

Validación de una metodología por HPLC en fase inversa para la determinación de Candesartan Cilexetil en tabletas recubiertas

Paola Bustillo^{1,2}, María Luisa Daza², Noralba Sierra Martínez¹

¹ Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, A. A. 14490, Bogotá, Colombia.

² Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia.

* Correspondencia: correo electrónico: *mldazacal@hotmail.com*.

Recibido para evaluación: 12 de diciembre de 2013.

Aceptado para publicación: 15 de mayo de 2014.

RESUMEN

Se presentan en este artículo los resultados del desarrollo y validación de una metodología analítica para la cuantificación de Candesartan Cilexetil en tabletas recubiertas para uso humano. El procedimiento consiste en una separación por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase inversa y detector de arreglo de diodos, empleando como fase móvil una mezcla compuesta por un buffer de acetatos de pH 4,0 y acetonitrilo (30:70), una columna C18 a temperatura ambiente y detección a una longitud de onda de 306 nm. Se comprobó la selectividad, la precisión y la exactitud de la metodología. Estas características junto con su sencillez hacen el método adecuado y conveniente para el objetivo propuesto. La robustez de la metodología se investigó frente a la variación de algunas de las condiciones cromatográficas bajo las cuales se llevó a cabo la validación.

Palabras clave: Candesartan Cilexetil, cromatografía líquida, detección ultravioleta, arreglo de diodos.

SUMMARY

Validation of an analytical methodology for the assay of Candesartan Cilexetil in coated tablets for human use by reverse phase high performance liquid chromatography

A reverse phase high performance liquid chromatographic method was developed for the quantitative assay of Candesartan Cilexetil in coated tablets for human use as hypotensor agent. The method was then validated for its quantitative determination assay in tablets as pharmaceutical specialties. A C18 column stabilized at room temperature was used and the detection was performed at 306 nm. A mixture of acetonitrile, acetate buffer pH 4,0 (30:70) was used as the mobile phase. The method is selective, linear and shows a good repeatability. The robustness was also studied. These properties besides the simplicity make the methodology convenient for the objective proposed.

Key words: Candesartan Cilexetil, reverse high performance liquid chromatography, UV detection, diode array detector.

INTRODUCCIÓN

El Candesartan Cilexetil es un profármaco no peptídico utilizado como antihipertensivo de uso oral. Este se convierte rápidamente en el fármaco activo, candesartan, por hidrólisis del grupo éster durante la absorción en el tracto gastrointestinal inferior [1]. El candesartan es un antagonista de los receptores de angiotensina II, selectivo para los receptores AT1, con fuerte unión y lenta disociación del receptor. En hipertensión, el Candesartan Cilexetil causa la reducción duradera de la presión arterial de acuerdo con la dosis. En la figura 1 se presenta su fórmula estructural.

Diferentes técnicas de análisis han sido reportadas por la literatura para la determinación de los antagonistas de los receptores de angiotensina II. Para su determinación en fluidos biológicos se han empleado técnicas cromatográficas con columnas C18 y detección fluorométrica [2-5]. Stenhoff, Lagerström y Andersen [6] determinan Candesartan Cilexetil en orina por HPLC con una columna fenilo y detección fluorométrica. Levi, Wuerzner, Ezan y Pruvost [7], analizan el valsartan y el candesartan en plasma y muestras de orina por extracción en fase sólida acoplada a espectrometría de masas.

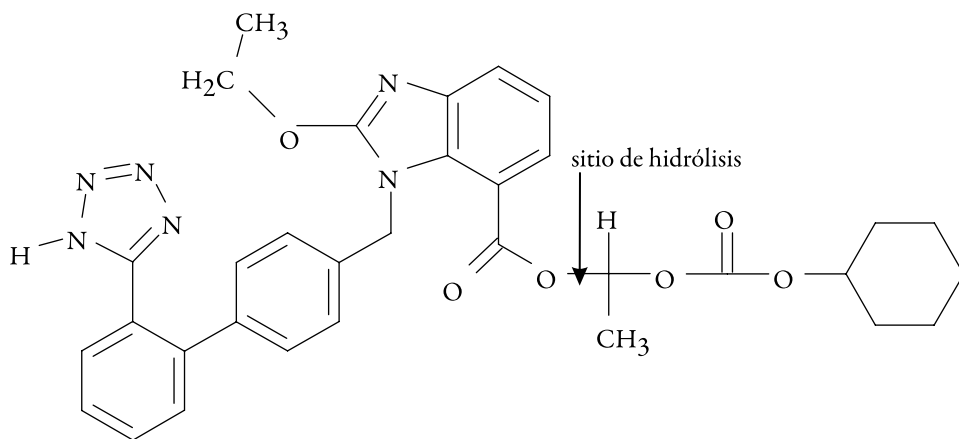


Figura 1. Fórmula estructural del Candesartan Cilixelil [1].

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en el desarrollo y validación de un método de análisis cuantitativo para la determinación de Candesartan Cilixelil en tabletas recubiertas, por HPLC en fase inversa, empleando una columna de $4,6 \times 250$ mm con octadecilsilano como fase estacionaria y detección por espectrofotometría ultravioleta a 306 nm.

MATERIALES Y MÉTODOS

Equipos y materiales

Cromatógrafo líquido Hewlett Packard serie 1050 con detector de arreglo de diodos, columna Zorbax Stable Bond C18; $5 \mu\text{m}$ de $4,6 \times 250$ mm, columna Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18; $5 \mu\text{m}$ de $4,6 \times 250$ mm, guardacolumna Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18; $5 \mu\text{m}$ de $1,2 \times 4,6$ mm, sistema Milli-Q plus de ósmosis reversa, espectrofotómetro UV/VIS Perking Elmer Lambda 25, potenciómetro Orion 3 Star, ultrasonido UltraSonik 28X, balanza analítica sensibilidad 0,1 mg Sartorius TE214S, estufa Memmert 25 a $250 \text{ }^\circ\text{C} \pm 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Sustancias y reactivos

Candesartan Cilixelil estándar de referencia de 99,68% Henan Huasbag Pharmaceutical Co. Ltda., metanol y acetonitrilo HPLC Merck, agua HPLC, acetato de sodio trihidrato Merck RA, ácido acético Merck RA, ácido clorhídrico 0,1N, hidróxido de sodio 0,1N, peróxido de hidrógeno 3%. Para la preparación de la matriz de la muestra se utilizó

almidón de maíz, celulosa microcristalina PH101, colorante verde ZLT601, Eudragit E 100%, fécula glicolata sódica, povidona K30, lactosa, magnesio estearato, polímero 6000, talco, óxido de titanio, todos de calidad farmacéutica.

Optimización del sistema cromatográfico

Para la estandarización de la metodología analítica se realizaron varios y diferentes ensayos en procura de obtener las mejores condiciones cromatográficas para la determinación del Candesartan Cilexetil, objeto del estudio. Como punto de partida, se tomaron las condiciones cromatográficas reportadas en la publicación de González, Alonso y Jiménez [5], con ligeras modificaciones debido al material disponible. Bajo las condiciones en dicha publicación y utilizando una columna C18, se encontró un tiempo de retención de 16,4 minutos, considerado elevado. Bajo las condiciones optimizadas se obtuvo un tiempo de retención para el candesartan de 3,35 minutos.

Parámetros de idoneidad del sistema

Como paso previo al proceso de validación, se verificó experimentalmente la idoneidad del sistema analítico, utilizando el sistema cromatográfico optimizado. Como parámetros de idoneidad, se evaluaron la precisión, el factor de capacidad, el número de platos teóricos y el factor de asimetría. Los valores hallados satisfacen los requerimientos generalmente aceptados (tabla 1). El factor de capacidad se calculó con referencia al tiempo de retención del uracilo, 1,22 minutos.

Tabla 1. Parámetros de aceptación del sistema cromatográfico.

Parámetro	Candesartan	Especificación
Tiempo de retención	3,35	---
Repetibilidad CV	0,35%	< 2 %
Factor de capacidad	1,75	2 – 10
Número de platos	5.016	> 800
FAS al 5%	1,09	< 1,5%

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la selección de la fase móvil y utilizando diferentes combinaciones de esta desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo, diferentes flujos, diferente temperatura y

diferentes volúmenes de inyección, se obtuvieron resultados variables con cada una de ellas. Los resultados se analizaron principalmente desde tres puntos de vista: selectividad, simetría de las señales y tiempo de corrida.

Mediante modificaciones de la fase móvil reportada [5], se obtuvo un tiempo de retención aproximado de 3,35 minutos. Esta nueva fase estaba compuesta por una mezcla de acetonitrilo y un buffer de acetatos de pH 4,0 en proporción 70:30, a temperatura ambiente. En el estudio del espectro de absorción del candesartan se encontraron tres máximos de absorción, 210, 257 y 306 nm. Los mejores resultados se encontraron a 306 nm, longitud de onda seleccionada para llevar a cabo la validación de la metodología. El flujo de fase móvil se estableció en 2,0 mL/min y 20 μ L como volumen de inyección.

De acuerdo con los diferentes ensayos realizados, se establecieron para la validación las siguientes condiciones cromatográficas (véase tabla 2).

Tabla 2. Condiciones cromatográficas para el análisis del candesartan.

Parámetro	Valor
Fase móvil	Acetonitrilo-Buffer pH 4,0 (30:70)
Flujo fase móvil	2 mL/min
Columna Zorbax C18	StableBond
Temperatura columna	25 °C
Longitud de onda	306 nm
Volumen de inyección	20 μ L

En la figura 2 se presenta el cromatograma obtenido bajo las condiciones cromatográficas establecidas en la tabla 1.

Como diluentes para estándares y muestras se ensayaron diferentes proporciones de buffer de pH 4,0 y acetonitrilo en proporciones 70:30, 25:75 y 5:95, respectivamente. La proporción 5:95 se seleccionó como mezcla diluyente.

Validación de la metodología analítica

La validación de la metodología analítica se llevó a cabo de acuerdo con los delineamientos establecidos por la USP [8] y por la ICH [9].

```
=====
Injection Date : 12/9/09 7:24:46 PM          Seq. Line : 8
Sample Name    : ST. 1                      Location  : Vial 1
Acc. Operator  : Alejandra Bustillo         Inj      : 1
                                           Inj Volume: 20 µl
Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\CANCIL.M
Last changed  : 12/9/09 7:30:32 PM by Alejandra Bustillo
               (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\CANCIL.M
Last changed  : 3/19/10 10:50:45 AM by MARIA CONDORI
Método candesartan cilexetil
=====
```

```
Instrument Conditions :      At Start          At Stop
Temperature           :      31.7             31.7 °C
Pressure              :      159.5            162.2 bar
Flow                  :      2.000            2.000 ml/min
```

```
Solvent Description   :
Pump 1, Solvent C     : AcW
Pump 1, Solvent D     : Buffer acetato pH 4
```

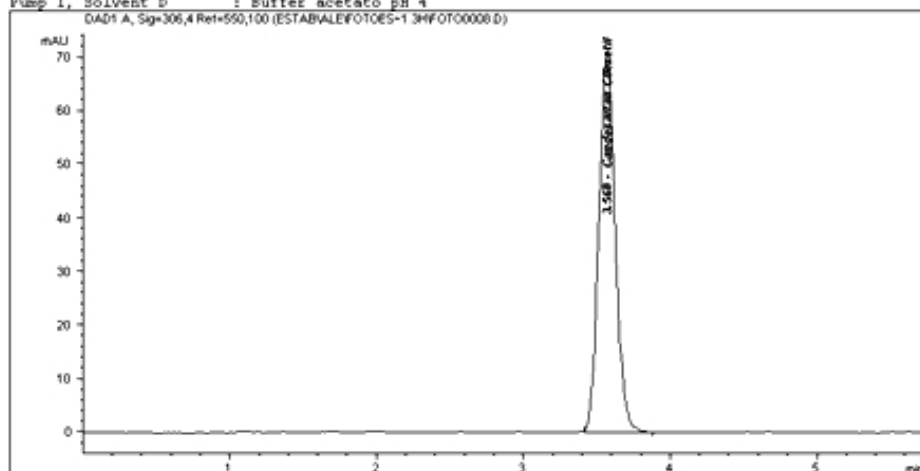


Figura 2. Cromatograma representativo del Candesartan Cilexetil.

Selectividad

Inicialmente, para establecer la selectividad del método, se analizaron los diferentes componentes de la fase móvil y del diluyente, así como los componentes de la matriz de la muestra o auxiliares de formulación. No se observó ningún tipo de interferencia.

Por otra parte, para verificar la selectividad, el estándar de trabajo se sometió a diferentes y variadas condiciones de degradación forzada. Estas degradaciones se llevaron a cabo con reflujo y sin reflujo durante 1, 4 y 8 horas mediante fotólisis con radiación UV, hidrólisis ácida con HCl 0,1N, hidrólisis básica con NaOH 0,1N, hidrólisis neutra con agua y oxidación con peróxido de hidrógeno al 3%. Además, se realizó una degradación térmica a 50 y 70 °C durante diez días, así como una degradación por fotólisis a 200 y a 1.000 Wh/m² [10].

Los cromatogramas resultantes de tres inyecciones de cada degradación se confrontaron con el cromatograma del estándar de Candesartan Cilxetil.

No se observó degradación del candesartan por fotólisis ni a 200 ni a 1.000 Wh/m², mientras que por termólisis a 70 °C se observó una ligera degradación, equivalente a un 3%, aproximadamente.

Por hidrólisis con agua sin reflujo y durante ocho horas, se observó una degradación aproximada de 76,5%. Sin embargo, en el cromatograma no se observan señales diferentes a la del candesartan a ninguno de los tres tiempos de hidrólisis. Mediante el empleo de reflujo, la degradación aumenta considerablemente hasta llegar a la desaparición de la señal del candesartan. En este último caso, se observa a las 4 horas de reflujo, una señal a 1,14 minutos y a las 8 horas, dos señales bien diferenciada, a 1,14 (compuesto A) y a 1,83 (compuesto B) minutos, señales que no interfieren con la señal del candesartan. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado en la literatura [11, 12]. En la degradación por ocho horas sin reflujo, se observa el producto de descomposición A con un tiempo de retención 1,1 minutos. En todos los casos, la comparación de espectros y los gráficos de pureza indican la pureza de la señal presentada por el candesartan, lo cual confirma la selectividad de la metodología. Igualmente se puede concluir que el aumento de la temperatura favorece la degradación del candesartan.

En la figura 3 se presenta el cromatograma obtenido luego de la hidrólisis ácida por ocho horas y sin reflujo.

En la tabla 3 se presenta un resumen de los procesos de degradación y de los resultados obtenidos.

Linealidad del sistema y del método

De acuerdo con los lineamientos de la ICH [9], la proporcionalidad en la respuesta para el Candesartan Cilxetil se verificó para cinco concentraciones, correspondientes a 0,08, 0,09, 0,10, 0,11 y 0,12 mg/mL de Candesartan Cilxetil. Para el método se estudiaron los mismos niveles de concentración, alcanzados mediante pesada y dilución de muestras placebo adicionadas de Candesartan Cilxetil de acuerdo con la composición cualitativa y cuantitativa de las tabletas. Se trabajaron tres réplicas, tanto para el sistema como para el método. Dentro de los rangos de concentración estudiados, tanto para el sistema como para el método, se observó un comportamiento lineal.

Como ecuaciones para las rectas de regresión, cinco concentraciones, tres réplicas, se encontró para el sistema y para el método las regresiones siguientes:

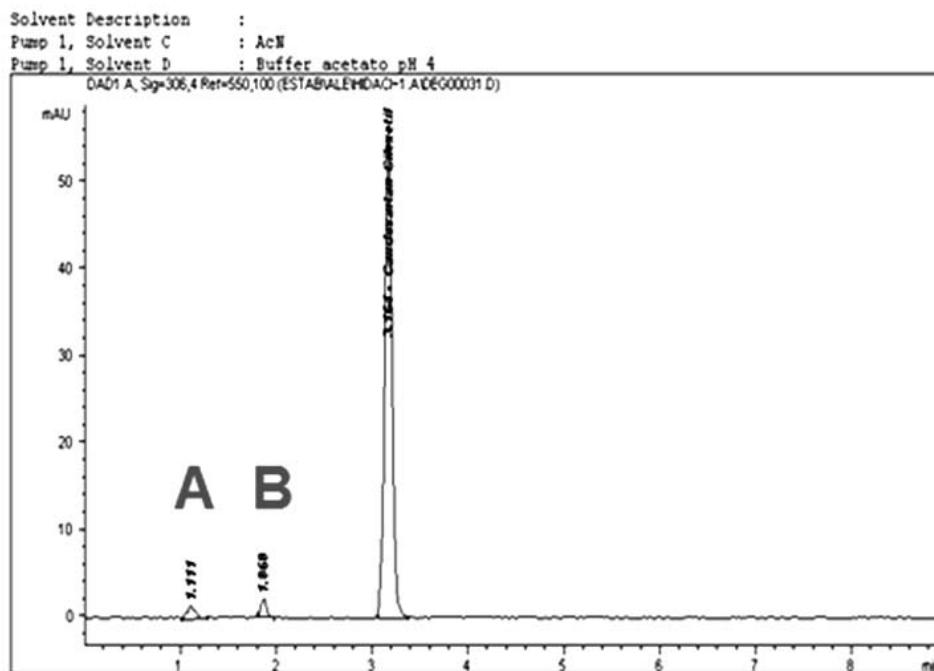


Figura 3. Cromatograma para Candesartan Cilexetil por hidrólisis ácida por ocho horas, sin reflujo.

Tabla 3. Resultados de los estudios de degradación del Candesartan Cilexetil.

Degradación	Reflujo a ocho horas	Tiempo de retención (tr) del producto de degradación	Porcentaje de degradación
Hidrólisis neutra	-	N/A	76,4%
	+	A (1,14 min) - B (1,84 min)	100%
Hidrólisis ácida	-	A (1,11 min) - B (1,87 min)	49,56%
	+	A (1,10 min) - B (1,87 min)	100%
Hidrólisis básica	-	A (1,10 min)	100%
	+	A (1,11 min)	100%
Oxidación	-	A (1,14 min)	60,86%
	+	A (1,14 min)	100%
Fotólisis	N/A	N/A	0%
Termólisis a 70 °C	N/A	No detectables	3%

Sistema: $y = 5654,789 x - 33,436$ $r = 0,9985$

Método: $y = 5409,237 x - 8,782$ $r = 0,9978$

La prueba de t para el sistema indicó un intercepto significativamente diferente de cero y un intercepto no significativo para el método. El primer resultado no afecta, sin embargo, la exactitud de la metodología, como se indicará más adelante. Para el sistema y el método se encontró una pendiente significativamente diferente de cero. De acuerdo con el test de F, se demostró una regresión significativa para el sistema y para el método. El mismo test indicó para el sistema un desvío de la linealidad no significativo ($F_{cal} > F_{tab}$) y para el método un desvío significativo ($F_{cal} < F_{tab}$), contrario a lo esperado. Sin embargo, en algunos casos, el desvío puede obedecer a otras causas diferentes a la falta de linealidad. En estos casos se debe proceder a un análisis de los residuos. Las gráficas obtenidas demostraron una distribución aleatoria de los residuos y una distribución normal de los mismos. Por otra parte, la normalidad de los residuos se demostró mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnov ($\alpha = 0,05$). Este comportamiento de los residuos permite demostrar la linealidad de los datos obtenidos. El análisis estadístico se presenta en la tabla 4, al igual que los límites superior (LS) e inferior (LI), calculados de acuerdo con el error estándar para el intercepto y para la pendiente en el estudio de linealidad del sistema y en el estudio de linealidad del método.

Tabla 4. Resultados para la linealidad.

Prueba	Parámetro	Sistema			Método		
		t	LS	LI	t	LS	LI
t	Intercepto	-3,894	-14,886	-51,985	-0,870	13,013	-30,577
	Pendiente	66,515	5838,457	5471,122	54,152	5625,040	5193,434
	Coef. Deter.	0,9971			0,9956		
Fcal	Regresión	4224,22 ¹			2932,42 ²		
	Desvío	2,38			7,01		

$t_{tab}(13, 0,05): 2,160, {}^1F_{tab}(1/13) = 4,67, {}^2F_{tab}(3/10) = 3,71.$

SC residuales: sistema 281,88, método 389,14.

En las figuras 4 y 5 se representan las curvas de calibración obtenidas, luego del ajuste por mínimos cuadrados, en el ensayo de linealidad del sistema y del método, respectivamente. Este tipo de ajuste está soportado por demostración de la homogeneidad de

varianzas para los cinco niveles de concentración, la cual se llevó a cabo mediante una prueba G de Cochran para el sistema y método.

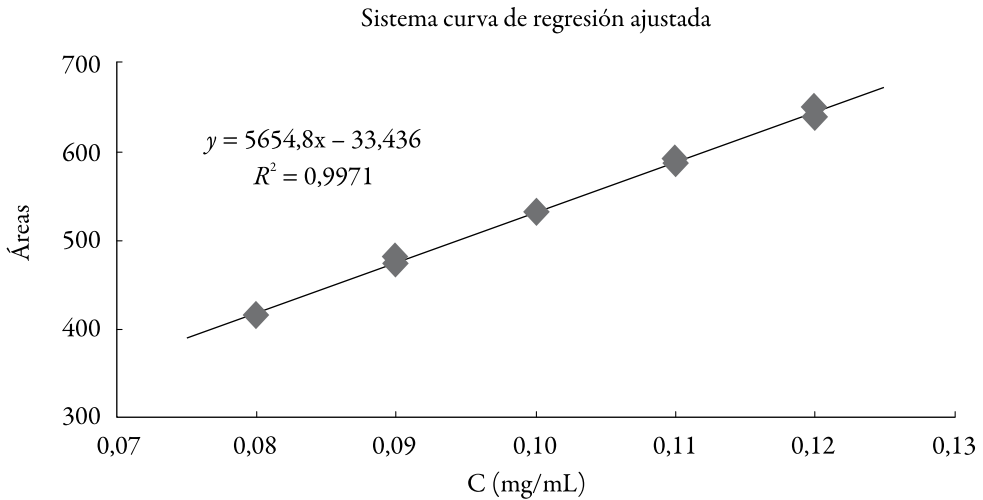


Figura 4. Representación gráfica de los resultados obtenidos en la linealidad del sistema.

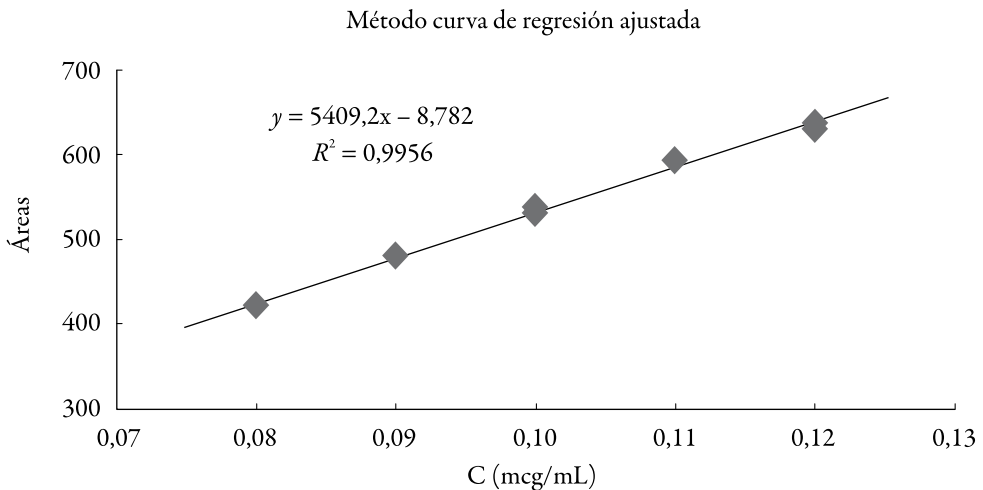


Figura 5. Representación gráfica de los resultados obtenidos en la linealidad del método.

Precisión del sistema y del método

Mediante los resultados obtenidos a nivel de repetibilidad para el sistema instrumental, se obtuvo un coeficiente de variación de 0,46%, el cual es inferior a 2%, porcentaje de variación recomendado para este tipo de técnica. La precisión se evaluó para una concentración del 100%, equivalente a 0,10 mg/mL y seis réplicas, uno de los procedimientos recomendados por la ICH [9]. La precisión del método bajo condiciones de repetibilidad se evaluó para tres niveles de concentración equivalentes al 80%, 100% y 120%, las cuales corresponden a 0,08, 0,10 y 0,12 mg/mL. Cada nivel de concentración se estudió por triplicado. Los factores de respuesta para los nueve ensayos presentaron un coeficiente de variación de 0,89%, valor aceptable de acuerdo con la literatura [9, 13]. La precisión del método a nivel de precisión intermedia se evaluó entre días (tres días) y entre analistas (dos analistas), para una concentración equivalente al 100 %. Se halló un valor de 1,17% (inferior a 2%) para el coeficiente de variación global para la totalidad de las respuestas obtenidas.

El análisis de varianza de los datos obtenidos indica diferencias no significativas entre analistas, días y réplicas.

Exactitud

La evaluación de este parámetro se determinó mediante el porcentaje de recuperación proveniente de placebos enriquecidos con Candesartan Cilexetil a niveles de concentración correspondientes al 80%, 100% y 120%, tres replicas por nivel.

Los porcentajes de recuperación obtenidos se encuentran en un intervalo del 99,29% al 101,65%. El coeficiente de variación en los tres niveles de concentración es de 1,27%. Como valor de G experimental, obtenido a partir de los resultados de recuperación para cada nivel, se obtuvo un valor de 0,4705. Este valor es menor que el valor de G de la tabla (0,8709) para una probabilidad de error de 5% ($\alpha = 0,05$, $K = 3$, $n = 3$), con lo cual se puede concluir que las varianzas son homogéneas. El valor del t experimental observado (0,265), menor que el t tabulado (2,306) para $\alpha = 0,05$ y $n-1$ grados de libertad, confirma la exactitud del método y una recuperación no significativamente diferente de 100%.

Robustez

La robustez de la metodología se analizó realizando variaciones en parámetros del método relacionados con el flujo de fase móvil, temperatura de la columna, volumen de inyección, columna, pH, porcentaje de acetonitrilo y longitud de onda. Como diseño experimental se seleccionó el diseño de Youden [14], diseño simplificado con el cual se analizan siete factores mediante la realización de ocho ensayos. En la tabla 5 se reportan

los valores nominales para los anteriores parámetros, los nuevos valores o valores alternativos y los valores de las diferencias encontradas para los ocho ensayos, calculados como la diferencia entre la media de los valores de área cuando el factor de interés se encontraba en uno u otro nivel.

Tabla 5. Niveles de los factores para el estudio de robustez.

Factor	Valor nominal	Valor alternativo	Diferencia
Flujo fase móvil	2,0 mL/min	1,5 mL/min	278,23
Temperatura columna	25 °C	40 °C	56,53
Volumen de inyección	20 μ L	10 μ L	617,27
Columna Zorbax C18	StableBond	Eclipse XDB	296,45
pH	4,0	3,8	103,32
Porcentaje acetonitrilo	30%	25%	146,42
Longitud de onda	306 nm	257 nm	951

Valor de referencia: $1,4142 \times 46,95 = 66,40$.

Cada experimento se llevó a cabo por triplicado, promediando luego los valores de área obtenidos. Los experimentos se hicieron de manera aleatoria.

Se observa que para todos los factores, excepto la temperatura de la columna, la diferencia entre la media de las áreas obtenidas cuando el parámetro se encontraba en el nivel nominal o estandarizado y la media de las áreas obtenidas cuando se encontraba en el nivel alternativo o nuevo valor fue mayor de 66,40, valor que corresponde a la diferencia del producto de la desviación estándar de la precisión del método por la raíz cuadrada de 2 [15]. Lo anterior demuestra que todos los factores son críticos, a excepción de la temperatura de la columna, factores que requieren especial atención durante la aplicación de la metodología en análisis de rutina.

CONCLUSIONES

Se estandarizó una metodología analítica por HPLC en fase inversa para la determinación de Candesartan Cilexetil en tabletas recubiertas para uso humano. Durante la etapa de validación, la metodología demostró ser precisa, lineal, reproducible y selec-

tiva frente a los auxiliares de formulación, a los componentes de la fase móvil, así como frente a los productos de descomposición obtenidos por hidrólisis neutra, hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina, temperatura y oxidación con peróxido de hidrógeno. Estas características la hacen adecuada y confiable para el objetivo propuesto. Además de ello, la metodología presentada es sencilla, rápida en su ejecución y se lleva a cabo con instrumental y materiales de uso corriente y disponible en la mayoría de los laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos. La selectividad y la pureza de la señal encontrada, permite la aplicación de la metodología para estudios de estabilidad de la formulación.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Universidad Mayor de San Andrés de La Paz, Bolivia, así como al Laboratorio Droguería Inti de La Paz, Bolivia, por su apoyo para la realización del presente trabajo y en cuyas instalaciones se llevó a cabo.

REFERENCIAS

1. E. Cagigal, L. González, R.M. Alonso, R.M. Jiménez, pKa determination of angiotensin II receptor antagonists (ARA II) by spectrofluorimetry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **26**, 477 (2001).
2. H. Lee, H.O. Shim, H.S. Lee, Simultaneous determination of losartan and active metabolite EX93174 in rat plasma by HPLC with column switching, *Chromatographia*, **42**, 39 (1996).
3. S.-Y. Chang, D.B. Whigan, N.N. Vachhrajani, R. Patel, High-performance liquid chromatography assay for the quantitation of irbesartan (SR-47436/BMS/186295) in human plasma and urine, *Journal of Chromatography B*, **702**, 149 (1997).
4. D. Farthing, D. Sica, I. Fakhry, A. Pedro, T. Gehr, Simple high-performance liquid chromatography method for the determination of losartan and E-3174 metabolite in human plasma, urine and dialysate, *Journal of Chromatography B*, **704**, 374 (1997).
5. L. González, R.M. Alonso, R.M. Jiménez, A high-performance liquid chromatographic method for screening angiotensin II receptor antagonist in human urine, *Chromatographia*, **52**, 735 (2000).

6. H. Stenhoff, P.-O. Lagerström, C. Andersen, Determination of candesartan cilexetil, candesartan and a metabolite in human plasma and urine by liquid chromatography and fluorometric detection, *Journal of Chromatography B*, **731**, 411 (1999).
7. M. Levi, G. Wuerzner, E. Ezan, A. Pruvost, Direct analysis of valsartan and candesartan in human plasma and urine by on-line solid phase extraction coupled to electrospray tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, **877**, 919 (2009).
8. The United States Pharmacopeial Convention, USP 35, Ed. Port City Press, Baltimore, Capítulo <1225>, 2012, p. 967.
9. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1), ICH, 2006.
10. Unión Europea, Japón, EE. UU., International Conference on Harmonization (ICH), Photostability testing of new drug substances and products (Q1B), 1996.
11. D.V. Subba-Rao, P. Radhakrishnanand, M.V. Suryanarayana, V. Himabindu, A stability-indicating LC method for candesartan cilexetil, *Chromatographia*, **66**, 499 (2007).
12. S. Mehta, R. P. Shah, R. Priyadarshi, S. Singh, LC and LC-MS/TOF studies on stress degradation behaviour of candesartan cilexetil, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **52**, 345 (2010).
13. W. Horwitz, Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs, *Analytical Chemistry*, **54**, 67 (1982).
14. W.J. Youden, The collaborative test, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **73**, 194 (1990).
15. O.A. Quattrocchi, S.I.A. Andrizzi, R.F. Laba, "Introducción a la HPLC, aplicación y práctica", Artes Gráficas Farro, Buenos Aires, 1992.