2500		
Total	20	790883.9657			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-2.2591	11.1963	-0.2018	0.8422	-25.6933	21.1751
Pendiente	2.4270	0.0275	88.2734	2.6587E-26	2.3695	2.4846



Tabla N° 7: Resumen del análisis de regresión lineal del sistema.

Pendiente	2.4270
Intercepto	-2.2591
Coefficiente de determinación	0.9976
Test t pendiente	88.2734
Test t intercepto	-0.2018
Intervalo confianza intercepto	(-25.6933; 21.1751)
Intervalo confianza pendiente	(2.3695; 2.4846)

Tabla N° 8: Análisis de los residuales.

Observación	Pronóstico para Y	Residuos	Promedio de los residuos
1	676.1471	14.,0529	7.5195
2	676.1471	13.8529	
3	676.1471	-5.3471	
4	773.0588	-11.0588	-8.4922
5	773.0588	-3.7588	
6	773.0588	-10.6588	
7	869.9705	-4.2705	0.6628
8	869.9705	-2.3705	
9	869.9705	8.6295	
10	966.8822	-1.2822	-2.8489
11	966.8822	-1.7822	
12	966.8822	-5.4822	
13	1063.7940	4.1060	2.8060
14	1063.7940	-1.8940	
15	1063.7940	6.2060	
16	1160.7057	-2.2057	-2.3723
17	1160.7057	6.8943	
18	1160.7057	-11.8057	
19	1257.6416	3.4584	2.7250
20	1257.6416	22.9584	
21	1257.6416	-18.2416	



Gráfico N° 2: Análisis de los Residuales para Aspirina



Tabla N° 9: ANOVA.

X (Conc) µg/ml	Y (Área)	Ymedia de serie (Yj media)	\hat{y}	Residual ($\hat{y}-y$) ²	Regresión ($\hat{y}-y_{media}$) ²	Falta de ajuste ($y_{jmedia}-\hat{y}$) ²
279.52	690.2	683.67	676.15	197.48	84528.93	56.54
279.52	690.0		676.15	191.90	84528.93	56.54
279.52	670.8		676.15	28.59	84528.93	56.54
319.45	762.0	764.57	773.06	122.30	37568.86	72.12
319.45	769.3		773.06	14.13	37568.86	72.12
319.45	762.4		773.06	113.61	37568.86	72.12
359.38	865.7	870.63	869.97	18.24	9392.55	0.44
359.38	867.6		869.97	5.62	9392.55	0.44
359.38	878.6		869.97	74.47	9392.55	0.44
399.31	965.6	964.03	966.88	1.64	0.000012	8.12
399.31	965.1		966.88	3.18	0.000012	8.12
399.31	961.4		966.88	30.06	0.000012	8.12
439.24	1067.9	1066.60	1063.8	16.86	9391.21	7.87
439.24	1061.9		1063.8	3.59	9391.21	7.87
439.24	1070.0		1063.8	38.51	9391.21	7.87



479.17	1158.5	1158.33	1160.7	4.86	37566.17	5.63
479.17	1167.6		1160.7	47.53	37566.17	5.63
479.17	1148.9		1160.7	139.37	37566.17	5.63
519.11	1261.1	1260.37	1257.6	11.96	84539.01	7.43
519.11	1280.6		1257.6	527.09	84539.01	7.43
519.11	1239.4		1257.6	332.76	84539.01	7.43
Promedio	966.886		Σ	1923.75	788960.21	474.43
			g.l	19.00	1.00	5.00
			Variancia	101.25	788960.21	94.89

Tabla N° 10: Resumen de ANOVA.

	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Varianza
Regresión	788960.21	1	788960.2149
Residual	1923.75	19	101.25
Falta de Ajuste	474.43	5	94.89
Error Experimental	1449.32	14	103.52
Total	790883.97	20	299.66

Tabla N° 11: Resultados Prueba F.

F1 exp	F1 tabla	F2 exp	F2 tabla
7792.20	4.38	0.91657	2.95

Análisis de resultados de la linealidad del sistema para Aspirina:

Al realizar una curva de calibración para la cuantificación de Aspirina, se obtuvo una representación gráfica lineal para el rango de concentraciones de 280 µg/ml a 520 µg/ml, con un coeficiente de determinación $r^2 = 0.9976$, lo que demuestra que existe correlación entre la concentración y la respuesta del analito.

Para verificar la linealidad, se calculó el CV de los factores respuesta obteniendo un valor de 1.05, el cual está por debajo del criterio de aceptación establecido ($CV < 2\%$), lo que exhibe la poca variación de las respuestas obtenidas; quedó establecido que la pendiente de



la recta de regresión es significativamente distinta de cero mediante la prueba t de Student siendo el valor de t experimental mayor que el valor crítico establecido para n-2 grados de libertad ($t_{exp} = 88.27$, $t_{tab} = 2.0930$), así mismo se calcularon los intervalos de confianza para la pendiente, no incluyendo estos el cero (2.369493 a 2.484586).

La proporcionalidad entre la concentración de analito y las áreas obtenidas, se demostró mediante la aplicación de la prueba t de Student para el intercepto de la recta. El t experimental es menor al t de tabla, para n-2 grados de libertad, y un nivel de significancia del 95% ($t_{exp} = -0.2018$, $t_{tab} = 2.0930$), por lo tanto, la variable independientemente es significativamente distinta de cero, así como los intervalos de confianza incluyen al cero (-25.693291 a 21.175050).

Para verificar la validez del modelo, se aplicó el análisis de varianza ANOVA donde se observa que el modelo se ajusta a una línea recta ya que el F experimental es mayor al F de tabla ($F_{exp} = 7792.19$, $F_{tab} = 2.65 \times 10^{-26}$).

En la representación de los residuales la distribución de los puntos es aleatoria (ver gráfico N° 2) y no refleja ninguna tendencia, lo que indica que los supuestos del modelo de regresión lineal se cumplen. El valor de G experimental (0.38) es menor que G de tabla (0.56), lo que refleja que existe homogeneidad de variancias; es decir, que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados. Se calcularon los estadísticos F_1 y F_2 , siendo $F_{1exp} > F_{1tabla}$ ($7792.20 > 4.38$) lo que demuestra la existencia de una pendiente distinta de cero, $F_{2exp} < F_{2tabla}$ ($0.92 < 2.95$) lo que demuestra la linealidad entre los resultados.



7.3.2 Resultados de la linealidad del sistema de ácido salicílico

Tabla N° 12: Cálculos para la ecuación de la recta.

X(Concentración) µg/ml	Y (Área)	y media	xy	x ²	y ²	f(y/x)
22.35	110.5	110.90	2469.675	499.5225	12210.25	4.944072
22.35	111.1		2483.085	499.5225	12343.21	4.970917
22.35	111.1		2483.085	499.5225	12343.21	4.970917
25.55	129.3	128.23	3303.615	652.8025	16718.49	5.060665
25.55	126.9		3242.295	652.8025	16103.61	4.966732
25.55	128.5		3283.175	652.8025	16512.25	5.029354
28.74	142.0	142.17	4081.080	825.9876	20164.00	4.940849
28.74	144.5		4152.930	825.9876	20880.25	5.027836
28.74	140.0		4023.600	825.9876	19600.00	4.871260
31.93	159.2	161.43	5083.256	1019.5249	25344.64	4.985907
31.93	163.5		5220.555	1019.5249	26732.25	5.120576
31.93	161.6		5159.888	1019.5249	26114.56	5.061071
35.13	174.0	176.47	6112.620	1234.1169	30276.00	4.953032
35.13	178.7		6277.731	1234.1169	31933.69	5.086820
35.13	176.7		6207.471	1234.1169	31222.89	5.029889
38.32	195.1	194.13	7476.232	1468.4224	38064.01	5.091336
38.32	194.2		7441.744	1468.4224	37713.64	5.067850
38.32	193.1		7399.592	1468.4224	37287.61	5.039144
41.52	207.6	207.30	8619.552	1723.9104	43097.76	5.000000
41.52	208.0		8636.160	1723.9104	43264.00	5.009634
41.52	206.3		8565.576	1723.9104	42559.69	4.968690
Promedio						5.009360
Desviación estándar						0.060882
CV						1.22



Tabla N° 13: Resultados para la determinación del Test de Cochran.

f(y/x)	Promedio	Desviación estándar	Variancia
4.944072	4.961969	0.015499	0.000240
4.970917			
4.970917			
5.060665	5.029354	0.047829	0.002288
4.966732			
5.029354			
4.940849	4.946648	0.078449	0.006154
5.027836			
4.871260			
4.985907	5.055851	0.067486	0.004554
5.120576			
5.061071			
4.953032	5.023247	0.067141	0.004508
5.086820			
5.029889			
5.091336	5.066110	0.026139	0.000683
5.067850			
5.039144			
5.000000	4.992775	0.021407	0.000458
5.009634			
4.968690			
Varianza máxima			0.006154
G experimental			0.33
G tabla			0.56
t tabla para pendiente e intercepto			2.09

Gráfico N° 3: Curva de regresión lineal para ácido salicílico

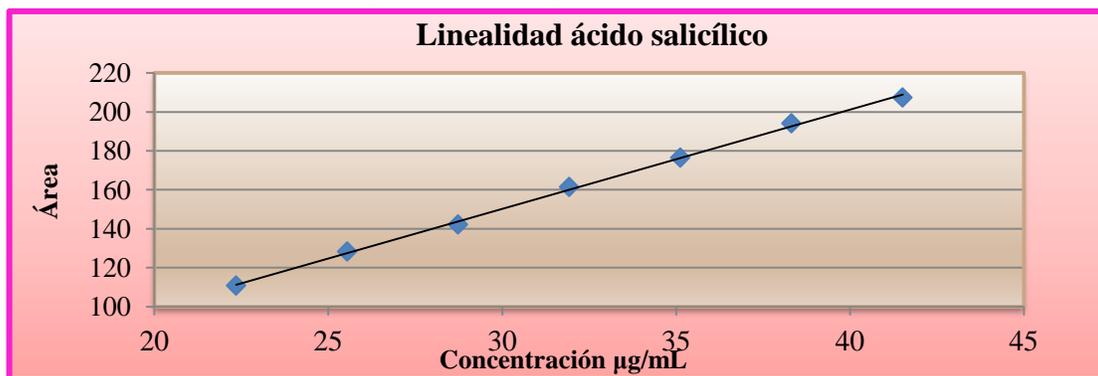




Tabla N° 14: Resultados del análisis de regresión lineal del sistema.

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.9985
Coefficiente de determinación R²	0.9970
R² ajustado	0.9968
Error típico	1.8872
Observaciones	21

Tabla N° 15: Resultados de análisis de varianza.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	22210.1692	22210.1692	6236.1498	2.1946E-25
Residuos	19	67.6689	3.5615		
Total	20	22277.8381			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-2.4718	2.0993	-1.1774	0.2536	-6.8657	1.9222
Pendiente	5.0905	0.0645	78.9693	2.19457E-25	4.9556	5.2254

Tabla N° 16: Resumen del análisis de regresión lineal del sistema.

Pendiente	5.090523986
Intercepto	-2.471771206
Coefficiente de determinación	0.996962503
Test t pendiente	78.96929669
Test t intercepto	-1.177404494
Intervalo confianza intercepto	(-6.8657; 1.9222)
Intervalo confianza pendiente	(4.9556; 5.2254)



Tabla N° 17: Análisis de los residuales.

Observación	Pronóstico para Y	Residuos	Promedio de los residuos
1	111.3014	-0.8014	-0.4014
2	111.3014	-0.2014	
3	111.3014	-0.2014	
4	127.5911	1.7089	0.6422
5	127.5911	-0.6911	
6	127.5911	0.9089	
7	143.8299	-1.8299	-1.6632
8	143.8299	0.6701	
9	143.8299	-3.8299	
10	160.0687	-0.8687	1.3647
11	160.0687	3.4313	
12	160.0687	1.5313	
13	176.3583	-2.3583	0.1083
14	176.3583	2.3417	
15	176.3583	0.3417	
16	192.5971	2.5029	1.5362
17	192.5971	1.6029	
18	192.5971	0.5029	
19	208.8868	-1.2868	-1.5868
20	208.8868	-0.8868	
21	208.8868	-2.5868	

Gráfico N° 4: Análisis de residuales para ácido salicílico





Tabla N° 18: ANOVA.

X (Conc) µg/ml	Y (Área)	y _{media} de series (y _{jmedia})	\hat{y}	Residual ($\hat{y}-y$) ²	Regresión ($\hat{y}-y_{media}$) ²	Falta de ajuste ($y_{jmedia}-\hat{y}$) ²
22.35	110.5	110.900	111.301	0.642	2380.370	0.161
22.35	111.1		111.301	0.041	2380.370	0.161
22.35	111.1		111.301	0.041	2380.370	0.161
25.55	129.3	128.233	127.591	2.920	1056.208	0.412
25.55	126.9		127.591	0.478	1056.208	0.412
25.55	128.5		127.591	0.826	1056.208	0.412
28.74	142	142.167	143.830	3.348	264.407	2.766
28.74	144.5		143.830	0.449	264.407	2.766
28.74	140		143.830	14.668	264.407	2.766
31.93	159.2	161.433	160.069	0.755	0.00048	1.862
31.93	163.5		160.069	11.774	0.00048	1.862
31.93	161.6		160.069	2.345	0.00048	1.862
35.13	174	176.467	176.358	5.562	264.643	0.012
35.13	178.7		176.358	5.483	264.643	0.012
35.13	176.7		176.358	0.117	264.643	0.012
38.32	195.1	194.133	192.597	6.264	1056.681	0.934
38.32	194.2		192.597	2.569	1056.681	0.004
38.32	193.1		192.597	0.253	1056.681	1.068
41.52	207.6	207.300	208.887	1.656	2381.080	0.090
41.52	208		208.887	0.786	2381.080	0.490
41.52	206.3		208.887	6.691	2381.080	1.000
Promedio	160.09		Σ	67.669	22210.169	19.229
			g.l	19	1	5
			Variancia	3.562	22210.169	3.846



Tabla N° 19: Resumen de ANOVA.

	Suma de cuadrados	g.l	Varianza
Regresión	22210.17	1	22210.17
Residual	67.67	19	3.56
Falta de Ajuste	19.23	5	3.85
Error Experimental	48.44	14	3.46
Total	22277.84	20	22221.04

Tabla N° 20: Resultados prueba F.

F1 exp	F1 tabla	F2 exp	F2 tabla
6236.150	4.38	1.1115	2.95

Análisis de resultados de linealidad del sistema para ácido salicílico:

Al realizar una curva de calibración para la cuantificación de ácido salicílico, se obtuvo una representación gráfica lineal para el rango de concentraciones de 22.4 µg/ml a 41.6 µg/ml con un coeficiente de determinación $r^2 = 0.997$, lo que demuestra que existe correlación entre la concentración y la respuesta del analito.

Para verificar la linealidad, se calculó el CV de los factores respuesta obteniendo un valor de 1.22, el cual por debajo del criterio de aceptación establecido ($CV < 2\%$), lo que exhibe la poca variación de las respuestas obtenidas; quedó establecido que la pendiente de la recta de regresión es significativamente distinta de cero mediante la prueba t de Student siendo el valor de t experimental mayor que el valor crítico establecido para n-2 grados de libertad ($t_{exp} = 78.9692$, $t_{tab} = 2.0930$), así mismo se calcularon los intervalos de confianza para la pendiente no incluyendo estos el cero (4.955603; 5.225444).

La proporcionalidad entre la concentración de analito y las áreas obtenidas, se demostró mediante la aplicación de la prueba t de Student para el intercepto de la recta. El t experimental es menor al t de tabla, para n-2 grados de libertad, y un nivel de significancia del 95% ($t_{exp} = -1.1774$, $t_{tab} = 2.0930$), por lo tanto, la variable independientemente es significativamente distinta de cero, así como los intervalos de confianza incluyen al cero (-6.86574; 1.922196).



Para verificar la validez del modelo, se aplicó el análisis de varianza ANOVA donde se observa que el modelo se ajusta a una línea recta ya que el F experimental es mayor al F de tabla. ($F_{exp} 6236.15$, $F_{tab} = 2.19 \times 10^{-25}$).

En la representación de los residuales la distribución de los puntos es aleatoria (ver gráfico N° 4) y no refleja ninguna tendencia, lo que indica que los supuestos del modelo de regresión lineal se cumplen. El valor de G experimental (0.32) es menor que G de tabla (0.56), lo que refleja que existe homogeneidad de variancias; es decir, que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados. Se calcularon los estadísticos F_1 y F_2 , siendo $F_{1exp} > F_{1tabla}$ ($6236.14 > 4.38$) lo que demuestra la existencia de una pendiente distinta de cero, $F_{2exp} < F_{2tabla}$ ($1.11 < 2.95$) lo que demuestra la linealidad entre los resultados.

7.3.3 Resultados de la linealidad del método

Tabla N° 21: Cálculos para la ecuación de la recta.

X (Concentración) µg/ml	Y (Área)	xy	x ²	y ²	f(y/x)
280.08	671.8	188157.744	78444.806	451315.24	2.398600
280.08	677.3	189698.184	78444.806	458735.29	2.418238
280.08	668.2	187149.456	78444.806	446491.24	2.385747
321.274	755.7	242786.762	103216.983	571082.49	2.352198
321.274	756.0	242883.144	103216.983	571536.00	2.353132
321.274	758.9	243814.839	103216.98	575929.21	2.362158
360.266	859.4	309612.600	129791.590	738568.36	2.385460
360.266	858.3	309216.308	129791.590	736678.89	2.382406
360.266	857.7	309000.148	129791.590	735649.29	2.380741
398.709	952.2	379650.710	158968.866	906684.84	2.388208
398.709	953.7	380248.773	158968.866	909543.69	2.391970
398.709	952.2	379650.710	158968.866	906684.84	2.388208



439.349	1050.9	461711.864	193027.543	1104390.81	2.391948
439.349	1044.6	458943.965	193027.543	1091189.16	2.377609
439.349	1054.3	463205.651	193027.543	1111548.49	2.399687
479.989	1144.3	549251.413	230389.440	1309422.49	2.384013
479.989	1143.3	548771.424	230389.440	1307134.89	2.381930
479.989	1140.6	547475.453	230389.440	1300968.36	2.376304
520.629	1249.0	650265.621	271054.556	1560001.00	2.399021
520.629	1240.1	645632.023	271054.556	1537848.01	2.381926
520.629	1249.6	650577.998	271054.556	1561500.16	2.400174
Promedio					2.384747
s					0.015552
CV					0.65

Tabla N° 22: Resultados para la determinación del Test de Cochran.

f(y/x)	Promedio	Desviación estándar	Variancia
2.398600	2.400862	0.016363	0.000268
2.418238			
2.385747			
2.352198	2.362158	0.005501	0.000030
2.353132			
2.362158			
2.385460	2.382869	0.002393	0.000006
2.382406			
2.380741			
2.388208	2.389462	0.002172	0.000005
2.391970			
2.388208			
2.391948	2.389748	0.011202	0.000125
2.377609			
2.399687			
2.384013	2.380749	0.003988	0.000016
2.381930			
2.376304			



2.399021	2.393707	0.010219	0.000104
2.381926			
2.400174			
Varianza máxima			0.000268
G experimental			0.48
G tabla			0.56
t tabla para pendiente e intercepto			2.09

Gráfico N° 5: Curva de regresión lineal del método

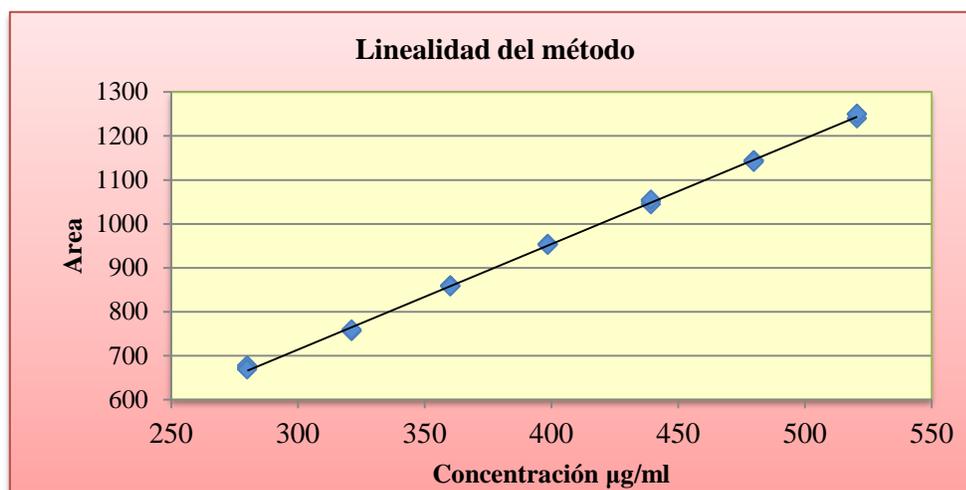


Tabla N° 23: Resultados de análisis de regresión lineal del método.

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.9996
Coefficiente de determinación R ²	0.9993
R ² ajustado	0.9992
Error típico	5.3889
Observaciones	21



Tabla N° 24: Resultados de análisis de varianza.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	772091.3770	772091.3770	26586.5663	2.3330E-31
Residuos	19	551.7725	29.0407		
Total	20	772643.1495			

Tabla N° 25: Resumen del análisis de regresión lineal del método.

Pendiente	2.4006
Intercepto	-6.1668
Coefficiente de determinación	0.9993
Test t pendiente	163.0538
Test t intercepto	-1.0268
Intervalo confianza intercepto	(-18.7376; 6.4041)
Intervalo confianza pendiente	(2.3698; 2.43147)

Tabla N° 26: Análisis de residuales.

Observación	Pronóstico para Y	Residuos	Promedio de los residuos
1	666.2076	5.5924	6.2257
2	666.2076	11.0924	
3	666.2076	1.9924	
4	765.1001	-9.4001	-8.2334
5	765.1001	-9.1001	
6	765.1001	-6.2001	
7	858.7062	0.6938	-0.2396
8	858.7062	-0.4062	
9	858.7062	-1.0062	
10	950.9945	1.2055	1.7055
11	950.9945	2.7055	
12	950.9945	1.2055	
13	1048.5570	2.3430	1.3764
14	1048.5570	-3.9570	
15	1048.5570	5.7430	



16	1146.1194	-1.8194	-3.3861
17	1146.1194	-2.8194	
18	1146.1194	-5.5194	
19	1243.6819	5.3181	2.5514
20	1243.6819	-3.5819	
21	1243.6819	5.9181	

Gráfico N° 6: Análisis de residuales de la linealidad del método de Aspirina.

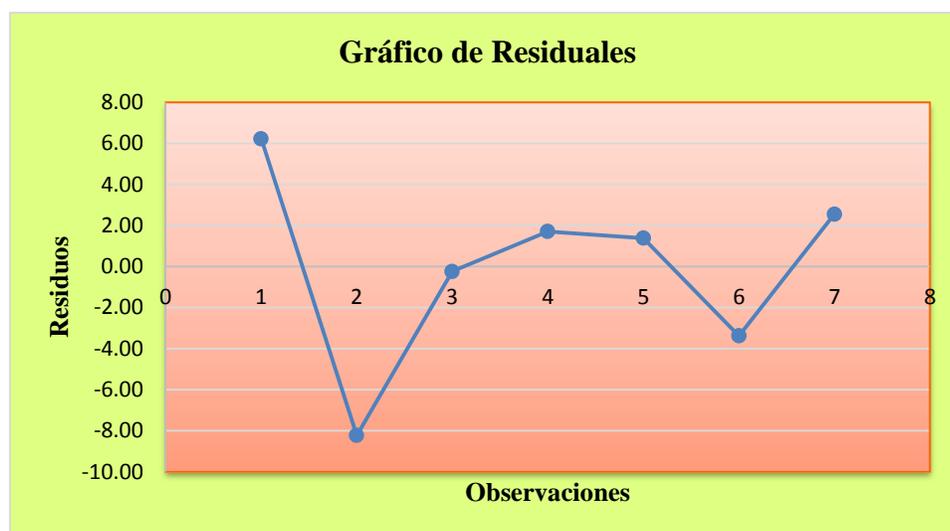


Tabla N° 27: ANOVA.

X (Conc) µg/ml	Y (Área)	ymedia de series (yj media)	\hat{y}	Residual $(\hat{y}-y)^2$	Regresión $(\hat{y}-ymedia)^2$	Falta de ajuste $(yjmedia-\hat{y})^2$
280.08	671.80	82936.866	666.208	31.275	82936.9	6768461231.71
280.08	677.30		666.208	123.041	82936.9	6768461231.71
280.08	668.20		666.208	3.970	82936.9	6768461231.71
321.274	755.70	35756.989	765.100	88.361	35757.0	1224432308.69
321.274	756.00		765.100	82.811	35757.0	1224432308.69
321.274	758.90		765.100	38.441	35757.0	1224432308.69
360.266	859.40	9118.147	858.706	0.481	9118.1	68218368.44
360.266	858.30		858.706	0.165	9118.1	68218368.44
360.266	857.70		858.706	1.013	9118.1	68218368.44



398.709	952.20	10.245	950.994	1.453	10.2	885009.92
398.709	953.70		950.994	7.320	10.2	885009.92
398.709	952.20		950.994	1.453	10.2	885009.92
439.349	1050.90	8904.133	1048.557	5.490	8904.1	61710075.62
439.349	1044.60		1048.557	15.657	8904.1	61710075.62
439.349	1054.30		1048.557	32.983	8904.1	61710075.62
479.989	1144.30	36834.892	1146.119	3.310	36834.9	1273688454.28
479.989	1143.30		1146.119	7.949	36834.9	1273688454.28
479.989	1140.60		1146.119	30.464	36834.9	1273688454.28
520.629	1249.00	83802.520	1243.682	28.282	83802.5	6815961798.07
520.629	1240.10		1243.682	12.830	83802.5	6815961798.07
520.629	1249.60		1243.682	35.024	83802.5	6815961798.07
Promedio	954.195		∑	551.7725	772091.4	48640071740.22
			g.l	19	1	5
			Variancia	29.0407	772091.4	9728014348.04

Tabla N° 28: Resumen de ANOVA.

	Suma de cuadrados	g.l	Varianza
Regresión	772091.377	1	772091.377
Residual	551.773	19	29.041
Falta de Ajuste	48640071740.217	5	9728014348.043
Error Experimental	-48640071188.444	14	-3474290799.175
Total	772643.150	20	6254495669.286

Tabla N° 29: Resultados prueba F.

F1 exp	F1 tabla	F2 exp	F2 tabla
26586.566	4.38	-2.80	2.95

Análisis de resultados de la linealidad del método:

Al realizar una curva de calibración para la cuantificación de aspirina, se obtuvo una representación gráfica lineal para el rango de concentraciones de 280 µg/mL a 520 µg/mL, con un coeficiente de determinación $r^2 = 0.9993$, lo que demuestra que existe correlación entre la concentración y la respuesta del analito.



Para verificar la linealidad, se calculó el CV de los factores respuesta obteniendo un valor de 0.65, el cual está muy por debajo del criterio de aceptación establecido ($CV < 2\%$), lo que exhibe la poca variación de las respuestas obtenidas; quedó establecido que la pendiente de la recta de regresión es significativamente distinta de cero mediante la prueba t de Student siendo el valor de t experimental mayor que el valor crítico establecido para n-2 grados de libertad ($t_{exp} = 163.0539$, $t_{tab} = 2.0930$), así mismo se calcularon los intervalos de confianza no incluyendo estos el cero (2.369836 a 4.314670).

La proporcionalidad entre la concentración de analito y las áreas obtenidas, se demostró mediante la aplicación de la prueba t de Student para el intercepto de la recta. El t experimental es menor al t de tabla, para n-2 grados de libertad, y un nivel de significancia del 95% ($t_{exp} = -1.026755$, $t_{tab} = 2.0930$), por lo tanto, la variable independientemente es significativamente distinta de cero, así como los intervalos de confianza incluyen al cero (-18.737684 a 6.401126).

Para verificar la validez del modelo, se aplicó el análisis de varianza ANOVA donde se observa que el modelo se ajusta a una línea recta ya que el F experimental es mayor al F de tabla. ($F_{exp} 26586$, $F_{tab} = 2.3330 \times 10^{-31}$).

En la representación de los residuales la distribución de los puntos es aleatoria (Ver gráfico N° 6) y no refleja ninguna tendencia, lo que indica que los supuestos del modelo de regresión lineal se cumplen. El valor de G experimental (0.48) es menor que G de tabla (0.56), lo que refleja que existe homogeneidad de variancias; es decir, que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados. Se calcularon los estadísticos F_1 y F_2 , siendo $F_{1exp} > F_{1tabla}$ ($26586.5663 > 4.38$) lo que demuestra la existencia de una pendiente distinta de cero, $F_{2exp} < F_{2tabla}$ ($-2.80 < 2.95$) lo que demuestra la linealidad entre los resultados.



7.4 PRECISIÓN

7.4.1 Repetibilidad

Tabla N° 30: Resultados de repetibilidad instrumental para aspirina y ácido salicílico

	Aspirina	Ácido salicílico
N° inyecciones	Área	Área
1	961.6	171.30
2	956.0	167.90
3	956.4	166.00
4	972.7	166.70
5	959.9	167.80
6	973.7	166.20
7	957.9	170.30
8	961.8	173.30
9	956.2	168.90
10	966.8	165.50
Promedio	962.30	168.39
s	6.6327	2.5558
CV	0.6893	1.5178

Tabla N° 31: Resultados de repetibilidad del método de Aspirina.

Nivel	Conc. teórica de la muestra (µg/ml)	Área del estándar	Conc. del estándar (µg/ml)	Área de la muestra	Conc. encontrada (µg/ml)	Porcentaje recuperado base 100	Promedio % recuperado
Nivel 1 (80 %)	319.08	979.23	400.728	784.50	321.04	100.61	100.06
	319.08	979.23	400.728	776.90	317.93	99.64	
	319.08	979.23	400.728	779.10	318.83	99.92	
Nivel 2 (100%)	399.81	979.23	400.728	959.60	392.69	98.22	98.53
	399.81	979.23	400.728	962.00	393.68	98.47	
	399.81	979.23	400.728	966.20	395.39	98.90	
Nivel 3 (120%)	481.04	979.23	400.728	1171.60	479.45	99.67	99.29
	481.04	979.23	400.728	1165.40	476.91	99.14	
	481.04	979.23	400.728	1164.50	476.54	99.07	
Promedio						99.29	
s						0.75	
CV						0.75	



Tabla N° 32: Intervalos de confianza.

Nivel 1 (80 %)	Nivel 2 (100 %)	Nivel 3 (120 %)
98.81 - 101.3	97.68 - 99.37	98.48 - 100.11

Análisis de resultados de Repetibilidad:

Los coeficientes de variación de la repetibilidad del sistema instrumental para Aspirina y ácido salicílico y repetibilidad del método se encuentran por debajo del criterio de aceptación establecido ($CV < 2\%$), por lo que no existe una dispersión apreciable de los resultados.

En la repetibilidad del método se calcularon los límites de confianza para cada nivel de concentración (80%, 100% y 120%) y el promedio de porcentaje recuperado para cada nivel de concentración está dentro del intervalo de confianza calculado.

El porcentaje recuperado para cada muestra se encuentra dentro del rango establecido (97-103%).

7.4.2 Precisión intermedia

7.4.2.1 Precisión intermedia del sistema de Aspirina

Tabla N° 33: Resultados obtenidos (áreas) por día y por analista; y resultados del test de Bartlett evaluando Analistas.

DÍA	N° de solución	Analista 1	Analista 2	
1	1	973.7	958.3	
		985.1	959.0	
		984.0	954.3	
	2	969.7	984.1	
		972.3	968.0	
		966.6	976.1	
	3	965.6	965.0	
		961.4	961.9	
		965.1	978.3	
		Promedio	971.5	967.22
		Desviación estándar	8.3045	10.21308
		CV	0.8548	1.0559



2	1	968.9	948.9
		959.5	949.3
		954.9	952.5
	2	973.5	968.3
		968.0	959.6
		981.0	956.6
	3	961.9	976.8
		949.0	971.1
		959.9	966.4
	Promedio	964.066667	961.,0556
Desviación estándar	9.8011	10.06816	
CV	1.0166	1.0476	
DIA 3	1	954.0	966.4
		951.4	965.5
		959.0	954.5
	2	964.5	963.2
		964.0	971.1
		956.3	955.2
	3	988.0	962.4
		972.3	957.5
		981.0	962.4
	Promedio	963.6875	961.975
	Desviación estándar	12.51912	5.4648
	CV	1.2990	0.5680
	Varianza	109.6540	80.0892
	Promedio global	965.2462	
Desviación estándar global	9.8199		
CV global	1.0173		
S² global	94.8716		
C	1.0192		
X² entre analistas	0.63		
X² tabla	3.84		



Tabla N°34: Cálculos para el test de Bartlett evaluando días para precisión intermedia de Aspirina.

ANALISTA	DIA 1	DIA 2	DIA 3
1	973.7	968.9	954.0
	985.1	959.5	951.4
	984.0	954.9	959.0
	969.7	973.5	964.5
	972.3	968.0	964.0
	966.6	981.0	956.3
	965.6	961.9	988.0
	961.4	949.0	972.3
	965.1	959.9	981.0
2	958.3	948.9	966.4
	959.0	949.3	965.5
	954.3	952.5	954.5
	984.1	968.3	963.2
	968.0	959.6	971.1
	976.1	956.6	955.2
	961.9	971.1	957.5
	978.3	966.4	962.4
	973.7	968.9	954.0
Varianza	90.52	87.85	96.79
S² GLOBAL	91.72		
C	1.026		
X² entre días	0.04099		
X² tabla	5.99		

Tabla N° 35: Análisis de varianza de dos factores

Resumen	Día 1	Día 2	Día 3	Total
Cuenta	9	9	9	27
Suma	8743.5	8676.6	8690.5	26110.6
Promedio	971.5	964.066	965.611111	967.05926
Varianza	68.965	96.0625	156.728611	109.65405



Cuenta	9	9	9	27
Suma	8705	8649.5	8658.2	26012.7
Promedio	967.22	961.0556	962.022	963.433
Varianza	104.30694	101.3678	29.8644444	80.089231
Total				
Cuenta	18	18	18	
Suma	17448.5	17326.1	17348.7	
Promedio	969.36111	962.5611	963.816667	
Varianza	86.383693	95.3084	91.2179412	

Análisis de varianza.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	F crítico
Analista	177.489	1	177.489	1.910	0.17326	4.042
Día	471.344	2	235.671	2.537	0.08964	3.190
Interacción	3.619	2	1.8096	0.014	0.98071	3.190
Dentro del grupo	4458.362	48	92.882			
Total	5110.814	53				

7.4.2.2 Precisión intermedia del sistema de ácido salicílico

Tabla N° 36: Resultados obtenidos (áreas) por día y por analista; y resultados del test de Bartlett evaluando Analistas.

DÍA	N° de Solución	Analista 1	Analista 2	
1	1	165.9	169.5	
		169.5	165.0	
		166.3	170.3	
	2	165.9	166.0	
		166.7	167.1	
		159.3	169.6	
	3	170.4	171.1	
		165.3	167.8	
		165.4	168.0	
		Promedio	166.08	168.27
		S	3.12	2.03
		CV	1.88	1.21



2	1	164.4	168.0
		166.1	164.0
		165.9	164.7
	2	163.5	170.2
		171.0	169.3
		164.1	167.2
	3	168.7	168.4
		167.9	174.6
		165.1	166.0
	Promedio	166.30	168.04
S	2.46	3.20	
CV	1.48	1.90	
3	1	169.1	168.1
		170.8	173.3
		167.7	165.4
	2	171.1	167.2
		168.3	166.7
		167.6	169.0
	3	168.4	173.3
		166.8	166.7
	Promedio	168.3	168.62
	S	1.92	2.84
	CV	1.14	1.68
	Varianza	7.023	6.950
	Promedio global	167.6	
S global	2.71		
CV global	1.619		
S² global	6.986		
C	1.0192		
X² entre analistas	0.00069173		
X² tabla	3.84		



Tabla N°37: Cálculos para el test de Bartlett evaluando días para precisión intermedia de ácido salicílico.

ANALISTA	DIA 1	DIA 2	DIA 3
1	165.9	164.4	169.1
	169.5	166.1	170.8
	166.3	165.9	167.7
	165.9	163.5	171.1
	166.7	171.0	168.3
	159.3	164.1	167.6
	170.4	168.7	168.4
	165.3	167.9	166.8
	165.4	165.1	164.9
2	169.5	168.0	168.1
	165.0	164.0	173.3
	170.3	164.7	165.4
	166.0	170.2	167.2
	167.1	169.3	166.7
	169.6	167.2	169.0
	171.1	168.4	173.3
	167.8	174.6	166.7
	168.0	166.0	167.9
Varianza	7.7868301	8.4585948	5.5507516
S² global	7.265		
C	1.026		
X² entre días	0.792		
X² tabla	5.99		

Tabla N° 38: Análisis de varianza de dos factores

Resumen	Día 1	Día 2	Día 3	Total
Cuenta	9	9	9	27
Suma	1494.7	1496.7	1514.7	4506.1
Promedio	166.078	166.3	168.3	166.89259
Varianza	9.737	6.0425	3.675	7.0230



Cuenta	9	9	9	27
Suma	1514.4	1512.4	1517.6	4544.4
Promedio	168.267	168.04	168.622	168.31111
Varianza	4.115	10.220	8.06194	6.950
Total				
Cuenta	18	18	18	
Suma	3009.1	3009.1	3032.3	
Promedio	167.172	167.172	168.461	
Varianza	7.7868	8.45859	5.55075	

Análisis de varianza.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Día	27.165	1	27.165	3.89	0.054	4.04
Analista	19.935	2	9.967	1.43	0.250	3.19
Interacción	8.557	2	4.279	0.61	0.546	3,19
Dentro del grupo	334.813	48	6.975			
Total	390.698	53				

7.4.2.3 Precisión intermedia del método de Aspirina

Tabla N° 39: Matriz del desarrollo de la precisión intermedia del método y test de Bartlett evaluando Analistas.

DÍA	N° Solución	% Recuperado Analista 1	% Recuperado Analista 2	
1	1	99.15	99.86	
		99.03	99.21	
		98.94	98.60	
	2	100.48	99.97	
		100.42	100.32	
		100.35	99.42	
	3	100.65	100.42	
		100.58	100.49	
		100.75	100.38	
		Promedio	100.04	99.85
		S	0.76	0.65
	CV	0.76	0.66	



2	1	99.58	100.01
		100.11	101.17
		100.29	99.78
	2	101.71	98.32
		101.34	98.40
		100.62	98.99
	3	99.31	100.28
		100.24	101.12
		99.64	100.74
	Promedio	100.32	99.87
S	0.80	1.09	
CV	0.80	1.09	
3	1	100.63	99.92
		100.88	100.37
		100.45	98.32
	2	99.12	98.21
		99.36	99.21
		99.05	99.05
	3	100.44	100.99
		100.40	98.50
		99.58	98.73
	Promedio	99.99	99.26
	S	0.71	0.97
	CV	0.71	0.98
	Varianza	0.55	0.8736
	Promedio global	99.89	
Desviación estándar global	0.87		
Coefficiente de variación global	0.87		
S² global	0.71		
C	1.02		
X² entre analistas	1.34		
X² tabla	3.84		



Tabla N° 40: Cálculos para el test de Bartlett entre días para precisión intermedia del método.

ANALISTA	Día 1	Día 2	Día 3
1	99.15	99.58	100.63
	99.03	100.11	100.88
	98.94	100.29	100.45
	100.48	101.71	99.12
	100.35	100.62	99.05
	100.65	99.31	100.44
	100.58	100.24	100.40
	100.75	99.64	99.58
2	99.86	100.01	99.92
	99.21	101.17	100.37
	98.60	99.78	98.32
	99.97	98.32	98.21
	100.32	98.40	99.21
	99.42	98.99	99.05
	100.42	100.28	100.99
	100.49	101.12	98.50
	100.38	100.74	98.73
Varianza	0.50	0.873	0.869
S² global	0.75		
C	1.03		
X²	1.61		
X² tabla	5.99		



Tabla N° 41: Análisis de varianza de dos factores

Resumen	Día 1	Día 2	Día 3	Total
Cuenta	9	9	9	27
Suma	900.3377	902.84071	899.916479	2703.094869
Promedio	100.0375	100.31563	99.990720	100.1146248
Varianza	0.5779	0.64542	0.499601	0.551489444
Cuenta	9	9	9	27
Suma	898.6626	898.8072	893.305598	2690.775358
Promedio	99.8514	99.8675	99.256178	99.65834658
Varianza	0.4282	1.1936	0.944443	0.873647244
Total				
Cuenta	18	18	18	
Suma	1799.000	1801.647899	1793.22208	
Promedio	99.944	100.09155	99.62345	
Varianza	0.483	0.918583904	0.82237	

Análisis de varianza.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	F crítico
Muestra	2.8106	1	2.8106	3.93	0.05313	4.04
Columnas	2.0628	2	1.0314	1.44	0.24633	3.19
Interacción	0.6772	2	0.3386	0.47	0.62562	3.19
Dentro del grupo	34.3136	48	0.7149			
Total	39.8641	53				

Análisis de resultados de la precisión intermedia de las mediciones analíticas:

En la precisión intermedia, se realizó un análisis de variancia de dos factores con varias muestras por grupo, para evaluar que no exista diferencia significativa en los resultados tanto para la cuantificación de aspirina como para la determinación de ácido salicílico libre entre analistas y días. Como se puede observar en los resultados obtenidos el valor de $F_{\text{experimental}}$ es menor que el F crítico tanto para precisión intermedia del sistema como para precisión intermedia del método, lo cual evidencia que no existe variabilidad en el



método al cambiar las condiciones operativas (analistas, días). Para corroborar este resultado, se realizó el test de Bartlett, siendo X^2 calculado para días y X^2 para analistas menor al X^2 de tabla, habiendo homogeneidad de variancias.

El coeficiente de variación global es menor que el establecido 3%, además se observa que el CV para cada grupo de análisis, día-analista, se encuentra dentro de las especificaciones establecidas en la precisión intermedia ($CV < 2\%$).

7.5 Exactitud

7.5.1 Exactitud de Aspirina

Tabla N^a 42: Resultados de determinación de la exactitud mediante el método de adición patrón para Aspirina.

Réplica	Blanco	x + 80.15 µg/ml	x + 200.36 µg/ml	x + 320.58 µg/ml
1	480.2	677	975.3	1273
2	485.1	678.5	966.8	1278.7
3	479.0	678.5	967	1274
Media	481.43	678	969.7	1275.23
S	3.23	0.87	4.85	3.04
CV	0.67	0.13	0.50	0.24

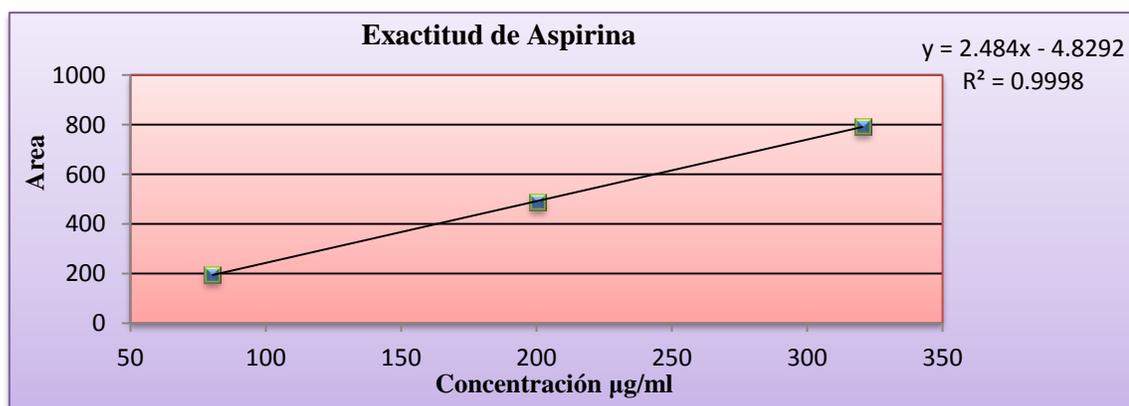
Concentración	Muestra cargada - blanco	Interpolación	% Recuperado
x + 80.15 µg/ml	196.57	192.27	102.24
x + 200.36 µg/ml	488.27	484.01	100.88
x + 320.58 µg/ml	793.80	775.79	102.32
Ecuación de la recta de la linealidad del sistema : $y=2.427x-2.259$		Media	101.81
		s	0.81
		CV	0.80
		t experimental	3.94
		t tabla	4.30



Tabla N^a 43: Prueba de Fisher.

Área linealidad del sistema	Variancias	Área exactitud	Variancias
690.2	124.17	677.0	0.75
690.0		678.5	
670.8		678.5	
965.6	5.26	975.3	23.53
965.1		966.8	
961.4		967.0	
1261.1	424.76	1273.0	9.26
1280.6		1278.7	
1239.4		1274.0	
Promedio	184.73		11.18
F exp	16.52		
F tabla	39		

Gráfico N^o 7: Curva de calibración por adición patrón de Aspirina



7.5.2 Exactitud de ácido salicílico

Tabla N^a 44: Resultados de determinación de la exactitud mediante el método de adición patrón para ácido salicílico.

Réplica	Muestra (x)	x + 22.4 µg/ml	x + 32 µg/ml	x + 41.6 µg/ml
1	14.0	125.1	174.3	230.1
2	14.1	126.5	177.0	231.6
3	12.7	124.9	178.8	227.8
Media	13.6	125.5	176.7	229.83
s	0.78	0.87	2.26	1.91
CV	5.74	0.69	1.28	0.83

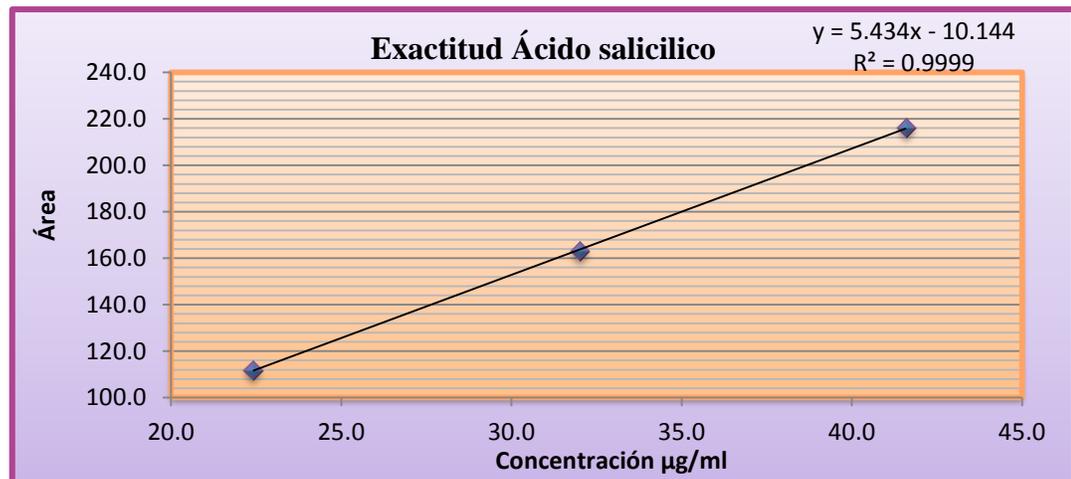


Concentración	Muestra cargada - blanco	Interpolación	% Recuperado
x + 22.4 µg/ml	111.9	111.9	100.0
x + 32 µg/ml	163.1	161.2	101.2
x + 41.6 µg/ml	216.2	209.6	103.2
Ecuación de la recta de la linealidad del sistema : $y=5.09x - 2.152$		Media	101.5
		S	1.59
		CV	1.56
		t exp	2.09
		t tabla	4.30

Tabla N^o 45: Prueba de Fisher.

Área linealidad del sistema	Variancia	Área exactitud	Variancia
110.5	0.12	125.1	0.76
111.1		126.5	
111.1		124.9	
159.2	4.6433	174.3	5.13
163.5		177.0	
161.6		178.8	
207.6	0.79	230.1	3.66
208.0		231.6	
206.3		227.8	
Promedio	1.8511		3.1844
F experimental	0.5813		
F tabla	39		

Gráfico N^o 8: Curva de calibración por adición patrón de ácido salicílico





Análisis de Resultado de Exactitud:

El cálculo de la recuperación media de analito en la determinación de la exactitud es 101.81% para Aspirina y 101.46% para ácido salicílico, encontrándose el porcentaje recuperado dentro del intervalo especificado 97%-103%. De igual manera el coeficiente de variación de los porcentajes recuperados es menor al 2% revelando que no existe gran variabilidad en los resultados obtenidos.

Al aplicar el test de Student para demostrar la exactitud del método analítico, se obtuvo un $t_{exp} < t_{tab}$ tanto para ácido salicílico como para aspirina; lo cual prueba que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y la cantidad añadida de analito, es decir el porcentaje de recuperación de analito es muy cercano al 100%, por lo tanto la exactitud es correcta.

A partir del Test de Fisher, se demostró la homogeneidad de las varianzas entre la curva de calibración normal y la curva de calibración por adición patrón, ya que $F_{exp} < F_{tab}$.

7.6 Límite de detección y límite de cuantificación

Tabla N° 46: Estimación del límite de detección y de cuantificación de Aspirina.

Parámetro	Valor
Desviación estándar residual	10.0623
Pendiente	2.4840
Límite de detección ($\mu\text{g/ml}$)	13.3678
Límite de cuantificación ($\mu\text{g/ml}$)	40.5085

Tabla N° 47: Estimación del límite de detección y de cuantificación de ácido salicílico.

Parámetro	Valor
Desviación estándar residual	1.8872
Pendiente	5.4340
Límite de detección ($\mu\text{g/ml}$)	1.1461
Límite de cuantificación ($\mu\text{g/ml}$)	3.4729



Análisis de resultados de Límite de detección y límite de cuantificación:

La mínima cantidad de ácido acetil salicílico que se puede cuantificar en la muestra bajo las condiciones experimentales descritas es de 40.5084 µg/ml; y la mínima cantidad de analito que se puede detectar bajo dichas condiciones experimentales es de 13.3678 µg/ml.

Así mismo la cantidad más pequeña de ácido salicílico en la muestra que puede ser cuantitativamente determinada con exactitud aceptable bajo las condiciones experimentales descritas es de 3.4729 µg/ml; y la cantidad más pequeña de ácido salicílico en la muestra que puede ser detectada bajo dichas condiciones experimentales es de 1.1461 µg/ml.

7.7 ROBUSTEZ

Tabla N° 48: Resultados de las áreas obtenidas en cada uno de los experimentos realizados.

Experimento	A (temperatura) °C	B (flujo) ml/min	C (pH)	Áreas	Promedio áreas
1	44	1.1	3.4	1050.1 1035.6 1050.5	1045.4
2	46	1.1	3.4	1040.3 1052.1 1042.1	1044.8
3	44	1.3	3.4	890.8 877.3 886.2	884.8
4	46	1.3	3.4	879.4 877.5 880.4	879.1
5	44	1.1	3.6	1051.0 1040.1 1040.1	1043.7



6	46	1.1	3.6	988.6 993.0 971.8	984.5
7	44	1.3	3.6	987.9 992.5 988.5	989.6
8	46	1.3	3.6	851.1 855.1 868.1	858.1

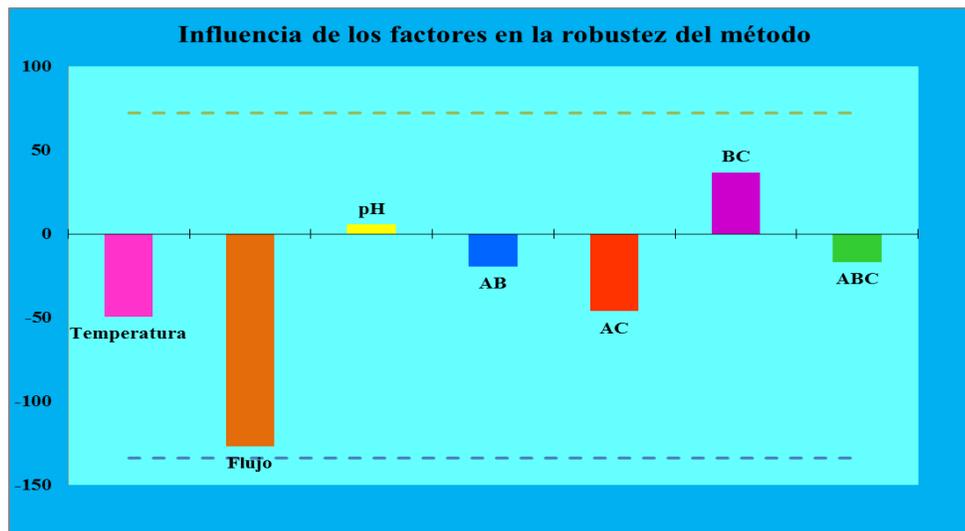
Tabla N° 49: Resultados de las influencias de los factores y sus interacciones en el estudio de la robustez.

	Factores			Interacciones			
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
	-1045.4	-1045.4	-1045.4	1045.4	1045.4	1045.4	-1045.4
	1044.8	-1044.8	-1044.8	-1044.8	-1044.8	1044.8	1044.8
	-884.8	884.8	-884.8	-884.8	884.8	-884.8	884.8
	879.1	879.1	-879.1	879.1	-879.1	-879.1	-879.1
	-1043.7	-1043.7	1043.7	1043.7	-1043.7	-1043.7	1043.7
	984.5	-984.5	984.5	-984.5	984.5	-984.5	-984.5
	-989.6	989.6	989.6	-989.6	-989.6	989.6	-989.6
	858.1	858.1	858.1	858.1	858.1	858.1	858.1
Influencia	-49.25	-126.7	5.45	-19.35	-46.1	36.45	-16.8

Promedio Influencias	-30.9
Desviación estándar	51.5347132
2S	103.069426



Gráfico N° 9: Influencia de los factores y sus interacciones en la robustez del método.



Análisis de Resultados de Robustez:

En la robustez se realizaron ocho experimentos para evaluar tres factores que podrían afectar los resultados (temperatura, flujo y pH de la solución de 1-heptanosulfonato de sodio) así como sus interacciones. Con los resultados obtenidos se demuestra que no hay influencia significativa en la capacidad del método analítico, ya que ninguno de los efectos de estos supera el intervalo de $\pm 2S$ (103.069), siendo este método robusto.

7.8 ESTABILIDAD

Tabla N° 50: Porcentaje recuperado de Aspirina en la solución analítica.

Tiempo (Horas)	% Recuperado
0	101.68
2	101.92
4	101.05
6	101.78
24	102.80
48	101.56



Gráfico N° 10: Estabilidad de la solución analítica para Aspirina.

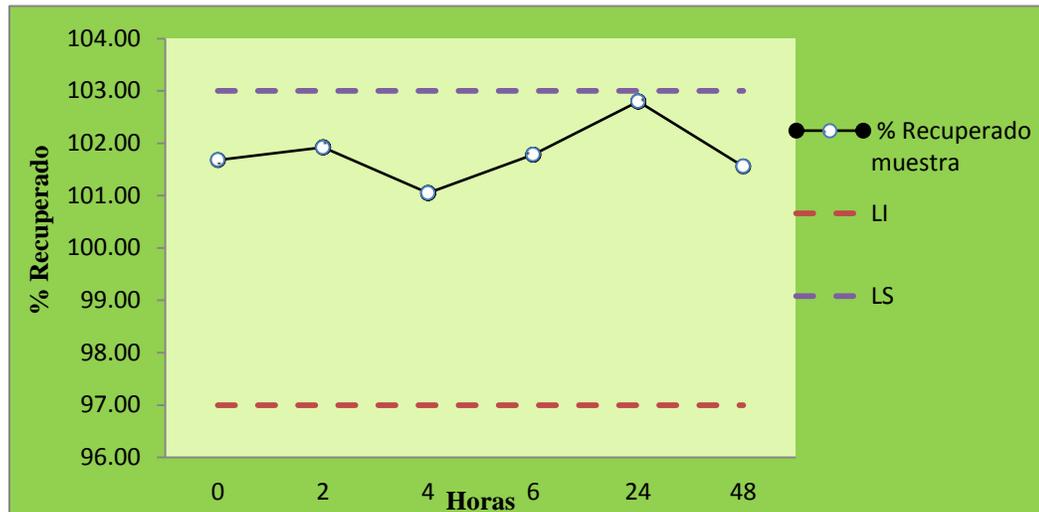
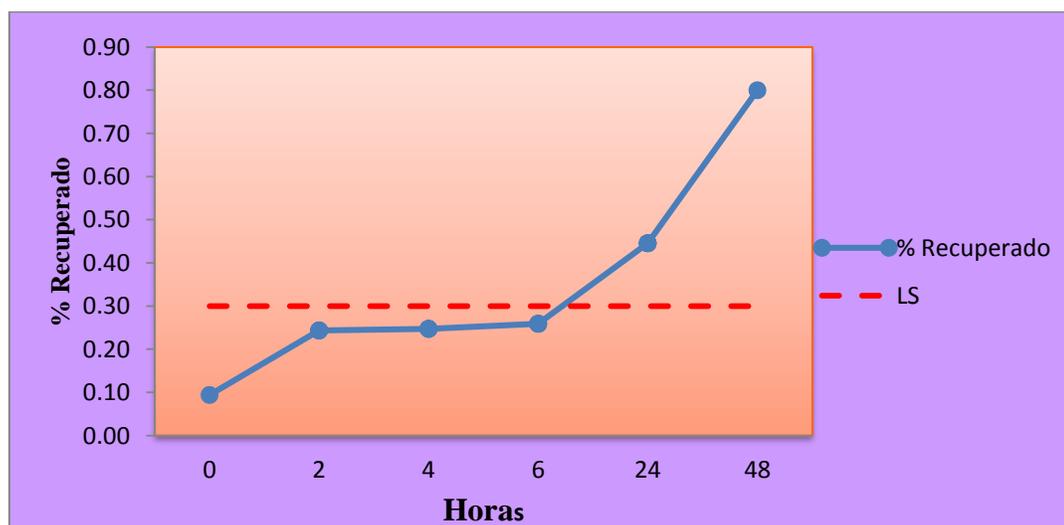


Tabla N° 51: Porcentaje recuperado de ácido salicílico en la solución analítica.

Tiempo (Horas)	% Recobro
0	0.09
2	0.24
4	0.25
6	0.26
24	0.45
48	0.80

Gráfico N° 11: Estabilidad de la solución analítica para Aspirina.





Análisis de Resultados Estabilidad:

La solución muestra es estable para la cuantificación de aspirina por 48 horas, ya que durante este tiempo el porcentaje recuperado se mantuvo dentro del rango establecido (97-103%), con un porcentaje recuperado de 101.56%, cumpliendo éste con el criterio de aceptación. En cambio para la determinación de ácido salicílico libre, la solución muestra es estable solamente por 6 horas en la condición de almacenamiento evaluada, ya que después de este tiempo se recupera un porcentaje de ácido salicílico mayor al 0.3%. Por tanto, la solución muestra debe de ser analizada el mismo día de su preparación.

7.9 INCERTIDUMBRE

Tabla N° 52: Resultados de la estimación de la incertidumbre para la cuantificación de Aspirina en la muestra.

Variablen (x _i)	valor (x _i)	u _{x_i}	C _s	C _s u _{x_i}	(C _s u _{x_i)²}
Am	973.9	1.17900311	0.10310937	0.12156627	0.014778358
Ap	974.3	2.3944728	-0.10306704	-0.24679122	0.060905907
w _p	56.7	0.66833126	1.77104437	1.18364431	1.401013847
v ₁	50	0.02041654	-2.00836431	-0.04100385	0.001681316
v ₂	10	0.00816501	10.0418216	0.08199157	0.006722618
v ₃	25	0.01224918	-4.01672863	-0.04920163	0.002420801
P	88.5	1	1.1346691	1.1346691	1.2874740
V ₄	25	0.01224918	4.01672863	0.04920163	0.002420801
V ₅	10	0.00816501	-10.0418216	-0.08199157	0.006722618
V ₆	50	0.02041654	2.00836431	0.04100385	0.001681316
w _m	49.95	0.66833126	-2.01037469	-1.34359624	1.805250858
				Suma	4.591072414
				uc	2.142678794
				ue	4.285357588



Tabla N° 53: Resultados de la estimación de la incertidumbre para la determinación de ácido salicílico libre en la muestra.

Variables (x _i)	valor (x _i)	u _{x_i}	C _s	C _s u _{x_i}	(C _s u _{x_i}) ²
Am	5.7	1.1790031	0.0460087	0.0542444	0.002942455
Ap	173.7	1.4097439	-0.00151	-0.002128	4.53013E-06
Was	20.1	0.6879922	0.0130472	0.0089764	8.05758E-05
v1	50	0.0204165	-0.005245	-0.000107	1.14671E-08
v2	2	0.0024495	0.1311248	0.0003212	1.03162E-07
v3	25	0.0122492	-0.01049	-0.000128	1.65106E-08
P	99.3	1	0.002641	0.002641	6.97479E-06
V4	25	0.0122492	0.01049	0.0001285	1.65106E-08
V5	10	0.008165	-0.026225	-0.000214	4.58499E-08
V6	50	0.0204165	0.005245	0.0001071	1.14671E-08
Wasa	49.95	0.6683313	-0.00525	-0.003509	1.23124E-05
Suma					0.003047053
uc					0.055200122
ue					0.110400244

Análisis de Resultados Incertidumbre.

Tomando en cuenta los componentes que influyen en la determinación de la incertidumbre del porcentaje recuperado de aspirina y ácido salicílico libre en tabletas de 100 mg se obtuvo una incertidumbre expandida de ± 4.28 para aspirina y de ± 0.11 para ácido salicílico con un factor de cobertura de 2 al 95.45% de intervalo de confianza.



VIII. CONCLUSIONES

El método respondió satisfactoriamente a cada uno de los parámetros de desempeño establecidos en el Reglamento Técnico Centroamericano para la categoría de prueba a la cual pertenece (categoría I y II), demostrando que la metodología analítica para la cuantificación de Aspirina y ácido salicílico libre, por cromatografía líquida de alta resolución, es exacta, precisa, selectiva y lineal, por lo cual se tiene la certeza que los resultados obtenidos son confiables dentro de las condiciones descritas en este documento; y su utilización como método de rutina en el Laboratorio de Control de calidad de medicamentos de la UNAN-León se encuentra justificada y documentada.

Se evidenció que pequeñas variaciones introducidas respecto a las condiciones descritas en el método, las cuales son susceptibles de producirse durante su utilización, no afectan la capacidad del mismo para proporcionar resultados válidos, siendo el método analítico robusto.

Se estimó un límite de cuantificación de aspirina en la muestra bajo las condiciones experimentales descritas de 40.5084 $\mu\text{g/ml}$ y un límite de detección de 13.3678 $\mu\text{g/ml}$. Así mismo, se estimó un límite de cuantificación de ácido salicílico de 3.4729 $\mu\text{g/ml}$ y un límite de detección de 1.1461 $\mu\text{g/ml}$.

Se determinó la incertidumbre expandida para aspirina dando como resultado un porcentaje recuperado de 100.4 % y una incertidumbre de ± 4.28 y para ácido salicílico un porcentaje recuperado de 0.26 % y una incertidumbre de ± 0.11 con un factor de cobertura de 2 al 95.45% de intervalo de confianza.



IX. RECOMENDACIONES

1. Realizar ensayos de aptitud para comparar nuestros resultados con los de otro laboratorio y asegurar la calidad del ensayo validado.
2. Aplicar la técnica analítica validada con productos de otros laboratorios para verificar el desempeño del método con otras matrices.
3. Tomar precauciones durante el proceso de pesado, tanto de la muestra como del estándar, para evitar pérdidas y variaciones que puedan alterar los resultados en la cuantificación de aspirina y en la determinación de ácido salicílico libre.
4. Realizar la cuantificación de aspirina y la determinación de ácido salicílico el mismo día que se preparan las soluciones analíticas, ya que éstas no son estables por mucho tiempo.



X. BIBLIOGRAFIA

1. Secretaria de Integración Económica Centroamericana (SIECA). Proyecto Diseño y Aplicación de Políticas Comunes centroamericanas (ADAPCCA). Validación de Metodologías Analíticas.
2. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). (2001). Validación de Métodos Analíticos. *Validación de métodos de análisis en Materias Primas y Especialidades Farmacéuticas*. Páginas 46-99. Barcelona: AEFI.
3. Zamora, R.J., y Zapata, R.J. (2012). Desarrollo y validación de la metodología analítica para la identificación y cuantificación de dipropionato de betametasona en crema por cromatografía líquida de alta resolución. Monografía para optar al título de químico farmacéutico no publicada. UNAN, León, Nicaragua.
4. Skoog, D.A., Holler, F.J., y Nieman, T.A. (2001). Principios de Análisis Instrumental (5ª Ed). *Capítulo 28: Cromatografía de líquidos de alta eficacia*. Páginas 785-807. España: McGraw-Hill.
5. Grunton, L.L., Lazo, J.S., y Parker, K.L. (2007). Goodman y Gilman Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica (11ª Ed). *Antiinflamatorios no esteroideos*. Páginas 688-689. China: McGraw-Hill.
6. Drug Bank. Open Data Drug y Drug Target Data Base. (2013). Acetylsalicylic acid. Recuperado el 11 de febrero del 2014, de <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00945>.
7. Delgado, C. (2009). UNAN-León. Facultad de Ciencias y Tecnología. Validación y Verificación de Métodos de Ensayos. Un dilema en los laboratorios de ensayo y en las auditorias de la acreditación. *Universitas*, 3(2), 14-21. Recuperado el 11 de febrero del 2014, de http://universitas.unanleon.edu.ni/pdf/volumen3n2/Arto2_universitas_nov2009.pdf.



8. Asamblea Nacional de la República de Nicaragua. (1999). Ley de Medicamentos y Farmacia. Ley No. 292. *Capítulo IV Registro de medicamentos*. Recuperado el 11 de febrero del 2014, de http://cicad.oas.org/fortalecimiento_institucional/Legislations/PDF/NI/ley_292.pdf.
9. Báez, E.M, Chávez, U.S y Díaz, M.V. (2012). Validación de un método volumétrico para la cuantificación de yodopovidona en solución al 10% aplicado a un estudio de estabilidad. Monografía para optar al título de químico farmacéutico no publicada. UNAN, León, Nicaragua.
10. The United States Pharmacopeial Convention USP 32 NF 27 Volumen 1. (2009). *Validación de Procedimientos Farmacopéicos*. Páginas 749-752. Estados Unidos de América: Twinbrook Parkway, Rockville, MD.
11. Nash, R.A., y Wachter, A.H. (2003). Pharmaceutical Process Validation. An international third edition, revised and expanded (3^a Ed). *Chapter 15: Validation of Analytical Methods and Processes*. New York, United States: Marcel Dekker, Inc.
12. Ministerio de Economía, MINECO. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT. Ministerio de Fomento, Industria y Comercio, MIFIC. Secretaria de Industria y Comercio, SIC. Ministerio de Economía, Industria y Comercio, MEIC. (2011). Reglamento Técnico Centroamericano. *Productos Farmacéuticos. Validación de Métodos Analíticos para la Evaluación de la Calidad de los Medicamentos. RTCA 11.03.39:06*. Recuperado el 13 de febrero del 2014, de <http://www.mific.gob.ni/LinkClick.aspx?fileticket=O9Us2nbt1rs%3D&tabid=437&language=en-US>.
13. Miller, J.N., y Miller, J.C. (2002). Estadística y Quimiometría para Química Analítica (4^a Ed). *La calidad de las medidas analíticas*. Páginas 100-101. España.: Pearson Prentice Hall.



14. Rubinson, K.A., y Rubinson, J.F. (2001). Análisis instrumental. *Cromatografía líquida*. Páginas 636-637. Madrid, España: Prentice Hall.
15. Peralta, C. (2013). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua UNAN-León. Facultad de ciencias Químicas. Departamento de Farmacia Industrial. Análisis Farmacéutico III. Cromatografía.
16. Watson, D.G. (2000). Pharmaceutical Analysis. A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists. *Chapter 12: High-pressure liquid chromatography*. Páginas 238-239. New York: Harcourt Publishers Limited.
17. Sweetman, C. (2009). Martindale the Complete Drug Reference (36^a Ed). *Analgesics Anti-inflammatory Drugs and Antipyretics. Aspirin*. Página 20. *Dermatological Drugs and Sunscreens Salicylic Acid*. Página 1612. Chicago: Pharmaceutical Press.
18. Flores, J. (2010). Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica (4^a Ed). *Fármacos analgésicos-antitérmicos y antiinflamatorios no esteroideos. Antiartríticos*. Páginas 355-367. España: MASSO.
19. Alfonso, R. Genaro (2003). Remington Farmacia. Parte 2. (20^a Ed). *Cinética química*. Páginas 313-314. Buenos aires: Medica Panamericana.
20. Chemical Book. Ácido salicílico. Extraído el 13 de febrero del 2014 de: http://www.chemicalbook.com/CASEN_69-72-7.htm.
21. British Pharmacopoeia. Volumen I. (1993). London, United Kingdom: HMSO.



ANEXOS



ANEXO N° 1: Resultado de la estandarización de soluciones:

• **Estandarización de NaOH 0.1 N:**

$$N = \frac{\text{mg de biftalato de potasio}}{204.23 \text{ mg} * \text{ml NaOH}}$$
$$N1 = \frac{304.5 \text{ mg}}{204.23 \text{ mg} * 15.4 \text{ ml}} = 0.09681$$
$$N2 = \frac{308.1 \text{ mg}}{204.23 \text{ mg} * 15.6 \text{ ml}} = 0.09670$$
$$N3 = \frac{306.2 \text{ mg}}{204.23 \text{ mg} * 15.5 \text{ ml}} = 0.09672$$

Normalidad Promedio: 0.09674.

• **Estandarización del NaOH 0.1 N:**

$$N = \frac{\text{mg de biftalato de potasio}}{204.23 \text{ mg} * \text{ml NaOH}}$$
$$N1 = \frac{211.7 \text{ mg}}{204.23 \text{ mg} * 10.7 \text{ ml}} = 0.0969$$
$$N2 = \frac{210.7 \text{ mg}}{204.23 \text{ mg} * 10.7 \text{ ml}} = 0.0964$$
$$N3 = \frac{209.4 \text{ mg}}{204.23 \text{ mg} * 10.6 \text{ ml}} = 0.0967$$

Normalidad Promedio: 0.0967

• **Estandarización de H₂SO₄ 0.1 N:**

$$N = \frac{v_{NaOH} * N_{NaOH}}{V_{H_2SO_4}} = 0.09013$$
$$N1 = \frac{30 \text{ ml} * 0.09674}{32.2 \text{ ml}} = 0.09013$$



$$N2 = \frac{30 \text{ ml} * 0.09674}{32 \text{ ml}} = 0.09099$$

$$N3 = \frac{30 \text{ ml} * 0.09674}{32.2 \text{ ml}} = 0.09013$$

Normalidad Promedio: 0.09041.



ANEXO N° 2: Resultados de la determinación de la pureza del estándar de Aspirina y estándar de ácido salicílico.

- **Pureza de Aspirina**

Volúmenes gastados de H₂SO₄ en la solución blanco:

$$V_{1\text{gastado}} = 31.6 \text{ ml}$$

$$V_{2\text{gastado}} = 31.6 \text{ ml}$$

$$V_{3\text{gastado}} = 31.6 \text{ ml}$$

Masa teórica de Aspirina (pesos reales):

$$M_1 = 98.6 \text{ mg}$$

$$M_2 = 99.2 \text{ mg}$$

$$M_3 = 101.2 \text{ mg}$$

$$\text{ml}_{\text{NaOH muestra}} = \frac{\text{ml H}_2\text{SO}_4 \times N_{\text{H}_2\text{SO}_4}}{N_{\text{NaOH}}}$$

$$m_{\text{aspirina}} = \text{titre} * (\text{ml}_{\text{NaOH blanco}} - \text{ml}_{\text{NaOH muestra}}) * f$$

$$\% \text{ Pureza} = (m_{\text{experimental}} / m_{\text{teórica}}) * 100$$

$$\text{ml}_{\text{NaOH muestra 1}} = \frac{21.3 \text{ ml} \times 0.09041}{0.09674} = 19.91 \text{ ml}$$

$$\text{ml}_{\text{NaOH muestra 2}} = \frac{21.3 \text{ ml} \times 0.09041}{0.09674} = 19.91 \text{ ml}$$

$$\text{ml}_{\text{NaOH muestra 1}} = \frac{21.2 \text{ ml} \times 0.09041}{0.09674} = 19.81 \text{ ml}$$

$$\text{Masa 1} = 9.008 * (30 \text{ ml} - 19.91 \text{ ml}) * 0.9674 = 87.93 \text{ mg}$$

$$\% \text{ pureza} = \frac{87.93 \text{ mg}}{98.6 \text{ mg}} * 100 = 89.18\%$$

$$\text{Masa 2} = 9.008 * (30 \text{ ml} - 19.91 \text{ ml}) * 0.9674 = 87.93 \text{ mg}$$



$$\% \text{pureza} = \frac{87.93 \text{ mg}}{99.2 \text{ mg}} * 100 = 88.64\%$$

$$\text{Masa 3} = 9.008 * (30 \text{ ml} - 19.81 \text{ ml}) * 0.9674 = 88.79 \text{ mg}$$

$$\% \text{pureza} = \frac{88.79 \text{ mg}}{101.1 \text{ mg}} * 100 = 87.82\%$$

Pureza Promedio: 88.55%

- **Pureza ácido salicílico:**

$$m_{\text{ácido salicílico}} = \text{titre} * \text{ml}_{\text{NaOH}} * f$$

$$\% \text{ Pureza} = (m_{\text{experimental}} / m_{\text{teórica}}) * 100$$

1. M (ácido salicílico)= 13.81 mg * 9 ml * (0.0967/ 0.1)

M (ácido salicílico)= 120.18843 mg

$$\% \text{ Pureza} = \frac{120.18843 \text{ mg}}{120.9 \text{ mg}} * 100 = 99.41\%$$

2. M (ácido salicílico)= 13.81 mg * 9.2 ml * (0.0967/0.1)

M (ácido salicílico)= 122.8593 mg

$$\% \text{ Pureza} = \frac{122.8593 \text{ mg}}{123.97 \text{ mg}} * 100 = 99.09\%$$

3. M (ácido salicílico)= 13.81 mg * 9.6 ml * (0.0967/ 0.1)

M (ácido salicílico)= 128.2009 mg

$$\% \text{ Pureza} = \frac{128.2009 \text{ mg}}{128.81 \text{ mg}} * 100 = 99.53 \%$$

Promedio de las 3 purezas = 99.3 %



ANEXO N° 3: Valores críticos de F para un contraste de una cola (P=0.05)

v_2	v_1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.9	245.9	248.0
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45
3	10.13	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.786	8.745	8.703	8.660
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.912	5.858	5.803
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.678	4.619	4.558
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.000	3.938	3.874
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.575	3.511	3.445
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.687	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.284	3.218	3.150
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.073	3.006	2.936
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.913	2.845	2.774
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.788	2.719	2.646
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.687	2.617	2.544
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.604	2.533	2.459
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.534	2.463	2.388
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.475	2.403	2.328
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.425	2.352	2.276
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.381	2.308	2.230
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.342	2.269	2.191
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378	2.308	2.234	2.155
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.278	2.203	2.124

v_1 = número de grados de libertad del numerador y v_2 = número de grados de libertad del denominador.



ANEXO N° 4: Valores críticos de F para un contraste de dos colas (P=0.05)

v_2	v_1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20
1	647.8	799.5	864.2	899.6	921.8	937.1	948.2	956.7	963.3	968.6	976.7	984.9	993.1
2	38.51	39.00	39.17	39.25	39.30	39.33	39.36	39.37	39.39	39.40	39.41	39.43	39.45
3	17.44	16.04	15.44	15.10	14.88	14.73	14.62	14.54	14.47	14.42	14.34	14.25	14.17
4	12.22	10.65	9.979	9.605	9.364	9.197	9.074	8.980	8.905	8.844	8.751	8.657	8.560
5	10.01	8.434	7.764	7.388	7.146	6.978	6.853	6.757	6.681	6.619	6.525	6.428	6.329
6	8.813	7.260	6.599	6.227	5.988	5.820	5.695	5.600	5.523	5.461	5.366	5.269	5.168
7	8.073	6.542	5.890	5.523	5.285	5.119	4.995	4.899	4.823	4.761	4.666	4.568	4.467
8	7.571	6.059	5.416	5.053	4.817	4.652	4.529	4.433	4.357	4.295	4.200	4.101	3.999
9	7.209	5.715	5.078	4.718	4.484	4.320	4.197	4.102	4.026	3.964	3.868	3.769	3.667
10	6.937	5.456	4.826	4.468	4.236	4.072	3.950	3.855	3.779	3.717	3.621	3.522	3.419
11	6.724	5.256	4.630	4.275	4.044	3.881	3.759	3.664	3.588	3.526	3.430	3.330	3.226
12	6.554	5.096	4.474	4.121	3.891	3.728	3.607	3.512	3.436	3.374	3.277	3.177	3.073
13	6.414	4.965	4.347	3.996	3.767	3.604	3.483	3.388	3.312	3.250	3.153	3.053	2.948
14	6.298	4.857	4.242	3.892	3.663	3.501	3.380	3.285	3.209	3.147	3.050	2.949	2.844
15	6.200	4.765	4.153	3.804	3.576	3.415	3.293	3.199	3.123	3.060	2.963	2.862	2.756
16	6.115	4.687	4.077	3.729	3.502	3.341	3.219	3.125	3.049	2.986	2.889	2.788	2.681
17	6.042	4.619	4.011	3.665	3.438	3.277	3.156	3.061	2.985	2.922	2.825	2.723	2.616
18	5.978	4.560	3.954	3.608	3.382	3.221	3.100	3.005	2.929	2.866	2.769	2.667	2.559
19	5.922	4.508	3.903	3.559	3.333	3.172	3.051	2.956	2.880	2.817	2.720	2.617	2.509
20	5.871	4.461	3.859	3.515	3.289	3.128	3.007	2.913	2.837	2.774	2.676	2.573	2.464

v_1 = número de grados de libertad del numerador y v_2 = número de grados de libertad del denominador.



ANEXO N° 5: Nivel de significación de la prueba de Cochran ($\alpha=0.05$)

v	k (n° de grupos)												
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	30
1	0.9985	0.9669	0.9065	0.8412	0.7808	0.7271	0.6798	0.6385	0.6020	0.5410	0.4709	0.3894	0.2929
2	0.9750	0.8709	0.7679	0.6838	0.6161	0.5612	0.5157	0.4775	0.4450	0.3924	0.3346	0.2705	0.1980
3	0.9392	0.7977	0.6841	0.5981	0.5321	0.4800	0.4377	0.4027	0.3733	0.3264	0.2758	0.2205	0.1593
4	0.9057	0.7457	0.6287	0.5441	0.4803	0.4307	0.3910	0.3584	0.3311	0.2880	0.2419	0.1921	0.1377
5	0.8772	0.7071	0.5895	0.5065	0.4447	0.3974	0.3595	0.3286	0.3029	0.2624	0.2195	0.1735	0.1237
6	0.8534	0.6771	0.5598	0.4783	0.4184	0.3726	0.3362	0.3067	0.2823	0.2439	0.2034	0.1602	0.1137
7	0.8332	0.6530	0.5365	0.4564	0.3980	0.3535	0.3185	0.2901	0.2666	0.2299	0.1911	0.1501	0.1061
8	0.8159	0.6333	0.5175	0.4387	0.3817	0.3384	0.3043	0.2768	0.2541	0.2187	0.1815	0.1422	0.1002
9	0.8010	0.6167	0.5017	0.4241	0.3682	0.3259	0.2926	0.2659	0.2439	0.2098	0.1736	0.1357	0.0958
10	0.7880	0.6025	0.4884	0.4118	0.3568	0.3154	0.2829	0.2568	0.2353	0.2020	0.1671	0.1303	0.0921
16	0.7341	0.5466	0.4366	0.3645	0.3135	0.2756	0.2462	0.2226	0.2032	0.1737	0.1429	0.1108	0.0771
36	0.6602	0.4748	0.3720	0.3066	0.2612	0.2278	0.2022	0.1820	0.1655	0.1403	0.1144	0.0879	0.0604
144	0.5813	0.4031	0.3093	0.2513	0.2119	0.1833	0.1616	0.1446	0.1308	0.1100	0.0889	0.0675	0.0457
∞	0.5000	0.3333	0.2500	0.2000	0.1667	0.1429	0.1250	0.1111	0.1000	0.0833	0.0667	0.0500	0.0333



ANEXO N° 6: Valores críticos de X^2 (P=0.05)

<i>Número de grados de libertad</i>	<i>Valor crítico</i>
1	3.84
2	5.99
3	7.81
4	9.49
5	11.07
6	12.59
7	14.07
8	15.51
9	16.92
10	18.31

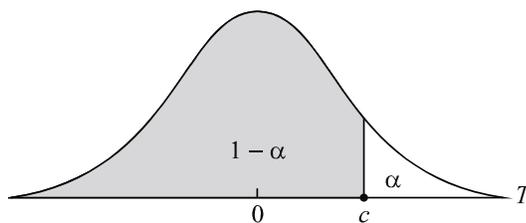


ANEXO N° 7: Tabla t-Student dos colas

<i>Valor de t para un intervalo de confianza de Valor crítico de t para valores de P de número de grados de libertad</i>	<i>90%</i>	<i>95%</i>	<i>98%</i>	<i>99%</i>
	<i>0.10</i>	<i>0.05</i>	<i>0.02</i>	<i>0.01</i>
1	6.31	12.71	31.82	63.66
2	2.92	4.30	6.96	9.92
3	2.35	3.18	4.54	5.84
4	2.13	2.78	3.75	4.60
5	2.02	2.57	3.36	4.03
6	1.94	2.45	3.14	3.71
7	1.89	2.36	3.00	3.50
8	1.86	2.31	2.90	3.36
9	1.83	2.26	2.82	3.25
10	1.81	2.23	2.76	3.17
12	1.78	2.18	2.68	3.05
14	1.76	2.14	2.62	2.98
16	1.75	2.12	2.58	2.92
18	1.73	2.10	2.55	2.88
20	1.72	2.09	2.53	2.85
30	1.70	2.04	2.46	2.75
50	1.68	2.01	2.40	2.68
∞	1.64	1.96	2.33	2.58



ANEXO N° 8: Valores críticos de la distribución *t*-Student una cola.



Área de una cola								
<i>gl</i>	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	0.025	0.01	0.005
1	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657
2	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925
3	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841
4	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604
5	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032
6	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707
7	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499
8	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355
9	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250
10	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169
11	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106
12	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055
13	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012
14	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977
15	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947
16	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921
17	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898
18	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878
19	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861



20	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845
21	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831
22	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819
23	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807
24	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797
25	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787
26	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779
27	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771
28	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763
29	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756
30	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750
40	0.681	0.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704
60	0.679	0.848	1.046	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660
120	0.677	0.845	1.041	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617
∞	0.674	0.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576



ANEXO N° 9: Formulario

1. Coeficiente de variación

$$CV = \frac{S}{\bar{x}} * 100$$

2. Desviación estándar

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

3. Coeficiente de correlación

$$r = \frac{\sum_i^n [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \sum_i (y_i - \bar{y})^2}}$$

4. Pendiente

$$b = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

5. Intercepto

$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$$

6. Residuales

$$e_i = Y_i - \hat{Y}_i$$

$$\hat{Y}_i = a + (b * X_i)$$

7. Test de Cochran

$$G_{exp} = \frac{s^2 \text{máxima}}{\sum s_i^2} = \frac{s^2 \text{máxima}}{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2 + s_4^2 + s_5^2}$$

8. Factores respuestas

$$f = \frac{Y_i}{X_i}$$



7. Coeficiente de variación de los factores respuestas

$$CV = \frac{S_f}{\bar{f}} \times 100$$

8. Variancia de la pendiente o error experimental de la variancia de la pendiente

$$S^2_a = \frac{S^2_{y/x}}{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}}$$

9. Variancia residual

$$S^2_{y/x} = \frac{\Sigma(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}$$

10. Variancia del término independiente o error experimental del intercepto.

$$S^2_a = \frac{S^2_{y/x}}{\Sigma(x - \bar{x})^2} \times \frac{\Sigma x^2}{n}$$

11. Intervalos de confianza de la pendiente

$$b \pm t_{(0.05; n-2)} \times S_b$$

12. Intervalos de confianza del intercepto

$$a \pm t_{(0.05; n-2)} \times S_a$$

13. Intervalo de confianza de repetibilidad del método

$$\bar{X} \pm t_{(0.05; n-1)} * \frac{S}{\sqrt{n}}$$

14. Test de Bartlett

$$x^2 = \frac{1}{C} * [2.3026 * (y * 10gS^2 - \Sigma y_i * 10gSi^2)]$$

$$C = \frac{\Sigma(\frac{1}{y_i} - \frac{1}{y})}{3*(k-1)} + 1$$

$$S^2 = \frac{\Sigma(y_i * Si^2)}{y}$$



15. Numero de platos teóricos

$$N = 16(tR/W)^2$$

16. Cálculo de t experimental

$$t_{\text{cal}} = \frac{|100 - \%R| * \sqrt{n}}{CV}$$

17. Cálculo de Fisher

$$F_{\text{exp}} = \frac{S^2_a}{S^2_b}$$

18. Fórmulas utilizadas para el cálculo del ANOVA

Suma de cuadrados Residual (SC_{Residual}):

$$SC_{\text{Residual}} = \sum (Y_i - \hat{Y}_i)^2$$

Suma de cuadrados de la Regresión ($SC_{\text{Regresión}}$):

$$SC_{\text{Regresión}} = \sum (\hat{Y}_i - \bar{Y})^2$$

Suma de cuadrados de la Falta de Ajuste ($SC_{\text{Falta Ajuste}}$):

$$SC_{\text{Falta Ajuste}} = \sum (\bar{Y}_i - \hat{Y}_i)^2$$

Suma de cuadrados del Error Experimental ($SC_{\text{Error Experimental}}$):

$$SC_{\text{Error Experimental}} = \left(\sum (Y_i - \hat{Y}_i)^2 \right) - \left(\sum (\bar{Y}_i - \hat{Y}_i)^2 \right)$$

$$SC_{\text{Error Experimental}} = SC_{\text{Residual}} - SC_{\text{Falta Ajuste}}$$

Suma de cuadrados Total (SC_{Total}):

$$SC_{\text{Total}} = \left(\sum (Y_i - \hat{Y}_i)^2 \right) + \left(\sum (\hat{Y}_i - \bar{Y})^2 \right)$$

$$SC_{\text{Total}} = SC_{\text{Residual}} + SC_{\text{Regrsión}}$$



Cuadrados medios de Regresión ($CM_{\text{Regresión}}$):

$$CM_{\text{Regresión}} = \frac{SC_{\text{Regresión}}}{2 - 1}$$

Cuadrados medios Residual (CM_{Residual}):

$$CM_{\text{Residual}} = \frac{SC_{\text{Residual}}}{N - 2}$$

Cuadrados medios de la Falta de Ajuste ($CM_{\text{Falta Ajuste}}$):

$$CM_{\text{Falta Ajuste}} = \frac{SC_{\text{Falta Ajuste}}}{n - 2}$$

Cuadrados medios del Error Experimental ($CM_{\text{Error Experimental}}$):

$$CM_{\text{Error Experimental}} = \frac{SC_{\text{Error Experimental}}}{N - n}$$

Cuadrados medios Total (CM_{Total}):

$$CM_{\text{Total}} = \frac{SC_{\text{Total}}}{N - 1}$$

Estadístico de Fisher calculado de la Regresión ($F_{\text{Regresión}}$):

$$F_{\text{Regresión}} = \frac{CM_{\text{Regresión}}}{CM_{\text{Residual}}}$$

Estadístico de Fisher calculado de la Falta de Ajuste ($F_{\text{Falta Ajuste}}$):

$$F_{\text{Falta Ajuste}} = \frac{CM_{\text{Falta Ajuste}}}{CM_{\text{Error Experimental}}}$$



ANEXO N° 10

Registro de Temperatura durante la Validación

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12
Mañana	26.2 °C	26.1 °C	26.2 °C	25.6 °C	25.5 °C	26.4 °C	26.6 °C	26.4 °C	26.0 °C	26.6 °C	26.4 °C	26.9 °C
Tarde	26 °C	25.8 °C	26.9 °C	26.8 °C	26.4 °C	26.5 °C	26.2 °C	26.2 °C				
	Día 13	Día 14	Día 15	Día 16	Día 17	Día 18	Día 19	Día 20	Día 21	Día 22	Día 23	Día 24
Mañana	26 °C	25.2 °C	24.2 °C	24.4 °C	25.8 °C	26.3 °C	25.2 °C	25.8 °C	26.2 °C	25.8 °C	25.5 °C	26.3 °C
Tarde	25.1 °C	25.8 °C	25.2 °C	25.1 °C	26.5 °C	25.4 °C	25.5 °C	26.2 °C	25.4 °C	24.1 °C	26.2 °C	25.8 °C



ANEXO N° 11

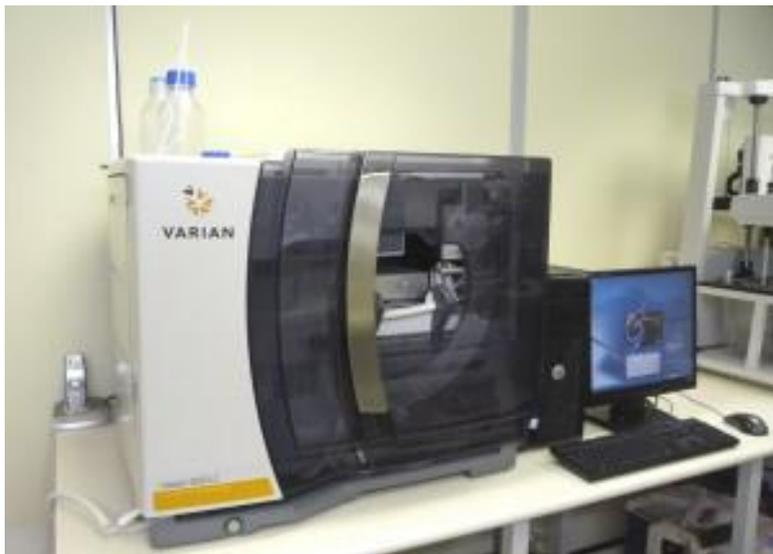
Registro de Humedad Relativa durante la Validación

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12
Mañana	54.7 %	61 %	64.4 %	61.2 %	62.6 %	56.3 %	61.1 %	54.6 %	49.4 %	58.9 %	58.2 %	47.9 %
Tarde	69 %	62.7 %	56.8 %	57.7 %	54.2 %	57.7 %	65.7 %	64.4 %	58.5 %	61.7 %	64.4 %	56.8 %
	Día 13	Día 14	Día 15	Día 16	Día 17	Día 18	Día 19	Día 20	Día 21	Día 22	Día 23	Día 24
Mañana	56.7 %	49.9 %	56.80 %	57.3 %	56.6 %	56.70 %	57.9 %	56.9 %	48.9 %	63.2 %	64.5 %	58.2 %
Tarde	54.5 %	53.8 %	57.1 %	58.5 %	58.5 %	57.2 %	58.3 %	58.6 %	49.7 %	56.8 %	56.4 %	63.4 %



ANEXO N° 12: FOTOGRAFÍAS







ANEXO N° 13

**CERTIFICADOS DE CALIBRACIÓN DE LOS
EQUIPOS Y MATERIALES UTILIZADOS EN LA
VALIDACIÓN**

Validación del Método Analítico para la cuantificación de Aspirina y Ácido Salicílico libre en tabletas de 100 mg por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.



Costado Sur Villa Progreso

UNI - RUPAP
Managua, Nicaragua.

Telefax: (505) 2248 – 0851

e-Mail: lanamet@ibw.com.ni

http://: www.mific.gob.ni/



Laboratorio Nacional de Metrología

CERTIFICADO DE CALIBRACION

Calibration Certificate

Registro: RCB-5577-14 Número de Servicio: OP-2894-14-02
Register Service Number

Página 1 de 3 Páginas
Page of Pages

Objeto Balanza electrónica
Device

Marca AND
Manufacturer

Modelo HM-120 Número de Serie 13506973
Model / Type Serial Number Inv: LCCM-BAL-02

Rango de Calibración 0 g a 120 g División de Escala 0,0001 g
Range of Calibration Scale Division e= 0,001 g

Cliente Facultad de Ciencias Químicas LCCM. UNAN-León.
Costumer Compus Médico, complejo docente de la salud
León, Nicaragua.

Fecha de Calibración 2014-06-10
Date of Calibration

Este Certificado de Calibración expresa fielmente el resultado de las mediciones realizadas. Podrá ser reproducido total pero no parcialmente, excepto cuando se haya obtenido previamente permiso por escrito del Laboratorio Nacional de Metrología. Los datos contenidos en el presente Certificado se refieren sólo al instrumento descrito en ésta página. Estos conciernen al resultado de la calibración realizada en éste instrumento en el momento y bajo las condiciones en que se realizaron las mediciones. El Laboratorio que lo emite no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado de los instrumentos calibrados o de éste documento. El Certificado de Calibración no es válido sin firma y sello autorizados.

This Calibration Certificate expresses the result of realized measurements. It shall not be reproduced other than in full, except with prior written permission of the issuing laboratory. The data contained on the present certificate refer only to the instrument described on this page and concern the result of calibration performed on this instrument at the moment and under test conditions. The issuing laboratory is not responsible for any damage resulting from the inappropriate use of the calibrated equipment or of this document. This Calibration Certificate is not valid without authorized signature and seal.

Fecha de Emisión
Date of Issue

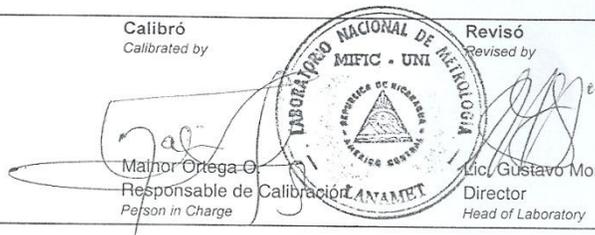
2014-06-20

Calibró
Calibrated by

Manhor Ortega-O
Responsable de Calibración
Person in Charge

Revisó
Revised by

Lic. Gustavo Montiel
Director
Head of Laboratory



Validación del Método Analítico para la cuantificación de Aspirina y Ácido Salicílico libre en tabletas de 100 mg por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.



☑ Costado Sur Villa Progreso

UNI - RUPAP

Managua, Nicaragua.

Telefax: (505) 2248 – 0851

e-Mail: lanamet@ibw.com.ni

http://www.mific.gob.ni/



Laboratorio Nacional de Metrología

CERTIFICADO DE CALIBRACION

Calibration Certificate

Registro: RCB-5576-14 Número de Servicio: OP-2894-14-01
Register Service Number

Página 1 de 3 Paginas
Page of Pages

Objeto: Balanza electrónica
Device

Marca: AND
Manufacturer

Modelo: GH-120 Número de Serie: 15102356
Model / Type Serial Number Inv: LCCM-BAL-01

Rango de Calibración: Máx¹: 0 g a 120 g División de Escala: 0,0001 g
Range of Calibration Scale Division e= 0,001 g

Cliente: Facultad de Ciencias Químicas LCCM. UNAN-León.
Customer Compus Médico, complejo docente de la salud
León, Nicaragua.

Fecha de Calibración: 2014-06-10
Date of Calibration

Este Certificado de Calibración expresa fielmente el resultado de las mediciones realizadas. Podrá ser reproducido total pero no parcialmente, excepto cuando se haya obtenido previamente permiso por escrito del Laboratorio Nacional de Metrología. Los datos contenidos en el presente Certificado se refieren sólo al instrumento descrito en esta página. Estos conciernen al resultado de la calibración realizada en este instrumento en el momento y bajo las condiciones en que se realizaron las mediciones. El Laboratorio que lo emite no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado de los instrumentos calibrados o de este documento. El Certificado de Calibración no es válido sin firma y sello autorizados.

This Calibration Certificate expresses the result of realized measurements. It shall not be reproduced other than in full, except with prior written permission of the issuing laboratory. The data contained on the present certificate refer only to the instrument described on this page and concern the result of calibration performed on this instrument at the moment and under test conditions. The issuing laboratory is not responsible for any damage resulting from the inappropriate use of the calibrated equipment or of this document. This Calibration Certificate is not valid without authorized signature and seal.

Fecha de Emisión: 2014-06-20
Date of Issue

Calibró: Maihor Ortega O.
Calibrated by

Revisó: Lc. Gustavo Montiel
Reviewed by

2014-06-20

Maihor Ortega O.
Responsable de Calibración
Person in Charge

Lc. Gustavo Montiel
Director
Head of Laboratory

Validación del Método Analítico para la cuantificación de Aspirina y Ácido Salicílico libre en tabletas de 100 mg por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.



☒ Costado Sur Villa Progreso
UNI - RUPAP
Managua, Nicaragua.
☎ Telefax: (505) 248 - 0851
e-Mail: lanamet@ibw.com.ni
☎ http:// www.mific.gob.ni/dtnm.index.htm



CERTIFICADO DE CALIBRACION

Calibration Certificate

Registro: RCV-1378-14
Register

Número de Servicio: OP-2894-14-13
Service Number

Página 1 **de** 2 **Páginas**
Page of Pages

Objeto Balón volumétrico
Device Clase A

Marca PYREX
Manufacturer

Modelo 5642
Model / Type

Número de Serie N.D.
Serial Number Inv: B-2

Rango de Medición 25 ml
Measuring Range

Error Máximo ± 0,03 ml
Tolerado
Scale Division

Cliente Facultad de Ciencias Químicas LCCM (UNAN-León)
Customer Campus Médico (Complejo Docente de la Salud) Facultad de Ciencias Químicas León, Nicaragua.

Fecha de Calibración 2014-07-08
Date of Calibration

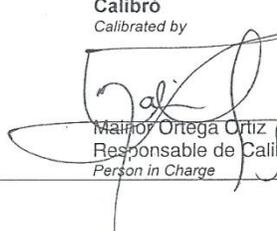
Este Certificado de Calibración expresa fielmente el resultado de las mediciones realizadas. Podrá ser reproducido total pero no parcialmente, excepto cuando se haya obtenido previamente permiso por escrito del Laboratorio Nacional de Metrología. Los datos contenidos en el presente Certificado se refieren sólo al instrumento descrito en ésta página. Estos conciernen al resultado de la calibración realizada en éste instrumento en el momento y bajo las condiciones en que se realizaron las mediciones. El Laboratorio que lo emite no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado de los instrumentos calibrados o de éste documento. El Certificado de Calibración no es válido sin firma y sello autorizados.

This Calibration Certificate expresses the result of realized measurements. It shall not be reproduced other than in full, except with prior written permission of the issuing laboratory. The data contained on the present certificate refer only to the instrument described on this page and concern the result of calibration performed on this instrument at the moment and under test conditions. The issuing laboratory is not responsible for any damage resulting from the inappropriate use of the calibrated equipment or of this document. This Calibration Certificate is not valid without authorized signature and seal.

Fecha de Emisión
Date of Issue

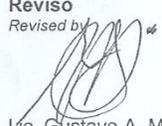
2014-07-18

Calibró
Calibrated by


Mainer Ortega Ortiz
Responsable de Calibración
Person in Charge



Revisó
Revised by


Lic. Gustavo A. Montiel
Director
Head of Laboratory

Validación del Método Analítico para la cuantificación de Aspirina y Ácido Salicílico libre en tabletas de 100 mg por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.



☒ Costado Sur Villa Progreso
UNI - RUPAP
Managua, Nicaragua.
☎ Telefax: (505) 248 - 0851
e-Mail: lanamet@ibw.com.ni
☎ http://www.mific.gob.ni/dtnm.index.htm



CERTIFICADO DE CALIBRACION
Calibration Certificate

Registro: RCV-1379-14
Register

Número de Servicio: OP-2894-14-14
Service Number

Página 1 **de** 2 **Páginas**
Page of Pages

Objeto Balón volumétrico
Device Clase A

Marca KIMAX
Manufacturer

Modelo 58008
Model / Type

Número de Serie N.D.
Serial Number Inv: B-3

Rango de Medición 50 ml
Measuring Range

Error Máximo ± 0,05 ml
Tolerado
Scale Division

Cliente Facultad de Ciencias Químicas LCCM (UNAN-León)
Customer Campus Médico (Complejo Docente de la Salud) Facultad de Ciencias Químicas León, Nicaragua.

Fecha de Calibración 2014-07-08
Date of Calibration

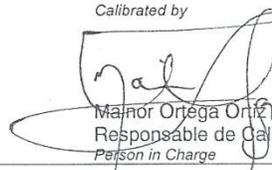
Este Certificado de Calibración expresa fielmente el resultado de las mediciones realizadas. Podrá ser reproducido total pero no parcialmente, excepto cuando se haya obtenido previamente permiso por escrito del Laboratorio Nacional de Metrología. Los datos contenidos en el presente Certificado se refieren sólo al instrumento descrito en ésta página. Estos conciernen al resultado de la calibración realizada en éste instrumento en el momento y bajo las condiciones en que se realizaron las mediciones. El Laboratorio que lo emite no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado de los instrumentos calibrados o de éste documento. El Certificado de Calibración no es válido sin firma y sello autorizados.

This Calibration Certificate expresses the result of realized measurements. It shall not be reproduced other than in full, except with prior written permission of the issuing laboratory. The data contained on the present certificate refer only to the instrument described on this page and concern the result of calibration performed on this instrument at the moment and under test conditions. The issuing laboratory is not responsible for any damage resulting from the inappropriate use of the calibrated equipment or of this document. This Calibration Certificate is not valid without authorized signature and seal.

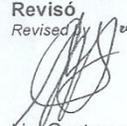
Fecha de Emisión
Date of Issue

2014-07-18

Calibró
Calibrated by


Major Ortega Ortez
Responsable de Calibración
Person in Charge

Revisó
Revised by


Lic. Gustavo A. Montiel
Director
Head of Laboratory

Validación del Método Analítico para la cuantificación de Aspirina y Ácido Salicílico libre en tabletas de 100 mg por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.



☒ Costado Sur Villa Progreso
UNI - RUPAP
Managua, Nicaragua.
☎ Telefax: (505) 248 - 0851
e-Mail: lanamet@ibw.com.ni
🌐 http:// www.mific.gob.ni/dtnm.index.htm



CERTIFICADO DE CALIBRACION

Calibration Certificate

Registro: RCV-1058-12
Register

Número de Servicio: OP-2303-12-08
Service Number

Página 1 de 2 Páginas
Page of Pages

Objeto Device	Balón Clase A		
Marca Manufacturer	PYREX		
Modelo Model / Type	5640	Número de Serie N.D. Serial Number	Inv: LCCMBL01-1000
Rango de Medición Measuring Range	1000 ml	División de la Escala ± 0,3 (EMT) Scale Division	
Cliente Customer	Facultad de Ciencias Químicas Campus medico, Complejo Docentes de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas León, Nicaragua		
Fecha de Calibración Date of Calibration	2012-08-27		

Este Certificado de Calibración expresa fielmente el resultado de las mediciones realizadas. Podrá ser reproducido total pero no parcialmente, excepto cuando se haya obtenido previamente permiso por escrito del Laboratorio Nacional de Metrología. Los datos contenidos en el presente Certificado se refieren sólo al instrumento descrito en ésta página. Estos conciernen al resultado de la calibración realizada en éste instrumento en el momento y bajo las condiciones en que se realizaron las mediciones. El Laboratorio que lo emite no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado de los instrumentos calibrados o de éste documento. El Certificado de Calibración no es válido sin firma y sello autorizados.

This Calibration Certificate expresses the result of realized measurements. It shall not be reproduced other than in full, except with prior written permission of the issuing laboratory. The data contained on the present certificate refer only to the instrument described on this page and concern the result of calibration performed on this instrument at the moment and under test conditions. The issuing laboratory is not responsible for any damage resulting from the inappropriate use of the calibrated equipment or of this document. This Calibration Certificate is not valid without authorized signature and seal.

Fecha de Emisión
Date of Issue

2012-07-28

Calibró
Calibrated by

Mano Ortega O
Responsable de Calibración
Person in Charge



Revisó
Revised by

Lic. Gustavo A. Montiel
Director
Head of Laboratory

Validación del Método Analítico para la cuantificación de Aspirina y Ácido Salicílico libre en tabletas de 100 mg por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.



☒ Costado Sur Villa Progreso
UNI - RUPAP
Managua, Nicaragua.
☎ Telefax: (505) 248 - 0851
e-Mail: lanamet@ibw.com.ni
☎ http://www.mific.gob.ni/dtnm.index.htm



CERTIFICADO DE CALIBRACION Calibration Certificate

Registro: RCV-1381-14
Register

Número de Servicio: OP-2894-14-10
Service Number

Página 1 de 2 Páginas
Page of Pages

Objeto Device	Pipeta volumétrica Clase A		
Marca Manufacturer	Fisherbrand		
Modelo Model / Type	13-650-2F	Número de Serie Serial Number	N.D. Inv: P-1
Rango de Medición Measuring Range	5 ml	Error Máximo Tolerado Scale Division	± 0,01 ml
Cliente Customer	Facultad de Ciencias Químicas LCCM (UNAN-León) Campus Médico (Complejo Docente de la Salud) Facultad de Ciencias Químicas León, Nicaragua.		
Fecha de Calibración Date of Calibration	2014-07-09		

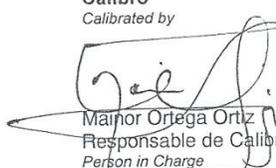
Este Certificado de Calibración expresa fielmente el resultado de las mediciones realizadas. Podrá ser reproducido total pero no parcialmente, excepto cuando se haya obtenido previamente permiso por escrito del Laboratorio Nacional de Metrología. Los datos contenidos en el presente Certificado se refieren sólo al instrumento descrito en esta página. Estos conciernen al resultado de la calibración realizada en este instrumento en el momento y bajo las condiciones en que se realizaron las mediciones. El Laboratorio que lo emite no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado de los instrumentos calibrados o de este documento. El Certificado de Calibración no es válido sin firma y sello autorizados.

This Calibration Certificate expresses the result of realized measurements. It shall not be reproduced other than in full, except with prior written permission of the issuing laboratory. The data contained on the present certificate refer only to the instrument described on this page and concern the result of calibration performed on this instrument at the moment and under test conditions. The issuing laboratory is not responsible for any damage resulting from the inappropriate use of the calibrated equipment or of this document. This Calibration Certificate is not valid without authorized signature and seal.

Fecha de Emisión
Date of Issue

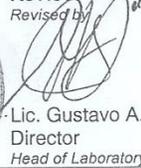
2014-07-18

Calibró
Calibrated by


Manior Ortega Ortiz
Responsable de Calibración
Person in Charge



Revisó
Revised by


Lic. Gustavo A. Montiel
Director
Head of Laboratory

Validación del Método Analítico para la cuantificación de Aspirina y Ácido Salicílico libre en tabletas de 100 mg por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.



☒ Costado Sur Villa Progreso
UNI - RUPAP
Managua, Nicaragua.
☎ Telefax: (505) 248 - 0851
e-Mail: lanamet@ibw.com.ni
☐ http:// www.mific.gob.ni/dtnm.index.htm



CERTIFICADO DE CALIBRACION Calibration Certificate

Registro: RCV-1382-14
Register

Número de Servicio: OP-2894-14-11
Service Number

Página 1 de 2 Páginas
Page of Pages

Objeto Device	Pipeta volumétrica Clase A		
Marca Manufacturer	Fisherbrand		
Modelo Model / Type	13-650-2L	Número de Serie Serial Number	N.D. Inv: P-2
Rango de Medición Measuring Range	10 ml	Error Máximo Tolerado Scale Division	± 0,02 ml
Cliente Customer	Facultad de Ciencias Químicas LCCM (UNAN-León) Campus Médico (Complejo Docente de la Salud) Facultad de Ciencias Químicas León, Nicaragua.		
Fecha de Calibración Date of Calibration	2014-07-09		

Este Certificado de Calibración expresa fielmente el resultado de las mediciones realizadas. Podrá ser reproducido total pero no parcialmente, excepto cuando se haya obtenido previamente permiso por escrito del Laboratorio Nacional de Metrología. Los datos contenidos en el presente Certificado se refieren sólo al instrumento descrito en ésta página. Estos conciernen al resultado de la calibración realizada en éste instrumento en el momento y bajo las condiciones en que se realizaron las mediciones. El Laboratorio que lo emite no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado de los instrumentos calibrados o de éste documento. El Certificado de Calibración no es válido sin firma y sello autorizados.

This Calibration Certificate expresses the result of realized measurements. It shall not be reproduced other than in full, except with prior written permission of the issuing laboratory. The data contained on the present certificate refer only to the instrument described on this page and concern the result of calibration performed on this instrument at the moment and under test conditions. The issuing laboratory is not responsible for any damage resulting from the inappropriate use of the calibrated equipment or of this document. This Calibration Certificate is not valid without authorized signature and seal.

Fecha de Emisión
Date of Issue

2014-07-18

Calibró
Calibrated by

Mainer Ortega Ortiz
Responsable de Calibración
Person in Charge



Revisó
Revised by

Lic. Gustavo A. Montiel
Director
Head of Laboratory

Validación del Método Analítico para la cuantificación de Aspirina y Ácido Salicílico libre en tabletas de 100 mg por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.



☑ Costado Sur Villa Progreso

UNI - RÚPAP
Managua, Nicaragua.

☎ Telefax: (505) 248 – 0851

e-Mail: lanamet@ibw.com.ni

🌐 http://www.mific.gob.ni/dtnm.index.htm



Laboratorio Nacional de Metrología

41810.4135

CERTIFICADO DE CALIBRACION

Calibration Certificate

Registro: RCT-1276-14 **Número de Servicio:** OP-2894-14-08
Register Service Number

Página 1 de 2 Paginas
Page of Pages

Objeto Termóhigrómetro digital
Device

Marca Thomas Scientific
Manufacturer
P.O. Box 99, Swedesboro, NJ 08085 U.S.A.

Modelo 1235C97 **Número de Serie** 80554929
Model / Type *Serial Number*

Rango de Medición (25 a 50) °C **División de Escala** 0,1 °C
Measuring Range *Scale Division*

Cliente UNAN-León. Facultad de Ciencias Químicas LCCM.
Customer Campus Médico (Complejo Docente de la Salud). Facultad Ciencias Químicas.
León, Nicaragua

Fecha de Calibración 2014-06-20
Date of Calibration

Este Certificado de Calibración expresa fielmente el resultado de las mediciones realizadas. Podrá ser reproducido total pero no parcialmente, excepto cuando se haya obtenido previamente permiso por escrito del Laboratorio Nacional de Metrología. Los datos contenidos en el presente Certificado se refieren sólo al instrumento descrito en ésta página. Estos conciernen al resultado de la calibración realizada en éste instrumento en el momento y bajo las condiciones en que se realizaron las mediciones. El Laboratorio que lo emite no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado de los instrumentos calibrados o de éste documento. El Certificado de Calibración no es válido sin firma y sello autorizados.

This Calibration Certificate expresses the result of realized measurements. It shall not be reproduced other than in full, except with prior written permission of the issuing laboratory. The data contained on the present certificate refer only to the instrument described on this page and concern the result of calibration performed on this instrument at the moment and under test conditions. The issuing laboratory is not responsible for any damage resulting from the inappropriate use of the calibrated equipment or of this document. This Calibration Certificate is not valid without authorized signature and seal.

Fecha de Emisión <i>Date of Issue</i>	Calibró <i>Calibrated by</i>		Revisó <i>Revised by</i>
2014-06-20			
	Ing. Hugo Torres Responsable de Calibración <i>Person in Charge</i>		Lic. Gustavo Montiel Director <i>Head of Laboratory</i>



☑ Costado Sur Villa Progreso

UNI - RUPAP

Managua, Nicaragua.

☎ Telefax: (505) 248 - 0851

e-Mail: lanamet@ibw.com.ni

☎ http://www.mific.gob.ni/dtnm.index.htm



Laboratorio Nacional de Metrología

CERTIFICADO DE CALIBRACION

Calibration Certificate

Registro: RCH-0048-14 Número de Servicio: OP-2894-14-05
Register Service Number

Página 1 de 2 Páginas
Page of Pages

Objeto: Termo-higrómetro digital
Device

Marca: Thomas Scientific
Manufacturer: P.O. Box 99, Swedesboro, NJ 08085 U.S.A.

Modelo: 1235C97 Número de Serie: 90762236
Model / Type Serial Number

Rango de Medición: (40 a 80) %RH División de Escala: 0,1 %RH
Measuring Range Scale Division

Cliente: UNAN-León. Facultad de Ciencias Químicas LCCM.
Customer: Campus Médico (Complejo Docente de la Salud). Facultad Ciencias Químicas.
León, Nicaragua

Fecha de Calibración: 2014-08-22
Date of Calibration

Este Certificado de Calibración expresa fielmente el resultado de las mediciones realizadas. Podrá ser reproducido total pero no parcialmente, excepto cuando se haya obtenido previamente permiso por escrito del Laboratorio Nacional de Metrología. Los datos contenidos en el presente Certificado se refieren sólo al instrumento descrito en esta página. Estos conciernen al resultado de la calibración realizada en este instrumento en el momento y bajo las condiciones en que se realizaron las mediciones. El Laboratorio que lo emite no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado de los instrumentos calibrados o de éste documento. El Certificado de Calibración no es válido sin firma y sello autorizados.

This Calibration Certificate expresses the result of realized measurements. It shall not be reproduced other than in full, except with prior written permission of the issuing laboratory. The data contained on the present certificate refer only to the instrument described on this page and concern the result of calibration performed on this instrument at the moment and under test conditions. The issuing laboratory is not responsible for any damage resulting from the inappropriate use of the calibrated equipment or of this document. This Calibration Certificate is not valid without authorized signature and seal.

Fecha de Emisión
Date of Issue

2014-08-28

Calibró
Calibrated by

Ing. Hugo Torres
Responsable de Calibración
Person in Charge



Revisó
Revised by

Ing. Juan Gabriel Pérez
Sub Director
Assistant Manager

Validación del Método Analítico para la cuantificación de Aspirina y Ácido Salicílico libre en tabletas de 100 mg por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.



☑ Costado Sur Villa Progreso

UNI - RUPAP
Managua, Nicaragua.

☎ Telefax: (505) 248 - 0851

e-Mail: lanamet@ibw.com.ni

🌐 http://www.mific.gob.ni/dtnm.index.htm

LANAMET

Laboratorio Nacional de Metrología

4101.01.200

CERTIFICADO DE CALIBRACION

Calibration Certificate

Registro: RCM-0985-12

Register

Número de Servicio: OP-2303-12-09

Service Number

Página 1 de 3 Páginas
Page of Pages

Objeto Juego de ocho (8) pesas de 10 mg a 50 g en estuche de plástico
Device

Marca Henry Troemner LLC
Manufacturer 201 Wolf Drive. P.O. Box 87. Thorofare. NJ 08086-0087. EEUU.

Clase No aplica
Class

Número de Serie 28643
Serial Number

Cliente UNAN - LEÓN. Facultad de Ciencias Químicas. LCOM.
Customer Campus Médico (Complejo Docente de la Salud). Facultad Ciencias Químicas.
León Nicaragua.

Fecha de Calibración 2012-08-28
Date of Calibration

Este Certificado de Calibración expresa fielmente el resultado de las mediciones realizadas. Podrá ser reproducido total pero no parcialmente, excepto cuando se haya obtenido previamente permiso por escrito del Laboratorio Nacional de Metrología. Los datos contenidos en el presente Certificado se refieren sólo al instrumento descrito en esta página. Estos conciernen al resultado de la calibración realizada en este instrumento en el momento y bajo las condiciones en que se realizaron las mediciones. El Laboratorio que lo emite no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado de los instrumentos calibrados o de este documento. El Certificado de Calibración no es válido sin firma y sellado autorizados.

This Calibration Certificate expresses the result of realized measurements. It shall not be reproduced other than in full, except with prior written permission of the issuing laboratory. The data contained on the present certificate refer only to the instrument described on this page and concern the result of calibration performed on this instrument at the moment and under test conditions. The issuing laboratory is not responsible for any damage resulting from the inappropriate use of the calibrated equipment or of this document. This Calibration Certificate is not valid without authorized signature and seal.

Fecha de Emisión
Date of Issue

2012-08-30

Calibró
Calibrated by

Ing. Hugo Torres
Responsable de Calibración
Person in Charge

Revisó
Revised by

Lic. Gustavo Montiel
Director
Head of Laboratory

