

# Validación de un método analítico por HPLC para la cuantificación del principio activo en tabletas de Controfilina-200

Jiovanna Contreras Roura, Yunaysi Jardines Leyva,\* Magdalena Fonseca\*\* y Belinda Águila.\*\*

Lab. Farmacocinética-HPLC, \*Lab. Polímeros, Dpto. Polímeros, \*\* Lab. Analítica, Dpto. Procesos Biotecnológicos, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Cubanacán, Playa, Apartado Postal 6412 ó 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 19 de noviembre de 2003. Aceptado: 16 de septiembre de 2004.

Palabras clave: teofilina, acetaminofen, Controfilina-200, Cromatografía Líquida de Alta Resolución, validación.  
Key words: theophylline, acetaminophen, Controfilina-200, HPLC & validation.

**RESUMEN.** Se presenta un método analítico rápido y sencillo para la cuantificación de teofilina en tabletas de acción sostenida (Controfilina-200) por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). La fase móvil consistió en una mezcla acetonitrilo-agua destilada pH 4 (9 : 91) y detección a 273 nm. En este trabajo se presentan los resultados correspondientes a la especificidad, linealidad, exactitud, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), estabilidad de la muestra y robustez del método. El método desarrollado es lineal en el intervalo de concentración seleccionado (50 a 120 % de la concentración teórica) con un coeficiente de correlación mayor a 0,999. Es exacto porque se obtuvieron porcentajes de recobrado mayores al 90 %. Es preciso porque se obtuvieron coeficientes de variación menores al 1 %. Es robusto porque no es sensible a pequeñas modificaciones. Es específico para la teofilina y se demostró además, que las muestras permanecen estables durante 24 h.

**ABSTRACT.** A rapid and simplified high-performance liquid chromatographic (HPLC) method is presented for the determination of theophylline in sustained release tablets (Controfilina-200). The mobile phase consists of acetonitrile-distilled water pH 4 in the 9 : 91 (v/v) ratio. This paper presents specificity, linearity, accuracy, precision, sample stability and ruggedness data. The calibration curve showed excellent linearity over the range of concentration examined (50-120 %). Correlation coefficient (r) of calibration curve was calculated 0.999. The method was precise because it found coefficients of variation less than 1 %. The assay recovery was more than 90 %. The stability of the sample during 24 h was good. The method is specific for theophylline.

## INTRODUCCION

Cualquier método analítico que se desarrolle debe validarse, es decir, se debe confirmar y documentar que los resultados por él producidos son confiables. Con relación a los productos farmacéuticos, los métodos codificados en la USP<sup>1</sup> (Farmacopea de los Estados Unidos de América) se consideran válidos y el único requerimiento es el cumplimiento de la prueba de adecuación indicada en cada monografía. Es importante destacar que la validez de estos métodos es ampliamen-

te discutible. Diferencias entre distintas formas farmacéuticas, tipo y calidad de las materias primas empleadas por cada fabricante, hacen necesario validar la metodología para cada producto en particular.

La valoración de tabletas de teofilina de acción sostenida no aparece desarrollada en las ediciones de la USP, solamente aparece para cápsulas de acción sostenida. Debido a esto, se desarrolló un método analítico por HPLC para la valoración de este tipo de formulación, la cual, se requiere validar para su

posterior aplicación en la industria farmacéutica.

El objetivo de este trabajo fue presentar los resultados correspondientes a la validación del método analítico. Los parámetros de validación evaluados fueron: especificidad, linealidad, exactitud, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), estabilidad de la muestra y robustez.

## MATERIALES Y METODOS

### Reactivos

Teofilina monohidratada (estándar referencia del Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos, Ciudad de La Habana y acetaminofen (empleado como estándar interno) (estándar referencia del Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos. Teofilina monohidratada (materia prima valorada). Acetaminofen (materia prima valorada). Tabletás Controfilina-200 (lote industrial, Laboratorios Medsol, Ciudad de La Habana). Acetonitrilo, ácido acético glacial, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, peróxido de hidrógeno y sulfato de cobre (reactivo, BDH). Agua destilada. Metanol comercial (bidesilado).

### Equipos

Balanza analítica Sartorius BP 221S (0,1 mg a 200 g; Germany). Balanza analítica Mettler AT-250 (0,1 a 0,01 mg, Suiza). Potenciometro Philips (PW 9420, The Netherlands). Estufa MEMMERT (25 a 200 °C, Ger-

many). Cromatógrafo líquido equipado con bomba isocrática 2150 LKB. Inyector Rheodyne 7725i (loop 20  $\mu$ L). Detector UV, Merck-Hitachi L-7400 acoplado a computadora. Para la adquisición y procesamiento de los cromatogramas, se empleó el programa EZChrom Chromatography Data System Versión 6.7, Konick Instruments, Inc.

### Condiciones cromatográficas

Se empleó como fase móvil una mezcla acetonitrilo-agua destilada (9 : 91) y se ajustó a pH 4 con ácido acético glacial. Se empleó una columna Lichrospher 100 RP-18; 5  $\mu$ m, 125 X 4 mm (Merck). Se trabajó a un flujo de 1 mL/min y se empleó detección UV a 273 nm .

### Programas de cómputo

En el procesamiento estadístico de los resultados se emplearon los programas siguientes: Statistica 5.1, Excel y Statgraphics 5.0.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Procedimiento para la preparación de las muestras, disolución de referencia y disolución del estándar interno para la valoración del producto terminado

#### Preparación de la disolución de referencia (0,05 mg/mL)

Se pesaron 50 mg de teofilina monohidratada y se transfirieron cuantitativamente a un volumétrico de 100 mL . Se añadieron 70 mL metanol y se agitó hasta completa disolución. Se añadieron 4 mL de la disolución correspondiente al estándar interno y se enrasó con fase móvil. Se pipetearon 5 mL de esta disolución, se transfirió cuantitativamente a un volumétrico de 50 mL y se enrasó con fase móvil.

#### Preparación de la disolución del estándar interno (1 mg/mL)

Se pesaron 100 mg de acetaminofen y se transfirieron cuantitativamente a un volumétrico de 100 mL . Se enrasó con metanol.

#### Preparación de las muestras

Se determinó el peso promedio de 20 tabletas y se trituraron para lograr homogeneidad. Se pesó el equivalente a 50 mg de teofilina monohidratada, de polvo de tableta y se transfirieron cuantitativamente a un volumétrico de 100 mL . Se añadieron 70 mL metanol y se agitó mecánicamente durante 5 min . Se añadieron 4 mL de la disolución correspondiente al estándar interno y se enrasó con fase móvil. Se dejó reposar durante 10 min . Se filtró la disolución, desechando los primeros

20 mL . Se pipeteó 5 mL de la disolución filtrada y se transfirieron cuantitativamente a un volumétrico de 50 mL . Se enrasó con fase móvil.

### Parámetros a validar. Procedimiento estadístico de los resultados y criterios de aceptación para cada parámetro

#### Especificidad

Para determinar la especificidad, se evaluó la influencia de las sustancias auxiliares empleadas en la formulación en la determinación. También se evaluó la influencia de posibles "productos de degradación" del principio activo y(o) placebo, correspondiente a la formulación, para lo cual, fueron sometidos a degradación artificial.

A) Evaluación de la influencia del placebo y(o) sustancias auxiliares

Para su determinación, se preparó una muestra con una mezcla de las sustancias auxiliares empleadas en la elaboración de las tabletas de Controfilina-200 en la misma proporción en que ellas se encuentran en la tableta. La preparación de la muestra se realizó según el procedimiento descrito.

B) Degradación artificial del principio activo

La teofilina es un fármaco muy estable y no se conoce ningún compuesto o producto de degradación de él.<sup>2-5</sup> Debido a esto, se sometió la materia prima y las tabletas; así como el placebo, a degradación artificial teniendo en cuenta los factores siguientes: temperatura (100 °C, 10 d), luz solar (10 d), humedad relativa (90 %, 10 d), hidrólisis ácida (HCL 1 mol/L, reflujo 1 h), hidrólisis básica (NaOH 1 mol/L, reflujo 1 h) y oxidación (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 %, 10 d).

Todas las muestras fueron analizadas por triplicado. Se registraron todos los tiempos de retención durante 10 min y se compararon con los correspondientes a la disolución de referencia. Las muestras degradadas también fueron evaluadas empleando la Cromatografía de Capa Delgada (CCD) reportada para la teofilina (materia prima) en la BP-98 y(o) BP-2000 con vistas a detectar si experimentó degradación por alguna de las vías de degradación evaluadas.

El método se considera específico si:<sup>6-9</sup>

A) no aparecen nuevas señales en el cromatograma y(o) de aparecer, no deben interferir con el tiempo de retención correspondiente al

analito de interés ni con el tiempo de retención correspondiente al estándar interno.

B) es capaz de detectar únicamente al analito o en su defecto, separarlo de sus impurezas y(o) productos de degradación, si aparecen durante la degradación artificial.

#### Linealidad

Se prepararon tres curvas de calibración con cinco concentraciones correspondientes al: 50, 80, 100, 120 y 150 % de la concentración teórica. Se analizó cada una tres veces y con los resultados, se realizaron los análisis siguientes: regresión lineal, prueba de linealidad y prueba de proporcionalidad.

El método es lineal en el intervalo de concentración evaluado si se obtienen los resultados siguientes:<sup>6-9</sup>

- Análisis de regresión lineal: coeficiente de correlación ( $r$ )  $\geq 0,99$  y de determinación ( $r^2$ )  $\geq 0,98$ .
- Prueba de linealidad: coeficiente de variación de los factores respuesta (CVf)  $\leq 5$  % y la desviación de la pendiente (Sb)  $< 2$  %.
- Prueba de proporcionalidad: intercepto (a) no es significativamente diferente de cero si  $t_{\text{exp.}} \leq t_{\text{tabla}} [0,05, f(n - 1)]$ .

#### Precisión

A) Repetibilidad

Se prepararon cinco réplicas a las concentraciones correspondientes al 70, 100 y 115 % de la concentración teórica. Se analizó tres veces cada una y el porcentaje de principio activo (PA) en las muestras se determinó a partir de la ecuación siguiente (1):

$$PA = \frac{Am \cdot Ps \cdot Bh \cdot Pp \cdot F}{As \cdot Pm \cdot D} \cdot 0,909$$

donde:

Am relación entre el área correspondiente al analito y el estándar interno en las muestras.

As relación entre el área correspondiente al analito y el estándar interno en la disolución de referencia.

Ps peso del patrón (mg).

Bh base hidratada del patrón.

Pp peso promedio (mg).

Pm peso de la muestra (mg).

D dosis (mg).

F factor de dilución.

Se realizó la prueba G con vistas a determinar si existían diferencias significativas entre las dispersiones obtenidas.

B) Precisión intermedia

Para evaluar la precisión intermedia, participaron tres analistas que ejecutaron el procedimiento

propuesto sobre la misma muestra en el mismo laboratorio durante tres días consecutivos. Cada analista preparó cuatro réplicas de la muestra correspondiente al 100 %; cada una de las cuales fue analizadas cada una tres veces. Para evaluar si las concentraciones no influían en los resultados, se realizó la prueba G para los obtenidos en los diferentes días y analistas.

El método es preciso si todos los coeficientes de variación (CV)  $\leq 1,5\%$  para cada nivel de concentración y si  $G_{exp.} \leq G_{tab.}$  (0,05; f, m).<sup>6-9</sup>

### Exactitud

Para determinar la exactitud se empleo el método de los placebos cargados. Para ello, se prepararon cinco réplicas a las concentraciones de: 50, 75, 100 y 125 % de la teórica y se analizó cada una tres veces. Se realizó la prueba G con vistas a verificar la no influencia del factor de concentración y la prueba *t* Student (0,05; n - 1) para verificar que no existían diferencias significativas entre el porcentaje de recobrado promedio y el 100 % de recobrado. También se realizó el análisis de regresión lineal entre los porcentajes de concentración calculada contra los de concentración añadidos.

El método es exacto si se obtienen porcentajes de recobrados entre un 98 y 102 %; si el coeficiente de variación total para el recobrado (CVR<sub>total</sub>) es  $\leq 2\%$ ; y si los resultados del análisis de regresión lineal cumplen con los criterios de aceptación para la linealidad.<sup>6-9</sup>

### Estabilidad de las muestras

Para su determinación, se evaluó a la concentración teórica del 100 %. La muestra se analizó por triplicado, durante 24 h a diferentes intervalos (0, 3, 6 y 24 h). El almacenamiento de las muestras se realizó a la temperatura ambiente ( $\pm 25\text{ }^\circ\text{C}$ ). Se determinó el porcentaje de principio activo para cada intervalo de tiempo. Se realizó la prueba *t* Student (0,05; n - 1) para comprobar si existían diferencias significativas entre las concentraciones obtenidas a las 3, 6 y 24 h con relación a la concentración obtenida a tiempo 0 h y(o) análisis de varianza (ANOVA) para verificar que no existían diferencias significativas en la concentración de las muestras durante el intervalo de tiempo evaluado.

Las muestras permanecen estables durante 24 h si no aparecen cambios significativos en su con-

**Tabla 1.** Factores a evaluar para determinar la robustez del método.

Factores a evaluar	Nivel alto (A, B, C)	Nivel bajo (a, b, c)
Fase móvil (pH)	5,0	4,0
Flujo (mL/min)	1,2	1,0
Fase móvil (composición)	9 % acetonitrilo	8 % acetonitrilo

centración una vez preparada (tiempo 0) y almacenada a temperatura ambiente durante el intervalo de tiempo evaluado, es decir, si  $t_{exp.} \leq t_{tabla}$  (0,05; n - 1) y(o)  $p > 0,05$  (ANOVA).

### Robustez

Para determinar la robustez, se preparó la muestra a la concentración teórica del 100 %, y se evaluó la influencia de tres factores que pudieran incidir en los resultados (Tabla 1) empleando el diseño de Youden-Steiner.<sup>10</sup>

Para decidir si un parámetro influía significativamente sobre el resultado, se comparó la diferencia obtenida para el cambio efectuado sobre él con el producto de S (desviación estándar correspondiente al ensayo de precisión (repetibilidad) y la raíz cuadrada de dos, es decir, si

$$|VX| > Sx \sqrt{2}$$

existe diferencia significativa y viceversa.<sup>10</sup> De aparecer diferencias entre las variantes propuestas, se señalarían los factores que deberían permanecer inalterados para obtener resultados satisfactorios con el método analítico que se proponía.

El método analítico se considero robusto si la concentración de la muestra no varía al analizarla introduciendo pequeños cambios en el método.<sup>6-10</sup>

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Especificidad

Los resultados en la evaluación de la especificidad (Tabla 2 y 3) del método permiten afirmar que el analítico evaluado es específico para la teofilina, ya sea para muestras sin degradar como para muestras degradadas. Por lo tanto, puede emplearse para la valoración de las tabletas de Controfilina-200; así como en los estudios de estabilidad.

De acuerdo con los resultados se puede afirmar que:

- el método es específico para la cuantificación de la teofilina en polvo de tableta (Controfilina-200) porque las sustancias auxiliares (poviac y estearato de magnesio) no aportan ninguna señal cromatográfica que pudie-

ra interferir en la determinación o cuantificación del principio activo.

- en el estudio de degradación artificial de muestras correspondientes a la teofilina materia prima y tabletas hubo una disminución significativa en su concentración cuando fueron sometidas a oxidación, hidrólisis básica y ácida. Para los otros factores evaluados, no hubo diferencias significativas en los resultados correspondientes a las muestras degradadas y no degradadas.
- las tabletas de Controfilina-200 se afectan a la temperatura de 100 °C. Esta combinación de sustancias (teofilina, poviac y estearato de magnesio) a esa temperatura origina la formación de producto(s) de degradación de características más polares (Rf = 0,31) que la teofilina (0,40).
- la hidrólisis ácida (HCL 1 mol/L) degrada la teofilina (materia prima y tabletas de Controfilina-200) a compuesto(s) de características muy polares (Rf = 0,00).
- debido a las variaciones obtenidas en la concentración en algunas de las muestras sometidas a degradación artificial y los resultados obtenidos en la CCD, se puede sospechar de la existencia de posibles "productos de degradación"; con características muy polares que la teofilina (Rf < 0,40) y(o) que no absorban a la longitud de onda de trabajo (273 nm) que hace imposible su determinación con el método analítico evaluado; quedando, por lo tanto, demostrado que el método es específico también para las muestras degradadas.

### Linealidad

Los resultados (Tabla 4, 5 y figura 1) permiten afirmar que el método es lineal en el intervalo de concentración evaluado porque se obtuvieron coeficientes de correlación ( $r \geq 0,99$  y coeficientes de determinación ( $r^2 \geq 0,98$ ). Los interceptos no fueron significativamente diferentes de cero y el coeficiente de variación total de los factores de respuesta

(CVf)  $\leq 5\%$  y la desviación estándar de la pendiente (Sb)  $< 2\%$ .

### Precisión

#### A) Repetibilidad.

El método analítico cumple con el criterio de aceptación correspondiente a la repetibilidad, porque para los tres niveles de concentración evaluados, se obtuvieron coeficientes de variación (CV)  $\leq 1,5\%$  (Tabla 6).

#### B) Precisión intermedia.

Los resultados indican (Tabla 7) que el método es preciso, independientemente del día en que se realice el análisis y de la experiencia del analista que lo ejecute; porque

se obtuvo un coeficiente de variación total (CV<sub>total</sub>)  $\leq 2\%$ ; y además, la prueba de Cochran demostró que no existen diferencias significativas entre las dispersiones obtenidas en porcentaje de contenido de concentración.

### Exactitud

Los resultados (Tabla 8 y figura 2) permiten afirmar que el método es exacto porque se obtuvieron porcentajes de recobrados del 99 % (% R = 98 a 102 %) para cada nivel de concentración y el coeficiente de variación total recobrado fue 0,16 % (CVR<sub>total</sub>  $\leq 2$ ). Además, al evaluar estadísticamente el gráfico de porcentaje de principio activo calculado

contra el añadido, se cumplió con los criterios de aceptación para la linealidad.

La figura 2 muestra los resultados del análisis de la regresión lineal de los porcentajes de concentración calculado contra los de concentración añadida. La ecuación de la recta obtenida fue

$$y = 1,000x + 0,104$$

con un coeficiente de correlación (r) de 0,999 y un coeficiente de determinación (r<sup>2</sup>) de 0,999. El intercepto de la recta no fue significativamente diferente de cero ( $t_{\text{exp}} = 0,50 \leq t_{\text{tabla}}(0,05,3) = 3,182$ ) y pendiente no significativa de uno.

**Tabla 2.** Resultados correspondientes al estudio de especificidad del método (Análisis cualitativo).

Observaciones		HPLC			CCD	
		tr (min), (n = 3)			Rf	
		tr <sub>1</sub>	tr <sub>2</sub>	tr <sub>3</sub>	Rf <sub>TEO</sub>	Rf <sub>x</sub>
Influencia placebo	Blanco	-	-	-	-	-
	Disolución referencia	3,49 ± 0,05	4,42 ± 0,08	-	-	-
	Placebo	-	-	-	-	-
Muestras sin degradar	Blanco	-	-	-	-	-
	Materia prima	3,53 ± 0,00	4,52 ± 0,00	-	0,41	-
	Tableta	3,53 ± 0,00	4,52 ± 0,00	-	0,39	-
Termólisis	Placebo	-	-	-	-	0,96
	Blanco	-	-	-	-	-
	Materia prima	3,51 ± 0,01	4,46 ± 0,01	-	0,41	-
Humedad relativa (90 %)	Tableta	3,50 ± 0,00	4,45 ± 0,00	-	0,40	0,31
	Placebo	-	-	-	-	0,96
	Blanco	-	-	-	-	-
Fotólisis (luz solar)	Materia prima	3,52 ± 0,00	4,49 ± 0,01	-	0,41	-
	Tableta	3,52 ± 0,00	4,50 ± 0,00	-	0,39	-
	Placebo	-	-	-	-	0,94
Hidrólisis ácida	Blanco	-	-	-	-	-
	Materia prima	3,48 ± 0,00	4,40 ± 0,00	-	0,40	0,00
	Tableta	3,47 ± 0,00	4,40 ± 0,00	-	0,39	0,00
Hidrólisis básica	Placebo	-	-	-	-	-
	Blanco	-	-	6,76 ± 0,00	-	-
	Materia prima	3,48 ± 0,01	4,39 ± 0,01	6,76 ± 0,00	0,39	-
Oxidación	Tableta	3,48 ± 0,00	4,40 ± 0,00	6,76 ± 0,00	0,39	-
	Placebo	-	-	6,76 ± 0,00	-	-
	Blanco	-	-	-	-	-
	Materia prima	3,47 ± 0,00	4,38 ± 0,00	-	0,39	-
	Tableta	3,47 ± 0,00	4,38 ± 0,00	-	0,39	-
	Placebo	-	-	-	-	-

tr Tiempo de retención. tr<sub>1</sub> Acetaminofen (estándar interno). tr<sub>2</sub> Teofilina monohidratada (analito). Rf Factor de retención.

**Tabla 3.** Resultados correspondientes al estudio de especificidad del método (análisis cuantitativo).

Degradación artificial	C (%)	
	Materia prima	Controfilina-200
Humedad relativa (90 %)	97,06	102,06
Luz solar	97,65	103,60
Termólisis (100 °C)	107,65	94,33
Hidrólisis ácida (HCL 1 mol/L)	65,88	73,19
Hidrólisis básica (NaOH 1 mol/L)	46,47	51,03
Oxidación (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 %)	35,29	31,96
Muestras sin degradar	98,23	100,01

**Tabla 4.** Resultados análisis de regresión lineal y de la prueba de proporcionalidad.

Magnitud	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva promedio
r	0,999	0,999	0,999	0,999
r <sup>2</sup>	0,999	0,999	0,999	0,998
a	-0,015	0,010	-0,012	-0,006
t <sub>exp.</sub> ≤ t (0,05; 3)	2,23 ≤ 3,18	1,33 ≤ 3,18	1,48 ≤ 3,18	0,95 ≤ 3,18
Significación intercepto	NS	NS	NS	NS
b	0,009 9	0,009 6	0,010 0	0,009 9
Sb	0,000 1	0,000 1	0,000 1	0,000 1

r Coeficiente de correlación. r<sup>2</sup> Coeficiente de determinación. a Intercepto. b Pendiente. Sb Desviación estándar de la pendiente. NS No significativo.

**Tabla 5.** Resultados de la prueba de linealidad.

Magnitud	f		
	Curva		
	1	2	3
X ± S	0,009 7 ± 0,000 1	0,009 8 ± 0,000 1	0,009 9 ± 0,000 2
t <sub>exp.</sub> ≤ t <sub>tabla</sub> (0,05; 4)	0,87 ≤ 2,78	1,31 ≤ 2,78	1,76 ≤ 2,78
p > 0,05 no signif.	p = 0,41	p = 0,23	p = 0,11
CVf (%)	1,34	0,86	1,89
X <sub>total</sub> ± S	0,009 8 ± 0,000 2		
CV <sub>total</sub> (%)	1,54		

f Factores respuesta. X Media. S Desviación estándar. CVf Coeficiente de variación de los factores respuesta.

### Estabilidad de las muestras

Los resultados (Tabla 9) del estudio de estabilidad de las muestras permiten afirmar que estas permanecen estables durante 24 h a temperatura ambiente; porque no aparecieron cambios significativos en la concentración de la muestra. Este resultado es importante para la Industria Farmacéutica, donde el número de muestras a analizar es muy grande y el intervalo de tiempo transcurrido entre el primer análisis y el último es grande.

### Robustez

Los resultados (Tabla 10 y 11) permiten afirmar que el método es robusto porque en los cuatro ensayos realizados no se encontraron diferencias para cada parámetro evaluado.

### CONCLUSIONES

El método analítico propuesto para la cuantificación del principio activo en las tabletas de teofilina de acción sostenida (Controfilina-200) es específico para muestras degradadas y sin degradar; por lo que

puede ser empleado para la valoración del principio activo en las tabletas de Controfilina-200; así como en los estudios de estabilidad de las tabletas. Es lineal, preciso y exacto en los intervalos de concentración evaluados y cumple con los criterios de aceptación establecidos para estos parámetros. El estudio de estabilidad de las muestras demostró que permanecen estables durante 24 h. Es robusto porque no es sensible a pequeños cambios o modificaciones en el método, que pudieran surgir de imprevisto.

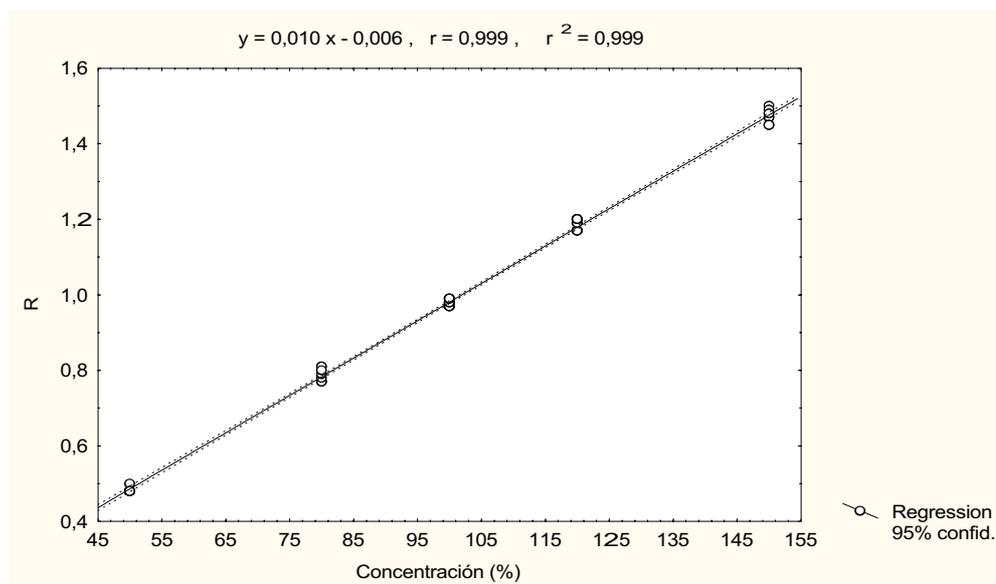


Fig. 1. Curva de calibración promedio ( $n = 3$ ) obtenida en la determinación de la linealidad del método.

Tabla 6. Resultados de la repetibilidad del método.

Estadígrafos	Nivel bajo	Nivel medio	Nivel alto
	70 %	100 %	115 %
$X \pm S$	$70,68 \pm 0,69$	$101,80 \pm 0,68$	$117,30 \pm 0,60$
$S^2$	0,47	0,46	0,36
CV (%)	0,97	0,67	0,51
$G_{exp.} \leq G_{tabla} (0,05; 4,3)$	$0,36 \leq 0,63$		

X Media. S Desviación estándar.  $S^2$  Varianza. CV Coeficiente de variación (%).

Tabla 7. Resultados correspondientes a la precisión intermedia.

Días	100 (%) ( $n = 4$ )			Estadígrafos ( $n = 12$ )
	Analista			
	1	2	3	
1	$99,96 \pm 0,57$	$100,24 \pm 0,57$	$99,41 \pm 0,30$	$X = 99,87 \pm 0,57$ CV(%) = 0,58
2	$99,81 \pm 0,50$	$99,51 \pm 0,00$	$99,40 \pm 0,25$	$X = 99,57 \pm 0,34$ CV(%) = 0,34
3	$99,50 \pm 0,02$	$100,05 \pm 0,03$	$100,14 \pm 0,19$	$X = 99,90 \pm 0,31$ CV(%) = 0,31
Estadígrafos ( $n = 12$ )	$X = 99,76 \pm 0,44$ CV(%) = 0,44	$X = 99,93 \pm 0,44$ CV(%) = 0,44	$X = 99,65 \pm 0,43$ CV(%) = 0,43	$X_{total} = 99,78 \pm 0,44$ CV <sub>total</sub> = 0,44
$G_{exp.} (d) = 0,60$	$G_{exp.} (analistas) = 0,32$			$G_{tabla} (0,05; 11,3) = 0,60$

X Media  $\pm$  desviación estándar. CV Coeficiente de variación (%).

## AGRADECIMIENTOS

A Elsa Díaz, Juan Luis Benítez, Mireya López, Alberto Suzarte, Adaris M. López, Hilda María de San Miguel, Marquiza Sablón y Carmen Fonticella por la colaboración y asesoría brindada, que hicieron posible la realización del trabajo.

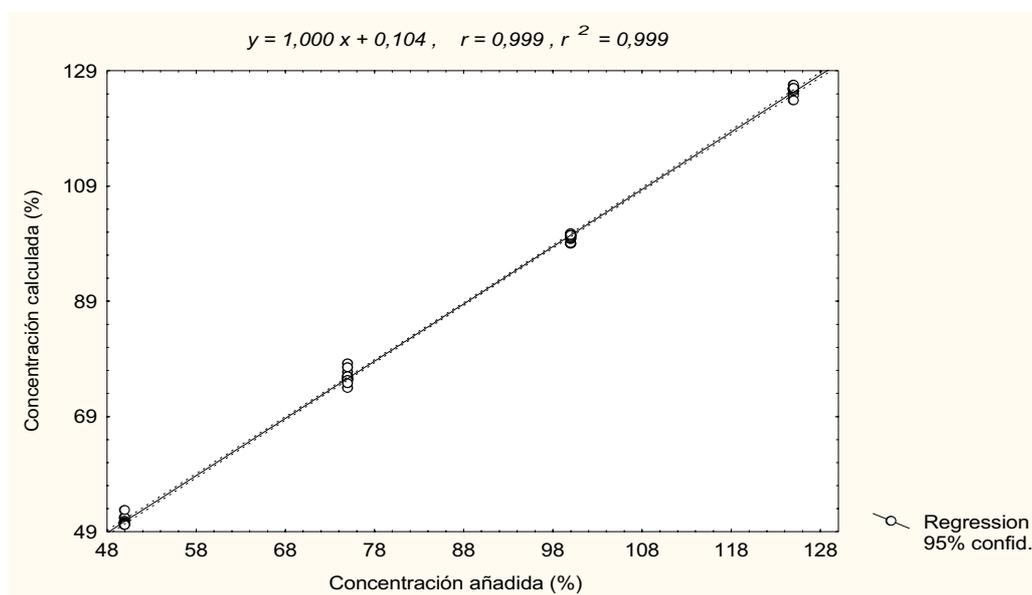
## BIBLIOGRAFIA

1. The Pharmacopeia of the United States of America, Twenty-Fifth Revision, Easton: Mack Printing, 1420-1421, 2002.
2. Martindale W. The Complete Drug Reference. Thirty-Second Edition published, London, Pharmaceutical Press, 1100-1105, 1999.
3. Farmacia Práctica de Remigton. Segunda Edición en Español. Edición Revolucionaria, 1423-1428, 1974.
4. Clarke' S. Isolation and Identification of Drugs, Second edition, 243-245, 1986.
5. Connors K.A. Chemical Stability of Pharmaceuticals. A Handbook for Pharmacists. Second edition, New York, John Wiley, 120-122, 1986.
6. Castro M., Gascón S. y col. Validación de Métodos Analíticos. Sesión Catalana de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, Comisión de Normas de Buena Fabricación y Control de la Calidad, 1-94, 1989.
7. Commission of the European Communities. CPMP Working Party on Qual-

**Tabla 8.** Resultados correspondientes a la exactitud.

Estadígrafos	Porcentaje adicionado			
	50	75	100	125
$X_{\text{calc.}} \pm S$	49,70 $\pm$ 0,45	74,68 $\pm$ 0,31	99,55 $\pm$ 0,57	124,75 $\pm$ 0,25
IC	[49,02 - 50,38]	[73,72 - 75,39]	[98,55 - 100,55]	[124,20 - 125,30]
$X_{\text{recob.}} \pm S$	99,39 $\pm$ 0,89	99,57 $\pm$ 0,42	99,55 $\pm$ 0,57	99,80 $\pm$ 0,20
IC	[98,05 - 100,73]	[98,61 - 100,53]	[98,55 - 100,55]	[99,36 - 100,24]
$t_{\text{exp. calc.}} \leq t(0,05,4)$	1,51 $\leq$ 2,77	2,29 $\leq$ 2,77	1,76 $\leq$ 2,77	2,18 $\leq$ 2,77
$S^2_{\text{recob.}}$	0,80	0,17	0,32	0,04
$CV_{\text{recob.}} (\%)$	0,90	0,42	0,57	0,20
$G_{\text{exp. recob.}} = 0,60 \leq G_{\text{tabla}}(0,05; 4,4) = 0,63$				
$X_{\text{total recob.}} (\%) = 99,58 \pm 0,17 \quad CV_{\text{total recob.}} (\%) = 0,16$				

$X_{\text{calc.}}$  Media % calculado.  $S$  Desviación estándar.  $X_{\text{recob.}}$  Media % recobrado.  $S^2_{\text{recob.}}$  Varianza del recobrado.  
 $CV_{\text{recob.}}$  Coeficiente de variación recobrado.  $X_{\text{total recob.}}$  Media total recobrado.  $CV_{\text{total recob.}}$  Coeficiente de variación total recobrado. IC Intervalo de confianza.


**Fig. 2.** Gráfico correspondiente a la evaluación de la exactitud del método.

**Tabla 9.** Resultados de la estabilidad de las muestras.

n	100 %			
	0	3	6	24
	(h)			
1	99,95	99,95	99,95	99,95
2	100,97	100,00	99,98	101,99
3	100,97	100,01	99,95	101,99
X	100,63	99,99	99,96	101,31
S	0,59	0,032	0,017	1,18
CV (%)	0,59	0,032	0,017	1,16
$t_{\text{exp.}} \leq t_{\text{tabla}}(0,05; 2)$	–	1,89 $\leq$ 4,30	1,97 $\leq$ 4,30	0,89 $\leq$ 4,30
$p (> 0,05)$ n.s.	–	$p = 0,13$	$p = 0,12$	$p = 0,42$
$p (p > 0,05)$ n.s.		0,18		

X Media. S Desviación estándar. p Probabilidad. n.s No significativo.

**Tabla 10.** Resultados de la robustez.

n	Ensayo			
	1	2	3	4
1	100,01	100,01	100,01	100,01
2	99,04	100,01	99,04	100,01
3	100,01	99,04	100,01	99,04
X ± S	100,01 ± 0,56	100,01 ± 0,56	100,01 ± 0,56	100,01 ± 0,56
CV (%)	0,56	0,56	0,56	0,56

X Media. S Desviación estándar. CV Coeficiente de variación.

**Tabla 11.** Diferencias calculadas para cada parámetro.

Parámetro	Diferencia
Fase móvil (pH)	0,00
Flujo	0,00
Fase móvil (composición)	0,00

ity of Medicinal Products, Note for Guidance for Analytical Validation, August, 1989.

8. Commission of the European Communities (CPMP). International Conference on Harmonization; Guideline on

Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology Availability; Notice. Federal Register, Vol. 60, No. 40, March, 11259-11262, 1995.

9. Commission of the European Communities (CPMP). Validation of Analytical

Procedures: Methodology, International Conference on Harmonization (ICH), 281, 1-9, 1995.

10. Quattrocchi O.A., Abelaira de Andrizzi S.I., Laba R.F. Introducción a la HPLC: Aplicación y práctica. Ed. Buenos Aires, Argentina, Capítulo 12, 301-328, 1992.

---



**SERVICIOS TECNICOS DESTACADOS**  
**MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR DE CUBA**

---

## NUEVO SERVICIO DE CONSERVACION ESTRUCTURAL DEL TRANSPORTE

**Centro de Estudios Anticorrosivos y Tensoactivos, Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos".**

*La conservación de los vehículos contra el deterioro es una práctica que emplean muchos países, incluyendo aquellos de un elevado desarrollo económico.*

*El Centro de Estudios Anticorrosivos y Tensoactivos oferta un nuevo servicio técnico sustentado en el empleo de productos desarrollados en sus propias instalaciones, que tiene como objetivo alargar la vida de la estructura de los vehículos automotores.*

*Actividades que incluye el servicio:*

- ✓ *Identificación y solución de los problemas de diseño anticorrosivo.*
- ✓ *Identificación y solución de los problemas de corrosión y protección de los recubrimientos de pintura y otros tipos de recubrimientos.*
- ✓ *Eliminación del óxido y de los puntos de corrosión.*
- ✓ *Protección a componentes huecos y áreas cerradas.*
- ✓ *Protección de partes inferiores del vehículo.*
- ✓ *Aplicación de recubrimiento impermeabilizante y abrillantador de pinturas con ceras nacionales.*

*Beneficios que brinda el servicio:*

- ✓ *Conservación adecuada de la carrocería de los vehículos.*
- ✓ *Alargamiento de la vida útil de la estructura y del vehículo.*
- ✓ *Garantía por 6 a 9 años.*
- ✓ *Empleo de una amplia variedad de productos anticorrosivos ofertados a los mejores precios.*
- ✓ *Rectificación de los errores de diseño anticorrosivos del vehículo.*
- ✓ *Servicio de postventa anual asegurado.*
- ✓ *Impermeabilización de las superficies pintadas. Mayor brillo y protección ¡GRATIS!*
- ✓ *Rapidez: el trabajo de protección y conservación solo toma unas horas.*

*Para mayor información:*

Dpto. Comercial, CEAT, Universidad de Matanzas, Autopista a Varadero km 3½.  
Teléfono: (45) 261 013 ext. 326; Correo electrónico: merca.ceat@umcc.cu