



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

**"CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO ACETILSALICÍLICO EN
TABLETAS SOLUBLES COMERCIALES POR
CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA CON
DETECTORES Uv y FLUORESCENCIA"**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
LICENCIADO EN QUÍMICA

PRESENTA:

PDQ. FABIOLA JUDITH CASTRO LÓPEZ

DIRECTORES:

DR. FIDEL PÉREZ MORENO

DR. JOSÉ LUIS CADENA ZAMUDIO

DEDICATORIA

A mi hijo César Isaín, porque con su nacimiento aprendí que en esta vida todo es posible; con su dulce sonrisa y su tierna mirada me enseñó a valorar las cosas hermosas de la vida. Porque siendo tan pequeñito tuvo que soportar mis ausencias para que pudiera lograr una meta mas en mi vida.

A mis padres, Inocencio y Guadalupe, por haberme educado como lo han hecho, porque con su apoyo y consejos he llegado hasta donde estoy.

A mi esposo Isaac por el amor, la comprensión, la confianza, los consejos por todo lo que hemos compartido y los buenos momentos que hemos vivido.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por dejarme vivir muchos momentos de alegría y por este logro mas en mi vida.

A César Isaín e Isaac por comprenderme y estar conmigo, los quiero mucho.

A mi papá Inocencio y a mi mamá Guadalupe por su apoyo.

Al Dr. Fidel Pérez Moreno por permitirme trabajar con él, por la enseñanza, la paciencia, los consejos, la confianza, gracias es una gran persona.

A mis hermanos Jesús y Linda por su apoyo.

A Nancy por su amistad sincera y su apoyo incondicional.

Al Dr. José Luis Cadena Zamudio, y a la Biol. Yolanda Marmolejo Santillán por su colaboración para la realización de esta tesis.

Al Ing. Guillermo por su amistad y sus buenos consejos.

A Hugo, Aracely, Luis, Luis Rey, Francisco, Naye, Irene, Jorge, Gladys, Ubaldo, por su apoyo y amistad.

A Marcos, Lupita y Esteban por la amistad que me han brindado en tan poco tiempo de conocernos.

A mis sinodales, Dr. Martín, Dr. Francisco, M. en C. Araceli, Dr. José Antonio, Dr. Kinardo, por su apoyo.

A todos los profesores que fueron parte de mi formación profesional.

A todos aquellos que fueron mis compañeros y que recorrieron el camino conmigo.

RESUMEN

Sin duda alguna el análisis químico de fármacos es una tarea ardua y una forma de realizarlo con una mayor precisión es mediante el análisis instrumental, por lo que la cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase inversa es la más apropiada para compuestos que son altamente polares.

El objetivo del presente trabajo es cuantificar ácido acetilsalicílico en comprimidos comerciales por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) empleando el detector de arreglo de diodos en la región ultravioleta y el detector de fluorescencia, para lo cual se plantea la hipótesis nula H_0 , de que con ambos métodos se obtienen resultados similares.

Dentro de la metodología que se siguió, se consideraron aspectos teóricos importantes de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia y el efecto de la variación de algunas variables tales como: fase móvil, fase estacionaria, velocidad de flujo, tipo de detectores, etc.

En la determinación de este fármaco antiinflamatorio no esteroideo se evaluaron parámetros de validación del método de análisis como selectividad, robustez, solidez, precisión, exactitud, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación y rango de cuantificación.

Mediante la evaluación de los resultados obtenidos, se confirmó que con ambos detectores se obtienen resultados similares en la determinación, aunque con el detector Uv se obtienen menores límites de detección y en consecuencia es más preciso para bajas concentraciones.

ABSTRACT

No doubt the chemical analysis of drugs is an arduous task and a way to do it with greater precision is by instrumental analysis, so the high performance liquid chromatography on reversed phase is most appropriate for compounds that are highly polar.

The objective of this work is to quantify acetylsalicylic acid in commercial tablets by high performance liquid chromatography (HPLC) using diodes array in ultraviolet region and fluorescence detectors, which raise the null hypothesis H_0 . That is with both methods similar results are obtained.

Within the methodology followed, important theoretical aspects of high performance liquid chromatography were considered as well as the effect of the variation of certain variables such as: mobile phase, stationary phase, flow rate, type detectors, and etcetera.

In the determination of this non-steroidal anti-inflammatory drug, parameters of validation of the method of analysis as selectivity, robustness, solidity, precision, accuracy, sensitivity, detection limit, quantification limit and range of quantification, among others, were evaluated.

Using the evaluation results, it was confirmed that both detectors achieve similar results in the determination, although the UV detector provides lower limits of detection and is therefore more accurate to low concentrations.

ÍNDICE

	Pág.
1. Introducción.....	6
2. Justificación	9
3. Objetivos.....	10
4. Antecedentes	
4.1. Aspectos teóricos.....	12
4.2. Diagramas.....	13
5. Marco teórico	
5.1. Cromatografía.....	14
5.2. Partes esenciales de un cromatógrafo de líquidos.....	19
5.3. Columna y precolumna.....	20
5.3.1. Columna.....	20
5.3.2. Fase estacionaria.....	20
5.3.3. Precolumna.....	23
5.3.4. Fase móvil.....	23
5.4. Elución isocrática y de gradiente.....	23
5.5. Válvulas de inyección.....	24
5.6. Detectores.....	25
5.6.1. Detectores de Uv-Vis.....	26
5.6.2. Detectores de fluorescencia.....	29
5.7. Parámetros de validación de cuantificación de ácido acetilsalicílico.....	35
5.7.1. Equipo, tiempo y costo.....	35
5.7.2. Selección de un método analítico.....	36
5.7.3. Exactitud.....	36
5.7.4. Precisión.....	37
5.7.5. Sensibilidad.....	38
5.7.6. Selectividad.....	39

	Pág.
5.7.7. Coeficiente de variabilidad.....	40
5.7.8. Escala de operación.....	41
5.7.9. Límites de detección.....	42
5.7.10. Linealidad y rango.....	46
5.7.11. Contraste de métodos.....	46
6. Hipótesis.....	49
7. Materiales y métodos	
7.1. Muestras y preparación.....	50
7.2. Estándar.....	50
7.3. Determinación de las condiciones de trabajo para análisis por cromatografía de líquidos.....	51
7.4. Equipo.....	52
7.5. Metodología.....	52
7.6. Cálculos.....	53
8. Resultados y discusión.....	55
8.1. Curvas de calibración del estándar de ácido acetilsalicílico.....	59
8.2. Cuantificación de ácido acetilsalicílico en tabletas comerciales.....	61
9. Conclusiones.....	66
10. Aportaciones.....	68
11. Referencias bibliográficas.....	69
Anexos.....	72

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
1. Acetilación del ácido salicílico.....	6
2. Diagrama lineal de zonas de predominio del ácido acetilsalicílico.....	13
3. Diagrama de distribución de especies del ácido acetilsalicílico en solución....	13
4. Técnicas cromatográficas.....	15
5. Diagrama de variación de temperatura y presión de un gas.....	18
6. Principales componentes de un cromatógrafo de líquidos	19
7. Diferentes sitios activos presentes en la sílice.....	21
8. Equilibrio general de reacción de sílice con compuesto organoclorosilano.....	22
9. Diagrama de un inyector tipo <i>loop</i>	25
10. Distribución de energía del orbital molecular en la capa de valencia y transiciones electrónicas	27
11. Diagrama del sistema óptico de un espectrofotómetro Uv-vis.....	28
12. Transiciones que se presentan en espectroscopia de fluorescencia.....	30
13. Diagrama del sistema óptico de espectrofotómetro de fluorescencia.....	32
14. Procedimientos utilizados en cromatografía de líquidos de alta eficiencia.....	33
15. Escala de operación para métodos analíticos.....	42
16. Espectro de absorción de ácido acetilsalicílico.....	55
17. Separación cromatográfica de naproxeno, ácido acetilsalicílico y ácido salicílico	56
18. Cromatograma de ácido acetilsalicílico.....	57
19. Cromatograma de ácido acetilsalicílico de estándar y muestra comercial.....	58
20. Curva de calibración de ácido acetilsalicílico con detector Uv por mínimos cuadrados.....	59
21. Curva de calibración de ácido acetilsalicílico con detector de fluorescencia por mínimos cuadrados.....	60

LISTA DE TABLAS

	Pág.
1. Peso promedio de tres marcas de tabletas de ácido acetilsalicílico.....	61
2. Contenido de ácido acetilsalicílico en muestras A determinado por CLAE.....	62
3. Contenido de ácido acetilsalicílico en muestras B determinado por CLAE.....	63
4. Contenido de ácido acetilsalicílico en muestras C determinado por CLAE.....	64
5. Valores estadísticos determinados por comparación de métodos Uv y fluorescencia para los tres tipos de muestras.....	65

LISTADO DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A⁻: Anión del ácido acetilsalicílico

A: Muestra de SSA

AINES: Antiinflamatorios no esteroideos

B: Muestra de Zerboni

C: Muestra de Psicofarma

CH₃OH: Metanol

C_L: Concentración leída

CLAE: Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia

C_R: Concentración real

DER: Desviación estándar relativa

H₃PO₄: Ácido fosfórico

HA: Ácido acetilsalicílico

L_C: Límite mínimo de cuantificación

L_D: Límite mínimo de detección

n: Número de muestras

P_{muestra}: Peso de la muestra

P_{ppastilla}: Peso promedio de pastilla

R.A.: Reactivo analítico

s: Desviación estándar

S: Selectividad

t_p: Tamaño de partícula

Uv: Ultravioleta

Uv-Vis: Ultravioleta-visible

λ_{em}: Longitud de onda máxima de emisión

λ_{exc}: Longitud de onda máxima de excitación

λ_{max}: Longitud de onda máxima de absorbancia

INTRODUCCIÓN

El ácido acetilsalicílico es un fármaco obtenido por primera vez en 1897 por el químico Félix Hoffman con una alta pureza y estabilidad (Mejía, 2009); La reacción por la que se obtiene este compuesto es una esterificación del ácido salicílico y el anhídrido acético utilizando como catalizador unas gotas de ácido sulfúrico y ocasionalmente ácido fosfórico como se muestra en la figura 1 (Vogel, 1974).

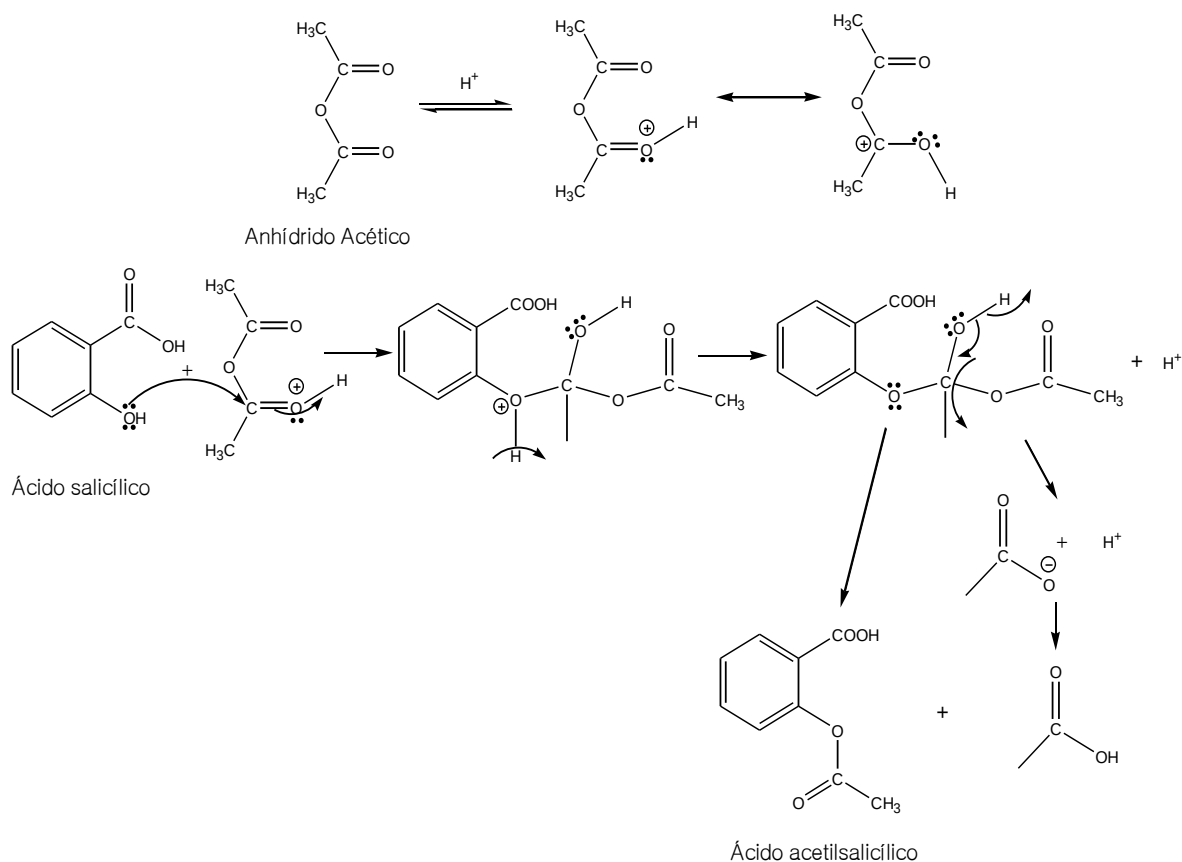


Figura 1. Acetilación del ácido salicílico (Vogel, 1974, Mann y Saunders, 1978).

Las propiedades fisicoquímicas que presenta el compuesto son: cristales blancos o polvo cristalino blanco, inodoro, sabor ligeramente amargo, soluble en agua, alcohol, cloroformo y éter a temperatura ambiente; se disuelve con descomposición en soluciones de hidróxidos y carbonatos. Su fórmula química $C_6H_4(OCOCH_3)COOH$ y su nombre sistemático de acuerdo a la IUPAC es el ácido 2-(acetiloxi)-benzoico, tiene peso molecular de $180.16 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, pK_a 3.49 a 25°C , $pf=132-136^\circ\text{C}$, $peb=140^\circ\text{C}$ (Hawley, 1993). Es conocido también por los siguientes sinónimos: ácido o-acetilsalicílico, acetilsalicilato y ácido 2-acetoxibenzoico. Actualmente se utiliza como analgésico, antiinflamatorio, antipirético, previsor de la repetición de infarto al miocardio, además está comprobado que reduce el riesgo de accidentes cardiovasculares, cerebro vasculares, vasculares periféricos y obstrucción de vasos sanguíneos, entre otros (Torrado, 1992, Lednicer y Mitscher, 1977).

El ácido acetilsalicílico es el antiinflamatorio no esteroideo (AINES) mejor estudiado y más comunmente utilizado, tiene una vida media de eliminación del cuerpo humano que varía entre 2.5 horas a dosis bajas y 19 horas a dosis elevadas. Se absorbe correctamente en el estómago y el intestino delgado, con concentraciones máximas en sangre al cabo de una hora de administración oral (Martínez y Baeza, 2004).

El ácido acetilsalicílico es para muchos el medicamento más emblemático del siglo XX, pero no es casualidad, ya que algunas estimaciones indican que cada segundo se consumen en el mundo 2,500 tabletas elaboradas con esta

sustancia activa, y que por lo menos se han fabricado 350 billones de estos comprimidos, lo que indica que son aproximadamente 210 millones de toneladas.

El ácido acetilsalicílico ha sido evaluado por diferentes métodos Uv-Vis, IR y cromatografía de líquidos de alta eficiencia; sin embargo, es necesario considerar algunos parámetros de validación de los métodos de análisis, los cuales se abordan en el presente trabajo.

JUSTIFICACIÓN

El análisis de fármacos por cromatografía de líquidos de alta eficiencia, es ampliamente utilizada, debido a su confiabilidad y precisión, sin embargo es necesario confirmar estadísticamente los resultados; por lo que en el presente estudio se realiza un esfuerzo importante en este sentido utilizando el detector de arreglo de diodos en la región ultravioleta visible y el detector de fluorescencia para cuantificar ácido acetilsalicílico con estos dos detectores.

Trabajos anteriores a este no se han encontrado en la literatura, aunque sí hay análisis de ácido acetilsalicílico con el detector ultravioleta visible (Torrado, 1992), mediante cromatografía de capa fina (Mennickent *et al.*, 2000) o por cromatografía de intercambio iónico (Pérez y Bello, 1995), pero no con los dos detectores (ultravioleta y fluorescencia); y tampoco con análisis estadístico detallado, por lo que el presente trabajo resulta de interés para el control de calidad en cromatografía de líquidos de alta eficiencia de otros compuestos de interés.

OBJETIVO GENERAL

Cuantificar ácido acetilsalicílico en comprimidos comerciales por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) empleando los detectores de arreglo de diodos en la región ultravioleta y el de fluorescencia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Cuantificar ácido acetilsalicílico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia ultravioleta visible y fluorescencia en tabletas comerciales.

Validar los parámetros de análisis de ácido acetilsalicílico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia: selectividad, límites de detección y cuantificación, variabilidad, repetibilidad y rango de trabajo.

Mediante la prueba estadística de comparación de promedios, determinar si los resultados obtenidos con los dos detectores son iguales.

ANTECEDENTES

Aspectos teóricos del ácido acetilsalicílico

El ácido acetilsalicílico es un ácido monoprótico orgánico, con un $pK_a=3.49$, y presenta el siguiente equilibrio de disociación en el agua, generando el ion hidronio y el anión acetilsalicilato.



Donde:

HA es el ácido acetilsalicílico

A^- es el anión del ácido acetilsalicílico o acetil salicilato

La distribución de las especies del ácido acetilsalicílico se muestra tanto en el diagrama lineal de zonas de predominio de especies del ácido acetilsalicílico como en el diagrama bidimensional de distribución de especies, el cual proporciona mayor información acerca del predominio de las especies en solución de este compuesto como se puede observar en las figuras 2 y 3; ya que la intersección de las dos líneas en la figura 3 corresponde al pK_a del ácido.

Diagramas

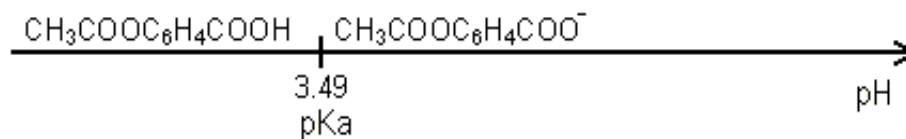


Figura 2. Diagrama lineal de zonas de predominio de especies del ácido acetilsalicílico.

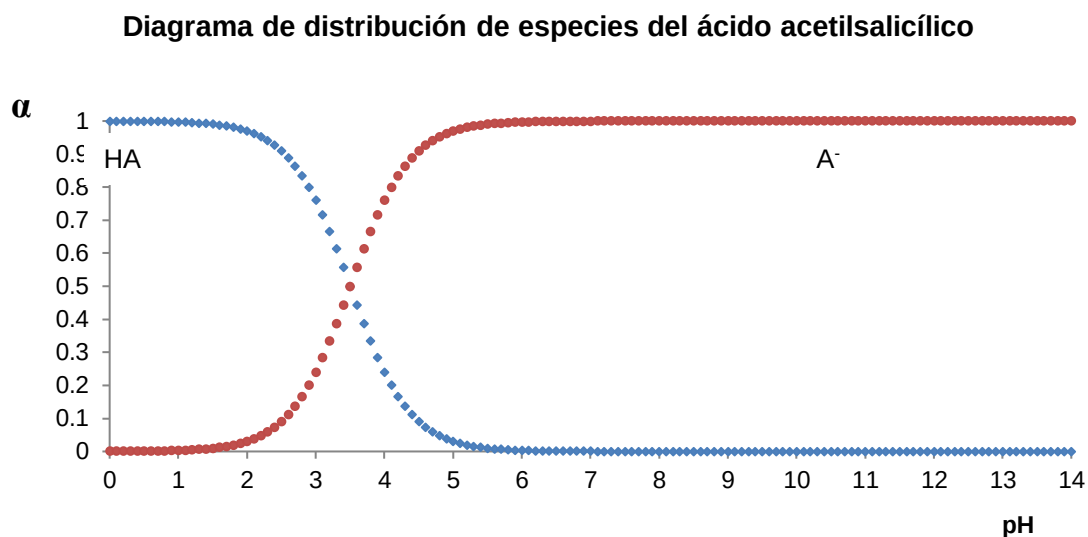


Figura 3. Diagrama de distribución de especies del ácido acetilsalicílico en solución; donde α es la fracción de disociación del ácido en función del pH: — el ácido no disociado (HA) y — el anión del ácido disociado (A^-).

MARCO TEÓRICO

Cromatografía

La cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes a ser separados son distribuidos entre dos fases, una de las cuales es la fase estacionaria que puede ser un sólido, un gel o un líquido. Si es un líquido, éste debe estar distribuido sobre un sólido, que puede contribuir o no al proceso de separación, mientras que la otra es la fase móvil, el cual es un fluido que puede ser un líquido, un gas o un fluido supercrítico que percola a través del lecho de la fase estacionaria en dirección definida (Ardrey, 2003).

Por consiguiente, la cromatografía es considerada como una técnica de análisis basada en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar distintos componentes de características fisicoquímicas semejantes de una mezcla que se distribuye en las dos fases, permitiendo identificar y cuantificar los componentes por medio de los tiempos de retención.

Los componentes de la mezcla interactúan en distinta forma con la fase estacionaria y la fase móvil; por lo que la separación entre los componentes inicia cuando una es retenida fuertemente por la fase estacionaria, y las otras tienden a desplazarse rápidamente por la fase móvil. Las diferencias en las velocidades de flujo de los componentes comúnmente llamadas retenciones, pueden tener su origen en los fenómenos de adsorción y desorción; interacciones que se presentan

en los sitios activos de la superficie del sólido o líquido, delimitando el fenómeno a la superficie que separa a las fases o superficie interfacial.

En consecuencia, las distintas técnicas cromatográficas se pueden dividir según se utilice la fase móvil y como esté dispuesta la fase estacionaria como se puede observar en la figura 4:

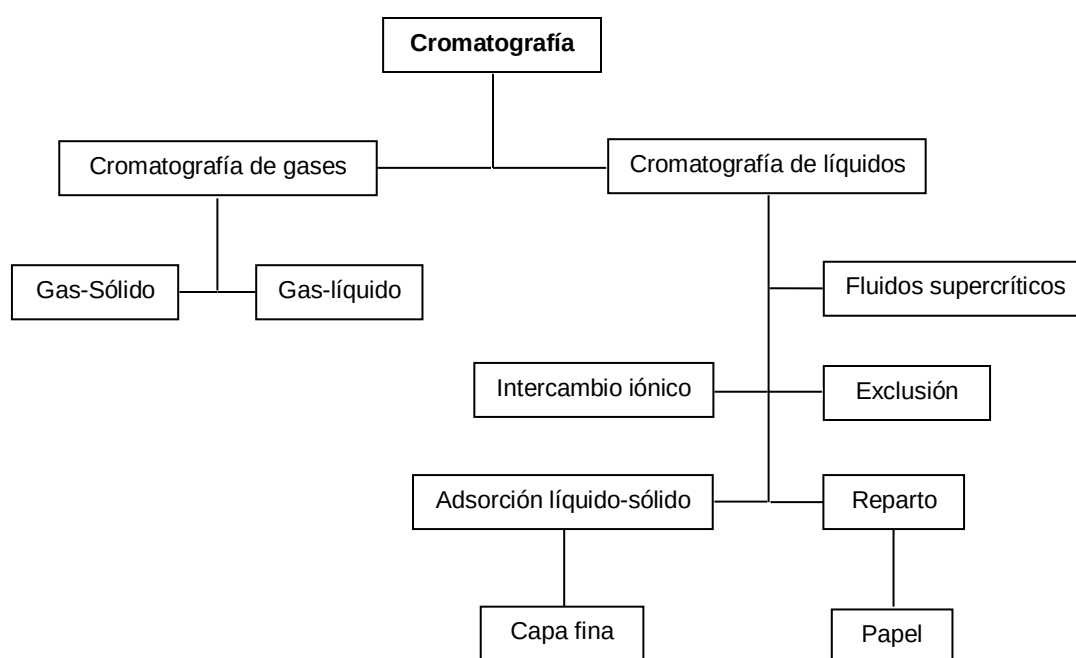


Figura 4. Técnicas cromatográficas (Johnson y Stevenson, 1978)

La cromatografía entonces se puede clasificar como cromatografía de gases o cromatografía de líquidos, según la fase móvil que se utilice para realizar la separación de los analitos.

La cromatografía de gases se subdivide en cromatografía gas-sólido o gas líquido, de acuerdo a la fase estacionaria que se esté utilizando en el análisis

La cromatografía de líquidos, por su parte, se subdivide en diversas técnicas cromatográficas, de acuerdo a la fase estacionaria que se esté utilizando como:

Cromatografía de adsorción.- La fase estacionaria será una fase polar como la sílice o fase no polar como la sílice modificada con grupos funcionales orgánicos tales NH_2 , CN , C_8 , C_{18} , etc. Mediante esta técnica se pueden separar compuestos no polares, isómeros, e hidrocarburos alifáticos.

Cromatografía intercambio iónico.- La fase estacionaria es material polimérico de divinilbenceno entrecruzado con estireno en diferentes porcentajes con cargas fijas llamados contraiones que pueden ser desplazados por otros iones que compiten mas favorablemente por los sitios de intercambio activos, denominada resina de intercambio iónico y pueden ser catiónica o aniónica y también pueden ser fuertes o débiles, de tipo gel o macro reticular, esta última dependerá del porcentaje de divinilbenceno que se le adicione a la resina.

Las resinas de intercambio iónico se dividen en cuatro categorías: intercambiadores catiónicos ácidos fuertes y débiles e intercambiadores aniónicos básicos fuertes y débiles. Mediante esta técnica se permite analizar compuestos iónicos de bajo peso molecular (Meyer, 2000; Harvy, 2000).

Cromatografía de exclusión.- Esta técnica es también llamada cromatografía de permeación en gel o cromatografía de exclusión molecular. La separación se basa en la capacidad del soluto para penetrar en el interior de los poros de la fase estacionaria, en donde los solutos más pequeños quedan retenidos por más

tiempo dentro de los poros y consecuentemente toman más tiempo que los solutos de mayor tamaño en eluir de la columna. La selectividad de la fase estacionaria está limitada a rangos moderados de tamaño de soluto. Con esta técnica se puede separar compuestos con peso molecular superior a 10,000 uma.

Cromatografía de reparto.- La fase estacionaria es un líquido que está sobre la superficie de un soporte sólido, la fase estacionaria es un líquido y la separación de los compuestos se realiza mediante el proceso de reparto entre las dos fases. Mediante esta técnica se pueden separar compuestos polares no iónicos

Cromatografía de fluidos supercríticos.- Esta técnica de separación es utilizada como complementaria de la cromatografía de gases y cromatografía de líquidos; sin embargo, su aplicación está limitada a compuestos volátiles o analitos que puedan ser volátiles mediante una derivatización adecuada, en la cual se utiliza una fase estacionaria que es un líquido y una fase móvil que es un gas mantenido a una temperatura y presión que exceden su punto crítico (figura 5). Bajo estas condiciones la fase móvil no es ni un gas ni un líquido, sino que es un fluido supercrítico cuyas propiedades son intermedias a las de un gas y a las de un líquido; específicamente presenta viscosidad semejante a la de un gas por lo que se puede mover capilarmente en la columna sin necesidad de altas presiones y también presenta una densidad cercana a la de un líquido (Harvy, 2000).

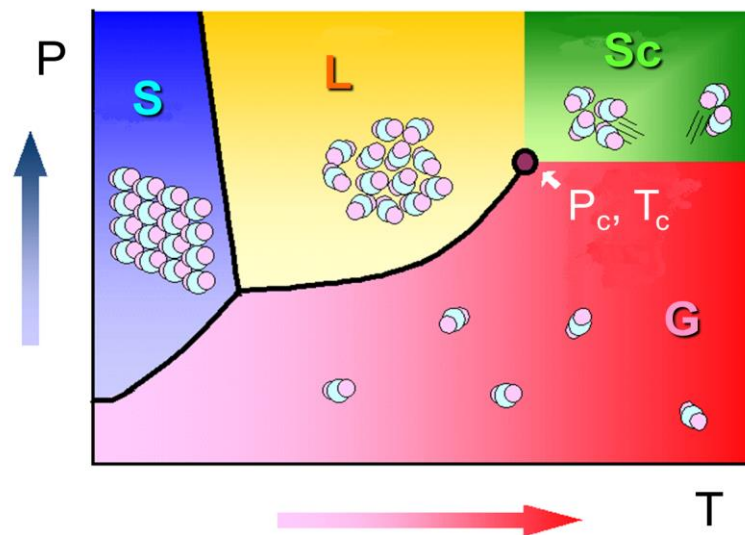


Figura 5. Variación de temperatura y presión de un gas hasta alcanzar sus puntos críticos que lo convierten en un fluido supercrítico.

PARTES ESENCIALES DE UN CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS

Un sistema cromatográfico básico contiene cuatro componentes principales: dispositivo de introducción de muestra, fase móvil, fase estacionaria y detector como se muestra en el arreglo básico de un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia en la figura 6.

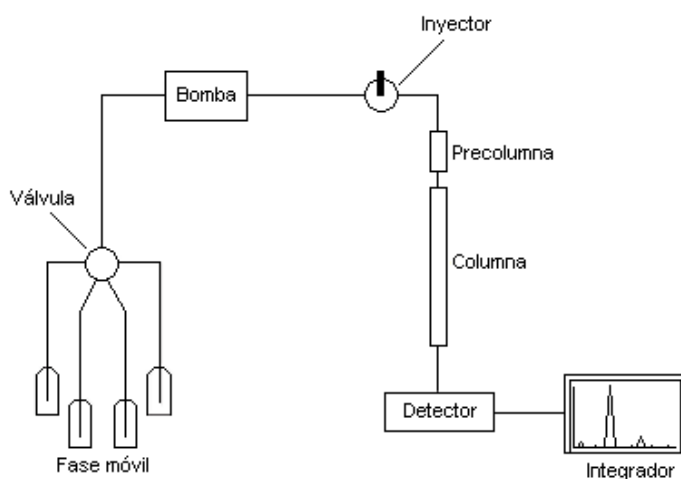


Figura 6. Esquema de los principales componentes de un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia.

Los componentes asociados con la separación de los compuestos dentro del sistema cromatográfico son la fase estacionaria y la móvil; las cuales son responsables para obtener una separación adecuada y para realizar el análisis químico cuantitativo con precisión.

Columna y precolumna

Columna

Es el principal componente de un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia, es la responsable de la separación y el corazón del cromatógrafo de líquidos; constituida por un relleno de tamaño de partícula entre 3 y 10 μm , denominada fase estacionaria. Debido a que el tamaño de partículas es muy pequeño, se requieren presiones elevadas que solamente pueden ser proporcionadas por bombas de alta presión.

Fase estacionaria

Son partículas esféricas porosas de 3-10 μm de diámetro con estructura interna totalmente porosa semejantes en apariencia a una esponja, aunque muy rígida. Dentro de los poros, la fase móvil y los analitos no fluyen, sino que se mueven por difusión a través de la fase estacionaria. Estos materiales, también pueden ser utilizados si son recubiertos con una capa de material cromatográficamente activo en estado líquido de 1 a 3 μm de espesor para formar la fase estacionaria líquida.

La sílica es un material adsorbente con propiedades sobresalientes, ya que puede ser utilizado también para cromatografía de exclusión y es la base de numerosas fases estacionarias químicamente unidas, debido a que los átomos de silicio con puentes de oxígeno forman una red saturada en la superficie con

grupos OH, también llamados grupos silanol; debido a que el material es amorfo con una superficie heterogénea (Meyer, 2000), no es fácil sintetizar sílica bien definida aunque todos los grupos funcionales en la superficie actúan como centros de adsorción (Figura 7).

Los sitios activos de la sílice presentan diferentes propiedades:

- a) Los silanoles libres son ligeramente ácidos, por lo tanto compuestos básicos serán adsorbidos en este sitio activo.
- b) Silanoles geminales son no ácidos
- c) Silanoles asociados son no ácidos. Por consiguiente grupos con OH tienden a adsorberse en estos sitios.
- d) Silanoles cercanos a iones metálicos son fuertemente ácidos. Estos incrementan la heterogeneidad de la superficie y pueden afectar seriamente la separación de compuestos básicos.
- e) Los siloxanos son producto de la condensación de silanoles asociados.

El tratamiento de la sílica con calor incrementa la cantidad de siloxanos y disminuye la concentración de silanol.

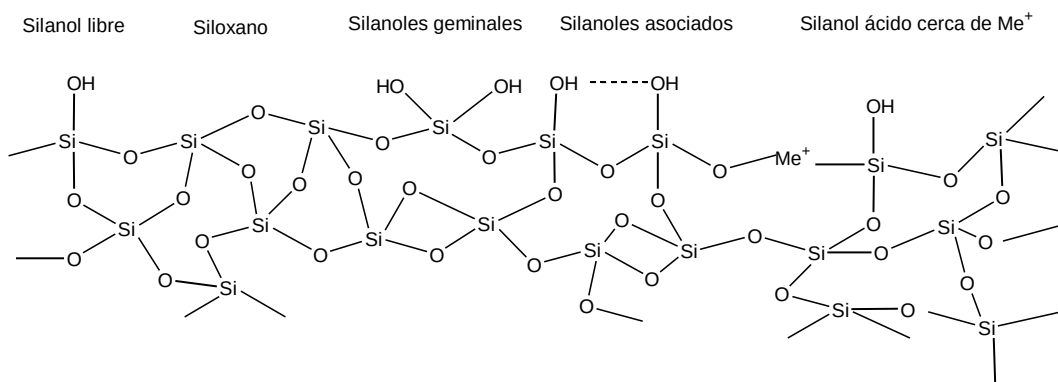


Figura 7. Diferentes sitios activos presentes en la sílice (Meyer, 2000).

La fase estacionaria líquida puede ser parcialmente soluble en la fase móvil causando una “purga” de la columna con el tiempo; para evitar la pérdida de fase estacionaria se forma un enlace covalente a las partículas de sílica.

Las fases estacionarias líquidas, se unen por reacciones de partículas de sílice con algún compuesto organoclorosilano de fórmula general $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{RCl}$, donde R es un alquilo o alquilo sustituido, como se muestra en la figura 8 (Meyer, 2000).

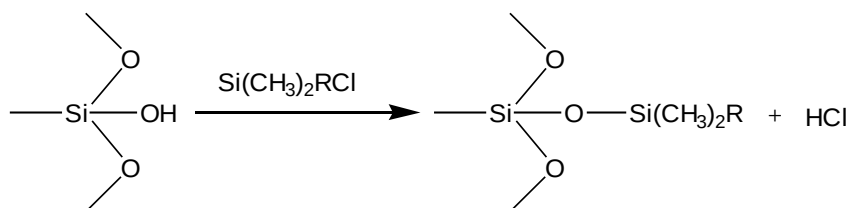


Figura 8. Equilibrio general de la reacción de sílice con un compuesto organoclorosilano para formar una fase estacionaria (Meyer, 2000).

Para evitar reacciones entre los solutos y los grupos SiOH que no han reaccionado, la sílice con frecuencia es “tapada” por reacción con $\text{Si}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$, a estas columnas se les designa como extremo encapsulado.

Las propiedades de una fase estacionaria están determinadas por la naturaleza del grupo alquilo del organosilano; por lo que si R es un grupo funcional polar, la fase estacionaria será polar.

Precolumna

Generalmente contiene el mismo material de embalaje y partículas de fase estacionaria que la columna de análisis. La precolumna se coloca delante de la columna para protegerla de la contaminación.

Cuando la técnica de separación cromatográfica se realiza utilizando una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar, se llama cromatografía de adsorción en fase normal, mientras que si la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es polar, la técnica se denomina cromatografía de fase inversa.

Fase móvil

El orden de elución de los solutos en la separación por CLAE en fase normal se rige por la polaridad de la muestra y de la fase móvil, donde el soluto menos polar pasa proporcionalmente en un menor tiempo dentro de la fase estacionaria polar y es el primer soluto en eluir por la columna; es decir, los tiempos de retención son controlados por la selección adecuada de la fase móvil, ya que con una fase móvil menos polar el tiempo de retención se incrementará (Harvey, 2000).

Elución isocrática y de gradiente

En elución isocrática, la fase móvil que se utiliza para realizar la separación cromatográfica es solo un único disolvente o una mezcla de disolventes en proporción fija. Si un disolvente no permite una elución suficientemente rápida de

todos los componentes, entonces se puede utilizar una elución de gradiente, que consiste en incrementar la concentración de uno de los disolventes y consecuentemente reducir la concentración del otro en forma gradual durante el tiempo de corrida de la separación, produciendo así un gradiente continuo (Harris, 2001).

Válvulas de inyección

La presión de funcionamiento de un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (CLAE) típico varía entre 200-3000 psi, por lo que es imposible inyectar la muestra en la misma forma que en cromatografía de gases, ya que sería necesario trabajar con válvulas de inyección sin flujo. Por lo que la muestra se introduce mediante un sistema de inyección tipo *loop*, como el que se muestra en la figura 9, en el que se utiliza una jeringa despuntada en la posición de carga para lavar y llenar el sistema hidráulico de volumen fijo con una nueva muestra a la presión atmosférica; cuando la válvula se coloca en la posición de inyección el líquido que procede de la bomba a alta presión pasa por el segmento donde se colocó la muestra, la que es eluida a alta presión dentro de la columna (Harris, 2001; Harvy, 2000).

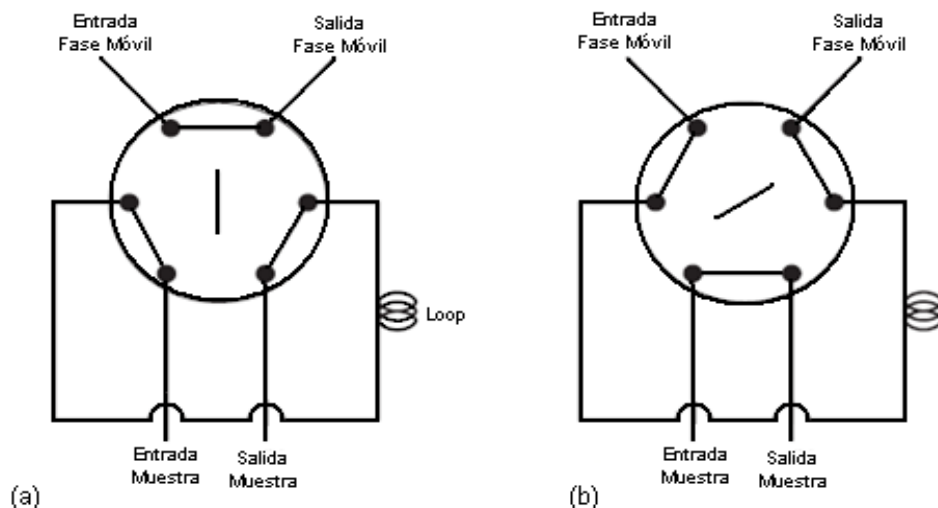


Figura 9. Diagrama de un inyector tipo *loop*. **a)** Posición de Carga y **b)** Posición de inyección (Harvy, 2000)

Detectores

Los detectores en cromatografía de líquidos responden a una propiedad fisicoquímica característica del componente o analito y puede ser el índice de refracción, el cual es característico de cada uno de los analitos, por lo que es considerado como un detector universal aunque su sensibilidad no es muy buena y también es afectada por los gradientes de elución, por lo que no es recomendable para separaciones con gradiente. Los detectores de absorción o emisión de energía a una longitud de onda definida es debido a la presencia de grupos cromóforos y/o auxocromos en los analitos, los cuales modifican la longitud de onda de absorción o emisión, pudiéndose considerar detectores ultravioleta

visible, fluorescencia, fosforescencia, luminiscencia o bioluminiscencia, los cuales presentan arreglos semejantes que los espectrofotómetros respectivos.

Detectores de ultravioleta-visible

Los detectores ultravioleta-visible utilizan una lámpara que emite energía en la región Uv, Vis o ambas; como las lámparas de Deuterio, Tungsteno y Xenón. La energía que se emite está cuantizada y cuando las moléculas o iones absorben esta energía, su configuración electrónica de valencia cambia de orbitales moleculares cuantizados sigma enlazante σ , pi enlazante π , no enlazante n a orbitales moleculares desocupados sigma antienlace σ^* y pi antienlace π^* ; lo suficientemente cercanos en energía que las transiciones electrónicas de un orbital ocupado a uno desocupado es posible (figura 10).

Las transiciones $\sigma\text{--}\sigma^*$ se presentan en todos los compuestos orgánicos y son de alta energía e intensidad y solamente se pueden observar en el Uv al vacío. Mientras que las transiciones $\sigma\text{--}\pi^*$ y $\pi\text{--}\sigma^*$ es posible observarlas en compuestos insaturados, son transiciones de baja intensidad en el Uv lejano; estos carecen de interés práctico. Las transiciones de $n\text{--}\sigma^*$ se presentan en compuestos con heteroátomos electronegativos (O, N, S, X), generalmente en la región cercana a los 200 nm; la intensidad de esta transición es variable dependiendo de la naturaleza del orbital n . Las transiciones $\pi\text{--}\pi^*$ se presentan sólo en compuestos insaturados; en ausencia de conjugación las transiciones se

presentan en el Uv al vacío, y dan lugar a bandas intensas que pueden aparecer en el Uv cercano si está presente insaturación conjugada.

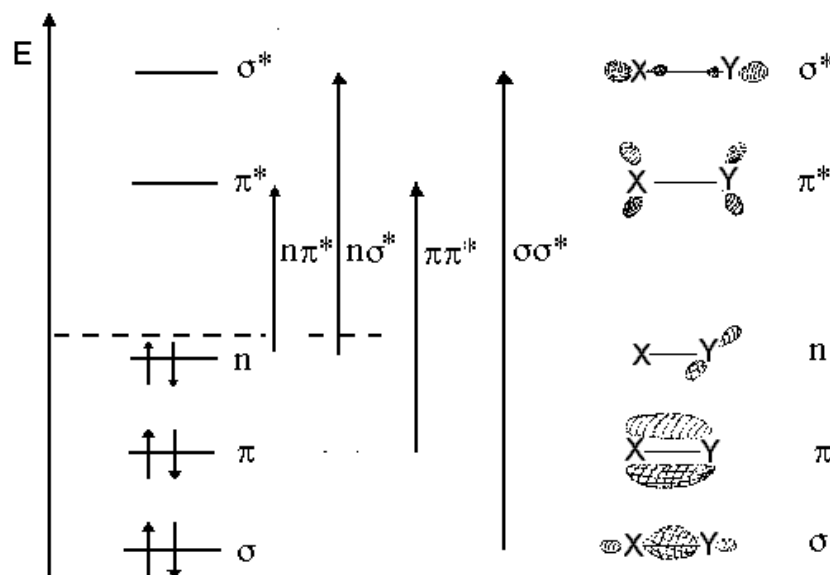


Figura 10. Distribución de energía del orbital molecular de la capa de valencia y transiciones electrónicas.

Finalmente las transiciones $n\text{-}\pi^*$ se presentan en compuestos insaturados con heteroátomos (grupos carbonilos, nitro, azo, tiocarbonilos), dan lugar a bandas débiles, usualmente en la región Uv cercano (transiciones de baja energía).

Los detectores espectrofotométricos de ultravioleta más potentes son los instrumentos de arreglo de diodos que permiten recoger los datos de un espectro completo en aproximadamente un segundo, aunque también se puede trabajar a

longitudes de onda fija o en forma alternada, es decir, cuando los picos que eluyen están suficientemente separados se puede elegir distinta longitud de onda para cada pico. De esta forma, los datos espectrales para cada pico cromatográfico se pueden coleccionar y almacenar a medida que van saliendo de la columna.

Los detectores Uv-Vis y de arreglo de diodos, así como los espectrofotómetros presentan arreglos en el sistema óptico y de monocromadores como se muestra en la figura 11, con celdas o micro celdas de flujo continuo e intervalos de escala desde 5.0×10^{-4} a 3 unidades de absorbancia.

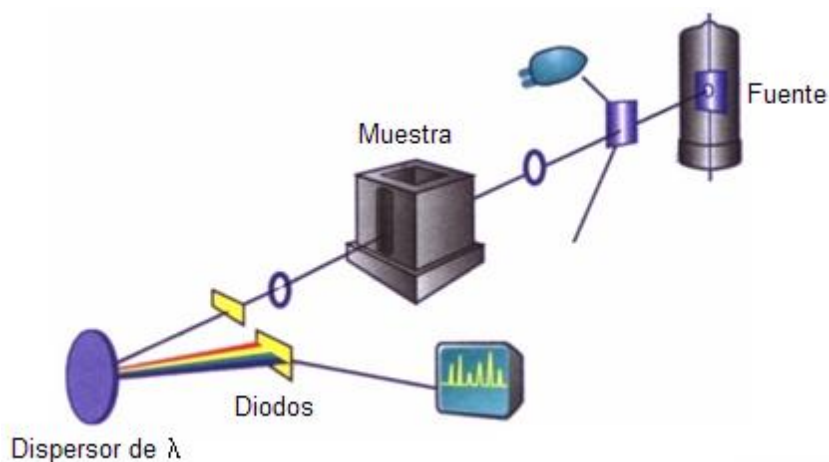


Figura 11. Diagrama de sistema óptico de un espectrofotómetro Uv-Vis

Detectores de fluorescencia

La fluorescencia es la propiedad de una sustancia para emitir luz cuando es expuesta a radiaciones del tipo ultravioleta, rayos catódicos o rayos X.

La espectroscopia de fluorescencia está referida principalmente con la emisión de energía de moléculas que presentarán estados electrónicos y vibracionales de mayor energía proporcionadas por fotones. Generalmente, las especies examinadas tendrán un estado electrónico basal (baja energía), y un estado electrónico de más alta energía, cada uno de esos estados electrónicos tiene varios estados vibracionales; y cuando se hace incidir fotones de alta energía en las moléculas, las especies son primero excitadas por absorción del fotón de luz desde su estado electrónico basal a uno de los varios estados vibracionales en el estado electrónico excitado (figura 12); cuando colisionan las moléculas excitadas, éstas pierden energía vibracional hasta alcanzar el estado vibracional más bajo del estado electrónico excitado; la molécula entonces cae a uno de los estados vibracionales del estado electrónico basal emitiendo un fotón de menor energía en el proceso (Heredia, 2008).

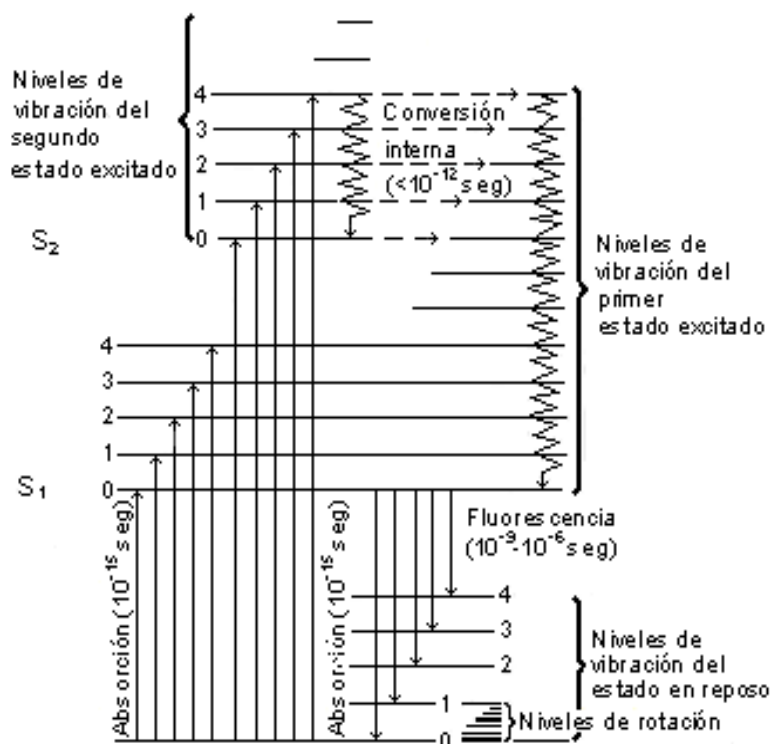


Figura 12. Transición que da lugar a la absorción y emisión del espectro de fluorescencia (Heredia, 2008).

Como las moléculas pueden caer en cualquiera de los niveles vibracionales del estado basal, los fotones tendrán diferente energía y consecuentemente diferente frecuencia que serán utilizados para realizar el análisis estructural y químico de los compuestos, ya que la fluorescencia de los analitos es directamente proporcional a la concentración como se observa en la expresión 1.

$$F = KC \quad (1)$$

Donde:

F = Fluorescencia

K = Constante de proporcionalidad

C= Concentración molar

Los detectores de fluorescencia para CLAE son semejantes en diseño a los fluorómetros y espectrofluorómetros. En la mayoría de ellos, la fluorescencia se detecta por medio de un detector fotoeléctrico colocado perpendicularmente respecto al haz de excitación como se muestra en la figura 13.

Los detectores más sencillos utilizan una fuente de excitación de mercurio, y uno o más filtros para aislar la radiación fluorescente. Una ventaja inherente a los métodos de fluorescencia es su alta sensibilidad que resulta ser más de un orden de magnitud mayor que la de los sistemas de absorbancia en forma general.

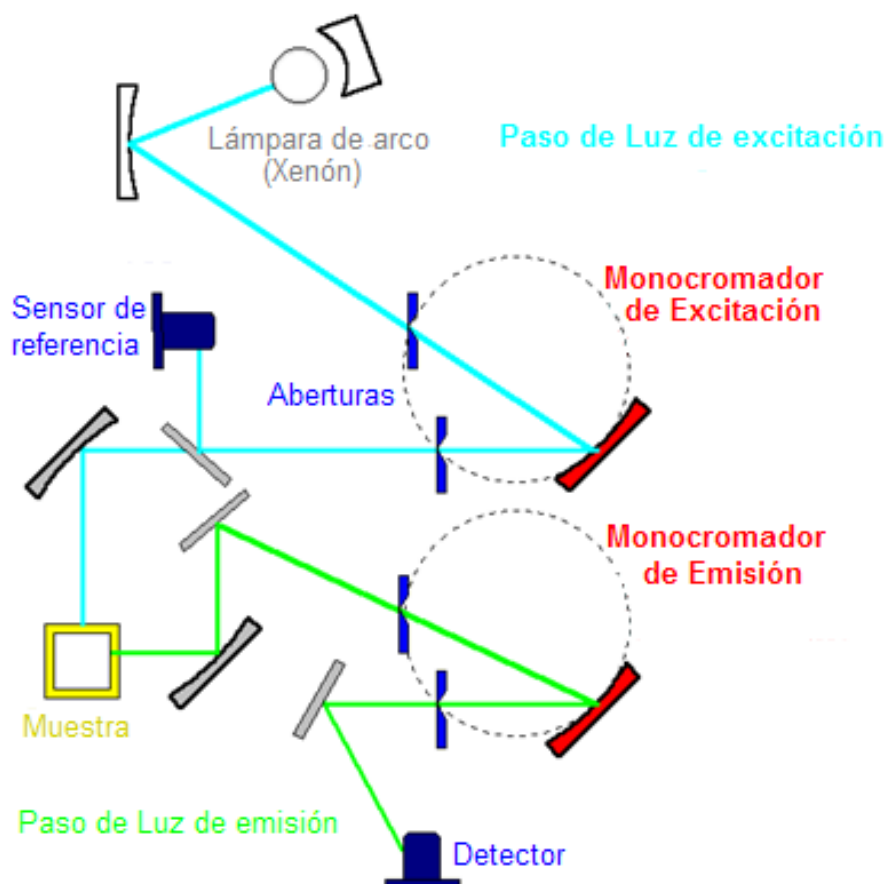


Figura 13. Arreglo de un espectrofotómetro de fluorescencia

En cromatografía de líquidos se ha aprovechado esta ventaja para la separación y determinación de los componentes fluorescentes de muestras; compuestos que tienen grupos funcionales no específicos son excitados por una energía cuya longitud de onda es más corta que la de la energía de emisión. Alrededor del 15% de todos los compuestos tiene una fluorescencia natural y la presencia de electrones π conjugados especialmente en los componentes aromáticos proporciona la actividad fluorescente más intensa (Noriega, 2000).

En estudios por cromatografía de líquidos de alta eficiencia además de las fases móviles y fases estacionarias es necesario considerar otros factores como peso molecular, solubilidad de los analitos en los diferentes disolventes, polaridad, etc., los cuales permiten relacionar sus propiedades con la metodología de separación adecuada, como se muestra en la figura 14.

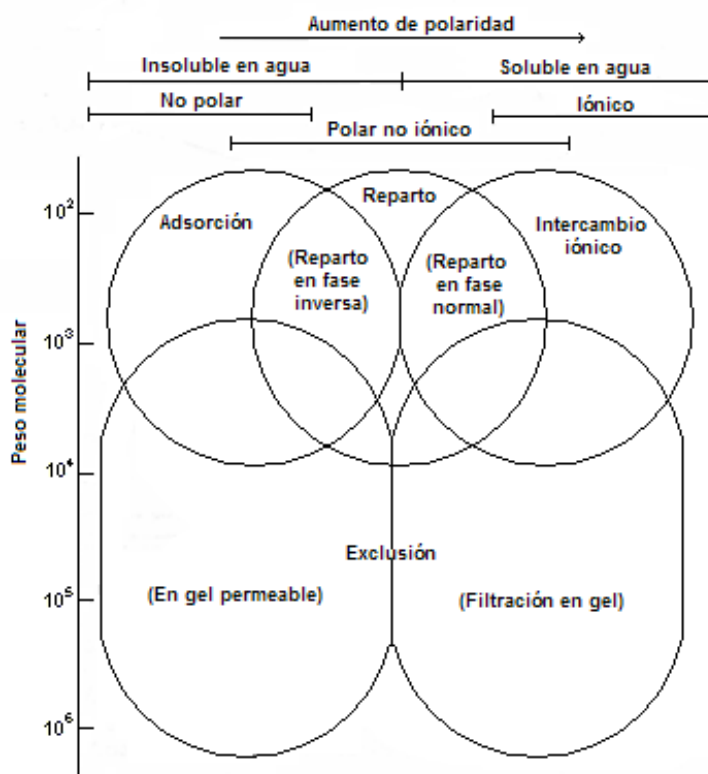


Figura 14. Distintos procedimientos utilizados por la cromatografía de líquidos, los cuales pueden ser complementarios.

El ácido acetilsalicílico es un compuesto de polaridad intermedia a alta, es decir, es soluble en metanol y en agua, pero es parcialmente soluble en solventes

orgánicos, por lo que de acuerdo con el diagrama de la figura 14, es recomendable para su análisis adecuado por cromatografía de líquidos una fase estacionaria no polar como una C_8 o C_{18} y una fase móvil polar como es el agua con metanol o agua con acetonitrilo, en una proporción mayoritaria de disolvente orgánico. Las condiciones así seleccionadas permiten identificar la técnica cromatográfica como cromatografía de fase inversa, donde la fase estacionaria tiene carácter no polar y la fase móvil polar.

La cromatografía de fase inversa se basa en el principio de retención selectiva, mediante diferentes procesos, tales como adsorción-desorción e interacciones de Van der Waals, distribuyéndose en las dos fases (estacionaria y móvil), permitiendo identificar y cuantificar los componentes de interés (Johnson y Stevenson, 1978; Harvy, 2000, Mennickent, *et al.*, 2000).

Esta técnica presenta alta sensibilidad, fácil adaptación para determinaciones cuantitativas exactas, es idónea para separación de especies no volátiles o termolábiles y sobre todo para sustancias que son de primordial interés en la industria, así como en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general.

Dependiendo de la relación carga/tamaño unos constituyentes de la mezcla serán retenidos con mayor fuerza sobre la fase estacionaria que otros, lo que propiciará su separación. Las sustancias que permanecen más tiempo en la fase móvil, avanzan rápidamente con la fase móvil y las que quedan más unidas a la

fase estacionaria (retenidas), avanzan menos y por tanto tardarán más tiempo en salir de la columna.

PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

Los métodos de análisis son desarrollados rutinariamente, optimizados, validados, estudiados colaborativamente y aplicados; son de interés práctico en una gran variedad de niveles donde se incluyen algunos de los factores que se mencionan a continuación.

Equipo, tiempo y costo

Los métodos analíticos pueden ser comparados en términos del equipo que se necesita, el tiempo requerido para completar el análisis y el costo del análisis por muestra.

El tiempo necesario para completar un análisis de una única muestra con frecuencia es similar de método a método. Algunas veces puede resultar engañoso, porque mucho de este tiempo es para preparar las soluciones y el equipo necesario para el análisis, una vez que las soluciones y el equipo están en su lugar, el número de muestras que se pueden analizar por hora difieren de método a método, esto es un factor significativo en la selección del método para laboratorios que manejan un alto volumen de muestras. El costo de un análisis es determinado por muchos factores incluyendo el costo necesario del equipo y el

número de muestras que se pueden procesar por hora (Harvey, 2000; Day y Underwood, 1989).

Selección de un método analítico

En la elección de un método de análisis también se debe tomar en consideración alguno de los siguientes criterios: exactitud, precisión, sensibilidad, selectividad, robustez, solidez, escala de operación, tiempo de análisis, disponibilidad de equipo y costo, en base a errores en el análisis y al tratamiento de los datos analíticos (Day y Underwood, 1989).

Exactitud

La exactitud es una medida cerrada del resultado de un experimento de acuerdo con el resultado esperado. La diferencia entre el resultado obtenido y el esperado dividido entre el resultado esperado generalmente es reportado como porcentaje de error relativo, como se muestra en la expresión 2.

$$\% \text{ Error} = \frac{\text{resultado obtenido} - \text{resultado esperado}}{\text{resultado esperado}} \times 100 \quad (2)$$

Los métodos de análisis se pueden dividir en tres grupos basados en la magnitud de su error relativo; cuando un resultado experimental está dentro del 1% del resultado correcto el método analítico es muy exacto; si el método resulta

entre 1% y 5% de error relativo es medianamente exacto; pero si los errores son mayores al 5%, entonces se considera que son de baja exactitud.

Precisión

Por otra parte, cuando una muestra es analizada varias veces, los resultados individuales rara vez son los mismos debido a que son distribuidos al azar y dependiendo de la distribución del análisis repetitivo será la precisión. Se puede considerar que la precisión es una medida de esta variabilidad y entre más cerca estén los resultados del análisis individual, más precisos serán los resultados. Por consiguiente el resultado final se debe proporcionar con un intervalo de confianza y los valores extremos de dicho intervalo se llaman límites de confianza, lo cual implica que se puede afirmar con un grado de confianza dado, es decir, con una cierta probabilidad, que el intervalo de confianza si incluye al valor verdadero. El intervalo de confianza dependerá de la certeza que se quiera tener en que se incluya el valor verdadero; cuanto más grande sea la certeza, más grande será el intervalo requerido. La expresión que se utiliza está dada por la expresión 3 para muestras pequeñas (Miller y Miller, 2002).

$$\bar{x} \pm (t_{n-1})s/\sqrt{n} \quad (3)$$

El subíndice $(n-1)$ indica que t depende de esta cantidad la cual se conoce como grados de libertad. El valor de t depende también del grado de confianza requerido, el cual podría ser 90, 95, 98 o 99% y cuyos valores se pueden localizar en la tabla A.1 del anexo 1.

El valor de s es el valor de la desviación estándar, el cual es calculado mediante la expresión 4.

$$s = \sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)} \quad (4)$$

Sensibilidad

La sensibilidad de una técnica de análisis químico reside en su capacidad para detectar diferencias o efectos ahí donde los haya, y se define como la pendiente de la recta de calibración en una regresión lineal, siempre que la representación sea lineal se podrá medir en cualquier punto de ella. Por consiguiente, la sensibilidad de un método es una medida de su capacidad para establecer diferencias significativas en muestras que tienen diferentes cantidades de analito (Quezada, 2007).

Se considera que la sensibilidad es el cambio en la señal por unidad de cambio en la cantidad del analito, y es equivalente a la constante de proporcionalidad. Si ΔS_A es el incremento más pequeño en la señal del analito que puede ser medida, entonces la diferencia más pequeña en la cantidad de analito que puede ser detectada se puede determinar mediante la expresión 5 para el

análisis total con el método Δn_A y por la expresión 6 para la determinación de la concentración del compuesto ΔC_A .

$$\Delta n_{A=\frac{\Delta S_A}{k}} \quad (5)$$

$$\Delta C_{A=\frac{\Delta S_A}{k}} \quad (6)$$

Es necesario evitar la confusión de límite de detección de una técnica con su sensibilidad, ya que el límite de detección se calcula con la ayuda prestada por la zona de la representación cercana al origen y utiliza tanto la pendiente como la ordenada al origen de la regresión lineal (Miller y Miller, 2002).

Selectividad

La selectividad tiene una importancia particular como parámetro de calidad de un método analítico, definido por la IUPAC, 2001 como la extensión en la que un método puede utilizarse para determinar analitos particulares en mezclas o en matrices sin interferencias de otros componentes con un comportamiento similar y por consiguiente, también debe de validarse (Boqué, 2009). Un método analítico es selectivo, si la señal es función de un solo analito presente en la muestra, en presencia de un interferente, se pueden tener errores sistemáticos constantes o proporcionales, la señal de respuesta del analito puede estar influenciada por la respuesta de la señal del interferente como se muestra en la expresión 7.

$$S_{\text{muestra}} = S_A + S_I = k_A n_A + k_I n_I \quad (7)$$

la cual puede expresarse como se muestra en (8)

$$S_{\text{muestra}} = S_A + S_I = k_A C_A + k_I C_I \quad (8)$$

Finalmente, la ecuación 8 se puede describir como:

$$S_{A,I} = k_A (C_A + K_{A,I} C_I) \quad (9)$$

$K_{A,I} = k_I/k_A$ es el *coeficiente de selectividad* del analito A con respecto a la sustancia interferente I. El inverso de este valor se denomina *índice de selectividad*.

Donde:

S_{muestra} es el total de la señal de los componentes de la muestra

k_A y k_I son la sensibilidad para el analito y el interferente respectivamente

n_I y C_I son los moles (o gramos) y la concentración del interferente en la muestra.

Coeficiente de variabilidad

Robustez es la capacidad de un método para no ser afectado por pequeños cambios deliberados en los parámetros de un método. La robustez de un método es evaluado variando parámetros tales como porcentaje de solvente orgánico, pH, fuerza iónica o temperatura, y determinando el efecto si lo hay sobre los resultados del método. Para que un método sea útil, debe proporcionar resultados confiables. Desafortunadamente los métodos están sujetos a una gran variedad de interferencias físicas y químicas que contribuyen a la incertidumbre del análisis.

Cuando un método es libre de interferencias químicas puede ser aplicado a la determinación de los analitos en una amplia variedad de muestras, tales métodos se consideran sólidos. Por otra parte si los resultados de un método u otras medidas son susceptibles a variaciones en los parámetros del método, entonces esos parámetros deberán ser adecuadamente controlados (Swartz y Krull, 1997).

Muchas variaciones en las condiciones experimentales también introducen incertidumbre. Si la sensibilidad de un método es altamente dependiente de las condiciones experimentales, tales como: temperatura, pH, acidez o tiempo de reacción, etc., estos pequeños cambios, en estas condiciones, pueden dar resultados significativos diferentes y un método robusto es relativamente insensible a los cambios en las condiciones experimentales. Por consiguiente, la robustez está implícito en la precisión, como el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos bajo una variedad de condiciones, expresado como porcentaje de desviación estándar relativa (RSD), incluyendo las diferencias entre laboratorios, analistas, instrumentos, reactivos y periodos experimentales (Swartz y Krull, 1997).

Escala de operación

Otra forma de limitar la forma de elección de los métodos que deben de utilizarse para realizar un análisis químico apropiado consiste en considerar la escala que se utilizará, la cantidad de muestra disponible y la cantidad absoluta del analito necesaria para obtener una señal medible.

La segunda y tercera consideración definen la escala de operación del análisis como se muestra en la figura 15, que muestra la concentración del analito en función del peso de la muestra en el eje Y; y el peso de la muestra en el eje X.

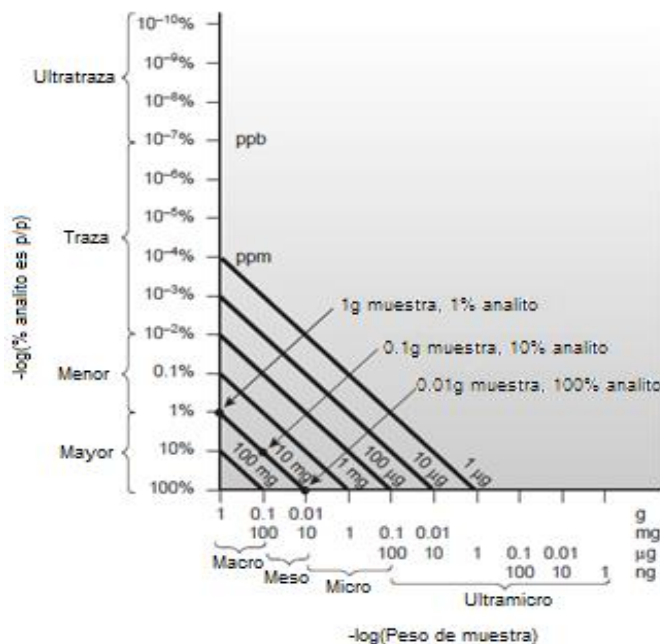


Figura 15. Escala de operación para métodos analíticos (Harvy, 2000).

Límites de detección

Los límites de detección y cuantificación son parámetros que determinan la capacidad de análisis de un método analítico en unas condiciones de mayor solubilidad que permite el sistema informático.

Límite de detección (L_D)

El límite de detección está definido como la mínima concentración de analito en una muestra que se puede detectar en un proceso de análisis con un nivel aceptable de confianza, mediante la expresión 10 (Miller y Miller, 2002; Swartz y Krull, 1997).

$$L_D = \bar{X}_n + 3S_{n-1} \quad (10)$$

Donde:

$\bar{X}$ = concentración media

n = número de muestras

s = desviación estándar

La Conferencia Internacional de Armonización ha reconocido que el límite de detección es la concentración específica que proporciona una señal de 2 a 3 veces mayor que el que proporciona el nivel de ruido y también menciona otras opciones para poder determinarla: métodos visuales no instrumentales y el promedio del cálculo; tales como la cromatografía de capa fina o las titulaciones.

El límite de detección (L_D) también puede ser determinado en base a la desviación estándar (s) de la respuesta y la pendiente (m) de la curva de calibración a niveles apropiados mediante la expresión 11 (Swartz y Krull, 1997).

$$L_D = 3.3(S/m)$$

Límite de cuantificación (L_C)

Este término está definido como la concentración mínima de un analito en una muestra que puede ser determinada con un nivel aceptable de exactitud y precisión bajo las condiciones operacionales establecidas para el método. Al igual que el límite de detección, el límite de cuantificación es expresado como una concentración en la cual la precisión y la exactitud de la medida también son reportadas y para la cual se utiliza la expresión 12 (Miller y Miller, 2002; Swartz y Krull, 1997).

$$L_C = \bar{X}_n + 10S_{n-1} \quad (12)$$

Donde:

$\bar{X}$ = concentración media

n= número de muestras

s= desviación estándar

Algunas veces una relación señal ruido 10:1 es utilizada para determinar el límite de cuantificación; esta relación es una buena regla, pero se debe de recordar que la determinación del límite de cuantificación es un compromiso entre la concentración, la precisión y exactitud requeridos. Esto es que, cuando los

niveles del límite de cuantificación disminuyen, también la precisión disminuye. Si una mayor precisión es requerida, entonces una mayor concentración deberá ser reportada para el límite de cuantificación (Swartz y Krull, 1997).

La Conferencia Internacional de Armonización ha reconocido que la relación señal ruido 10:1 es una forma típica; sin embargo, menciona dos opciones adicionales que pueden ser utilizadas para determinar el límite de cuantificación (L_C): métodos instrumentales visuales y la media de los cálculos. El método de cálculo es otra vez basado en la desviación estándar (s) de la respuesta y la pendiente (m) de la curva de calibración de acuerdo a la fórmula 13 (Swartz y Krull, 1997).

$$L_C = 10(s/m) \quad (13)$$

Nuevamente, la desviación estándar de la respuesta puede ser determinada en base a la desviación estándar del blanco, sobre la desviación estándar residual de la regresión lineal.

Un detalle adicional debe ser considerado: tanto el límite de detección como el límite de cuantificación pueden ser afectados por las formas de los picos cromatográficos que se obtengan.

Linealidad y rango

La linealidad es la capacidad del método para obtener resultados de prueba que son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un rango dado. La linealidad es generalmente reportada como la varianza de la pendiente de la regresión lineal. En tanto que el rango es el intervalo entre los valores superior e inferior del analito que han sido demostrados al ser determinados con precisión exactitud y linealidad utilizando el método. El rango es normalmente expresado en las mismas unidades que en los resultados obtenidos por el método. La guía de la Conferencia Internacional de Armonización específica que deben de utilizarse un mínimo de cinco niveles de concentración dentro de ciertos rangos mínimos especificados. El rango mínimo especificado en las pruebas de ensaye debe de estar entre el 80 y el 120 % de la concentración de prueba (Swartz y Krull, 1997). El rango, en consecuencia es la variabilidad de un proceso.

Contraste de métodos

Para determinar si los métodos utilizados proporcionan la misma información es necesario realizar una comparación de los valores medios experimentales ($\bar{x}$) de los dos métodos. En este caso se tienen dos medias muestrales ($\bar{x}_1$) y ($\bar{x}_2$), y se deberá de realizar un contraste de hipótesis, considerando que la hipótesis nula que los dos métodos proporcionan el mismo resultado, es decir $H_0: \mu_1 = \mu_2$, para lo cual se requiere probar si $((\bar{x}_1) - (\bar{x}_2))$

difiere significativamente de cero. Si las dos muestras tienen desviaciones estándar que no son significativamente diferentes, se puede calcular una estimación conjunta de la desviación estándar muestral s , a partir de las dos desviaciones estándar individuales s_1 y s_2 .

Para saber si la diferencia de las medias muestrales $(\bar{x}_1)$ y $(\bar{x}_2)$ es significativa, es decir, para contrastar la hipótesis nula $H_0: \mu_1 = \mu_2$, se calcula el estadístico t mediante la expresión 14, el cual se supone que las muestras se extraen de poblaciones con desviaciones estándar iguales

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (14)$$

Por su parte el valor de s , se calcula a partir de la expresión 15

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad (15)$$

el valor de t tiene $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad

Sí el valor de t calculado es mayor al valor de t de tablas (crítico), entonces se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$; por el

contrario sí el valor calculado de t , es menor al valor de t de tablas, entonces se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alterna (Miller y Miller, 2002).

Cuando las desviaciones estándar de las poblaciones sean diferentes, no es muy apropiado mezclar las desviaciones estándar muestrales para dar una estimación global o conjunto de la desviación estándar. Un método aproximado en estas circunstancias es considerado a continuación:

Para contrastar $H_0: \mu_1 = \mu_2$ cuando no se puede suponer que las dos muestras proceden de poblaciones con desviaciones estándar iguales, se calcula el estadístico t con la expresión 16.

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (16)$$

Los grados de libertad son calculados con la expresión 17, redondeándose el valor obtenido a un número entero.

$$\text{grados de libertad} = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \right)}{\left(\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1-1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2(n_2-1)} \right)} \quad (17)$$

Se aplica el mismo criterio que en el método anterior para aceptar o rechazar la hipótesis nula (Miller y Miller, 2002).

HIPÓTESIS

El análisis de ácido acetilsalicílico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia utilizando los detectores de Uv-visible y fluorescencia proporcionan resultados similares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras y preparación

Las muestras son tabletas efervescentes con contenidos de 300 mg de ácido acetilsalicílico que corresponden a tres compañías de productos farmacéuticos genéricos (A, B y C). Trece tabletas de cada una de las tres muestras fueron pesadas en una balanza analítica en forma individual, molidas en mortero de ágata para evitar contaminación y mezcladas perfectamente.

Del material preparado se tomaron dos fracciones de cada una de las muestras (0.0210 a 0.0249 g.), que fueron tratadas con 1 ml de MeOH grado cromatográfico para disolver el compuesto de interés, se aforaron a 10 ml con agua grado cromatográfico.

Para la inyección se tomó una alícuota de 0.1 ml de la solución preparada y se aforó en 10 ml de la solución de la fase móvil.

Estándar

Ácido acetilsalicílico R. A. fue disuelto en MeOH (grado cromatográfico), mediante un calentamiento ligero utilizando una parrilla, se enfrió en una solución acuosa con hielo para iniciar la recristalización; una vez recristalizado, la solución se decantó y se volvió a repetir el procedimiento por dos ocasiones más para asegurar que el ácido acetilsalicílico fuese de alta pureza. El sólido obtenido se dejó secar a peso constante y posteriormente se pesó con exactitud una muestra y

se disolvió en las mismas condiciones que las muestras con 1 ml de metanol y aforado a 10 ml con agua grado cromatográfico.

Determinación de las condiciones de trabajo para el análisis por cromatografía de líquidos

Longitud de onda de máxima absorbancia utilizado en el detector de Uv-Vis.

Para la determinación de la longitud de onda de máxima absorbancia ($\lambda_{\max}$) se utilizó un espectrofotómetro Uv-Vis de la marca Perkin Elmer, Modelo λ 40 y se realizó un barrido de 200 a 400 nm con el estándar de ácido acetilsalicílico preparado y a una dilución de 1:100 con agua destilada.

Longitud de onda de máxima excitación y emisión

La determinación de la longitud de onda de máxima excitación (λ_{exc}) es requerida en el análisis de fluorescencia y ésta, fue determinada utilizando el detector de fluorescencia de la marca de Perkin Elmer modelo LC 240, llenando la celda del equipo con una solución de 1:100 del estándar del ácido acetilsalicílico sin flujo y realizando un barrido de excitación del compuesto en el rango de 230-400 nm.

La longitud de onda de máxima emisión (λ_{em}) fue determinada con el mismo detector, realizando el barrido de emisión del compuesto en el rango de 250-500 nm.

Equipo

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (CLAE) de la marca Perkin Elmer Modelo Series 200 con bomba cuaternaria utilizando el Software Total Chrom versión 6.3.1 para su manejo.

Metodología utilizada

Se utilizaron dos detectores conectados en serie al cromatógrafo de líquidos para la detección de los compuestos de interés: detector de arreglo de diodos de la marca Biosystem modelo 1000 S, a $\lambda_{\max}=227$ nm; detector de Fluorescencia de la marca Perkin Elmer Modelos LC 240 con una $\lambda_{\text{exc}}=250$ nm y $\lambda_{\text{em}}=350$ nm condiciones que fueron determinadas previamente.

La columna empleada fue de sílice modificada con cadenas de C_{18} marca Perkin Elmer de un tamaño partícula de 5 μm ; dimensiones de la columna son de 250x4.6 mm; un *loop* de 20 μl ;

Se utilizó la técnica de cromatografía en fase inversa en condiciones optimizadas, en donde la fase móvil empleada fue agua grado cromatográfico ajustada a pH 3.5 con ácido fosfórico y metanol grado cromatográfico (65:35) a un flujo de 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, el tiempo de corrida de cada análisis fue de 10 min.

Cálculos

Para la realización de la curva de calibración se preparó una solución estándar de ácido acetilsalicílico de la que se hicieron seis diluciones de concentración conocida, posteriormente se inyectaron 20µl de cada una de las diluciones (cada inyección se hizo por triplicado); del área bajo la curva se obtuvieron los valores para graficar y obtener la curva de calibración por regresión lineal (Day y Underwood, 1989; Harvy, 2000; Verma, 2005).

Se tomaron 20 µl de cada una de las soluciones problema y se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos, se tomó nuevamente la lectura del área bajo la curva, y por interpolación con la curva de la regresión lineal de los estándares, se obtuvo la concentración de ácido acetilsalicílico de las soluciones de los comprimidos preparados utilizando la expresión 18 (Harvy, 2000; Verma, 2005).

$$C_L = \frac{(y-b)}{m} \quad (18)$$

Donde:

C_L = Concentración de la solución de los comprimidos leída en la curva estándar

y = Área bajo la curva

b = Intersección de la regresión lineal

m = Pendiente de la regresión lineal

La concentración de los comprimidos de cada muestra es calculada mediante la expresión 19 (Harvy, 2000; Verma, 2005).

$$C_R = \frac{C_L \times V_{af}}{P_{muestra}} \times F_d \times P_{ppastilla} \quad (19)$$

Donde:

C_R =Concentración real de la pastilla

C_L =Concentración leída de la pastilla

$P_{muestra}$ = Peso de la muestra

$P_{ppastilla}$ =Peso promedio de pastilla

$F_d = V_{af}/V_{alic}$ es el factor de dilución donde:

V_{af} =Volumen de aforo y V_{alic} =Volumen de alícuota

El porcentaje de recuperación es calculado mediante la expresión 20

$$\%Rec = \left(\frac{C_R}{C_C} \right) \times 100 \quad (20)$$

Donde:

C_R =Concentración real

C_C =Concentración marcada en la caja

La desviación estándar se calcula con la expresión 21

$$\%DER = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (21)$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La longitud de onda de máxima absorción $\lambda_{\text{max}} = 227 \text{ nm}$, se seleccionó a partir del espectro ultravioleta visible que se obtuvo de la muestra de ácido acetilsalicílico y que se muestra en la figura 16.

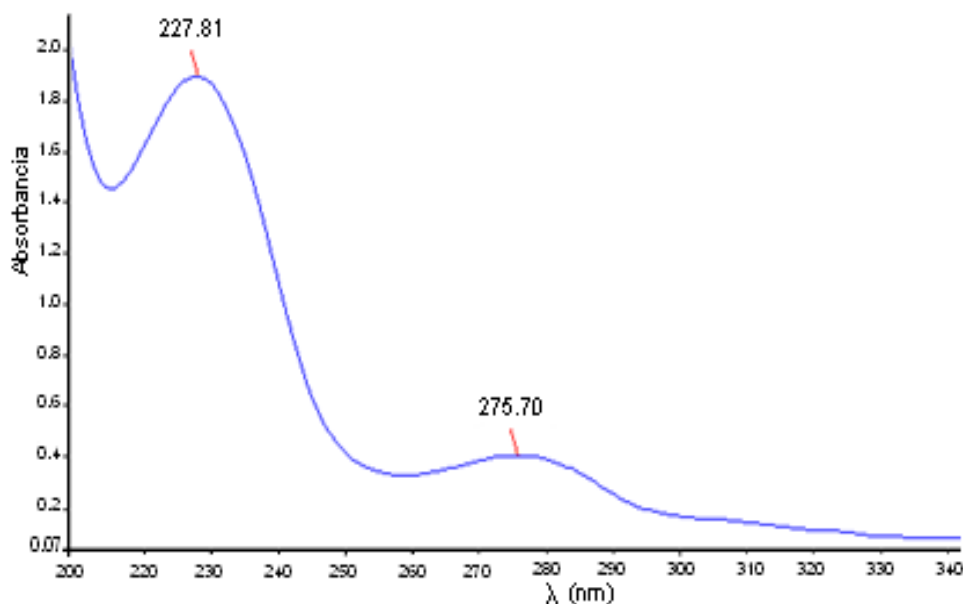


Figura 16. Espectro de absorción del ácido acetil salicílico, la longitud de onda de máxima absorción es de 227 nm.

Con las condiciones predeterminadas se realizó la detección del estándar del ácido acetilsalicílico utilizando los dos detectores, como se muestra en la figura 17; utilizando la columna de fase inversa C_{18} de 250x 4.6 mm, con fase móvil de H_2O (pH = 3.5 con H_3PO_4)- CH_3OH (65:35) a un flujo de $1.0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ y el detector de arreglo de diodos a 227 nm, obteniéndose una buena separación de los

compuestos naproxeno, ácido salicílico y ácido acetilsalicílico, respectivamente, por lo que se considera que el método es selectivo.

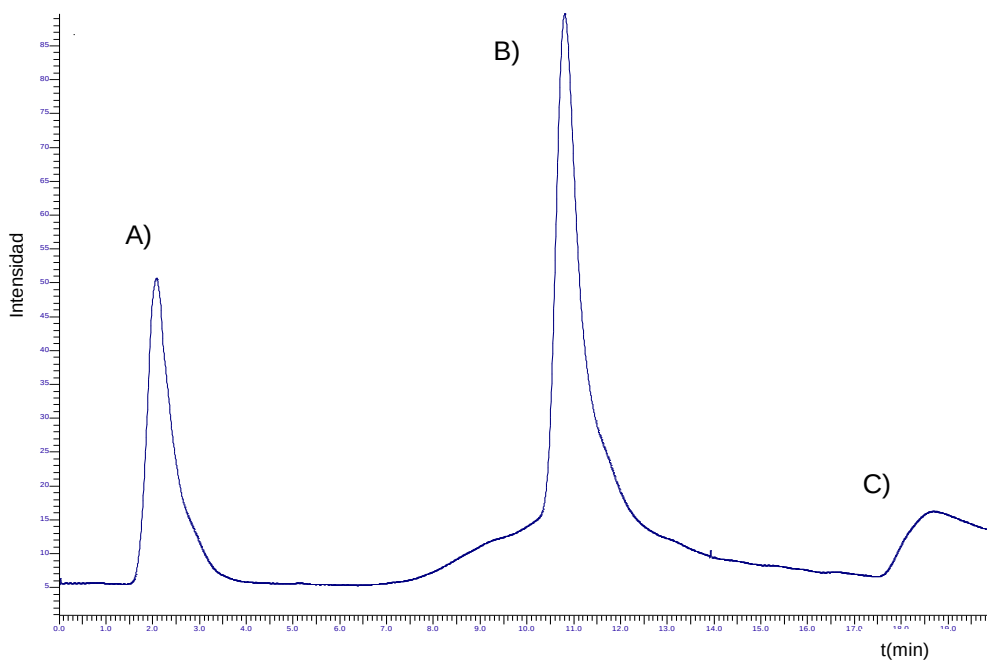


Figura 17. Cromatograma realizado a 227 nm, con solución de: A). naproxeno + B). ácido acetilsalicílico + C). ácido salicílico; en las siguientes condiciones: Columna C_{18} de 5 μm de tamaño de poro, fase móvil H_2O (pH=3.5 con H_3PO_4)- CH_3OH (90:10) a un flujo de $1.0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$

Las condiciones de trabajo del método se optimizaron, quedando como siguen: longitud de máxima absorbancia $\lambda_{\text{max}} = 227 \text{ nm}$ en el detector de arreglo de diodos; longitud de excitación $\lambda_{\text{exc}} = 250 \text{ nm}$ y de emisión $\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$ en el detector de fluorescencia para el ácido acetilsalicílico obtenidas con el detector del cromatógrafo de líquidos solo llenando la celda con la solución del estándar, la

fase móvil utilizada fue H₂O (a pH = 3.5 con H₃PO₄)-CH₃OH (65:35) a un flujo de 1.0 ml·min⁻¹, en ésta, se muestra que el tiempo de detección del estándar disminuido y que es menos sensible con el detector de fluorescencia que con el del detector de arreglo de diodos a longitud de onda fija, el cual fue utilizado para todo el análisis (figura 18).

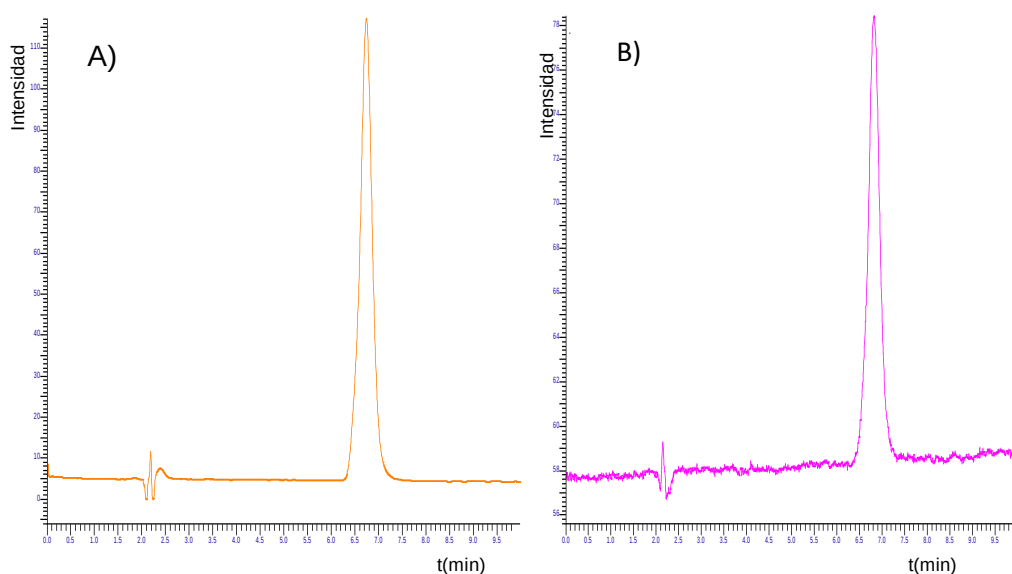


Figura 18. Cromatograma de ácido acetilsalicílico. Condiciones de operación: columna octadecil silano (C₁₈) de 5 µm. 250x 4.6 mm. Fase móvil: H₂O (pH = 3.5 con H₃PO₄)-CH₃OH (65:35), flujo de 1.0 ml·min⁻¹. **A)** Detector arreglo de diodos a λ_{max} =227nm. **B)** Detector de fluorescencia a λ_{exc} = 250 nm y λ_{em} = 350 nm.

El tiempo de retención del ácido acetilsalicílico por cromatografía de líquidos en condiciones optimizadas correspondió a 6.72 min con ambos detectores (figura 19).

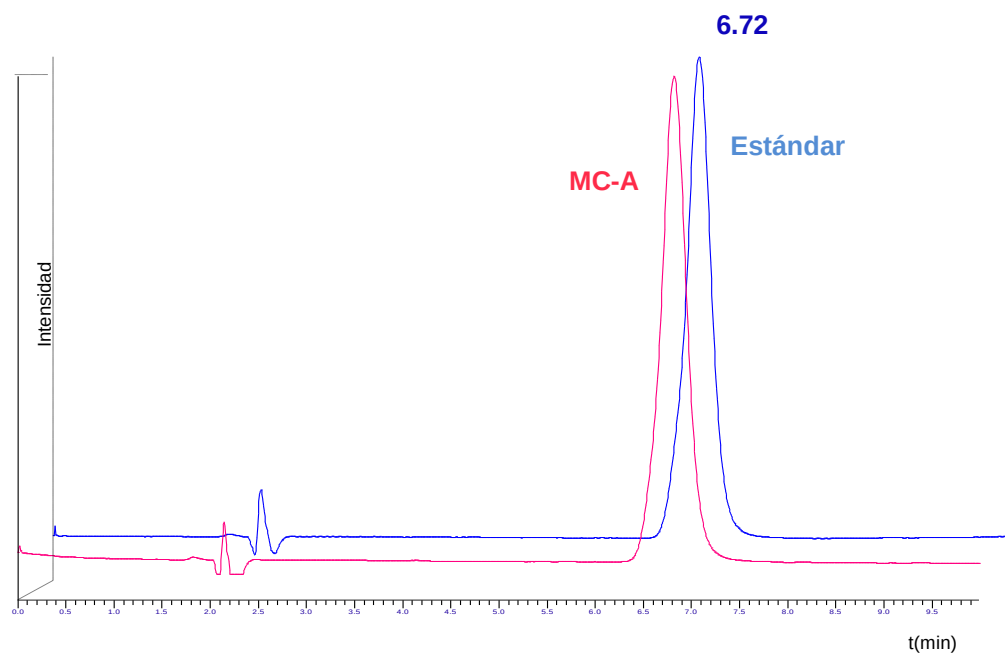


Figura 19. Cromatograma de ácido acetilsalicílico de estándar y muestra comercial A (MC-A). Condiciones de operación: columna octadecil silano (C₁₈) de 5 μ m. 250x 4.6 mm. Detector de arreglo de diodos a $\lambda = 227$ nm. Fase móvil. H₂O (pH = 3.5 con H₃PO₄)-H₃OH (65:35), flujo de 1.0 ml·min⁻¹.

Curvas de calibración

La curva de calibración para ácido acetilsalicílico obtenida utilizando el área bajo la curva con el detector de arreglo de diodos en la región Uv se muestra en la figura 20, la cual presenta una correlación $R^2 = 0.9989$, límite de detección $L_D = 1.22 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ con la expresión de $3.3(s/m)$ y un límite de cuantificación de $L_C = 3.71 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ con la expresión de $10(s/m)$, la linealidad de cuantificación se puede dar en consecuencia desde $1.22 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ hasta $65 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Curva de calibración de ácido acetilsalicílico por Uv

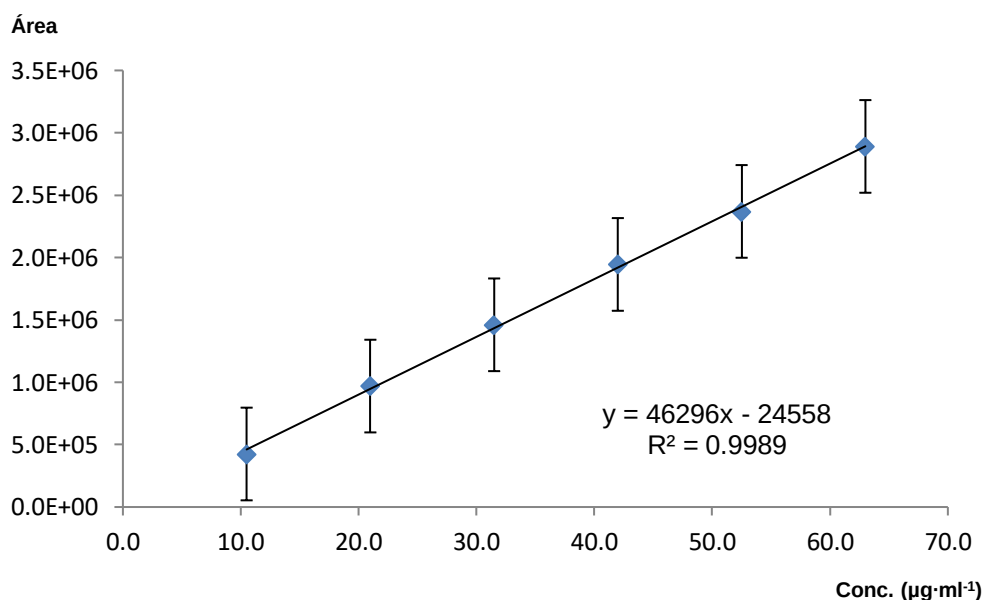


Figura 20. Condiciones de operación: Uv $\lambda_{\text{max}}=227\text{nm}$; columna C_{18} de 250×4.6 mm; fase móvil Agua ajustado a $\text{pH}=3.5$ con ácido fosfórico y metanol (65-35) a un flujo de $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$; tiempo de análisis de 10 min.
 $L_D = 1.22 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $L_C = 3.71 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

Por otra parte, la calibración del estándar de ácido acetilsalicílico obtenida utilizando el área bajo la curva con el detector de fluorescencia se muestra en la figura 21, la cual presenta una correlación $R^2 = 0.9958$, Límite de detección $L_D = 3.68 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ con la expresión de $3.3(s/m)$ y un Límite de cuantificación de $L_C = 11.15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ con la expresión de $10(s/m)$, la linealidad de cuantificación se puede dar en consecuencia desde $3.68 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ hasta $65 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

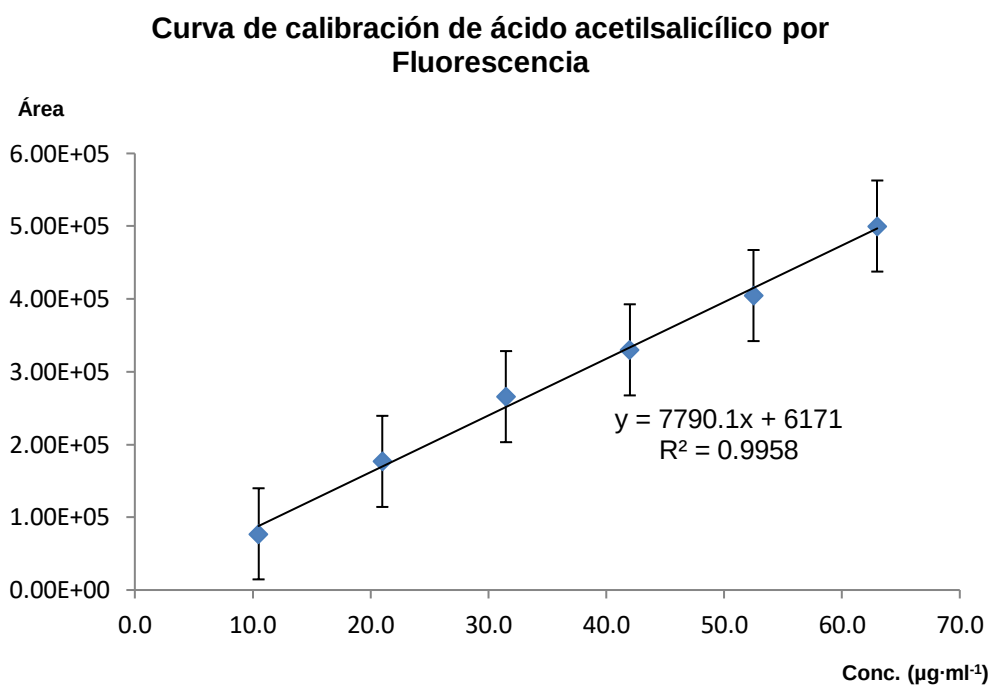


Figura 21. Calibración de ácido acetilsalicílico con el detector de fluorescencia. Condiciones de operación: $\lambda_{exc}=250 \text{ nm}$, $\lambda_{em}=350 \text{ nm}$; columna C_{18} de $250 \times 4.6 \text{ mm}$; fase móvil: agua (pH 3.5 con ácido fosfórico)-metanol (65:35) a un flujo de $1.0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; tiempo de análisis de 10 min. $L_D = 3.68 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $L_C = 11.15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

Los resultados del análisis de ácido acetilsalicílico se presentan en la tabla 1, así como los pesos del muestreo de la masa de cada una de las tabletas donde se tomaron $n = 13$ muestras de cada una y se obtuvo el promedio de las tres muestras con una precisión del 95 %, para las muestras de A se presenta el siguiente promedio 0.5990 ± 0.0114 ; las muestras de B 0.4678 ± 0.0068 y para las de C 0.5001 ± 0.0046 . Se puede observar que las que presentan menor variabilidad son las de C y las de mayor variabilidad son las de A.

Tabla 1. Peso promedio de tres marcas de tableta de ácido acetilsalicílico de 300 mg

Tableta	MARCA		
	A	B	C
P ₁	0.5855	0.4566	0.4943
P ₂	0.6066	0.4519	0.5131
P ₃	0.6520	0.4635	0.4932
P ₄	0.6029	0.4782	0.4985
P ₅	0.6135	0.4744	0.4916
P ₆	0.5913	0.4615	0.4957
P ₇	0.5891	0.4568	0.5061
P ₈	0.6000	0.4642	0.5076
P ₉	0.5935	0.4940	0.4997
P ₁₀	0.5804	0.4714	0.5036
P ₁₁	0.5823	0.4757	0.5124
P ₁₂	0.6029	0.4698	0.4930
P ₁₃	0.5874	0.4639	0.4926
Promedio	0.5990	0.4678	0.5001
Desv. Est.	0.0188	0.0112	0.0077
Desv. Est. al 95%	0.0114	0.0068	0.0046

Los resultados obtenidos de ácido acetilsalicílico de muestras A con marbete de 300 mg pastilla⁻¹, analizadas por CLAE se muestran en la tabla 2 y la concentración determinada en cada uno de los métodos es ligeramente diferente, sin embargo debido a que la norma oficial mexicana establece que el contenido puede variar un 5 %, entonces se puede decir que en ambos métodos se obtiene la concentración que presenta el marbete. En la misma tabla se presentan la desviación estándar con un 95% de precisión, el porcentaje de recuperación y el porcentaje de desviación estándar relativa tanto para el análisis con el método utilizando el detector de arreglo de diodos en la región ultravioleta, como por el método donde se utiliza el detector de fluorescencia.

Tabla 2. Contenido de ácido acetilsalicílico en muestras por CLAE utilizando detector de arreglo de diodos a $\lambda = 227$ nm y de fluorescencia a $\lambda_{exc} = 250$ nm, $\lambda_{em} = 350$ nm; muestra A.

Muestra	Masa (g)	Área UV	$C_{L(UV)}$ $mg \cdot L^{-1}$	* C_R (Uv)	Área Fluoresc.	$C_{L(Fluor)}$ $mg \cdot L^{-1}$	* C_R (Fluoresc)
A-1	0.0210	133675.5	10.7	305.8	198589.1	11.2	319.7
A-2	0.0210	501742.4	10.9	311.1	73494.6	11.0	313.4
A-3	0.0210	493874.9	10.9	311.4	92941.4	10.9	312.2
A-4	0.0249	528699.3	12.2	293.7	100040.6	12.6	302.6
A-5	0.0249	191119.9	12.7	305.6	28933.1	12.6	302.6
A-6	0.0249	256909.7	14.4	347.3	27618.0	12.0	289.6
Conc. Real Promedio				312.5			306.7
Desv. Est.				18.2			10.7
Desv. Est. al 95%				19.1			11.2
% Rec				104.2			102.2
% DER				5.8			3.5

* $mg \cdot pastilla^{-1}$

En la tabla 3 se presentan los resultados obtenidos del análisis de ácido acetilsalicílico realizado por CLAE a muestras B con marbete de 300 mg.pastilla⁻¹, y la concentración determinada por ambos métodos es ligeramente diferente, sin embargo, al igual que en las muestras A en ambos métodos se obtiene la concentración que presenta el marbete; de igual forma se presenta la desviación estándar con un 95% de precisión, el porcentaje de recuperación y el porcentaje de desviación estándar relativa para los dos métodos utilizados.

Tabla 3. Contenido de ácido acetilsalicílico en muestras por CLAE utilizando detector de arreglo de diodos a $\lambda = 227$ nm y de fluorescencia a $\lambda_{exc} = 250$ nm, $\lambda_{em} = 350$ nm; muestra B.

Muestra	Masa (g)	Área UV	$C_{L(UV)}$ $mg \cdot L^{-1}$	* C_R (Uv)	Área Fluoresc.	$C_{L(Fluor)}$ $mg \cdot L^{-1}$	* C_R (Fluoresc)
B-1	0.0211	196007.7	13.7	303.8	237875.4	13.4	296.7
B-2	0.0211	624820.7	13.6	302.4	93010.2	13.5	298.6
B-3	0.0211	622554.0	13.8	305.4	113205.9	13.5	299.6
B-4	0.0230	634779.8	14.6	296.7	119315.2	15.0	304.2
B-5	0.0230	223706.0	14.5	295.1	34700.7	15.0	304.2
B-6	0.0230	291706.9	16.4	332.8	33921.0	14.6	297.7
Conc. Real Promedio				306.0			300.2
Desv. Est.				13.7			3.3
Desv. Est. al 95%				14.4			3.4
% Rec				102.0			100.1
% DER				4.5			1.1

* mg.pastilla⁻¹

Los resultados obtenidos del análisis de ácido acetilsalicílico realizado por CLAE a muestras C con marbete de 300 mg.pastilla⁻¹, se presentan en la tabla 4 y

se observa que la concentración determinada por ambos métodos es ligeramente diferente, sin embargo, por ambos métodos se obtiene la concentración que presenta el marbete; de igual forma se presenta la desviación estándar con un 95% de precisión, el porciento de recuperación y el porcentaje de desviación estándar relativa para los dos métodos utilizados.

Tabla 4. Contenido de ácido acetilsalicílico en muestras por CLAE utilizando detector de arreglo de diodos a $\lambda = 227$ nm y de fluorescencia a $\lambda_{\text{exc}} = 250$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 350$ nm; muestra C.

Muestra	Masa (g)	Área UV	$C_{L(UV)}$ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	* C_R (Uv)	Área Fluoresc.	$C_{L(Fluor)}$ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	* C_R (Fluoresc)
C-1	0.0210	167811.9	12.4	294.2	225040.2	12.7	301.8
C-2	0.0210	575511.9	12.5	298.7	88019.0	12.8	305.6
C-3	0.0210	559401.7	12.4	294.7	104010.5	12.3	294.1
C-4	0.0242	628246.9	14.4	298.5	116541.0	14.6	302.0
C-5	0.0242	232428.9	15.0	309.8	32973.1	14.2	294.4
C-6	0.0242	301637.5	16.9	349.5	32895.1	14.2	293.7
Conc. Real Promedio				307.6			298.6
Desv. Est.				21.3			5.1
Desv. Est. al 95%				22.3			5.4
% Rec				102.5			99.5
% DER				6.9			1.7

* $\text{mg} \cdot \text{pastilla}^{-1}$

La comparación de los valores obtenidos por el método ultravioleta y el de fluorescencia se muestran en la tabla 5, y se observa que a pesar de que presentan diferentes valores promedio en la concentración de ácido acetilsalicílico,

al realizar la comparación de medias de ambos métodos, se observa que el valor de t calculado es menor al valor t de tablas (crítico), por lo que se llega a la conclusión de que ambos métodos proporcionan el mismo resultado.

Tabla 5. Valores estadísticos determinados en la comparación de los métodos ultravioleta y fluorescencia en la determinación de ácido acetilsalicílico por CLAE en muestras de A, B y C.

Variables	A	B	C
X_1	312.5	306.0	307.6
X_2	306.7	300.2	298.6
S_1	19.1	14.4	22.3
S_1^2	364.9	207.1	499.0
S_2	11.2	3.4	5.4
S_2^2	125.2	11.8	29.1
s^2	245.1	109.5	264.0
s	15.7	10.5	16.2
t_{calc1}	0.6	1.0	1.0

t de tablas=2.23

X es el promedio; S es la desviación estándar al 95 % de precisión; S^2 es la varianza; s^2 es la varianza calculada; s es la desviación estándar calculada; subíndice 1 y 2 es el método ultravioleta y fluorescencia respectivamente

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de ácido acetilsalicílico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia, utilizando el detector de arreglo de diodos en la región ultravioleta y el detector de fluorescencia, ambos métodos son robustos, selectivos, precisos, exactos, lineales y presentan bajos límites de detección aunque para las condiciones de trabajo seleccionadas, el de menor límite de detección se presenta en el método que utiliza el detector de arreglo de diodos en la región ultravioleta. Se observa que la detección se puede realizar con ambos detectores, pero con el detector de fluorescencia presenta menor sensibilidad, a pesar de que este último está considerado como el de mayor sensibilidad.

La cantidad de ácido acetilsalicílico determinada en las tres diferentes marcas farmacéuticas se encuentran dentro del rango de $\pm 5\%$ de tolerancia permitido por la Secretaría de Salud (Dipiro, *et al.*, 2004).

Con la comparación de la concentración promedio de ácido acetilsalicílico de las muestras, se comprueba la hipótesis H_0 planteada de que ambos promedios no difieren significativamente, por lo que ambos métodos pueden ser utilizados indistintamente para realizar el análisis cuantitativo de este fármaco.

Se cumple el objetivo específico de determinar las mejores condiciones de análisis del ácido acetilsalicílico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

El objetivo específico de validar el método de análisis de ácidoacetil salicílico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia fue alcanzado exitosamente y confirmado por los parámetros estadísticos que se calcularon tales como media, desviación estándar con un 95% de precisión, % de recuperación, entre otras., con las siguientes condiciones de operación optimizadas: columna con fase estacionaria de octadecil silano (C_{18}) de 5 μm de tamaño de partícula, dimensiones de la columna de 250x 4.6 mm., fase móvil: H_2O (pH = 3.5 con H_3PO_4)- CH_3OH (65:35), flujo de fase móvil de $1.0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. **A)** Detector arreglo de diodos a longitud de onda fija de $\lambda_{\text{max}}=227\text{nm}$. **B)** Detector de fluorescencia en la longitud de onda de excitación de $\lambda_{\text{exc}}= 250 \text{ nm}$ y en la longitud de onda de emisión de $\lambda_{\text{em}}= 350 \text{ nm}$.

Finalmente se concluye que la cuantificación de ácido acetilsalicílico puede ser realizada por CLAE utilizando el detector ultravioleta y/o fluorescencia.

APORTACIONES

En el presente trabajo se realizan aportaciones importantes en el área de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia, tales como:

1. Utilización de dos detectores en la cuantificación de un compuesto como el ácido acetilsalicílico.
2. Emplear del análisis estadístico para comparar los resultados obtenidos con los dos detectores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ardrey**, R. E. 2003. Liquid chromatography-mass spectrometry: An introduction. University of Huddersfield, Huddersfield, UK. Ed. John Wiley & Sons Ltd. 288 pp.
- Boqué**, R. 2009. La selectividad en análisis químico. Universidad Rovira i Virgili (Tarragona). <http://www.quimica.urv.es/quimio> 8 p.
- Coy**, G. A., 1999, Estandarización de métodos analíticos, Instituto de Hidrología, Meteorología y estudios Ambientales, Bogotá. Colombia.
- Day**, R. A. Jr. y A. L. Underwood. 1989. Química Analítica Cuantitativa. 5ª Ed. Editorial Prentice Hall. 841p.
- Dipiro**, J. T., Blouin R. A., Pruemer J. M. y A. J. Spruill, 2004. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Ed. Secretaría de Salud. 8a. Edición; Tomo I y II. México.
- Harris**, D. C. 2001, Análisis Químico Cuantitativo. Ed Reverté, S. A., España, 981 p.
- Harvy**, D. 2000. Modern Analytical Chemistry. Ed. McGraw-Hill Companies. USA. 816 p.
- Hawley**, 1993. Diccionario de Química y de Productos Químicos, Editorial Omega, Barcelona.

- Heredia**, S. A., 2008, Experiencias para observar el fenómeno de fluorescencia, Revista Eureka, 5(3):377-381.
- Johnson**, E. L. y R. Stevenson, 1978. Basic liquid chromatography. Ed. Varian Associates, Inc. USA. 354 p.
- Lednicer**, D. y L. A. Mitscher.1977. The organic chemistry of drug synthesis. Vol. 1. Ed. John Wiley and Sons, Inc. New York. USA. 85 p.
- Long**, G. L., y Winerfordner, J. D., 1983, Limit of Detection. Analytical Chemistry, 55(7): 712A-724A
- Mann**, F. G. and B. C. Saunders. 1978. Practical Organic Chemistry. Ed. Longman Group Limited. New York, USA.598 p.
- Martínez**, J. M., Baeza A., 2004. Química microanalítica: determinación de ácido acetilsalicílico. Revista Cubana de Química 16(3): 29-39
- Mejía**, R. 2009. Ácido acetilsalicílico, más de 100 años y contando, México.
- Mennickent**, S., Vega M., Godoy C. G., y T. Yates, 2000. Desarrollo de un método por cromatografía en capa fina Instrumental para análisis cuantitativo de ácido acetilsalicílico. Boletín de la Sociedad Chilena de Química. 45 (4): 615-620.
- Meyer**, R. V. 2000. Practical High-Performance Liquid Chromatography. Ed. John Wiley & Sons. 338 p.
- Miller**, N. J. y J. C. Miller. 2002. Estadística y quimiometría para química analítica. 4ª Ed. Editorial Prentice Hall. 278 p.

- Noriega, J. A.** 2000. HPLC y cromatografía de gases: Aspectos teóricos y aplicaciones analíticas, Universidad de Sonora, México.
- Pérez B. J. L. y L. M. A. Bello.** 1995. Determinación simultánea de ácido acetilsalicílico y paracetamol por cromatografía iónica. Libro de Resúmenes de 7ª Jornadas de análisis instrumental. Jornadas de Análisis Instrumental. Núm. 7. Madrid. Fira Barcelona.
- Quezada, C.** 2007. Potencia estadística, sensibilidad y tamaño de efecto: ¿Un nuevo canon para la investigación? Onomázein 16 (2): 159-170
- Swartz, M. y I. S. Krull.** 1997. Analytical method development and validation. Ed. Marcel Dekker, inc. New York, USA. 92 p.
- Torrado, D. S.** 1992. Estudio galénico de distintas formulaciones de ácido acetilsalicílico. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. España. 240 p.
- Verma, S. P.** 2005. Estadística básica para el manejo de datos experimentales: Aplicación en la geoquímica (Geoquimiometría). UNAM. México. 186 p.
- Vogel, A. I.** 1974. A text book of practical organic chemistry. Ed. Longman group limited. Great Britain. 1214 p.

Anexo 1

Tabla A-1. La distribución de t

Valor de t para un intervalo de confianza de: Valor crítico de $ t $ para valores de P de número de grados de libertad:	90%	95%	98%	99%
	0.10	0.05	0.02	0.01
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

Los valores críticos de $|t|$ son adecuados para un contraste de *dos colas*. Para un contraste de *una cola* el valor se toma de la columna para *dos veces* el valor de P deseado, es decir, para un contraste de una cola. $P=0.05$, 5 grad.

Anexo 2

Los pesos de las trece tabletas de ácido acetilsalicílico para cada muestra, se muestran en la siguiente tabla.

Tableta	A	B	C
P1	0.5855	0.4566	0.4943
P2	0.6066	0.4519	0.5131
P3	0.6520	0.4635	0.4932
P4	0.6029	0.4782	0.4985
P5	0.6135	0.4744	0.4916
P6	0.5913	0.4615	0.4957
P7	0.5891	0.4568	0.5061
P8	0.6000	0.4642	0.5076
P9	0.5935	0.4940	0.4997
P10	0.5804	0.4714	0.5036
P11	0.5823	0.4757	0.5124
P12	0.6029	0.4698	0.4930
P13	0.5874	0.4639	0.4926
Promedio	0.5990	0.4678	0.5001
Desv. Est.	0.0181	0.0108	0.0074
Desv. Est. al 95%	0.0114	0.0068	0.0046

Anexo 3

ANÁLISIS DEL ESTÁNDAR DE ÁCIDO ACETILSALICILICO REALIZADO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS CON DETECTOR DE UV Y FLUORESCENCIA

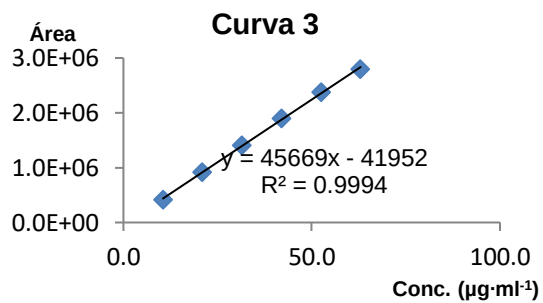
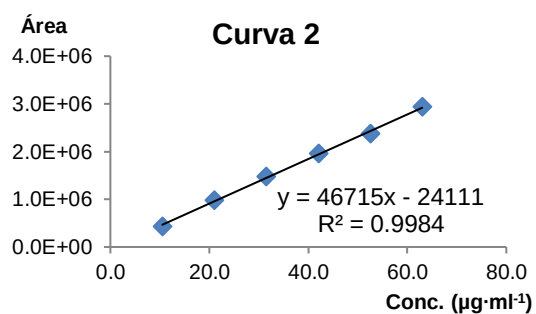
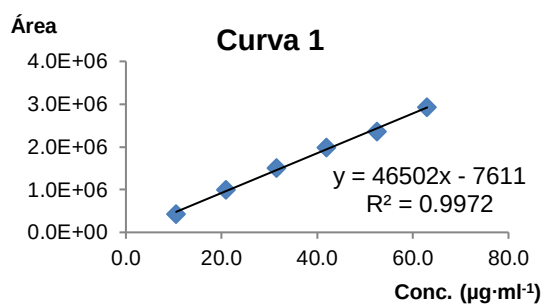
Uv						
Estandar	Conc. (µg/ml)	ÁREA 1	ÁREA 2	ÁREA 3	PROMEDIO	DESV. EST.
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	10.5	431003.4	428317.0	415814.4	425045.0	8106.0
2	21.0	999880.2	988036.8	920834.0	969583.7	42631.7
3	31.5	1498720.8	1475287.6	1408431.9	1460813.4	46852.4
4	42.0	1980959.1	1956962.8	1896235.1	1944719.0	43668.9
5	52.5	2362746.0	2372746.0	2373932.0	2369808.0	6144.5
6	63.0	2934742.1	2934742.1	2803073.2	2890852.5	76019.1

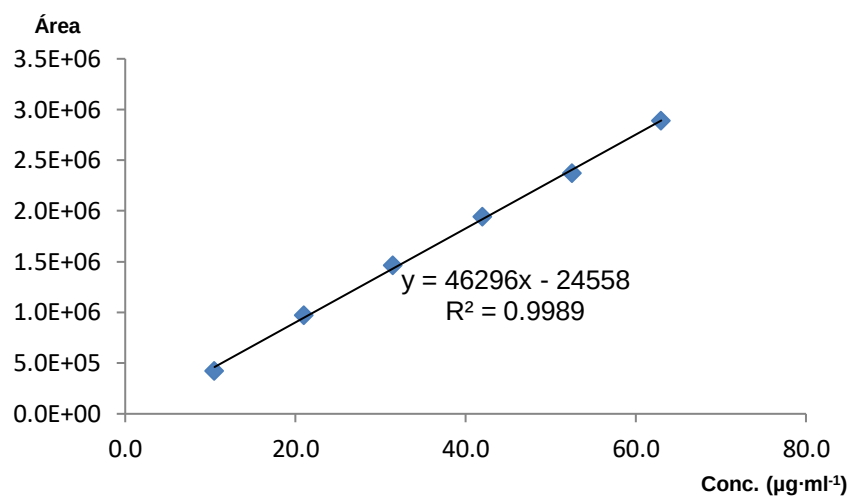
Fluorescencia						
Estandar	Conc. (µg/ml)	ÁREA 1	ÁREA 2	ÁREA 3	PROMEDIO	DESV. EST.
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	10.5	79393.1	78798.0	73522.7	77237.9	3231.2
2	21.0	170875.9	188687.0	170768.2	176777.1	10314.5
3	31.5	253879.8	269560.0	273879.0	265772.9	10523.7
4	42.0	321730.3	336828.0	331613.1	330057.2	7668.2
5	52.5	404339.6	406018.0	403748.8	404702.1	1177.2
6	63.0	474287.2	505037.0	521274.8	500199.7	23864.4

Condiciones de operación: Uv λ_{max} =227nm; fluorescencia λ_{exc} =250nm, λ_{em} =350nm; columna C₁₈ de 250X4.6 mm; fase móvil agua ajustado a pH=3.5 con ácido fosfórico y metanol (65-35) a un flujo de 1 ml·min⁻¹; tiempo de análisis de 10 min.

Anexo 4

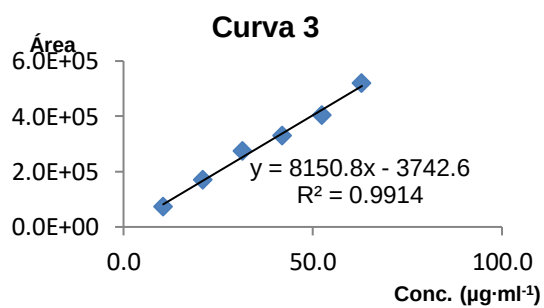
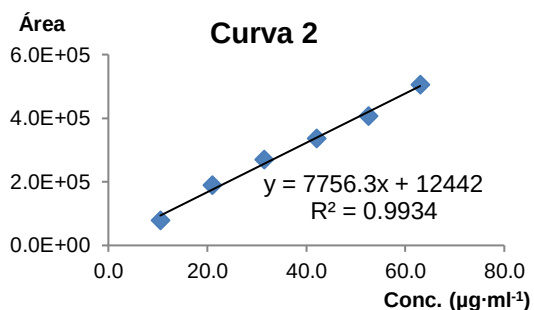
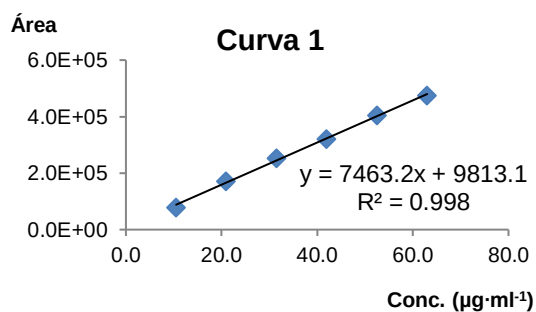
CURVAS DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO ACETILSALICÍLICO OBTENIDAS UTILIZANDO EL DETECTOR DE UV



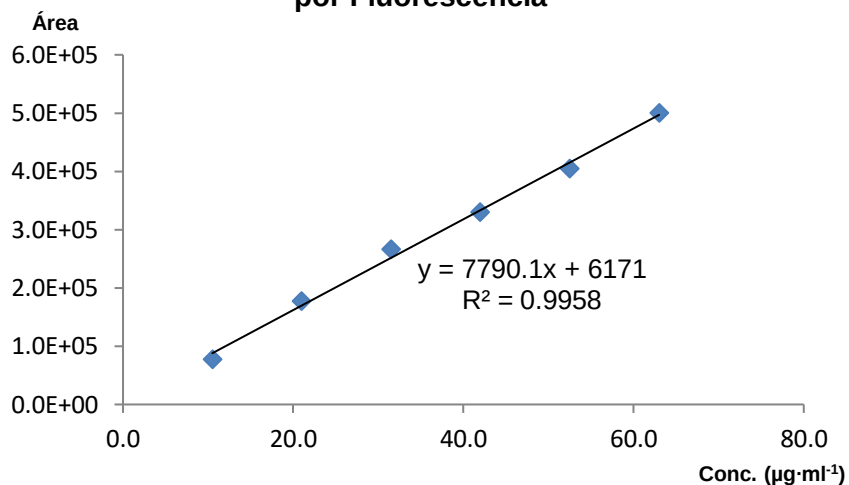
Curva de calibración promedio

Anexo 5

CURVAS DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO ACETILSALICÍCLICO UTILIZANDO EL DETECTOR DE FLUORESCENCIA



**Curva de calibración de ácido acetilsalicílico
por Fluorescencia**



Anexo 6

Tratamiento de datos de la curva de calibración de ácido acetilsalicílico por UV, para obtener los valores de los límites de detección y cuantificación.

Curva de calibración	Ordenada al Origen
1	-7611.0
2	-24111.0
3	-41952.0
Promedio	-24558.0
Desv. Est.	17174.9
m	46296.0

El límite de detección se obtiene mediante la expresión siguiente:

$$L_D = 3.3(S/m)$$

Sustituyendo nuestros valores en la ecuación tenemos que:

$$L_D = 3.3(17174.9/46296.0) = 1.2$$

Para el límite de cuantificación utilizamos la fórmula:

$$L_C = 10(S/m)$$

Que al sustituirla obtenemos:

$$L_C = 10^{(17174.9/46296.0)} = 3.7$$

Tratamiento de datos de la curva de calibración de ácido acetilsalicílico por fluorescencia, para obtener los valores de los límites de detección y cuantificación.

Curva de calibración	Ordenada al Origen
1	9813.1
2	12442.0
3	-3742.6
Promedio	6170.8
Desv. Est.	8685.3
m	7790.1

Al sustituir en nuestra ecuación obtenemos:

$$L_D = 3.3^{(8685.3/7790.1)} = 3.7$$

para el límite de cuantificación:

$$L_C = 10^{(8686.3/7790.1)} = 11.15$$

Otra forma de obtener el límite de detección es mediante la expresión siguiente:

$$L_D = \bar{X}_n + 3S_{n-1}$$

se obtiene que $y = 26966.6$ y se sustituye en la ecuación siguiente:

$$C_L = \frac{(y - b)}{m}$$

Entonces se obtiene un límite de detección de $1.11 \mu\text{g/ml}$.

Para el límite de cuantificación se usa la expresión

$$L_C = \bar{X}_n + 10S_{n-1}$$

De la que se obtiene que y tiene un valor igual a 147190.6 , y al sustituirla en la ecuación se obtiene un límite de cuantificación de 1.11 .

Para el método de fluorescencia se hace lo mismo y se obtiene un valor de $y = 32226.8$ y un límite de detección de 3.3 .

Para el límite de cuantificación $y = 93024.1$ y el límite de cuantificación es igual a 3.3 .

El límite de detección calculado para un elemento puede variar fácilmente en un orden de magnitud a través del uso de diferentes métodos estadísticos (Long, G. L., Winefordner, J. D., 1983).

Anexo 7

Contenido de ácido acetilsalicílico en muestras por CLAE utilizando detector de arreglo de diodos a $\lambda = 227$ nm y de fluorescencia a $\lambda_{exc} = 250$ nm, $\lambda_{em} = 350$ nm.

Primero se obtiene la concentración leída para la cual se utiliza la siguiente expresión:

$$C_L = \frac{(y - b)}{m}$$

Donde:

y= área bajo la curva

b= ordenada al origen

m= pendiente

Para la concentración real se utiliza la expresión siguiente

$$C_R = \frac{C_L \times V_{af}}{P_{muestra}} \times F_d \times P_{ppastilla} \times \frac{1000}{1000}$$

Donde:

C_L =Concentración leída

V_{af} =Volumen de aforo=10 ml=0.01 L

1000 ml= 1 L

F_d = 100/1

$$F_d = \frac{V_{af}}{V_{alic}}$$

Para la desviación estándar se utiliza la expresión:

$$s = \sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)}$$

El porcentaje de recuperación se obtiene mediante la fórmula siguiente:

$$\%Rec = \left(\frac{C_R}{C_C} \right) \times 100$$

La desviación estándar relativa se calcula con la expresión siguiente:

$$\%DER = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Lo anterior se realizó para cada muestra y los resultados obtenidos se muestran en las siguientes tablas:

Muestra	Masa (g)	Área UV	$C_{L(UV)}$ $mg \cdot L^{-1}$	* C_R (Uv)	Área Fluoresc.	$C_{L(Fluor)}$ $mg \cdot L^{-1}$	* C_R (Fluoresc)
A-1	0.0210	133675.5	10.7	305.8	198589.1	11.2	319.7
A-2	0.0210	501742.4	10.9	311.1	73494.6	11.0	313.4
A-3	0.0210	493874.9	10.9	311.4	92941.4	10.9	312.2

A-4	0.0249	528699.3	12.2	293.7	100040.6	12.6	302.6
A-5	0.0249	191119.9	12.7	305.6	28933.1	12.6	302.6
A-6	0.0249	256909.7	14.4	347.3	27618.0	12.0	289.6
Conc. Real Promedio				312.5			306.7
Desv. Est.				18.2			10.7
Desv. Est. al 95%				19.1			11.2
% Rec				104.2			102.2
% DER				5.8			3.5

* mg·pastilla⁻¹

Muestra	Masa (g)	Área UV	C _{L(UV)} mg·L ⁻¹	*C _R (Uv)	Área Fluoresc.	C _{L(Fluor)} mg·L ⁻¹	*C _R (Fluoresc)
B-1	0.0211	196007.7	13.7	303.8	237875.4	13.4	296.7
B-2	0.0211	624820.7	13.6	302.4	93010.2	13.5	298.6
B-3	0.0211	622554.0	13.8	305.4	113205.9	13.5	299.6
B-4	0.0230	634779.8	14.6	296.7	119315.2	15.0	304.2
B-5	0.0230	223706.0	14.5	295.1	34700.7	15.0	304.2
B-6	0.0230	291706.9	16.4	332.8	33921.0	14.6	297.7
Conc. Real Promedio				306.0			300.2
Desv. Est.				13.7			3.3
Desv. Est. al 95%				14.4			3.4
% Rec				102.0			100.1
% DER				4.5			1.1

* mg·pastilla⁻¹

Muestra	Masa (g)	Área UV	C _{L(UV)} mg·L ⁻¹	*C _R (Uv)	Área Fluoresc.	C _{L(Fluor)} mg·L ⁻¹	*C _R (Fluoresc)
C-1	0.0210	167811.9	12.4	294.2	225040.2	12.7	301.8
C-2	0.0210	575511.9	12.5	298.7	88019.0	12.8	305.6

C-3	0.0210	559401.7	12.4	294.7	104010.5	12.3	294.1
C-4	0.0242	628246.9	14.4	298.5	116541.0	14.6	302.0
C-5	0.0242	232428.9	15.0	309.8	32973.1	14.2	294.4
C-6	0.0242	301637.5	16.9	349.5	32895.1	14.2	293.7
Conc. Real Promedio				307.6			298.6
Desv. Est.				21.3			5.1
Desv. Est. al 95%				22.3			5.4
% Rec				102.5			99.5
% DER				6.9			1.7

*mg·pastilla⁻¹

Trabajo publicado durante la elaboración de esta tesis:

- **Fabiola J. Castro López**, Fidel Pérez Moreno, José L. Cadena Zamudio, Yolanda Marmolejo Santillán, Raúl Moreno Tovar y Oscar Coreño Alonso (2009). Evaluación de Ácido acetilsalicílico en tabletas por HPLC. *Bol. Soc. Quím. Méx.* Septiembre 2009, 3(Memorias C103):238

Financiamiento:

- La presente tesis fue apoyada mediante el proyecto: Caracterización y evaluación de adsorbentes naturales y/o dopados del Estado de Hidalgo con

capacidad potencial para ser utilizados en el proceso de disminución de contenido de arsénico en agua potable. PAI 2006-39, DI-DIP/179/08.

- Se agradece a la Universidad Autónoma del estado de Hidalgo, al Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería y en especial a las Áreas Académicas de Química y Ciencias de la Tierra y Materiales por el apoyo brindado para la realización del presente trabajo.