

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



*DESARROLLO DE UNA NUEVA METODOLOGÍA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE
IBUPROFENO, DEXTROMETORFANO BROMHIDRATO, FENILEFRINA
CLORHIDRATO Y ÁCIDO ASCÓRBICO PRESENTES EN PREPARACIONES
FARMACÉUTICAS, POR MEDIO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA
RESOLUCIÓN.*

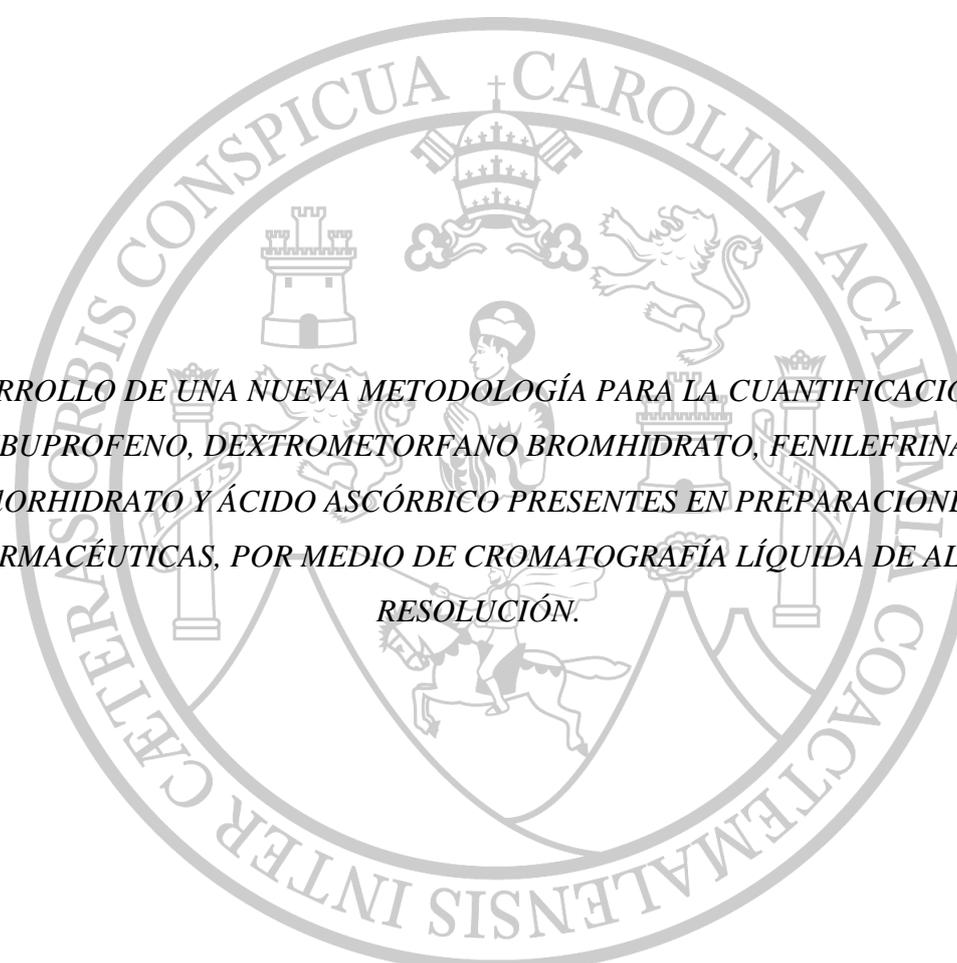
Álvaro Javier García López

Químico

Guatemala, Noviembre de 2014

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a large, circular emblem in the background. It features a central shield with a figure on horseback, a crown above, and various heraldic symbols. The Latin motto "CETERIS PARIBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER" is inscribed around the perimeter of the seal.

*DESARROLLO DE UNA NUEVA METODOLOGÍA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE
IBUPROFENO, DEXTROMETORFANO BROMHIDRATO, FENILEFRINA
CIORHIDRATO Y ÁCIDO ASCÓRBICO PRESENTES EN PREPARACIONES
FARMACÉUTICAS, POR MEDIO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA
RESOLUCIÓN.*

Informe de tesis

Presentado por

Álvaro Javier García López

Para optar al título de

Químico

Guatemala, Noviembre de 2014

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Manuel Cobar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Rodrigo José Vargas Rosales	Vocal III
Br. Lourdes Virginia Nuñez Portales	Vocal IV
Br. Julio Alberto Ramos Paz	Vocal V

DEDICATORIA

DEDICO ESTE TRABAJO DE TESIS

A Dios

A mis padres

Jorge García

Rosemary de García

A mis hermanos

Rodrigo García

Lucía García

A mi abuelita

Mamy Candy

A mi novia

María Isabel Amorín

AGRADECIMIENTOS

A Dios

A mis padres, porque sin su apoyo, amor, tiempo, paciencia y fortaleza, nada de esto hubiera sido posible, este trabajo y logro es suyo. Los amo.

A mis hermanos por ser mis consejeros, mi ejemplo, por tantas alegrías y porque sin importar las circunstancias siempre me han apoyado.

A mis abuelos, por enseñarme siempre a levantarme y seguir adelante.

A Alex López, por su cariño y por todas sus enseñanzas de vida.

A mi asesor M.Sc. Ricardo Véliz, por todo su apoyo a lo largo de mi carrera universitaria, por siempre confiar en mí, por darme mi primer trabajo y por sus consejos, enseñanzas y ánimo en todo momento en mi trabajo de tesis.

A mis amigos (Chino, Roy, Renato, Jorge, Pancho, Hugo, Loida, Fayver, Rony), por todos los buenos momentos que compartimos y seguimos compartiendo, por ser mis guías en el transcurso de la carrera y por apoyarme en todo momento. Sepan que hay un inmenso cariño para cada uno de ustedes.

Al Departamento de Análisis Inorgánico, en especial a la Licda. Bessie Oliva, por su cariño, sus regaños y consejos. Gracias por permitirme ser auxiliar y vivir una de las experiencias más lindas de mi vida.

A los profesores Licda. Julieta de Pezzarossi (†), Licda. Bessie Oliva, Lic. Ricardo Véliz, Lic. Jhonny Álvarez (†), Lic. Oswaldo Martínez, Licda. Nohemí Orozco, Licda. Idolly Carranza, Lic. Omar Velázquez, Lic. Eduardo Robles. Por sus enseñanzas tanto académicas como en la vida.

Al Personal de RGH desde sus inicios hasta el día de hoy.

A la familia Amorín Cabrera, por todo su cariño, consejos, alegrías, apoyo y por darme un segundo hogar.

A Issa, por ser mi amiga, mi cómplice, mi motor. Sos la pieza que le faltaba a mi rompecabezas y la estrella que ilumina mi mundo. Tu amor, tu apoyo y todo lo lindo que le traes cada día a mi vida, impulsó que este sueño se terminara de hacer realidad. ¡Gracias! Te amo.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Marco teórico	5
3.1. Ibuprofeno	5
3.1.1. Características Fisicoquímicas	5
3.2. Dextrometorfano Bromhidrato	6
3.2.1. Características Fisicoquímicas	6
3.3. Fenilefrina clorhidrato	6
3.3.1. Características Fisicoquímicas	7
3.4. Ácido Ascórbico	7
3.4.1. Características Fisicoquímicas	7
3.5. Antigripales	8
3.6. Cromatografía de Intercambio Iónico	9
3.6.1. Material de Relleno	10
3.6.2. Fase móvil	11
3.7. Parámetros de evaluación del método	11
3.7.1. Exactitud	11
3.7.2. Precisión	12
3.7.2.1. Repetibilidad	12
3.7.3. Linealidad	13
3.7.4. Límite de detección	13
3.7.5. Límite de cuantificación	13
3.7.6. Robustez	13
3.7.7. Rango	14
3.7.8. Especificidad	14
3.7.9. Resolución Cromatográfica	14
3.8. Antecedentes	14
4. Justificación	16
5. Objetivos	18
5.1. General	18
5.2. Específicos	18
6. Hipótesis	19
7. Materiales y métodos	20
7.1. Universo	20
7.2. Muestra	20
7.3. Recursos	20
7.3.1. Humanos	20
7.3.2. Materiales	20
7.3.2.1. Recursos institucionales	20
7.3.2.2. Instrumentos y equipos	21
7.3.2.3. Cristalería	21
7.3.2.4. Reactivos	21

7.4. Métodos	22
7.4.1. Implementación y afinación del método	22
7.4.1.1. Diseño de investigación	22
7.4.1.2. Condiciones cromatográficas	22
7.4.2. Procedimiento para el análisis del Dextrometorfano HBr y Fenilefrina HCl	23
7.4.2.1. Preparación fase móvil	23
7.4.2.2. Preparación solución patrón	23
7.4.2.3. Preparación de la muestra	24
7.4.3. Procedimiento para el análisis de Ibuprofeno y Ácido Ascórbico	24
7.4.3.1. Preparación fase móvil	24
7.4.3.2. Preparación de la solución patrón	25
7.4.3.3. Preparación de la muestra	26
7.4.4. Evaluación de la metodología	27
7.4.4.1. Exactitud	27
7.4.4.2. Repetibilidad	27
7.4.4.3. Precisión intermedia	28
7.4.4.4. Linealidad	28
7.4.4.5. Límite de detección	29
7.4.4.6. Límite de cuantificación	29
7.4.4.7. Robustez	30
7.4.4.7.1. Cambio de flujo	30
7.4.4.7.2. Cambio en la temperatura	30
7.4.4.7.3. Cambio en el largo de la columna	30
7.4.4.7.4. Rango	31
7.4.4.7.5. Especificidad	32
7.4.4.7.6. Eficiencia en la Separación	32
8. Resultados	33
8.1. Especificidad	33
8.2. Eficiencia de la separación	33
8.3. Exactitud	34
8.4. Repetibilidad	36
8.5. Precisión Intermedia	37
8.6. Linealidad	41
8.7. Límite de detección	45
8.8. Límite de cuantificación	46
8.9. Robustez	47
8.10. Rango	49
9. Discusión de Resultados	51
10. Conclusiones	55
11. Recomendaciones	56
12. Referencias	57
13. Anexos	59
13.1. Anexo No 1. Exactitud del Método	59
13.2. Anexo No 2. Repetibilidad del Método	67

13.3.	Anexo No 3. Presición Intermedia	75
13.4.	Anexo No 4. Linealidad del Método	91
13.5.	Anexo No 5. Robustez del Método	97

1. RESUMEN

El ibuprofeno, dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y ácido ascórbico, son combinados en preparaciones farmacéuticas, generalmente en medicamentos antigripales, por sus distintas actividades analgésicas, antipiréticas, antitusivas y descongestionantes para potenciar su acción terapéutica.

Debido a que las exigencias de los mercados y las buenas prácticas de manufactura que aseguran la calidad de los medicamentos son cada día más estrictas, la demanda en la calidad así como la necesidad de optimizar los procesos productivos han hecho necesario que se disponga de métodos analíticos rápidos, fiables y a un costo accesible (OGA, 2004).

Por lo mencionado anteriormente, este trabajo de investigación se desarrolló con el objetivo de evaluar un método para la determinación cualitativa y cuantitativa del ácido ascórbico, ibuprofeno, fenilefrina clorhidrato y dextrometorfano bromhidrato, en presentaciones farmacéuticas de un medicamento antigripal por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para ello se establecieron las condiciones cromatográficas adecuadas como lo son la fase móvil, el flujo y la temperatura para así obtener la mayor eficiencia en la separación de los analitos y especificidad en el cromatograma.

Ya establecidas estas condiciones se procedió a evaluar la exactitud, repetibilidad, precisión intermedia, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, robustez y rango del método. Los resultados obtenidos fueron comparados con los parámetros de aprobación dictados por la Pharmacopea de los Estados Unidos (2013) y la Oficina Guatemalteca de Acreditación (OGA).

Los resultados obtenidos son aceptables según los criterios estadísticos utilizados, el porcentaje de recuperación en la exactitud se encuentra dentro del rango de 96%-104%, el coeficiente de variación tanto para la repetibilidad como para la precisión del sistema es menor de 2%. La linealidad cumple con un coeficiente de determinación mayor a 0.9800 lográndose determinar los límites de detección, cuantificación y rango en base a ello. De esta forma se comprobó así que la metodología propuesta para la determinación de los analitos antes mencionados, cumple con todos los parámetros estadísticos necesarios para su correcto análisis cualitativo y cuantitativo.

2. INTRODUCCIÓN

Los antigripales son presentaciones farmacéuticas para aliviar los síntomas del resfriado, catarro o gripe común, entre ellos: estornudos, congestión y/o flujo nasal, lagrimeo, tos, fiebres leves, molestias musculares moderadas, dolor de cabeza e irritación de garganta. A pesar de ello no existe medicina que sea completamente eficaz contra esta enfermedad, pues además que puede ser causada por al menos 200 tipos distintos de virus, éstos mutan para adaptarse al sistema inmune del organismo (Heckman ,2009).

Los antigripales han logrado saciar la necesidad de disminuir los síntomas de la gripe, no obstante debido a que los virus mutan constantemente, cada vez son más las combinaciones de compuestos para aliviar los síntomas y es indispensable contar con un método que logre cuantificar acertadamente la cantidad en que se encuentra cada principio activo. La combinación de la presentación farmacéutica analizada contiene ibuprofeno, dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y ácido ascórbico. Estos compuestos además de no contar con una metodología propia para su análisis en conjunto; presentan características particulares que hacen que su análisis sea por demás interesante, son sensibles a ionización, degradación total si son sometidas a condiciones variables de pH, temperatura y oxidación (Arias, 1999).

Es viable analizar el ibuprofeno, dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y el ácido ascórbico por cromatografía líquida de alta resolución ya que el procedimiento es llevado a cabo a temperatura ambiente, no necesita derivatización y se utilizan reactivos e instrumentación básica. El desarrollo de la metodología para la cuantificación de dichos compuestos en presentaciones farmacéuticas es un proceso que conlleva varias etapas, iniciando por el tratamiento tanto de la muestra como de los estándares con disolventes tanto orgánicos como inorgánicos, para luego analizarlos por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y así obtener los resultados, seguido a ello se evaluó la metodología de análisis que se desarrolló, para ello dicha metodología se sometió a criterios analíticos de exactitud, precisión intermedia, repetibilidad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, rango, especificidad robustez y resolución cromatográfica, utilizando

patrones primarios trazables a NIST de cada principio a activo a analizar como referencia (Arias, 1999). Este procedimiento se llevará a cabo con el fin de contar con un método confiable y preciso para el análisis de antigripales que será de utilidad para laboratorios farmacéuticos y por ende para el desarrollo de Guatemala

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Ibuprofeno

Fue desarrollado por la división de investigación de Boots Group durante los años 1960. Fue descubierto por Stewart Adams junto con John Nicholson, Jeff Bruce Wilson, Andrew RM Dunlop y Colin Burrows y fue patentado en 1961. La droga fue lanzada como un tratamiento para la artritis reumatoidea en el Reino Unido en 1969, y en los Estados Unidos en 1974 (OMS, 2006).

Hoy en día es la cabeza de una serie de analgésicos-antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y su uso está indicado para el alivio sintomático de dolores ocasionales leves o moderados, como dolores de cabeza, dentales, menstruales, musculares o de espalda, así como estados febriles. (Davies, 1998). Forma parte del listado de la Organización Mundial de la Salud de medicamentos esenciales para el hombre (OMS, 2006).

3.1.1. Características Físicoquímicas

- Estado físico: Sólido
- Apariencia: Polvo fino
- Olor: Inodoro
- pKa: 4.91
- Punto de fusión: 76°C
- Solubilidad: poco soluble en agua, muy soluble en acetonitrilo y metanol.
- Fórmula molecular: $C_{13}H_{18}O_2$
- Peso molecular: 206.29 g/mol

3.2. Dextrometorfano Bromhidrato

Está incluido en el grupo de analgésicos disociativos. El dextrometorfano es el d-isómero del análogo del levofaból, se utiliza como fármaco antitusígeno, tratamiento sintomático de todas las formas improductivas de tos (tos irritativa, tos nerviosa). Tiene una acción inhibitoria específica y pronunciada, sobre la irritación del centro de la tos, por lo que es eficaz frente diversas formas de tos. No tiene acción narcótica ni analgésica en las dosis recomendadas para tratar la tos, la droga es segura y eficaz (OMS, 2006).

3.2.1. Características Fisicoquímicas

- Estado físico: Sólido
- Apariencia: polvo color blanco
- Olor: Inodoro
- pKa: 9.85
- Punto de fusión: 111°C
- Solubilidad: Muy soluble en alcohol; fácilmente soluble en metanol y ácido acético glacial; ligeramente soluble en agua
- Fórmula molecular: $C_{18}H_{25}NO \cdot HBr$
- Peso molecular: 352 g/mol

3.3. Fenilefrina Clorhidrato

Se utiliza para el mantenimiento de la presión sanguínea y como descongestivo nasal, esclero conjuntival y uveal. También se utiliza como agente midriático y para aumentar el flujo de salida del humor acuoso en el tratamiento de glaucoma de ángulo abierto. Sus propiedades vaso constrictoras determinan que se incluya en preparaciones anestésicas locales o espinales para prolongar la acción de estos compuestos. Es activo por vía oral (OMS, 2006).

3.3.1 Características Fisicoquímicas

- Estado físico: Sólido
- Apariencia: polvo color blanco
- Olor: Característico
- pKa: 8.97
- Punto de fusión: 140-145 °C
- Solubilidad: Muy soluble en agua, fácilmente soluble en alcohol, casi insoluble en éter dietílico.
- Fórmula molecular: $C_9H_{13}NO_2 \cdot HCl$
- Peso molecular: 203.67 g/mol

3.4. Ácido Ascórbico

En 1757 James Lind publicó *A Treatise of the Scurvy*, libro en el que demostraba el espectacular efecto beneficioso de los frutos cítricos sobre los enfermos. Aunque tardó algunos años en aceptarse y aplicarse en la práctica, este hallazgo, generalizable en mayor o menor medida a todos los vegetales frescos, terminó con el escorbuto como enfermedad carencial (OMS, 2006).

Es una vitamina hidrosoluble, y como tal puede perderse por lixiviación. En esta pérdida influye mucho la superficie de contacto, de modo que se pierde con mayor facilidad en alimentos que tienen más superficie relativa, como los vegetales foliáceos o los alimentos troceados. Por otra parte, el mantenimiento de estructuras protectoras durante el cocinado (la piel de las patatas, por ejemplo) la protegen de la oxidación y de otras alteraciones (OMS, 2006).

3.4.1 Características Fisicoquímicas

- Estado físico: Sólido
- Apariencia: polvo color blanco
- Olor: Característico

- pKa: 4.7
- Punto de fusión: 191°C
- Solubilidad: Fácilmente soluble en agua, ligeramente soluble en alcohol, casi insoluble en cloroformo y en éter dietílico.
- Fórmula molecular: C₆H₈O₆
- Peso molecular: 176.12 g/mol

3.5 Antigripales

Preparaciones farmacéuticas que alivian los síntomas del resfriado, catarro o gripe común, entre ellos: estornudos, congestión y/o flujo nasal, lagrimeo, tos, fiebres leves, molestias musculares moderadas, dolor de cabeza e irritación de garganta (OMS, 2006).

Los antigripales incluyen componentes que pertenecen a distintas familias. Éstos son:

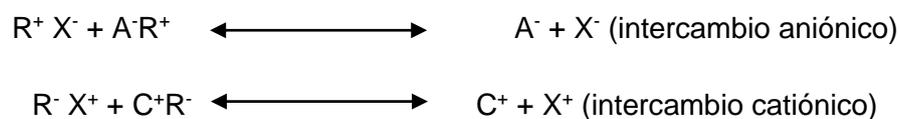
- Analgésicos y antipiréticos: Los más utilizados son ácido acetilsalicílico, acetaminofén (paracetamol), ibuprofeno o diclofenaco, y sirven para eliminar dolor muscular y de cabeza, malestar general, temperatura elevada e inflamación de garganta.
- Descongestionantes: Disminuyen el flujo de sangre en las vías respiratorias superiores (nariz y garganta), por lo que reducen la inflamación y producción de mucosidad en dicha zona. En este grupo se encuentran sustancias que se administran por vía oral y otras que se aplican en la mucosa nasal, a través de sprays; Los más empleados son imidazolina, xilometazolina, oximetazolina, nafazolina y antazolina.
- Antihistamínicos: Bloquean la acción de la histamina, que es una sustancia segregada por el organismo como parte de su reacción de defensa, pero también es la responsable de escurrimiento nasal, lagrimeo, estornudos y dolor de cabeza. Son la mejor elección en pacientes con resfriado común e historia de alergias respiratorias, como rinitis (inflamación de las mucosas nasales). Dentro de estos compuestos encontramos loratadina, pseudoefedrina, fenilefrina, clorfenamina y bromfeniramina, todos ellos útiles para reducir problemas como generación excesiva de moco, ojos llorosos y cosquilleo en la nariz, pero también en inflamación, congestión y dolor en los senos paranasales.

Otros compuestos menos usados en antigripales, pero igualmente efectivos para aliviar los síntomas del catarro común, son:

- Vitaminas A, C y D. Nutrientes de gran relevancia para fortalecer al sistema de defensas del organismo.
- Dextrometorfano. Inhibe la tos.
- Cafeína. Estimula al sistema nervioso

3.6 Cromatografía de Intercambio Iónico

En la cromatografía de intercambio iónico (IEC), la fase estacionaria contiene grupos funcionales iónicos y retienen el soluto, de características iónicas pero de signo opuesto, intercambiándolo en un proceso reversible con la fase móvil. El proceso se denomina de intercambio aniónico si el analito tiene carga negativa y catiónico si el analito tiene carga positiva (Quatrocci, 1992).

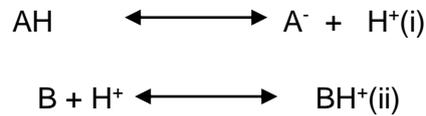


Donde R (\pm) representa el intercambio iónico, X(\pm) al contraión de la fase móvil, con la carga correspondiente, C⁺ y A⁻ al analito, catiónico y aniónico respectivamente.

La retención se debe a dos procesos independientes, en primer lugar, a una reacción reversible entre el soluto y el grupo cargado de la fase estacionaria (intercambio iónico) y en segundo lugar, a una distribución del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria (Quatrocci, 1992).

En el proceso de intercambio, el contraión en la fase estacionaria (X en las ecuaciones propuestas) compite con el soluto por los sitios de intercambio de la fase estacionaria y su concentración, por efecto del ión común, será uno de los determinantes de la fuerza de elusión de la fase móvil. (Quatrocci, 1992)

Según el pH del medio, las especies iónicas coexistirán en su forma iónica y no iónica, las siguientes ecuaciones muestran el equilibrio para ácidos o bases y sus sales:



La concentración de las especies en equilibrio depende de su pKa y del pH del medio y puede estimarse por la ecuación de Henderson-Hasselbalch. Así la separación IEC, está regulada, para una base por la ecuación (ii) y para un ácido por la ecuación (i). Estas ecuaciones incorporan un valor "C", correspondiente a la distribución del analito entre la fase móvil y la fase estacionaria. Si la única variable del sistema es el pH, "C" puede ser ignorado (Quatrocci, 1992).

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{B}]}{[\text{BH}^+]} + \text{C}$$

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{AH}]} + \text{C}$$

Dado que el intercambio se produce sólo con la forma iónica, el pH, es la primera variable a ajustar en la IEC de compuestos ionizables. La segunda variable está dada por la concentración de la solución amortiguadora y eventualmente una sal agregada (Quatrocci, O.A., 1992).

3.6.1. Materiales de Relleno

Los intercambiadores aniónicos contienen grupos ionogénicos fuertemente o débilmente ácidos. Los intercambiadores catiónicos contienen grupos ionogénicos fuertemente o débilmente básicos (Quatrocci, 1992).

Los intercambiadores de mayor difusión son los fuertes (aniónicos o catiónicos), porque se encuentran disociados en todo el rango de pH. Los intercambiadores débiles sólo actúan como tales en aquellos rangos de pH que aseguran su disociación. Sin embargo estos últimos son preferidos en aquellos casos en los cuales el intercambiador fuerte puede provocar retenciones muy acentuadas o irreversibles (Quatrocci, 1992).

La retención del soluto y la capacidad de la carga de la columna IEC dependen de la capacidad del intercambiador (Quatrocci, 1992).

3.6.2. Fase Móvil

La fase móvil en IEC es, en general, una solución acuosa de pH y fuerza iónica controlados por medio de una solución amortiguadora y puede tener cantidades moderadas (habitualmente no más de 30%) de un modificador orgánico, metanol o acetonitrilo (Quatrocci, 1992).

Durante la retención participan 2 procesos: intercambio iónico (sobre el cual influye el pH y la fuerza iónica) y partición entre las fases en equilibrio (la fase móvil y estacionaria). Sobre este segundo mecanismo actúan los modificadores orgánicos que permiten un control adicional sobre la retención (a mayor concentración de modificador, menor retención) y sobre selectividad (Quatrocci, 1992).

3.7 Parámetros de evaluación del método

3.7.1 Exactitud

Es el grado de concordancia entre el resultado de una determinación o la media de “n” resultados y el valor verdadero del analito en la muestra. Puede expresarse en forma absoluta o de forma relativa en porcentaje (OGA, 2004).

La exactitud puede referirse a solo un resultado; en este caso es la diferencia entre dicho resultado y el valor verdadero. También puede asociarse a un método, para esto se utiliza la media de los “n” resultados obtenidos para el mismo método aplicado a distintas alícuotas de la misma muestra (OGA, 2004).

La exactitud se expresa como un porcentaje de recuperación de la cantidad de analito presente en la muestra o bien en forma de diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero (OGA, 2004).

3.7.2 Precisión

Es el grado de concordancia entre un grupo de resultados que se obtienen al aplicar repetitiva e independientemente el mismo método analítico a alícuotas distintas de la misma muestra. De esta manera salta a la vista la dispersión de resultados entre sí y con respecto a su media (OGA, 2004).

La precisión es aplicable a un resultado individual, al conjunto de resultados y a la media de los mismos. Cuando se relaciona a un resultado individual coincide con el error sistemático y puede ser aleatoriamente por exceso o por defecto. Las magnitudes que caracterizan la precisión de un conjunto de resultados se basan en los parámetros estadísticos basados en las distribuciones normales o gaussianas (OGA, 2004).

3.7.2.1 Repetibilidad

Es la dispersión de resultados de ensayos mutuamente independientes, utilizando la misma muestra, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, usando el mismo equipamiento en un intervalo corto de tiempo. Es una medida de la variabilidad (varianza) interna y un reflejo de la máxima precisión que el método pueda alcanzar (OGA, 2004).

La repetibilidad puede ser expresada cuantitativamente en términos de los parámetros de dispersión de los resultados (desviación estándar, varianza, coeficiente de variación). A la repetibilidad también se le conoce como precisión intra-ensayos o intra-calibraciones (OGA, 2004).

3.7.3 Linealidad

Dentro de este término se incluye la proporcionalidad entre concentraciones de analito y respuesta, así como el intervalo o rango de concentraciones de analito para los cuales el método es satisfactorio. Se entiende como linealidad a la capacidad de un método analítico de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración de analito en la muestra, dentro de un intervalo determinado (OGA, 2004).

3.7.4 Límite de detección

Es una propiedad analítica asignable a un método analítico, que expresa su capacidad para discernir entre concentraciones semejantes de un mismo analito, o su capacidad para poder detectar o determinar pequeñas concentraciones de analito en una muestra. Es la concentración de analito que origina una señal que puede diferenciarse estadísticamente de la señal del blanco (OGA, 2004).

3.7.5 Límite de cuantificación

Mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con precisión y exactitud aceptable. Es un parámetro del análisis cuantitativo para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra y se usa particularmente para la determinación de impurezas y productos de degradación (OGA, 2004).

3.7.6 Robustez

Capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método. Provee una indicación de su confiabilidad en condiciones de uso normales (OGA, 2004).

3.7.7 Rango

Intervalo entre el valor máximo y mínimo de la concentración del analito y el parámetro de la muestra, para el cual ha sido demostrado que el nivel de precisión, exactitud y linealidad del método de análisis es adecuado (OGA, 2004).

3.7.8 Especificidad

Es la habilidad de un método para responder exclusivamente a la sustancia que se desea analizar. Sin embargo, en algunas ocasiones se aceptan métodos con una pobre especificidad cuando el propósito del análisis es captar compuestos similares dentro de un grupo (OGA, 2004).

La especificidad se refiere a la propiedad del método de producir una señal medible debida sólo a la presencia del analito, libre de interferencia de otros componentes en la matriz de la muestra (OGA, 2004)

3.7.9 Resolución Cromatográfica

La resolución cromatográfica " R_s " de una columna, constituye una medida cuantitativa de su capacidad para separar dos analitos. En este término si se toma en cuenta el ensanchamiento de los picos, así que la magnitud de este valor si permite asegurar la separación de dos picos (Quatrocci, 1992).

3.8. Antecedentes

En la investigación de Ramazzini (2008) sobre la validación de un método de cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de cipermetrina presente en pesticidas de uso doméstico de marcas comerciales, se buscó contar con un método fiable para la determinación de cipermetrina ya que este compuesto presenta toxicidad para los seres humanos. Para ello se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución y se evaluó la especificidad, linealidad, precisión, exactitud, sensibilidad y robustez del método. Se concluyó que el método utilizado no es preciso y no presenta buena exactitud, aunque si posee una buena linealidad y es una metodología flexible y robusta, pero la metodología presentada no es válido para la

cuantificación de la cipermetrina en pesticidas de uso doméstico en un rango comprendido entre 1.00 mg/ml y 2.100 mg/ml de cipermetrina.

En la investigación de García (2008) sobre la validación de un método para la cuantificación simultánea de vitaminas A y E en margarinas por cromatografía líquida de alta resolución, se buscó contar con un método fiable para la determinación de Vitaminas A y E en margarinas debido a la inexistencia de la metodología. Para ello se evaluó la precisión, repetibilidad, reproducibilidad, exactitud, linealidad, límite de cuantificación, límite de detección, rango, selectividad y robustez, concluyendo que la metodología analizada es válida para la cuantificación de la vitamina A en margarina para un rango entre 40 a 60 UI de vitamina A por gramo de margarina.

López (2011) implementó un método para la determinación de beta caroteno en harina comercial de zanahoria por cromatografía líquida de alta resolución, ya que la harina de zanahoria es comúnmente utilizada en Guatemala como producto de consumo humano así como suplemento alimenticio para ganado bovino y otros animales. Para ello se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución y se evaluó la precisión intermedia, repetibilidad, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, sensibilidad y rango. Se concluyó que el método era útil para la determinación de beta caroteno ya que cumplió satisfactoriamente los criterios de los parámetros evaluados.

En la investigación de Anleu (2000) sobre la validación del método por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de ibuprofeno en suspensión, se buscó cuantificar ibuprofeno en preparaciones pediátricas en suspensión. El método cumplió con los parámetros de especificidad, exactitud, precisión del método, precisión del sistema, linealidad y robustez.

4. JUSTIFICACIÓN

Las exigencias de los mercados y las buenas prácticas de manufactura que aseguran la calidad de los medicamentos son cada día más estrictas, por lo que las empresas farmacéuticas enfrentan escenarios cada día más competitivos. Esta demanda en la calidad así como la necesidad de optimizar los procesos productivos ha hecho necesario que se dispongan de métodos analíticos rápidos, fiables y a un costo accesible (OGA, 2004).

Actualmente el desarrollo de métodos analíticos soportados por suficientes datos de laboratorio y una estadística bien documentada es una herramienta de competencia de mercado y es además en muchas ocasiones una obligación.

El ibuprofeno, dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y ácido ascórbico, son combinados en preparaciones farmacéuticas por sus distintas actividades analgésicas, antipiréticas, antitusivas y descongestionantes para potenciar su acción terapéutica. En Guatemala estos medicamentos son producidos por varias empresas farmacéuticas por lo que es necesario que cuenten con una metodología adecuada para su cuantificación, ya que ninguna de las publicaciones recientes de la Farmacopea de Estados Unidos USP, Farmacopea Europea y la Farmacopea Mexicana cuentan con dicha metodología y la información que se encuentra en internet es limitada además de no presentar datos concretos. Por ello, en la presente investigación se implementó una metodología que permitió cuantificar y separar de una forma rápida, eficaz y económicamente viable dichos compuestos (European Pharmacopea, 2011; Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 2004).

Las decisiones que se toman en un laboratorio analítico están basadas en los datos que se obtienen de un método analítico, de esto la necesidad de que los laboratorios demuestren que sus métodos analíticos son confiables y que arrojan resultados estadísticamente correctos. El desarrollo del método así como su análisis

estadístico, junto a otras actividades de calidad permiten mostrar a los laboratorios que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables.

Con base a la norma ISO/IEC 17025, los laboratorios deben corroborar que los métodos que se utilicen en el laboratorio, ya sea procedentes de fuentes bibliográficas o desarrollados en el laboratorio, hayan pasado procesos estadísticos como exactitud, precisión, repetibilidad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, rango, especificidad robustez y resolución cromatográfica. .La estadística es la herramienta principal para soportar el proceso de desarrollo de un método ya que nos permitirá tomar decisiones (OGA, 2004).

5. OBJETIVOS

5.1 General

Desarrollar una metodología para la determinación cualitativa y cuantitativa de ibuprofeno, dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y ácido ascórbico presentes en una preparación farmacéutica de gelatina blanda por medio de cromatografía líquida de alta resolución.

5.2 Específicos

5.2.1 Evaluar la eficiencia de separación por medio de cromatografía líquida de alta resolución de los principios activos ibuprofeno, dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y ácido ascórbico que se encuentran presentes en una preparación farmacéutica de gelatina blanda evaluadas con diferentes proporciones de la fase móvil.

5.2.2 Evaluar los parámetros de exactitud, precisión, precisión intermedia, repetibilidad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, rango, especificidad y robustez en la metodología propuesta.

6. HIPÓTESIS

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando una columna de intercambio iónico, permite la determinación en conjunto de ibuprofeno, dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y ácido ascórbico presentes en una preparación farmacéutica de gelatina blanda, de forma cualitativa y cuantitativa.

7. MATERIALES Y METODO

7.1 Universo

El método propuesto al cual se le determinará la exactitud, precisión intermedia, repetibilidad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, rango, especificidad robustez y resolución cromatográfica

7.2 Muestra

Presentaciones farmacéuticas de gelatina blanda

7.3 Recursos

7.3.1 Humanos

Autor: Álvaro Javier García López

Asesor: MSc. Ricardo Véliz

Co-asesor: Lic. Jorge García

Personal de Empresa RGH, S.A.

7.3.2 Materiales

7.3.2.1 Recursos Institucionales

Empresa RGH, S.A.

7.3.2.2 Instrumentos y Equipo

- Balanza analítica Sartorius (0.0001 g)
- Equipo de filtración para solventes y filtros de membrana (0.2µm)
- Cromatógrafo para Cromatografía Líquida de Alta Resolución HITACHI Lachrom Elite.
- Bomba: HITACHI Lachrom Elite L-2130
- Automuestreador: HITACHI Lachrom Elite L-2200
- Detector: HITACHI UV-VIS modelo Lachrom Elite L-2400
- Horno: HITACHI modelo Lachrom Elite L-2350
- Columna: Macherey-Nagel EC 250/4 Nucleosil 100-5 SA

7.3.2.3 Cristalería

- Matraz aforado de 10, 50 y 100 ml.
- Vaso de precipitados de 50, 100 y 250 ml
- Varilla de vidrio
- Pipetas volumétricas de 0.5, 1, 2, 3, 5 y 10 ml
- Viales con septos

7.3.2.4 Reactivos

- Fosfato monobásico de potasio p.a. (Merck)
- Acetonitrilo HPLC Isocraticolichrosolv® (Merck)
- Agua para cromatografía Lichrosolv (Merck)
- Patrón primario Fenilefrina HCl (Pureza 99.5%)
- Patrón primario Dexametorfano HBr (Pureza 99.5%)
- Patrón primario Ibuprofeno (Pureza 99.5%)
- Patrón primario Ácido Ascórbico (Pureza 99.9%)

7.4 Métodos

7.4.1 Implementación y afinación del método

7.4.1.1 Diseño de Investigación

La determinación de ibuprofeno, dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y ácido ascórbico en una presentación farmacéutica de gelatina blanda por medio de un método desarrollado en el laboratorio, corresponde a una investigación experimental de tipo descriptiva, en la que se realizarán las mediciones tanto de patrones primarios de ibuprofeno, dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato, y ácido ascórbico en combinaciones ibuprofeno/ácido ascórbico (a) y fenilefrina clorhidrato/dextrometorfano bromhidrato (b), así como de éstos compuestos presentes en las presentaciones farmacéuticas de gelatina blanda, determinando el grado de adecuación del método. El grado de aceptación se evaluará por medio de distintos parámetros: exactitud, precisión, repetibilidad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, rango, especificidad, robustez y resolución cromatográfica.

7.4.1.2 Condiciones cromatográficas:

Probar las condiciones cromatográficas que se describen a continuación:

Fase Móvil

- a) Buffer de fosfato monobásico de potasio: Acetonitrilo (50:50)
- b) Buffer de fosfato monobásico de potasio: Acetonitrilo en gradiente de 70:30 a 50:50

Columna: Macherey-Nagel EC 250/4 Nucleosil 100-5 SA

Detector: Ultravioleta a 220 nm

Volumen de inyección: 20µL

Flujo: 2.0 mL/minuto

Temperatura del horno: 30°C

Referencia:(Pharmacopoea, 2013)

7.4.2 Procedimiento para el Análisis Dextrometorfano Bromhidrato y Fenilefrina Clorhidrato

7.4.2.1 Preparación Fase Móvil

Disolución de fosfato monobásico de potasio

- Pesar 2.72 g de fosfato monobásico de potasio grado analítico
- Colocarlo en un balón volumétrico de 1000 ml
- Diluir a volumen con agua grado HPLC.

Tabla No. 1

Acondicionamiento de Columna

TIEMPO Minutos	% B Agua HPLC	% C KH₂PO₄	% D Acetonitrilo HPLC
0	0	0	100
10	50	0	50
20	50	0	50
30	0	50	50
60	0	50	50

7.4.2.2 Preparación de Disoluciones Patrón

Estándar individual de dextrometorfano bromhidrato

- Pesar exactamente 50.00 mg de dextrometorfano bromhidrato patrón primario.
- Colocarlo en un balón volumétrico de 50.0 ml
- Disolver con diluyente y aforar con el mismo solvente.

Estándar individual de fenilefrina clorhidrato

- a) Pesar exactamente 50.00 mg de fenilefrina clorhidrato patrón primario.
- b) Colocarlo en un balón volumétrico de 50.0 ml
- c) Disolver con diluyente y aforar con el mismo solvente.

Estándar combinado de dextrometorfano bromhidrato y fenilefrina clorhidrato

- a) En un balón volumétrico de 10 ml agregar 2.0 ml del estándar individual de dextrometorfano y 1.0 ml del estándar individual de fenilefrina.
- b) Aforar con diluyente.
- c) Las concentraciones finales del estándar son 200.00 µg/ml de dextrometorfano y 100.00 µg/ml de fenilefrina.

7.4.2.3 Preparación de la muestra

- a) Pesar individualmente 20 cápsulas de gelatina blanda de marca comercial que contienen las sustancias de interés.
- b) Extraer el contenido de las 20 cápsulas y lavar con etanol al 95% las cápsulas vacías.
- c) Obtener el peso de las cápsulas vacías y determinar el contenido neto promedio de cada cápsula por diferencia con el peso inicial.
- d) Pesar lo más exactamente posible el contenido promedio de una cápsula en un balón volumétrico de 100.0 ml.
- e) Disolver con diluyente y aforar a volumen con el mismo solvente.

7.4.3 Procedimiento para el Análisis de Ibuprofeno y Ácido Ascórbico**7.4.3.1 Preparación Fase Móvil****Disolución de fosfato monobásico de potasio:**

- a) Pesar 2.72 g de fosfato monobásico de potasio grado analítico
- b) Colocarlo en un balón volumétrico de 1000 ml
- c) Diluir a volumen con agua HPLC.

Tabla No 2

Acondicionamiento de Columna

TIEMPO Minutos	% B Agua HPLC	% C KH₂PO₄	% D Acetonitrilo HPLC
0	0	0	100
10	70	0	30
20	70	0	30
30	0	70	30
60	0	70	30

7.4.3.2 Preparación de Disoluciones Patrón**Estándar individual de ibuprofeno**

- Pesar exactamente 50.00 mg de Ibuprofeno patrón primario.
- Colocarlo en un balón volumétrico de 50.0 ml
- Disolver con diluyente y aforar a volumen con el mismo solvente.

Estándar individual de ácido ascórbico

- Pesar exactamente 100.00 mg de ácido ascórbico patrón primario.
- Colocarlo en un balón volumétrico de 50.0 ml
- Disolver con diluyente y aforar a volumen con el mismo solvente.

Estándar combinado de ibuprofeno y ácido ascórbico

- En un balón volumétrico de 50.0 ml agregar 10.0 ml de solución de estándar individual de ibuprofeno y 1.25 ml de solución de estándar individual de ácido ascórbico.
- Aforar con diluyente.
- La concentración final conocida de la solución es de 200.00 µg/ml de Ibuprofeno y 50.00 µg/ml de ácido ascórbico.

7.4.3.3 Preparación de la muestra

- a) Pesar individualmente 20 cápsulas de gelatina blanda comercial.
- b) Extraer el contenido de las 20 cápsulas y lavar con etanol al 95% las cápsulas vacías.
- c) Obtener el peso de las cápsulas vacías y determinar el contenido neto promedio de cada cápsula por diferencia con el peso inicial.
- d) Pesar lo más exactamente posible el contenido promedio de una cápsula en un balón volumétrico de 100.0 ml.
- e) Disolver con diluyente y aforar a volumen con el mismo solvente.
- f) Tomar una alícuota de 1.0 ml de esta solución y colocarla en un balón volumétrico de 10.0 ml.
- g) Aforar con diluyente.

Tabla No 3

Gradiente de la Bomba

El siguiente gradiente se debe aplicar a cada inyección:

TIEMPO Minutos	% B Agua HPLC	% C KH₂PO₄	% D Acetonitrilo HPLC	Flujo (ml/min)
0	0	70	30	2.0
2.0	0	70	30	2.0
5.0	0	50	50	2.0
26.0	0	50	50	2.0
28.0	0	70	30	2.0
29.0	0	70	30	2.0

7.4.4 Evaluación de la metodología

7.4.4.1 Exactitud

Preparar soluciones estándar con concentraciones de 80, 100 y 120% de la concentración esperada para las muestras disolviendo con fase móvil. Inyectar cada una de las soluciones por triplicado y obtener el porcentaje de recuperación para cada una de las nueve inyecciones y la desviación estándar relativa o porcentaje de coeficiente de variación (RDS) de todas las mediciones. Para obtener la RDS utilizar la siguiente Fórmula:

$$\%RSD = \frac{s \cdot 100}{\bar{X}}$$

Donde “s” es la desviación típica de todas las mediciones y “ \bar{X} ” es el promedio de todas las mediciones. Luego obtener el promedio de todos los porcentajes de recuperación (R) y someter los datos a una prueba de hipótesis de t de student, a dos colas y con un nivel de significancia del 5%. Siendo la Hipótesis nula (H_0): $\mu = 100\%$ y la hipótesis alterna (H_a): $\mu \neq 100\%$ (Miller, 2002).

Los criterios de aceptación serán:

- Porcentaje de recuperación: 96.0 a 104% (Pharmacopea, 2013)
- Coeficiente de variación menor a 2.0% (Pharmacopea, 2013)

7.4.4.2 Repetibilidad:

Utilizar un estándar de concentración conocida dentro del rango analítico (98 – 102 % p/v) y medir la concentración del analito 10 veces, realizar las mediciones bajo las mismas condiciones. Calcular el promedio y desviación estándar, con estos datos la repetibilidad puede establecerse por medio del coeficiente de variación, el cual no debe ser mayor a un porcentaje preestablecido, según se indica a continuación:

- Coeficiente de variación menor al 2.0% (Pharmacopea, 2013)

7.4.4.3 Precisión intermedia:

Utilizando las mismas condiciones cromatográficas (el mismo aparato, la misma columna) trabajando dos analistas distintos en el mismo día:

Preparar un estándar de concentración 100% e inyectarlo 10 veces.

Preparar muestra de cápsula de gelatina blanda comercial e inyectarla 10 veces.

Criterio de aceptación

- Coeficiente de variación menor al 2.0% entre los resultados de ambos analistas. (Pharmacopea, 2013)
- Análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 5%

7.4.4.4 Linealidad

Se preparan cinco soluciones estándar que tengan concentraciones de 80, 90, 100, 110 y 120 % de la concentración esperada para las muestras, utilizando fase móvil como solvente. Hacer tres inyecciones de cada solución. Obtener el área de las inyecciones de cada solución y graficar contra la concentración de cada una, obteniendo así la curva de calibración. Luego determinar la pendiente y el intercepto de la curva de calibración así como el coeficiente de determinación r^2 mediante un análisis de regresión lineal simple. Para que sea aceptable se deben evaluar dos parámetros, el valor de r^2 y el análisis de varianza con un nivel de significancia del 5%. El valor r^2 establece la cantidad de variación explicada por el modelo lineal en función de la variabilidad total y ese valor debe ser mayor a 0.9800 para ser aceptado. El análisis de varianza se utiliza para determinar si la ecuación lineal obtenida anteriormente es significativa (Miller, 2002).

Los criterios de aceptación serán:

- El coeficiente de variación menor a 2.0% (Pharmacopea, 2013)
- El coeficiente de determinación mayor a 0.9800 (OGA)
- Análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 5%

7.4.4.5 Límite de detección:

El cálculo del límite de detección puede realizarse utilizando los valores obtenidos de la curva de calibración en el cálculo de la linealidad de la metodología. Primero se debe obtener el error estadístico $S_{(y/x)}$, que estima los errores aleatorios de los valores de “y” en la curva de calibración. El valor del error estadístico se determina con el siguiente modelo:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

En donde “ y_0 ” es el valor experimental de “y” a partir del cual se determina la concentración de x_0 , los otros símbolos mantienen su significado habitual. El valor de “n” será de 15 ya que serán 5 puntos en la curva y se hará por triplicado. El cálculo del valor de “s” en el límite de detección viene dado por:

$$LOD = y_b + 3.3 \cdot S_{y/x}$$

Donde “ y_b ” corresponde al valor de la ordenada en el origen (o valor del blanco) obtenido de la curva de calibración y donde $S_{(y/x)}$ es el error estadístico. Con esta ecuación se obtiene el valor de “y” en el límite de detección por lo que solo se sustituye este valor de la curva de calibración (obtenida al calcular la linealidad) y se obtiene la concentración del límite de detección (Miller, 2002).

7.4.4.6 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación se calcula de forma similar al límite de detección. La única diferencia radica en la forma de obtener el valor de “y” en el límite de cuantificación, ya que está dado por:

$$LOQ = y_b + 10 \cdot S_{y/x}$$

Luego se calcula de la misma forma la concentración del límite de cuantificación (Miller, 2002).

7.4.4.7 Robustez

Se escogen tres parámetros principales como el cambio de flujo, cambio en la temperatura de la columna durante el análisis y del largo de la columna.

7.4.4.7.1 Cambio de flujo: preparar una muestra por triplicado estableciendo el flujo 1.9 mL/min. Hacer tres inyecciones y determinar la concentración promedio y la desviación estándar relativa. Luego cambiar el flujo subiendo este a 2.1 mL/min. Hacer tres inyecciones y determinar la concentración promedio y desviación estándar relativa. Para que el método sea robusto en un cambio de flujo, la desviación estándar relativa entre las medidas de los dos valores obtenidos debe ser menor al 2%.

7.4.4.7.2 Cambio en la temperatura: preparar una muestra por triplicado estableciendo la temperatura del horno a 25°. Hacer tres inyecciones y determinar la concentración promedio y la desviación estándar relativa. Luego cambiar la temperatura del horno subiendo está a 35°C. Hacer tres inyecciones y determinar la concentración promedio y desviación estándar relativa. Para que el método sea robusto en un cambio de temperatura, la desviación estándar relativa entre las medidas de los dos valores obtenidos debe ser menor al 2%.

7.4.4.7.3 Cambio de largo de columna: preparar una muestra por triplicado. Hacer tres inyecciones en la columna que describe el método de 300 mm y determinar la concentración promedio y la desviación estándar relativa. Luego cambiar la columna y colocar una columna con las mismas especificaciones pero columna de longitud de 100 mm. Hacer tres inyecciones y determinar la concentración promedio y desviación estándar relativa. Para que el método sea robusto en un cambio de columna, la desviación estándar relativa entre las medidas de los dos valores obtenidos debe ser menor al 2%.

7.4.4.7.4 Rango

Para determinar el rango de una metodología primero se determina el límite de cuantificación y este se toma como el inicio del rango del método. Para obtener el límite superior del rango se preparan soluciones de 80, 100, 110, 120 % (de ser necesario se preparan soluciones de concentración superior aumentando un 25% la concentración cada vez) de la concentración esperada de la muestra. Se inyecta por triplicado cada solución, evaluando la linealidad y repetibilidad de cada solución antes de inyectar la siguiente. El límite superior del rango está dado por la última concentración que cumpla con los requisitos de linealidad y repetibilidad. Para ello se calcula el error aleatorio de cada concentración para los valores teóricos, el cual viene dado por:

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{m} \cdot \sqrt{\frac{1}{r} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{m^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

En donde m es la pendiente de la regresión, r es el número de repeticiones por muestra, n es el número de concentraciones a evaluar y y_0 es la absorbancia teórica calculada a partir de la ecuación de la regresión lineal.

Aprovechando la homocedasticidad de la curva, se utilizan los valores S_{x_0} como las desviaciones estándar de cada concentración para calcular el estadístico F . Este último se compara con un F crítico en el caso de cada una de las concentraciones para determinar el límite superior del rango. El estadístico F se calcula utilizando la siguiente expresión:

$$F = \frac{S_{x_0(i)}}{S_{x_0(\min)}}$$

En donde $S_{x_0(i)}$ es la desviación estándar hallada para la concentración i y $S_{x_0(\min)}$ es el valor más pequeño hallado entre todas las desviaciones estándar, representando esta el punto de menor variación dentro de la curva.

7.4.4.7.5 Especificidad

Se determinará la especificidad del método, inyectando concentraciones conocidas de los estándares y se verificará que el ruido no sea mayor a 100rms y sólo debe aparecer el pico de la muestra y los característicos de la fase móvil.

$$RMS_{Ruido} = \left[\frac{\sum_{i=1}^n (E_i - \bar{E})^2}{n - 1} \right]^{\frac{1}{2}}$$

En donde E_i es el voltaje individual de medición y \bar{E} es el promedio de las “n” medidas.

7.4.4.7.6 Eficiencia en la Separación

La eficiencia de la separación, será medida utilizando la resolución cromatográfica, la cual será calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$R_S = \frac{t_2 - t_1}{\frac{1}{2} \cdot (w_1 + w_2)}$$

Donde w_1 y w_2 son la anchura de cada pico.

Un valor de resolución de 1.5 o mayor entre dos o más picos asegura que los componentes de la mezcla se separaron adecuadamente- al grado de que el área y la altura de cada pico pueden ser medidas sin que interfieran unos de otros.

Criterio de aceptación:

Resolución mayor a 1.5 (Pharmacopea, 2013)

8. RESULTADOS

8.1 Especificidad

Tabla No 4. Condiciones de trabajo para especificidad del método

RMS
<50

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

8.2 Eficiencia de la Separación

Tabla No 5. Eficiencia de la separación entre el Ibuprofeno y el Ácido Ascórbico

	Tiempo de Retención	Ancho de pico
Ácido Ascórbico	0.90	0.2
Ibuprofeno	1.25	0.2
Resolución (Rs)	1.75	

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

Tabla No 6. Eficiencia de la separación entre el Dextrometorfano HBr y la Fenilefrina HCl

	Tiempo de Retención	Ancho de pico
Fenilefrina HCl	10.79	0.2
Dextrometorfano HBr	22.50	0.2
Resolución (Rs)	58.55	

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

8.3 Exactitud

Tabla No 7. Porcentaje de recuperación de 80%, 100% y 120% para el ácido ascórbico.

Ácido Ascórbico	
	% Recuperación
Exactitud 80%	99.09
Exactitud 80%	98.53
Exactitud 80%	97.25
Exactitud 100%	95.47
Exactitud 100%	94.42
Exactitud 100%	95.23
Exactitud 120%	95.96
Exactitud 120%	96.01
Exactitud 120%	95.21
Promedio	96.35 %
Desviación Estándar	1.596517912
Coefficiente de Variación %	1.656960136
Valor t	0.296391419
t crítico	4.30

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

Tabla No 8. Porcentaje de recuperación de 80%, 100% y 120% para el ibuprofeno.

Ibuprofeno	
	% Recuperación
Exactitud 80%	99.83
Exactitud 80%	99.19
Exactitud 80%	99.20
Exactitud 100%	98.91
Exactitud 100%	99.32
Exactitud 100%	99.26
Exactitud 120%	102.14
Exactitud 120%	102.05
Exactitud 120%	102.22
Promedio	100.23%
Desviación Estándar	1.446297956
Coefficiente de Variación %	1.442899127
Valor t	0.021969762
t crítico	4.30

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

Tabla No 9. Porcentaje de recuperación de 80%, 100% y 120% para la fenilefrina HCl.

Fenilefrina HCl	
	% Recuperación
Exactitud 80%	99.11
Exactitud 80%	99.00
Exactitud 80%	98.86
Exactitud 100%	99.64
Exactitud 100%	100.03
Exactitud 100%	99.74
Exactitud 120%	98.93
Exactitud 120%	98.85
Exactitud 120%	98.69
Promedio	99.20 %
Desviación Estándar	0.473421353
Coficiente de Variación %	0.477212542
Valor t	0.068678651
t crítico	4.30

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

Tabla No 10. Porcentaje de recuperación de 80%, 100% y 120% para el dextrometorfano HBr.

Dextrometorfano HBr	
	% Recuperación
Exactitud 80%	99.98
Exactitud 80%	100.13
Exactitud 80%	99.93
Exactitud 100%	99.43
Exactitud 100%	99.86
Exactitud 100%	99.65
Exactitud 120%	98.85
Exactitud 120%	98.88
Exactitud 120%	98.77
Promedio	99.50 %
Desviación Estándar	0.537233138
Coficiente de Variación %	0.539944861
Valor t	0.042340009
t crítico	4.30

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

8.4 Repetibilidad

Tabla No 11. Repetibilidad ácido ascórbico e ibuprofeno expresado en porcentaje y concentración.

No Inyección	Ibuprofeno (200 µg/ml)		Ácido Ascórbico (50 µg/ml)	
	Porcentaje	Concentración (µg/ml)	Porcentaje	Concentración (µg/ml)
1	101.31	202.62	100.88	50.44
2	102.08	204.16	101.39	50.69
3	103.01	206.02	101.86	50.93
4	102.55	205.10	102.46	51.23
5	103.84	207.68	103.13	51.56
6	104.21	208.42	103.93	51.96
7	105.25	210.50	104.60	52.30
8	105.16	210.32	106.04	53.02
9	105.84	211.68	105.54	52.77
10	105.83	211.66	106.18	53.09
Promedio %	103.91	207.81	103.60	51.80
Desviación Estándar	1.62045124	3.240902481	1.952579206	0.976289603
Coefficiente de Variación %	1.559505755	1.559505755	1.884710771	1.884710771

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

Tabla No 12. Repetibilidad fenilefrina HCl y dextrometorfano HBr expresado en porcentaje y concentración.

No Inyección	Dextrometorfano HBr (200 µg/ml)		Fenilefrina HCl (100 µg/ml)	
	Porcentaje	Concentración (µg/ml)	Porcentaje	Concentración (µg/ml)
1	100.00	200.00	100.52	100.52
2	100.34	200.68	100.65	100.65
3	101.53	203.06	101.17	101.17
4	101.61	203.22	101.49	101.49
5	102.28	204.56	101.98	101.98
6	102.88	205.76	102.36	102.36
7	103.65	207.30	103.00	103.00
8	104.39	208.78	103.91	103.91
9	104.83	209.66	105.11	105.11
10	105.12	210.24	105.73	105.73
Promedio %	102.66	205.33	102.59	102.59
Desviación Estándar	1.818534514	3.637069028	1.82026738	1.82026738
Coefficiente de Variación %	1.771363114	1.771363114	1.77427809	1.77427809

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

8.5 Precisión Intermedia

Tabla No 13. Precisión intermedia analista 1 para estándar de ibuprofeno y ácido ascórbico.

No Inyección	Ibuprofeno (200 µg/ml)		Ácido Ascórbico (50 µg/ml)	
	Porcentaje	Concentración (µg/ml)	Porcentaje	Concentración (µg/ml)
Analista 1 (1)	101.60	203.20	98.40	49.99
Analista 1 (2)	101.82	203.64	98.74	50.15
Analista 1 (3)	101.73	203.46	99.01	50.30
Analista 1 (4)	102.36	204.72	98.97	50.27
Analista 1 (5)	102.36	204.72	98.97	50.27
Analista 1 (6)	104.76	209.52	99.61	50.60
Analista 1 (7)	104.61	209.22	99.33	50.46
Analista 1 (8)	105.35	210.70	100.33	50.97
Analista 1 (9)	106.26	212.52	100.83	51.22
Analista 1 (10)	106.89	213.78	101.31	51.46
Promedio %	103.77	207.55	99.55	50.57
Desviación Estándar	2.021155885	4.04231177	0.962600644	0.489739443
Coefficiente de Variación %	1.947651517	1.947651517	0.966951928	0.968409961

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

Tabla No 14. Precisión intermedia analista 2 para estándar de ibuprofeno y ácido ascórbico.

No Inyección	Ibuprofeno (200 µg/ml)		Ácido Ascórbico (50 µg/ml)	
	Porcentaje	Concentración (µg/ml)	Porcentaje	Concentración (µg/ml)
Analista 2 (1)	100.56	201.12	100.42	50.21
Analista 2 (2)	101.06	202.12	100.94	50.47
Analista 2 (3)	101.85	203.70	101.36	50.68
Analista 2 (4)	102.19	204.38	101.41	50.70
Analista 2 (5)	102.19	204.38	101.41	50.70
Analista 2 (6)	103.47	206.94	102.78	51.39
Analista 2 (7)	104.10	208.20	102.42	51.21
Analista 2 (8)	104.74	209.48	103.47	51.73
Analista 2 (9)	105.61	211.22	104.05	52.02
Analista 2 (10)	106.25	212.50	104.03	52.01
Promedio %	103.20	206.40	102.22	51.11
Desviación Estándar	1.937264968	3.874529936	1.311084793	0.655542396
Coefficiente de Variación %	1.877158357	1.877158357	1.282497914	1.282497914

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

Tabla No 15. Análisis de varianza y coeficiente de variación entre analista 1 y analista 2 para estándar de ibuprofeno y ácido Ascórbico.

	Coefficiente de Variación %	F crítico	Valor F	Valor P
Ibuprofeno	1.871970632	4.413873419	0.417429468	0.526374704
Ácido Ascórbico	1.299525513	4.413873419	4.403488087	0.050242819

Fuente: Tabla No 13 y Tabla No 14.

Tabla No 16. Precisión intermedia analista 1 para estándar de dextrometorfano HBr y fenilefrina HCl.

No Inyección	Dextrometorfano HBr (200 µg/ml)		FenilefrinaHCl (100 µg/ml)	
	Porcentaje	Concentración (µg/ml)	Porcentaje	Concentración (µg/ml)
Analista 1 (1)	100.00	200	100.00	100.00
Analista 1 (2)	100.83	201.66	100.90	100.90
Analista 1 (3)	101.25	202.50	101.31	101.31
Analista 1 (4)	101.71	203.42	101.71	101.71
Analista 1 (5)	102.19	204.38	102.37	102.37
Analista 1 (6)	102.56	205.12	102.81	102.81
Analista 1 (7)	103.11	206.22	103.15	103.15
Analista 1 (8)	103.53	207.06	103.65	103.65
Analista 1 (9)	103.80	207.60	104.13	104.13
Analista 1 (10)	104.66	209.32	104.59	104.59
Promedio %	102.36	204.73	102.46	102.46
Desviación Estándar	1.450242892	2.900485783	1.480193681	1.480193681
Coefficiente de Variación %	1.4167509	1.4167509	1.444626965	1.444626965

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

Tabla No 17. Precisión intermedia analista 2 para estándar de dextrometorfano HBr y fenilefrina HCl.

No Inyección	Dextrometorfano HBr (200 µg/ml)		Fenilefrina HCl (100 µg/ml)	
	Porcentaje	Concentración (µg/ml)	Porcentaje	Concentración (µg/ml)
Analista 2 (1)	100.76	201.52	100.59	100.59
Analista 2 (2)	100.83	201.66	100.84	100.84
Analista 2 (3)	101.55	203.10	101.58	101.58
Analista 2 (4)	102.11	204.22	101.96	101.96
Analista 2 (5)	102.55	205.10	102.57	102.57
Analista 2 (6)	103.03	206.06	102.95	102.95
Analista 2 (7)	104.07	208.14	103.91	103.91
Analista 2 (8)	104.43	208.86	104.33	104.33
Analista 2 (9)	104.90	209.80	104.79	104.79
Analista 2 (10)	105.72	211.44	105.56	105.56
Promedio %	102.99	205.99	102.91	102.91
Desviación Estándar	1.732770742	3.465541484	1.700626029	1.700626029
Coefficiente de Variación %	1.68238336	1.68238336	1.652569313	1.652569313

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

Tabla No 18. Análisis de varianza y coeficiente de variación entre analista 1 y analista 2 para estándar de dextrometorfano HBr y fenilefrina HCl.

	Coefficiente de Variación %	F Crítico	Valor F	Valor P
DextrometorfanoHBr	1.687552766	4.4138734	0.7798364	0.3888333
FenilefrinaHCl	1.656158181	4.4138734	0.391328	0.5394535

Fuente: Tabla No 16 y Tabla No 17.

Tabla No 19. Precisión intermedia analista 1 para preparación farmacéutica de gelatina blanda, evaluando ibuprofeno y ácido Ascórbico.

No Inyección	Ibuprofeno (200 µg/ml)		Ácido Ascórbico (50 µg/ml)	
	Porcentaje	Concentración (µg/ml)	Porcentaje	Concentración (µg/ml)
Analista 1 (1)	100.51	201.02	99.64	49.82
Analista 1 (2)	100.48	200.96	98.14	49.07
Analista 1 (3)	100.49	200.98	97.82	48.91
Analista 1 (4)	100.17	200.34	95.02	47.51
Analista 1 (5)	100.33	200.66	95.21	47.60
Analista 1 (6)	100.40	200.80	93.91	46.95
Analista 1 (7)	100.54	201.08	91.77	45.88
Analista 1 (8)	100.71	201.42	94.93	47.46
Analista 1 (9)	100.66	201.32	91.92	45.96
Analista 1 (10)	100.76	201.52	90.86	45.43
Promedio %	100.50	201.01	94.92	47.46
Desviación Estándar	0.178590158	0.357180315	2.935929911	1.467964956
Coefficiente de Variación %	0.177692809	0.177692809	3.092992048	3.092992048

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

Tabla No 20. Precisión intermedia analista 2 para preparación farmacéutica de gelatina blanda, evaluando ibuprofeno y ácido ascórbico.

No Inyección	Ibuprofeno (200 µg/ml)		Ácido Ascórbico (50 µg/ml)	
	Porcentaje	Concentración (µg/ml)	Porcentaje	Concentración (µg/ml)
Analista 2 (1)	100.74	201.48	99.00	49.50
Analista 2 (2)	100.63	201.26	98.17	49.08
Analista 2 (3)	100.48	200.96	98.04	49.02
Analista 2 (4)	100.51	201.02	97.36	48.68
Analista 2 (5)	100.44	200.88	96.71	48.35
Analista 2 (6)	100.47	200.94	96.16	48.08
Analista 2 (7)	100.49	200.98	94.77	47.38
Analista 2 (8)	100.43	200.86	94.21	47.10
Analista 2 (9)	100.58	201.16	93.32	46.66
Analista 2 (10)	100.61	201.22	92.19	46.09
Promedio %	100.54	201.08	96.00	48.00
Desviación Estándar	0.099196774	0.198393548	2.277054872	1.138527436
Coefficiente de Variación %	0.098665951	0.098665951	2.372105124	2.372105124

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

Tabla No 21. Análisis de varianza y coeficiente de variación entre analista 1 y analista 2 para preparación farmacéutica de gelatina blanda, evaluando ibuprofeno y ácido ascórbico.

	Coefficiente de Variación %	F crítico	Valor F	Valor P
Ibuprofeno	0.140882831	4.413873419	0.260935545	0.61568618
Ácido Ascórbico	2.739975567	4.413873419	0.830908348	0.37405677

Fuente: Tabla 19 y Tabla 20.

Tabla No 22. Precisión intermedia analista 1 para preparación farmacéutica de gelatina blanda, evaluando dextrometorfano HBr y fenilefrina HCl.

No Inyección	Dextrometorfano HBr (200 µg/ml)		Fenilefrina HCl (100 µg/ml)	
	Porcentaje	Concentración (µg/ml)	Porcentaje	Concentración (µg/ml)
Analista 1 (1)	101.17	202.34	101.52	101.52
Analista 1 (2)	102.26	204.52	101.37	101.37
Analista 1 (3)	102.20	204.40	101.28	101.28
Analista 1 (4)	103.57	207.14	101.17	101.17
Analista 1 (5)	102.85	205.70	100.98	100.98
Analista 1 (6)	103.86	207.72	100.64	100.64
Analista 1 (7)	103.46	206.92	101.09	101.09
Analista 1 (8)	104.99	209.98	101.11	101.11
Analista 1 (9)	105.80	211.60	101.43	101.43
Analista 1 (10)	104.85	209.70	100.73	100.73
Promedio %	103.50	207.00	101.13	101.13
Desviación Estándar	1.435567638	2.871135277	0.288359344	0.288359344
Coefficiente de Variación %	1.387008472	1.387008472	0.285131653	0.285131653

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

Tabla No 23. Precisión intermedia analista 2 para preparación farmacéutica de gelatina blanda, evaluando dextrometorfano HBr y fenilefrina HCl.

No Inyección	Dextrometorfano HBr (200 µg/ml)		Fenilefrina HCl (100 µg/ml)	
	Porcentaje	Concentración (µg/ml)	Porcentaje	Concentración (µg/ml)
Analista 2 (1)	103.96	207.92	101.16	101.16
Analista 2 (2)	104.05	208.10	101.02	101.02
Analista 2 (3)	104.06	208.12	100.81	100.81
Analista 2 (4)	104.86	209.72	101.10	101.10
Analista 2 (5)	104.87	209.74	101.24	101.24
Analista 2 (6)	104.20	208.40	101.02	101.02
Analista 2 (7)	104.41	208.82	100.60	100.60
Analista 2 (8)	104.39	208.78	100.83	100.83
Analista 2 (9)	103.04	206.08	100.91	100.91
Analista 2 (10)	102.40	204.80	101.10	101.10
Promedio %	104.02	208.05	100.98	100.98
Desviación Estándar	0.770298643	1.540597287	0.192264286	0.192264286
Coefficiente de Variación %	0.740500888	0.740500888	0.190400267	0.190400267

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

Tabla No 24. Análisis de varianza entre analista 1 y analista 2 para preparación farmacéutica de gelatina blanda, evaluando dextrometorfano HBr y fenilefrina HCl.

	Coefficiente de Variación %	F Crítico	Valor F	Valor P
Dextrometorfano HBr	0.742367082	4.41387342	1.03054597	0.32348248
Fenilefrina HCl	0.190256132	4.41387342	1.94885528	0.17969164

Fuente: Tabla No 22 y Tabla 23.

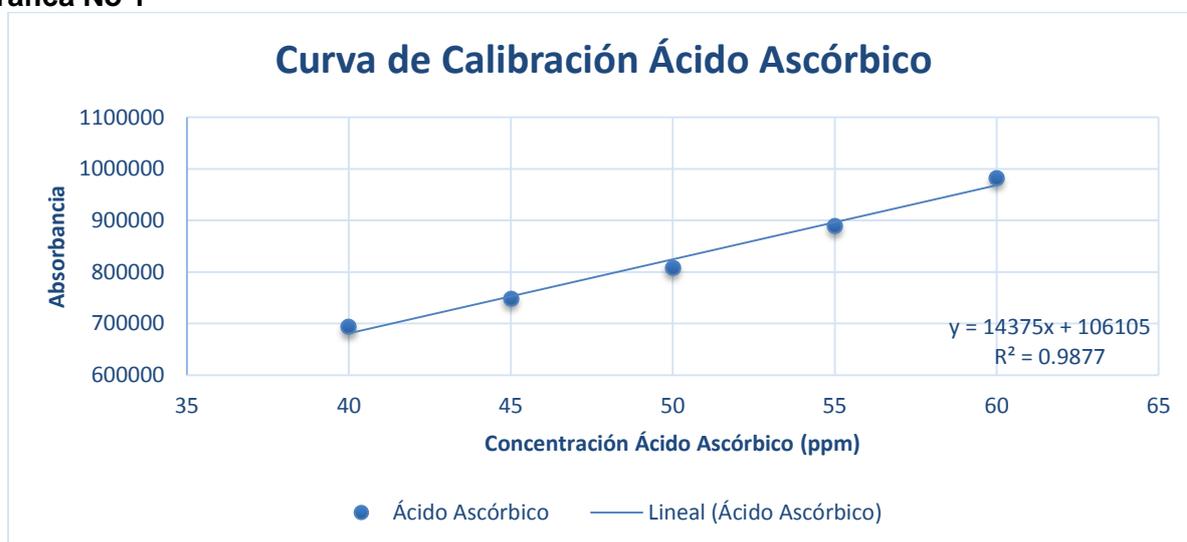
8.6 Linealidad

Tabla No 25. Datos para la obtención y evaluación de la recta para el ácido ascórbico.

%	Concentración ppm	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación %
80	40	691328	691328	697176	693277.3333	3376.34437	0.487012082
90	45	748254	749796	750238	749429.3333	1041.58405	0.138983624
100	50	804849	809326	813052	809075.6667	4107.22562	0.507644191
110	55	888619	891836	889813	890089.3333	1626.20488	0.182701312
120	60	978430	986647	981863	982313.3333	4126.96890	0.420127546

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

Gráfica No 1



Fuente: Tabla No 25

Tabla No 26. Resultados linealidad ácido ascórbico.

Estadísticas de Regresión (Ácido Ascórbico)	
Coefficiente de Determinación (R²)	0.9877
Coefficiente de Correlación (R)	0.9938
Pendiente (m)	14374.64
Intercepto (b)	106105.00
Valor P	0.00057906
Error estándar (S_{y/x})	14626.18

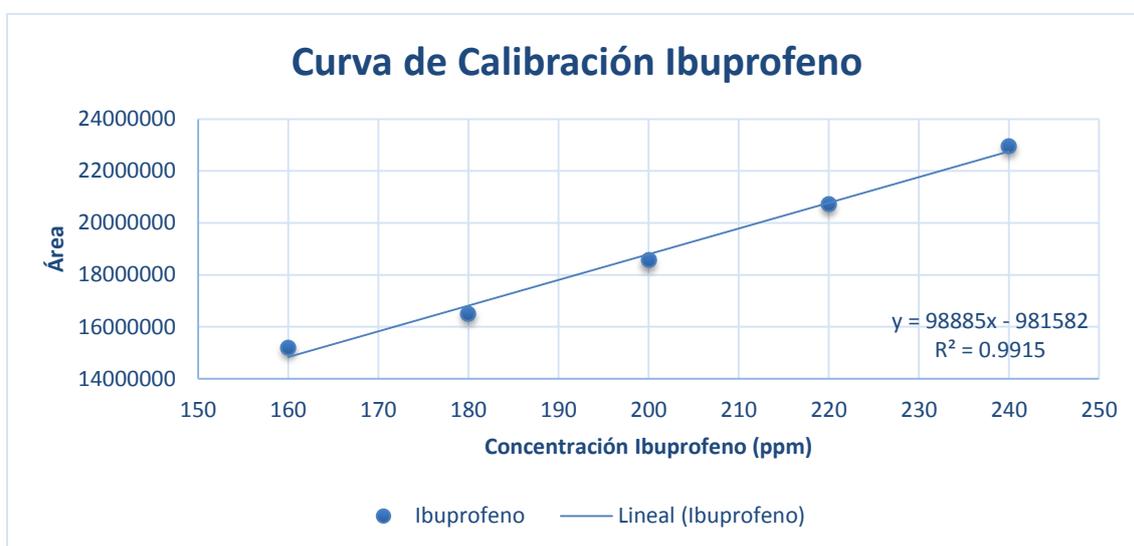
Fuente: Tabla No 25

Tabla No 27. Datos para la obtención y evaluación de la recta para el ibuprofeno.

%	Concentración ppm	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
80	160	15141615	15141615	15318323	15200517.67	102022.4114	0.671177216
90	180	16452099	16515833	16561773	16509901.67	55077.05607	0.333600146
100	200	18361004	18581023	18728986	18557004.33	185163.0642	0.99780687
110	220	20633663	20773373	20786028	20731021.33	84551.88382	0.407851994
120	240	22845259	23118447	22971605	22978437.00	136722.0831	0.595001667

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

Gráfica No 2



Fuente: Tabla No 27

Tabla No 28. Resultados linealidad ibuprofeno.

Estadísticas de Regresión (Ibuprofeno)	
Coefficiente de Determinación (R^2)	0.9915
Coefficiente de Correlación (R)	0.9957
Pendiente (m)	98884.79
Intercepto (b)	-981581.93
Valor p	0.00033319
Error estándar ($S_{y/x}$)	334232.71

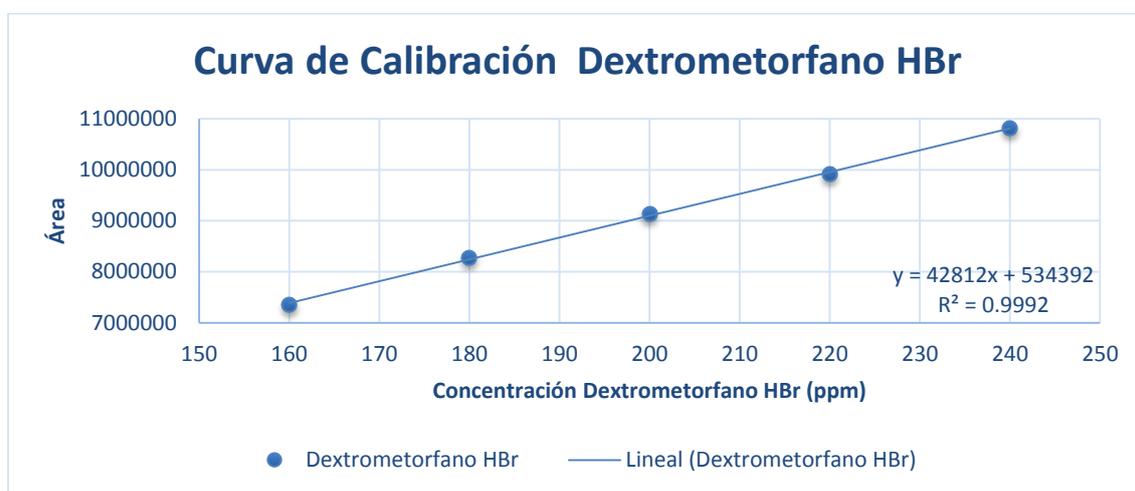
Fuente: Tabla No 27

Tabla No 29. Datos para la obtención y evaluación de la recta para el dextrometorfano HBr.

%	Concentración ppm	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
80	160	7341601	7346604	7352777	7346994.00	5598.197835	0.07619712
90	180	8277351	8278833	8270175	8275453.00	4630.555474	0.055955311
100	200	9132477	9146511	9134922	9137970.00	7497.067227	0.082043027
110	220	9907163	9926753	9912135	9915350.33	10183.11354	0.102700492
120	240	10786080	10815541	10823132	10808251.00	19572.19331	0.181085666

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

Gráfica No 3



Fuente: Tabla No 29.

Tabla No 30. Resultados linealidad dextrometorfano HBr.

Estadísticas de Regresión (Dextrometorfano HBr)	
Coefficiente de Determinación (R^2)	0.9992
Coefficiente de Correlación (R)	0.9996
Pendiente (m)	42812.06
Intercepto (b)	534392.33
Valor p	9.26E-06
Error estándar ($S_{y/x}$)	43693.21

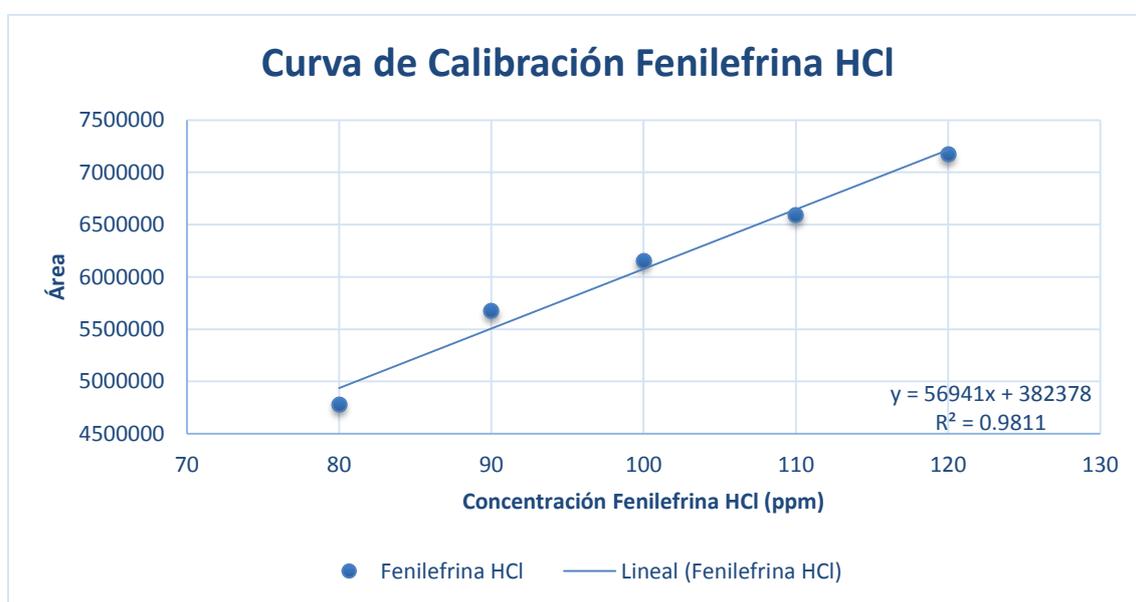
Fuente: Tabla No 29.

Tabla No 31. Datos para la obtención y evaluación de la recta para el fenilefrina HCl.

%	Concentración ppm	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio	Desviación Estándar	Coficiente de Variación
80	80	4780099	4785114	4787403	4784205.33	3735.821239	0.078086557
90	90	5671484	5673674	5680645	5675267.66	4783.911614	0.084294026
100	100	6155960	6157027	6154602	6155863.00	1215.406516	0.019743885
110	110	6573814	6614247	6600479	6596180.00	20556.45697	0.311641844
120	120	7145375	7171862	7195135	7170790.66	24897.29335	0.347204297

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

Gráfica No 4



Fuente Tabla No 31.

Tabla No 32. Resultados linealidad fenilefrina HCl.

Estadísticas de Regresión (Fenilefrina HCl)	
Coficiente de Determinación (R^2)	0.9811
Coficiente de Correlación (R)	0.9905
Pendiente (m)	56940.83
Intercepto (b)	382378.33
Valor p	0.00111258
Error estándar ($S_{y/x}$)	144444.47

Fuente Tabla No 31.

8.7 Límite de Detección

Tabla No 33. Límite de detección Ácido Ascórbico.

Límite de Detección (ppm)	Intercepto	S_{y/x}
3.05	106105.00	14626.18

Fuente: Tabla 25

Tabla No 34. Límite de detección Ibuprofeno.

Límite de Detección (ppm)	Intercepto	S_{y/x}
10.14	-981581.93	334232.7088

Fuente: Tabla 27

Tabla No 35. Límite de detección Dextrometorfano HBr.

Límite de Detección (ppm)	Intercepto	S_{y/x}
3.06	534392.33	43693.21

Fuente: Tabla 29

Tabla No 36. Límite de detección Fenilefrina HCl.

Límite de Detección (ppm)	Intercepto	S_{y/x}
7.61	382378.33	144444.47

Fuente: Tabla 31.

8.8 Límite de Cuantificación

Tabla No 37. Límite de cuantificación Ácido Ascórbico

Límite de Cuantificación (ppm)	Intercepto	S_{y/x}
10.17	106105.00	14626.18

Fuente: Tabla 25

Tabla No 38. Límite de cuantificación Ibuprofeno

Límite de Cuantificación (ppm)	Intercepto	S_{y/x}
33.80	-981581.93	334232.7088

Fuente: Tabla 27

Tabla No 39. Límite de cuantificación Dextrometorfano HBr

Límite de Cuantificación (ppm)	Intercepto	S_{y/x}
10.20	534392.33	43693.21

Fuente: Tabla 29

Tabla No 40. Límite de cuantificación Fenilefrina HCl

Límite de Cuantificación (ppm)	Intercepto	S_{y/x}
25.37	382378.33	144444.47

Fuente: Tabla 31

8.9 Robustez

Tabla No 41. Robustez variando la temperatura para el Ibuprofeno y el Ácido Ascórbico.

Temperatura	Ibuprofeno (200 µg/ml)		Ácido Ascórbico (50 µg/ml)	
	Porcentaje	Concentración (µg/ml)	Porcentaje	Concentración (µg/ml)
25°C	101.60	203.20	98.40	49.20
25°C	101.82	203.64	98.74	49.37
25°C	101.73	203.46	99.01	49.50
30°C	100.30	200.60	101.45	50.72
30°C	100.34	200.68	100.64	50.32
30°C	100.28	200.56	100.26	50.13
35°C	100.57	201.14	100.39	50.19
35°C	100.49	200.98	99.89	49.94
35°C	100.29	200.58	99.62	49.81
Promedio %	100.82	201.65	99.82	49.91
Desviación Estándar	0.67832719	1.356654382	0.98307906	0.491539532
Coficiente de Variación %	0.67278049	0.672780489	0.98482987	0.984829872

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

Tabla No 42. Robustez variando la temperatura para el Dextrometorfano HBr y Fenilefrina HCl.

Temperatura	Dextrometorfano HBr (200 µg/ml)		Fenilefrina HCl (100 µg/ml)	
	Porcentaje	Concentración (µg/ml)	Porcentaje	Concentración (µg/ml)
25°C	101.92	203.84	102.55	102.55
25°C	100.97	201.94	100.68	100.68
25°C	101.41	202.82	101.00	101.00
30°C	100.00	200.00	100.52	100.52
30°C	100.34	200.68	100.65	100.65
30°C	101.53	203.06	101.17	101.17
35°C	100.66	201.32	100.37	100.37
35°C	101.51	203.02	101.04	101.04
35°C	102.49	204.98	100.68	100.68
Promedio %	101.20	202.41	100.96	100.96
Desviación Estándar	0.78705146	1.574102919	0.6494955	0.649495531
Coficiente de Variación %	0.77769322	0.777693218	0.6433055	0.643305502

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

Tabla No 43. Robustez variando el flujo para el Ibuprofeno y el Ácido Ascórbico.

Temperatura	Ibuprofeno (200 µg/ml)		Ácido Ascórbico (50 µg/ml)	
	Porcentaje	Concentración (µg/ml)	Porcentaje	Concentración (µg/ml)
Flujo 1,9 mL/min	100.12	200.24	99.91	49.95
Flujo 1,9 mL/min	100.00	200.00	98.99	49.49
Flujo 1,9 mL/min	100.26	200.52	98.49	49.24
Flujo 2,0 mL/min	100.30	200.60	101.45	50.72
Flujo 2,0 mL/min	100.34	200.68	100.64	50.32
Flujo 2,0 mL/min	100.28	200.56	100.26	50.13
Flujo 2,1 mL/min	99.43	198.86	99.52	49.76
Flujo 2,1 mL/min	99.58	199.16	98.91	49.45
Flujo 2,1 mL/min	99.50	199.00	98.01	49.00
Promedio %	99.98	199.96	99.57	49.79
Desviación Estándar	0.373043042	0.746086084	1.098022212	0.549011106
Coefficiente de Variación %	0.373121812	0.373121812	1.102702572	1.102702572

Tabla No 44. Robustez variando el flujo para el Dextrometorfano HBr y Fenilefrina HCl.

Temperatura	Dextrometorfano HBr (200 µg/ml)		Fenilefrina HCl (100 µg/ml)	
	Porcentaje	Concentración (µg/ml)	Porcentaje	Concentración (µg/ml)
Flujo 1,9 mL/min	100.21	200.42	99.51	99.51
Flujo 1,9 mL/min	100.06	200.12	99.60	99.60
Flujo 1,9 mL/min	101.14	202.28	99.26	99.26
Flujo 2,0 mL/min	100.00	200.00	100.52	100.52
Flujo 2,0 mL/min	100.34	200.68	100.65	100.65
Flujo 2,0 mL/min	101.53	203.06	101.17	101.17
Flujo 2,1 mL/min	100.69	201.38	100.91	100.91
Flujo 2,1 mL/min	100.58	201.16	100.72	100.72
Flujo 2,1 mL/min	100.59	201.18	101.49	101.49
Promedio %	100.57	201.14	100.42	100.42
Desviación Estándar	0.503598164	1.007196329	0.786306415	0.786306415
Coefficiente de Variación %	0.500738392	0.500738392	0.782974424	0.782974424

8.10 Rango

Tabla No 45. Residuales y error aleatorio para el Ácido Ascórbico.

Observación	Y Teórico	Residuales	S _{x0}	F
1	681090.6	12186.73333	0.948178441	1.613671384
2	752963.8	-3534.466667	0.816165093	1.195613961
3	824837.0	-15761.33333	0.746418728	1
4	896710.2	-6620.866667	0.79843406	1.144229276
5	968583.4	13729.93333	1.024290736	1.883134909

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

Tabla No 46. Datos para la determinación del Rango del Ácido Ascórbico.

Valor de F	1.8831349
Valor F Crítico	15.1
Límite Inferior ppm	10.17
Límite Superior ppm	120.00

Fuente: Tabla 45 y Tabla 37

Tabla No 47. Residuales y error aleatorio para el Ibuprofeno.

Observación	Y Teórico	Residuales	S _{x0}	F
1	14839984.73	360532.9333	3.141305465	1.615107183
2	16817680.57	-307778.9	2.760217928	1.247003733
3	18795376.40	-238372.0667	2.471778188	1
4	20773072.23	-42050.9	2.680947272	1.176406875
5	22750768.07	227668.9333	3.347255256	1.833828311

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

Tabla No 48. Datos para la determinación del Rango del Ibuprofeno.

Valor de F	1.8338283
Valor F Crítico	15.1
Límite Inferior ppm	33.80
Límite Superior ppm	120.00

Fuente: Tabla 47 y Tabla 38

Tabla No 49. Residuales y error aleatorio para el Dextrometorfano HBr.

Observación	Y Teórico	Residuales	S _{x0}	F
1	7384321.40	-37327.4	0.99524333	1.782279763
2	8240562.53	34890.46667	0.807066559	1.172022717
3	9096803.66	41166.33333	0.745489169	1
4	9953044.80	-37694.46667	0.806661734	1.170847236
5	10809285.93	-1034.933333	0.985720503	1.748336017

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

Tabla No 50. Datos para la determinación del Rango del Dextrometorfano HBr.

Valor de F	1.748336
Valor F Crítico	15.1
Límite Inferior ppm	10.20
Límite Superior ppm	120.00

Fuente: Tabla 49 y Tabla 39

Tabla No 51. Residuales y error aleatorio para la Fenilefrina HCl.

Observación	Y Teórico	Residuales	S _{x0}	F
1	4937644.73	-153439.4	2.597390273	1.958578139
2	5507053.03	168214.6333	1.9368799	1.089110306
3	6076461.33	79401.66667	1.855952079	1
4	6645869.63	-49689.63333	1.992019549	1.152003173
5	7215277.93	-44487.26667	2.410166025	1.686399261

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

Tabla No 52. Datos para la determinación del Rango de la Fenilefrina HCl.

Valor de F	1.6863993
Valor F Crítico	15.1
Límite Inferior ppm	25.36
Límite Superior ppm	120.00

Fuente: Tabla No 51 y Tabla 40

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La determinación tanto cualitativa como cuantitativa de ibuprofeno, ácido ascórbico, dextrometorfano bromhidrato y fenilefrina clorhidrato, se realizó mediante combinaciones de los analitos ibuprofeno/ácido ascórbico y fenilefrina clorhidrato/dextrometorfano bromhidrato, debido a las diferencias en sus concentraciones y afinidad a la fase móvil. Se estableció una mejor separación para el ibuprofeno y ácido ascórbico en una proporción de acetonitrilo/buffer de fosfatos (30:70) siendo los tiempos de retención de 0.9 min para el ácido ascórbico y 1.25 min para el ibuprofeno. Para el dextrometorfano bromhidrato y fenilefrina clorhidrato la mejor separación se observó con proporción de fase móvil acetonitrilo/buffer de fosfatos (50:50), siendo los tiempos de retención 10.79 min para la fenilefrina clorhidrato y 22.5 min para el dextrometorfano bromhidrato. Debido a las diferencias en la proporción de fase móvil se trabajó con un gradiente para la evaluación de las muestras. Se obtuvo una eficiencia en la separación y especificidad adecuada para el análisis de los cuatro analitos (Tablas No. 4, 5 y 6) (Anexo No. 1)

Para evaluar la validez del método y al tratarse de un producto farmacéutico se siguieron los criterios de aceptación tanto los requeridos por la Oficina Guatemalteca de Acreditación (OGA) en su política OGA-GEC-016 como en la última edición de la Pharmacopea de los Estados Unidos 2013. (OGA, 2006; American Pharmacopea, 2013)

Al evaluarse la exactitud del método se obtuvieron porcentajes de recuperación promedio de 96.35% para el ácido ascórbico, 100.23% para el ibuprofeno, 99,20% para la fenilefrina clorhidrato y 99.50% para el dextrometorfano bromhidrato, para concentraciones correspondientes al 80%, 100% y 120%, siendo aceptadas según el rango de aceptación de la Pharmacopea de los Estados Unidos 96 - 104%, contando los cuatro analitos con un coeficiente de variación menor al 2% y una valor "t" menor a 4.30, siendo este el valor crítico a dos colas con $p=0.05$. Así se comprueba la hipótesis nula y se determina que los valores no son significativamente diferentes al 100% (Tablas No. 7, 8, 9 y 10).

La repetibilidad se evaluó inyectando cada analito 10 veces, y se determinó el coeficiente de variación de cada analito siendo estos 1.88% para el ácido ascórbico, 1.56% para el ibuprofeno, 1.77% para la fenilefrina clorhidrato y 1.77% para el dextrometorfano bromhidrato. El valor aceptable debe ser menor al 2% según la OGA por lo que los resultados se consideran válidos para la metodología. (Tablas No. 11 y 12)

La precisión intermedia se evaluó mediante la preparación de muestras por dos analistas distintos, el mismo día. Cada analista inyectó 10 veces, tanto estándares como muestras. Así se evaluó el comportamiento tanto de los estándares como la muestra en el sistema, siendo el valor aceptado según la OGA y la Pharmacopea un coeficiente de variación menor al 2% entre los analistas y en el análisis de varianza un valor de F menor a 4.41 correspondiente al valor crítico con $p=0.05$. Los coeficientes de variación obtenidos para los estándares fueron 1.29 % para el ácido ascórbico, 1.87% para el ibuprofeno, 1.66% para la fenilefrina clorhidrato y 1.69% para el dextrometorfano bromhidrato, y los valores de F obtenidos fueron de 4.40 para el ácido ascórbico, 0.42 para el ibuprofeno, 0.39 para la fenilefrina clorhidrato y 0.77 para el dextrometorfano bromhidrato, todos con un valor $p < 0.05$ como lo esperado, (Tablas No. 15 y 18). De esta manera se puede concluir que éstos analitos presentan los requisitos necesarios para dar como válido el método. Para la evaluación de las preparaciones farmacéuticas de gelatina blanda, se obtuvo coeficientes de variación de 2.73% para el ácido ascórbico, 0.14% para el ibuprofeno, 0.19% para la fenilefrina clorhidrato y 0.74% para el dextrometorfano bromhidrato, y valores de F de 0.83 para el ácido ascórbico, 0.26 para el ibuprofeno, 1.94 para la fenilefrina clorhidrato y 1.03 para el dextrometorfano bromhidrato, todos con un valor $p < 0.05$, (Tablas No. 21 y 24). Por los resultados obtenidos se puede observar que el único resultado no válido es el coeficiente de variación del ácido ascórbico. Esto se debe a que el ácido ascórbico es susceptible a degradación por oxidación por lo que en la muestra puede ya encontrarse en concentraciones bajas y sufrir degradaciones con el transcurso del tiempo para el análisis. No obstante sí presenta una buena variabilidad en los datos por lo que se puede establecer que es problema del analito y no del analista.

La linealidad del método se estableció inyectando 5 concentraciones conocidas (80%, 90%, 100%, 110% y 120%) por triplicado, se obtuvo un coeficiente de determinación r^2 de 0.9877 para el ácido ascórbico, 0.9915 para el ibuprofeno, 0.9811 para la fenilefrina clorhidrato y 0.9992 para el dextrometorfano bromhidrato, los cuales superan el valor 0.9800 establecido como criterio de evaluación. Así mismo se realizó un análisis de varianza en el cual se halló el valor “p” obteniéndose para todos los casos un valor de significancia bajo en el cual la probabilidad que no se ajusten los datos es despreciable, ($p < 0.001$). Lo anterior prueba que el método desarrollado cumple con los requisitos necesarios de linealidad para cuantificar las muestras que contengan los analitos antes mencionados (Tablas No. 26, 28, 30 y 32).

Se estableció el límite de detección para cada analito, tomando en cuenta el error estadístico ($S_{y/x}$) y la desviación estándar residual de cada curva, dando como resulta un límite de detección de 3.05 ppm para el ácido ascórbico, 10.14 ppm para el ibuprofeno, 7.61 ppm para la fenilefrina clorhidrato y 3.06 ppm para el dextrometorfano bromhidrato, (Tablas No. 33, 34, 35 y 36).

El límite de cuantificación se obtuvo modificando el valor Y del límite de detección, los resultados obtenidos son los siguientes: 10.17 ppm para el ácido ascórbico, 33.80 ppm para el ibuprofeno, 10.20 ppm para el dextrometorfano bromhidrato y 25.36 ppm para la fenilefrina, (Tablas No. 37, 38, 39 y 40).

La robustez del método se evaluó por medio de la modificación de las variables de temperatura, flujo y longitud de la columna, se estableció un criterio de aceptación para el coeficiente de variación entre las medidas y el valor original menor al 2% según lo establece la Pharmacopea, dando como resultado menor al 2% en todos los analitos al modificar la temperatura y el flujo (Tablas No. 41, 42, 43 y 44) , no así con la longitud de la columna ya que se observó cómo se modificó todo el cromatograma debido a la poca retención de la columna y sobreponiéndose picos.

El rango se evaluó inyectando por triplicado cada solución, lo que permitió evaluar la linealidad y repetibilidad. El límite superior del rango está dado por la última concentración que cumpla con los requisitos de linealidad y repetibilidad. Para ello se calculó el error aleatorio de cada concentración para los valores teóricos, al utilizar la homocedasticidad de la curva, se tomaron los valores S_{x_0} como las desviaciones estándar de cada concentración para calcular el estadístico F . Este último se comparó con un F crítico en el caso de cada una de las concentraciones para determinar el límite superior del rango, el valor de F obtenido fue menor a 15.1 en todos los casos y dando un rango de 10.17 – 120 ppm para el ácido ascórbico, 33.80 – 120 ppm para el ibuprofeno, 25.36 – 120 ppm para la fenilefrina clorhidrato y 10.20 – 120 ppm para el dextrometorfano bromhidrato. (Tablas No. 46, 48, 50 y 52).

10. CONCLUSIONES

- 10.1 Se desarrolló una metodología para la cuantificación y determinación de ácido ascórbico, ibuprofeno, dextrometorfano bromhidrato y fenilefrina clorhidrato, presentes en presentaciones farmacéuticas de gelatina blanda por medio de cromatografía líquida de alta resolución.
- 10.2 La metodología propuesta cumple con las especificaciones de exactitud, precisión, precisión intermedia, repetibilidad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, rango, especificidad y robustez.
- 10.3 Se obtuvo una eficiencia en la separación y especificidad adecuada para el análisis de ácido ascórbico, ibuprofeno, dextrometorfano bromhidrato y fenilefrina clorhidrato, presentes en presentaciones farmacéuticas de gelatina blanda.
- 10.4 El ácido ascórbico presenta degradación en el transcurso del análisis en la preparación farmacéutica de gelatina blanda.
- 10.5 El método desarrollado es robusto para cambios en temperatura y flujo de fase móvil.
- 10.6 El cambio de longitud en la columna impide la separación y cuantificación de los analitos.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1. Determinar la estabilidad del ácido ascórbico presente en la muestra.
- 11.2. Efectuar pruebas con distintas longitudes de columna aparte de 100mm.
- 11.3. Verificar la robustez del método cambiando equipo cromatográfico.

12. REFERENCIAS

- 12.1 America Pharmacopea. (2013). Farmacopea de los Estados Unidos de America. Rockville.
- 12.2 America Pharmacopea. (2009). Farmacopea de los Estados Unidos de America. Rockville.
- 12.3 Anleu, A.(2000). Validación de un Método para la cuantificación de Ibuprofeno en Suspensión. Guatemala : Universidad San Carlos de Guatemala .
- 12.4 Arias, T. D. (1999). Glosario de Medicamentos; Desarrollo Evaluación y Usos. Panamá: Organización Mundial de la Salud. Pp 15-35.
- 12.5 Biologos, C.N. (2002) Guía de Validación de Métodos Analíticos. México.
- 12.6 Comisión Guatemalteca de Normas. (1994). Política: COGUANOR NGO 34 130:94.Diario de Centroamérica Agosto de 1994.
- 12.7 European Pharmacopea. (2011). European Pharmacopea. France: Council of Europe.
- 12.8 Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (2004). Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. México.
- 12.9 García, R. (2008). Validación de una Metodología para la Cuantificación Simultánea de Vitaminas. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala .
- 12.10 Joachim Ermer, J. H. (2005). Method Validation in Pharmaceutical Analysis . Germany : Wiley-VCH Verlag GmbH& Co. KGaA. Pp 35-78.
- 12.11 Meredith A. Heckman. (2009). U.S. Food and Drug Administration. Estados Unidos: Nova. Pp 120-125.
- 12.12 Miller,N.J. y Miller, J.C. (2002). "Estadística y Quiometría para Química Analítica".4a Edición, Pearson Educación, S.A. Madrid. Pp11-125.
- 12.13 Oficina Guatemalteca de Acreditación. (2004). POLÍTICA OGA-GEC-016 "Política de Selección y Validación de Métodos de Ensayo".
- 12.14 Organización Guatemalteca de Acreditación (2004). Política de selección y Validación de Métodos de Ensayo. Guatemala.
- 12.15 Organization, W. H. (2006). Model List of Essential Medicines: Adison Wensley. Pp 35.
- 12.16 Skoog, D.A. (2000). Principios de Análisis Instrumental. Madrid: McGraw Hill. Pp 107-183.

- 12.17 Quatrocci, O.A. (1992) Introducción a la HPLC. Madrid: Artes Gráficas Farro S,A. Pp 250-310.
- 12.18 Ramazzini, E. (2008). Validación de un método para la cuantificación de cipermetrina en pesticidas de uso doméstico por cromatografía líquida de alta resolución Guatemala: Universidad San Carlos de Guatemala.

13. ANEXOS

Anexo No 1 Reporte de secuencia para Exactitud

Ibuprofeno y Ácido Ascórbico

RGH, S.A.

Reporte de secuencia

UV	Acido ascór...	Ibuprofeno	Acido ascór...	Ibuprofeno
Identificación de la muestra	Vial	Area	Area ESTD Conc...	ESTD Conc...
Exactitud 80%	2	429452	15080696	99.09 99.83
Exactitud 80%	2	427057	14983810	98.53 99.19
Exactitud 80%	2	421503	14986416	97.25 99.20
Exactitud 100%	3	517206	18677747	95.47 98.91
Exactitud 100%	3	511543	18754996	94.42 99.32
Exactitud 100%	3	515894	18744204	95.23 99.26
Exactitud 120%	4	611633	22690194	95.96 102.14
Exactitud 120%	4	611907	22670464	96.01 102.05
Exactitud 120%	4	606843	22708291	95.21 102.22
Min:		421503	14983810	94.42 98.91
Max:		611907	22708291	99.09 102.22
Mean:		517004	18810758	96.35 100.24
Std D...		79796	3323173	1.60 1.44
%RSD:		15.43	17.67	1.66 1.44

REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC

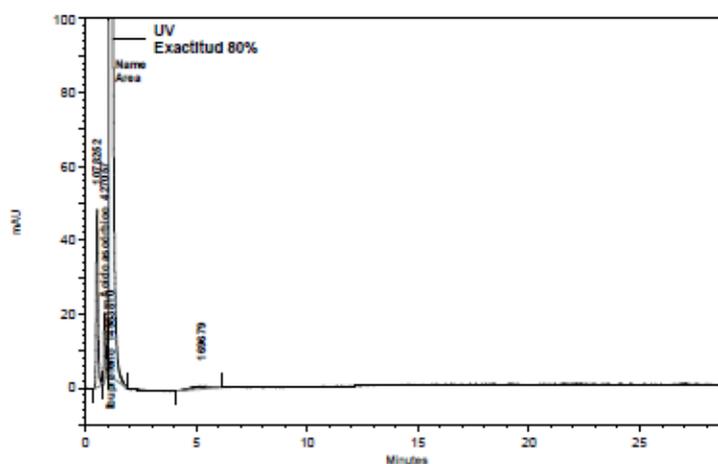
MÉTODO: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Tesis Alvaro\Dextrometorfano y Fenilefrina.met

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Exactitud 80%

FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 19/08/2014 03:27:51 p.m.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: Combinado Ibuprofeno y Ácido Ascórbico 80%

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 μ L



UV Results

Nombre del pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración
Acido ascórbico	0.873	427057	73529	96.534
Ibuprofeno	1.127	14993810	1675854	99.197
Totals		15410867	1749383	197.721

REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC

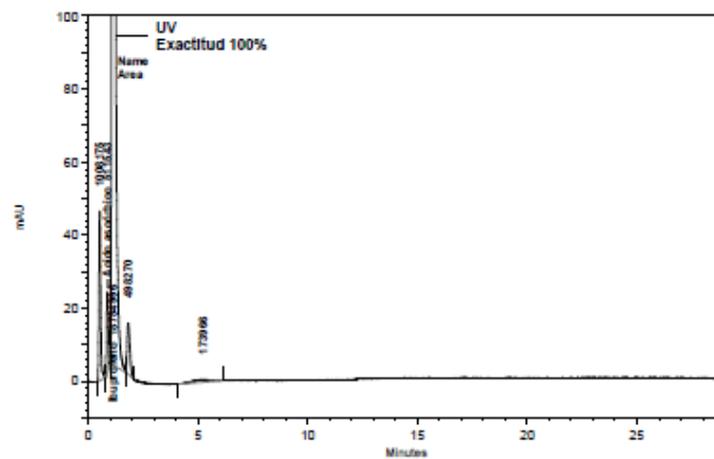
MÉTODO: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Tesis Alvaro\Dextrometorfano y Fenilefrina.met

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Exactitud 100%

FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 19/08/2014 04:58:59 p.m.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: Combinado Ibuprofeno y Ácido Ascórbico 100%

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results

Nombre del pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración
Acido ascórbico	0.873	511543	87934	94.422
Ibuprofeno	1.120	18754996	2079103	99.321
Totals		19266539	2167037	193.743

REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC

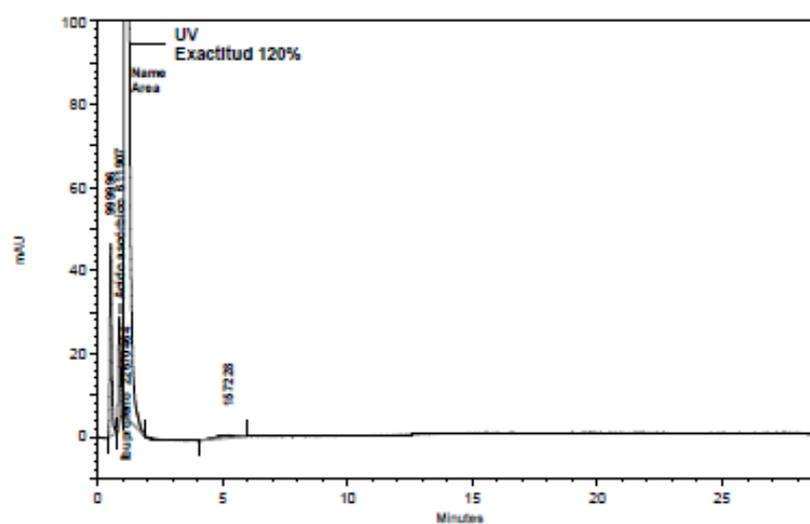
MÉTODO: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Tesis Alvaro\Dextrometorfano y Fenilefrina.met

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Exactitud 120%

FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 19/08/2014 06:30:16 p.m.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: Combinado Ibuprofeno y Ácido Ascórbico 120%

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results

Nombre del pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración
Acido ascórbico	0.890	611907	103647	96.005
Ibuprofeno	1.127	22670464	2478440	102.047
Totals		23292371	2582087	198.053

Exactitud Dextrometorfano HBr y Fenilefrina HCl

RGH, S.A.
Reporte de secuencia

UV		Fenilefrina ...	Dextrometor...	Fenilefrina ...	Dextrometo...
Identificación de la muestra	Vial	Area	Area	ESTD Conc...	ESTD Conc...
Exactitud 80%	2	4926816	7491334	99.11	99.98
Exactitud 80%	2	4921621	7502685	99.00	100.13
Exactitud 80%	2	4914418	7487571	98.86	99.93
Exactitud 100%	3	6191591	9312671	99.64	99.43
Exactitud 100%	3	6215696	9353387	100.03	99.86
Exactitud 100%	3	6198086	9333103	99.74	99.65
Exactitud 120%	4	7406503	11154994	98.93	98.85
Exactitud 120%	4	7400666	11157985	98.85	98.88
Exactitud 120%	4	7388641	11145583	98.69	98.77
	Min:	4914418	7487571	98.69	98.77
	Max:	7406503	11157985	100.03	100.13
	Mean:	6173782	9326590	99.20	99.50
	Std D...	1073093	1584438	0.47	0.54
	%RSD:	17.38	16.99	0.48	0.54

REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC

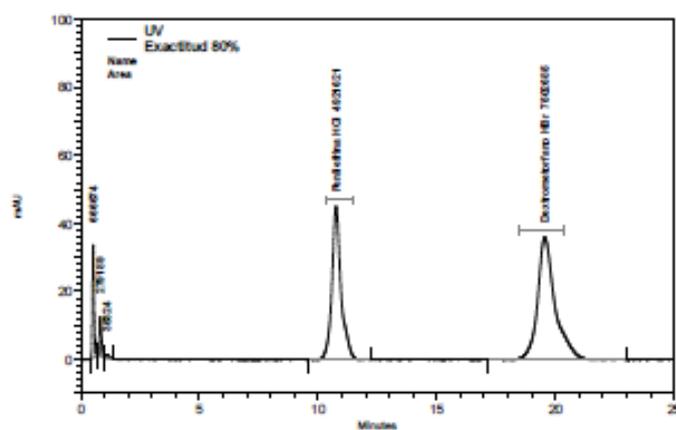
MÉTODO: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Tesis Alvaro\Dextrometorfano y Fenilefrina.met

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Exactitud 80%

FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 20/08/2014 05:23:08 p.m.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: Fenilefrina y Dextrometorfano 80%

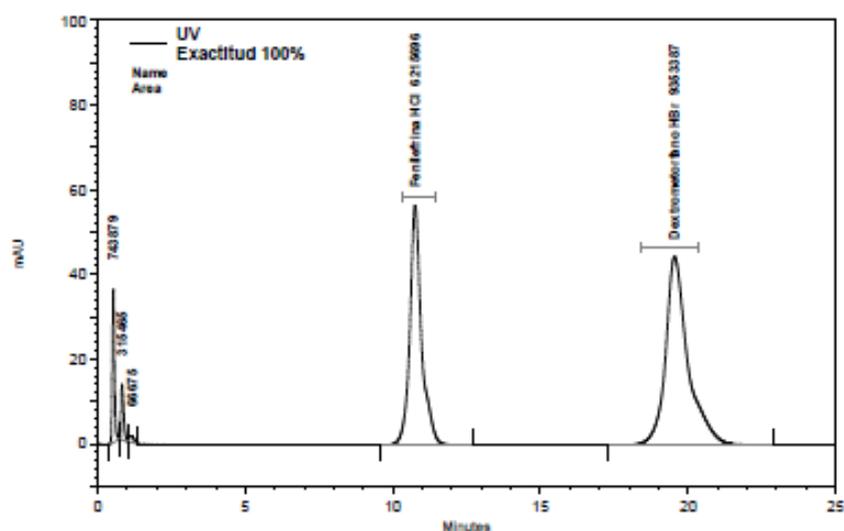
VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results				
Nombre del pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración
Fenilefrina HCl	10.700	4521451	100575	88.001
Dextrometorfano HBr	18.358	7002405	122855	100.158
Totals		11523856	223430	188.160

REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC

MÉTODO: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Tesis Alvaro\Dextrometorfano y Fenilefrina.met
 IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Exactitud 100%
 FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 20/08/2014 06:42:17 p.m.
 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: Fenilefrina y Dextrometorfano 100%
 VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results

Nombre del pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración
Fenilefrina HCl	10.753	6215696	226022	100.023
Dextrometorfano HBr	19.547	9353387	177586	99.963
Totals		15569083	403608	199.986

REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC

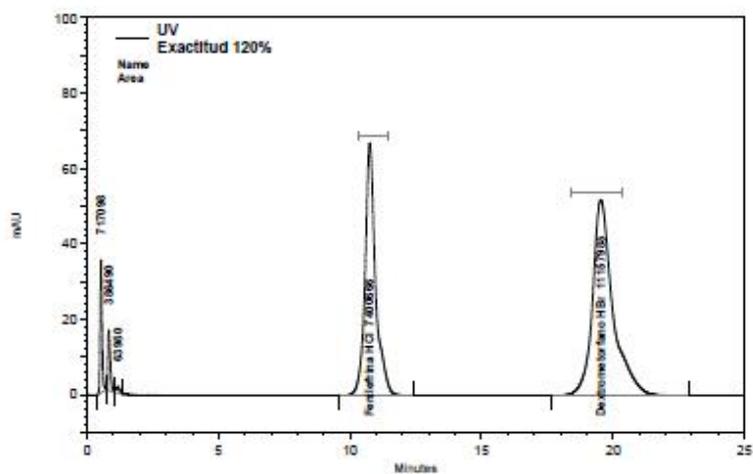
MÉTODO: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Tesis Alvaro\Dextrometorfano y Fenilefrina.met

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Exactitud 120%

FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 20/08/2014 08:01:30 p.m.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: Fenilefrina y Dextrometorfano 120%

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results

Nombre del pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración
Fenilefrina HCl	10.747	7400666	267734	98.948
Dextrometorfano HBr	19.540	11157985	207528	98.977
Totals		18558651	475262	197.926

Anexo No 2 Repetibilidad

Repetibilidad Ácido Ascórbico

RGH, S.A.

Reporte de secuencia

UV	Identificación de la muestra	Vial	Acido ascórbico Area	Acido asc... ESTD Co...
	Repetibilidad Acido Ascorbico...	2	16226267	100.88
	Repetibilidad Acido Ascorbico...	2	16308107	101.39
	Repetibilidad Acido Ascorbico...	2	16384129	101.86
	Repetibilidad Acido Ascorbico...	2	16479547	102.46
	Repetibilidad Acido Ascorbico...	2	16587941	103.13
	Repetibilidad Acido Ascorbico...	2	16716270	103.93
	Repetibilidad Acido Ascorbico...	2	16824606	104.60
	Repetibilidad Acido Ascorbico...	2	17055928	106.04
	Repetibilidad Acido Ascorbico...	2	16975746	105.54
	Repetibilidad Acido Ascorbico...	2	17078017	106.18
	Min:		16226267	100.88
	Max:		17078017	106.18
	Mean:		16663656	103.60
	Std D...		313959	1.95
	%RSD:		1.88	1.88

REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC

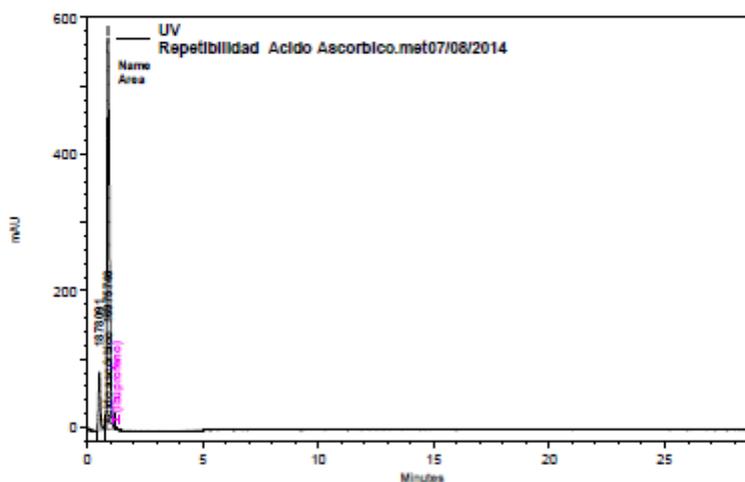
MÉTODO: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Tesis Alvaro\Robustez 2014 08 28.met

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Repetibilidad Acido Ascorbico.met07/08/2014

FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 08/08/2014 02:14:48 a.m.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: Repetibilidad Acido Ascorbico

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 10 µL



UV Results				
Nombre del pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración
Acido ascórbico	0.900	1697.5746	2291799	105.542
Ibuprofeno				0.000 BDL
Totals		1697.5746	2291799	105.542

Repetibilidad Ibuprofeno

RGH, S.A.

Reporte de secuencia

UV		Ibuprofeno	Ibuprofeno
Identificación de la muestra	Vial	Area	ESTD Co...
Repetibilidad Ibuprofeno.met0...	1	48283932	101.31
Repetibilidad Ibuprofeno.met0...	1	48649716	102.08
Repetibilidad Ibuprofeno.met0...	1	49093643	103.01
Repetibilidad Ibuprofeno.met0...	1	48872670	102.55
Repetibilidad Ibuprofeno.met0...	1	49490662	103.84
Repetibilidad Ibuprofeno.met0...	1	49662676	104.21
Repetibilidad Ibuprofeno.met0...	1	50161515	105.25
Repetibilidad Ibuprofeno.met0...	1	50116530	105.16
Repetibilidad Ibuprofeno.met0...	1	50440759	105.84
Repetibilidad Ibuprofeno.met0...	1	50436024	105.83

Min:	48283932	101.31
Max:	50440759	105.84
Mean:	49520813	103.91
Std D...	771836	1.62
%RSD:	1.56	1.56

REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC

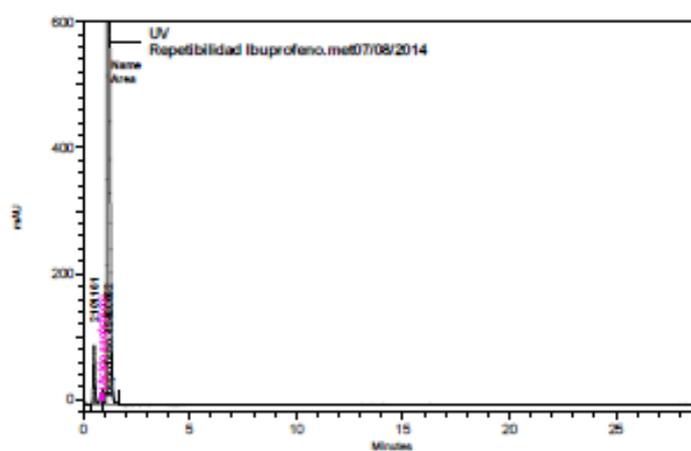
MÉTODO: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Tesis Alvaro\Robustez 2014 08 28.met

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Repetibilidad Ibuprofeno.met07/08/2014

FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 07/08/2014 04:09:07 p.m.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: Repetibilidad Ibuprofeno

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 10 µL



UV Results

Nombre del pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración
Acido ascórbico				0.000 BDL
Ibuprofeno	1.100	1000000	600000	100.000
Totals		1000000	600000	100.000

Repetibilidad Dextrometorfano HBr

RGH, S.A.

Reporte de secuencia

UV		Dextrometorfa...	Dextrome...
Identificación de la muestra	Vial	Area	ESTD Co...
Repetibilidad Dextrometorfano...	2	25817974	100.00
Repetibilidad Dextrometorfano...	2	25905570	100.34
Repetibilidad Dextrometorfano...	2	26211912	101.53
Repetibilidad Dextrometorfano...	2	26232869	101.61
Repetibilidad Dextrometorfano...	2	26405555	102.28
Repetibilidad Dextrometorfano...	2	26560962	102.88
Repetibilidad Dextrometorfano...	2	26760622	103.65
Repetibilidad Dextrometorfano...	2	26951216	104.39
Repetibilidad Dextrometorfano...	2	27065331	104.83
Repetibilidad Dextrometorfano...	2	27139417	105.12

Min:	25817974	100.00
Max:	27139417	105.12
Mean:	26505143	102.66
Std D...	469658	1.82
%RSD:	1.77	1.77

REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC

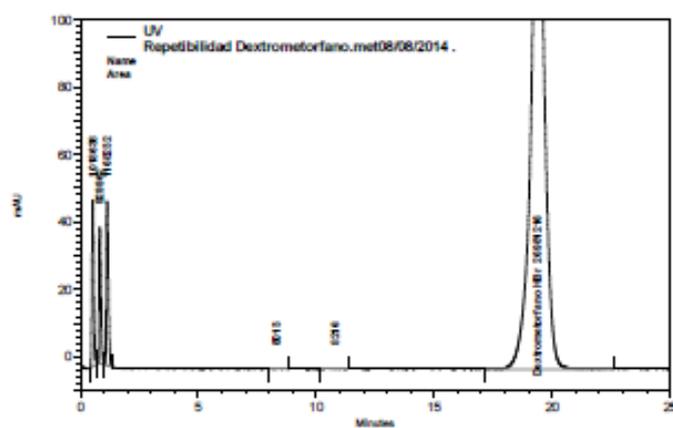
MÉTODO: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Tesis Alvaro\Dextrometorfano y Fenilefrina.met

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Repetibilidad Dextrometorfano.met08/08/2014 .

FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 09/08/2014 01:39:54 a.m.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: Repetibilidad Dextrometorfano

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 10 µL



UV Results				
Nombre del pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración
Dextrometorfano HBr	19.678	2669124	741078	109.838
Totals		2669124	741078	109.838

Repetibilidad Fenilefrina HCl

RGH, S.A.

Reporte de secuencia

UV			Fenilefrina HCl	Fenilefrin...
Identificación de la muestra	Vial		Area	ESTD Co...
Repetibilidad Fenilefrina.met0...	1		31410509	100.52
Repetibilidad Fenilefrina.met0...	1		31449399	100.65
Repetibilidad Fenilefrina.met0...	1		31611558	101.17
Repetibilidad Fenilefrina.met0...	1		31712084	101.49
Repetibilidad Fenilefrina.met0...	1		31867278	101.98
Repetibilidad Fenilefrina.met0...	1		31984089	102.36
Repetibilidad Fenilefrina.met0...	1		32184146	103.00
Repetibilidad Fenilefrina.met0...	1		32468322	103.91
Repetibilidad Fenilefrina.met0...	1		32845290	105.11
Repetibilidad Fenilefrina.met0...	1		33036538	105.73

Min:	31410509	100.52
Max:	33036538	105.73
Mean:	32056921	102.59
Std D...	568827	1.82
%RSD:	1.77	1.77

REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC

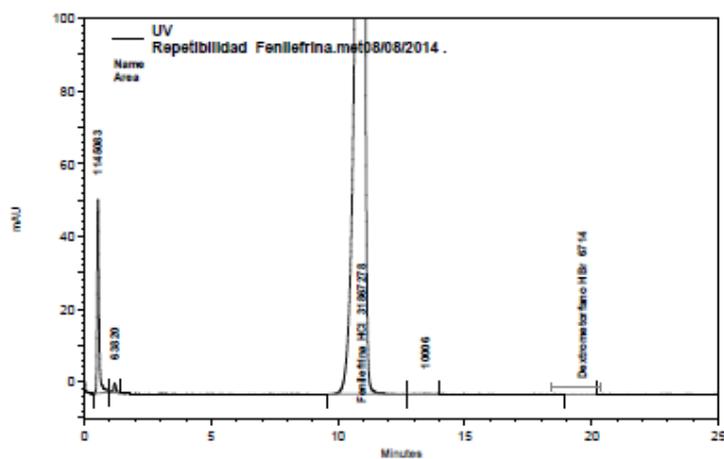
MÉTODO: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Tesis Alvaro\Dextrometorfano y Fenilefrina.met

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Repetibilidad Fenilefrina.met08/08/2014 .

FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 08/08/2014 05:21:15 p.m.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: Repetibilidad Fenilefrina

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 10 µL



UV Results

Nombre del pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración
Fenilefrina HCl	10.920	31967278	1579333	101.984
Dextrometorfano HBr	19.640	6714	175	0.000
Totals		31973992	1579533	101.984

Anexo No 3 Precisión Intermedia

Estándar Ácido Ascórbico e Ibuprofeno Analista 1

RGH, S.A.
Reporte de secuencia

UV		Acido ascór...	Ibuprofeno	Acido ascór...	Ibuprofeno
Identificación de la muestra	Vial	Area	Area	ESTD Conc...	ESTD Conc...
Analista 1 Ibu-AcAsc.met001	1	663786	19047706	98.40	101.60
Analista 1 Ibu-AcAsc.met001	1	666035	19088049	98.74	101.82
Analista 1 Ibu-AcAsc.met001	1	667917	19071740	99.01	101.73
Analista 1 Ibu-AcAsc.met001	1	667606	19190871	98.97	102.36
Analista 1 Ibu-AcAsc.met001	1	667606	19190871	98.97	102.36
Analista 1 Ibu-AcAsc.met001	1	671922	19640065	99.61	104.76
Analista 1 Ibu-AcAsc.met001	1	670064	19623073	99.33	104.67
Analista 1 Ibu-AcAsc.met001	1	676801	19751047	100.33	105.35
Analista 1 Ibu-AcAsc.met001	1	680181	19920925	100.83	106.26
Analista 1 Ibu-AcAsc.met001	1	683376	20039669	101.31	106.89
Min:		663786	19047706	98.40	101.60
Max:		683376	20039669	101.31	106.89
Mean:		671529	19456402	99.55	103.78
Std D...		6492	379474	0.96	2.02
%RSD:		0.97	1.95	0.97	1.95

REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC

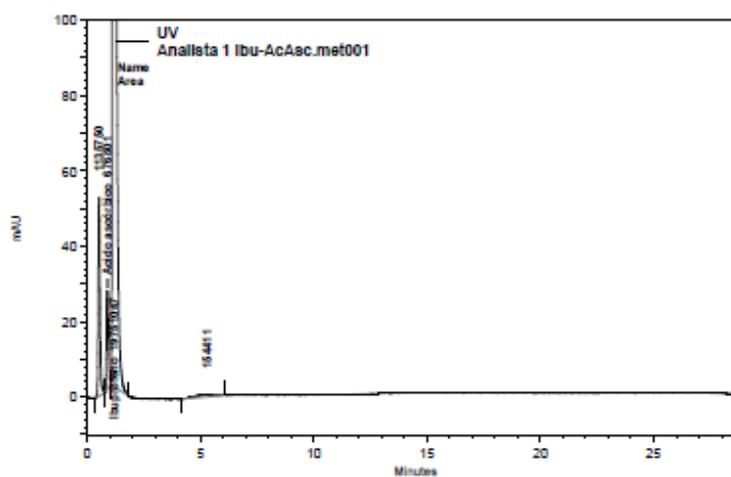
MÉTODO: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Tesis Alvaro\Dextrometorfano y Fenilefrina.met

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Analista 1 Ibu-AcAsc.met001

FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 11/08/2014 04:58:41 p.m.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: Presición del Sistema Álvaro

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results

Nombre del pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración
Acido ascórbico	0.897	676901	104959	101.936
Ibuprofeno	1.187	19751047	2216370	105.352
Totals		20427948	2321229	207.288

Precisión Intermedia Estándar Ácido Ascórbico e Ibuprofeno Analista 2

RGH, S.A.
Reporte de secuencia

UV	Acido ascór...	Ibuprofeno	Acido ascór...	Ibuprofeno
Identificación de la muestra	Vial	Area	Area ESTD Conc...	ESTD Conc...
Analista 2 Ibu-AcAsc.met002	2	686346	20844630	100.42
Analista 2 Ibu-AcAsc.met002	2	689919	20948538	100.94
Analista 2 Ibu-AcAsc.met002	2	692793	21112961	101.36
Analista 2 Ibu-AcAsc.met002	2	693100	21183868	101.41
Analista 2 Ibu-AcAsc.met002	2	693100	21183868	101.41
Analista 2 Ibu-AcAsc.met002	2	702507	21448602	102.78
Analista 2 Ibu-AcAsc.met002	2	700056	21578792	102.42
Analista 2 Ibu-AcAsc.met002	2	707189	21712281	103.47
Analista 2 Ibu-AcAsc.met002	2	711180	21892300	104.05
Analista 2 Ibu-AcAsc.met002	2	711038	22024341	104.03
Min:		686346	20844630	100.42
Max:		711180	22024341	104.05
Mean:		698723	21393018	102.23
Std D...		8967	401607	1.31
%RSD:		1.28	1.88	1.28

REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC

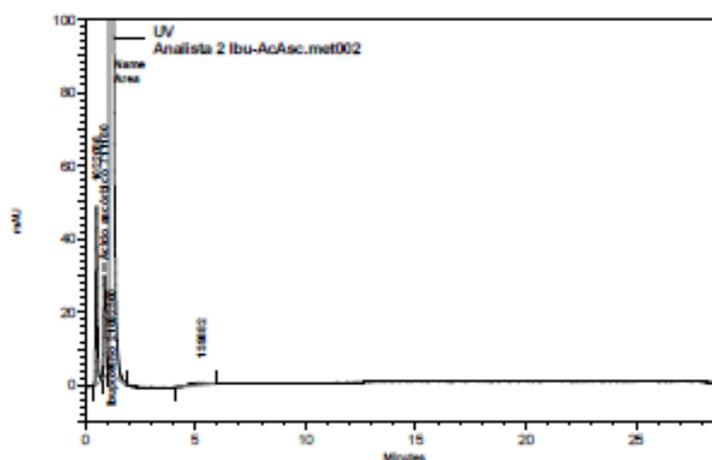
MÉTODO: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Tesis Alvaro\Dextrometorfano y Fenilefrina.met

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Analista 2 Ibu-AcAsc.met002

FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 12/08/2014 01:36:28 a.m.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: Presición del Sistema Renato

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results				
Nombre del pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración
Acido ascórbico	0.550	711150	111040	104.052
Ibuprofeno	1.107	2102200	222222	103.010
Totals		2260850	222722	208.062

Precisión Intermedia Estándar Dextrometorfano HBr y Fenilefrina HCl Analista 1

RGH, S.A.
Reporte de secuencia

UV		Fenilefrina ...	Dextrometor...	Fenilefrina ...	Dextrometo...
Identificación de la muestra	Vial	Area	Area	ESTD Conc...	ESTD Conc...
Analista 1 Dextro-Fenil.met	1	6229328	9366465	100.00	100.00
Analista 1 Dextro-Fenil.met	1	6285404	9444441	100.90	100.83
Analista 1 Dextro-Fenil.met	1	6310916	9483241	101.31	101.25
Analista 1 Dextro-Fenil.met	1	6335765	9526891	101.71	101.71
Analista 1 Dextro-Fenil.met	1	6377045	9571438	102.37	102.19
Analista 1 Dextro-Fenil.met	1	6404377	9606495	102.81	102.56
Analista 1 Dextro-Fenil.met	1	6425732	9657530	103.15	103.11
Analista 1 Dextro-Fenil.met	1	6456411	9697045	103.65	103.53
Analista 1 Dextro-Fenil.met	1	6486882	9722524	104.13	103.80
Analista 1 Dextro-Fenil.met	1	6515225	9802815	104.59	104.66
Min:		6229328	9366465	100.00	100.00
Max:		6515225	9802815	104.59	104.66
Mean:		6382709	9587889	102.46	102.36
Std D...		92225	135802	1.48	1.45
%RSD:		1.44	1.42	1.44	1.42

REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC

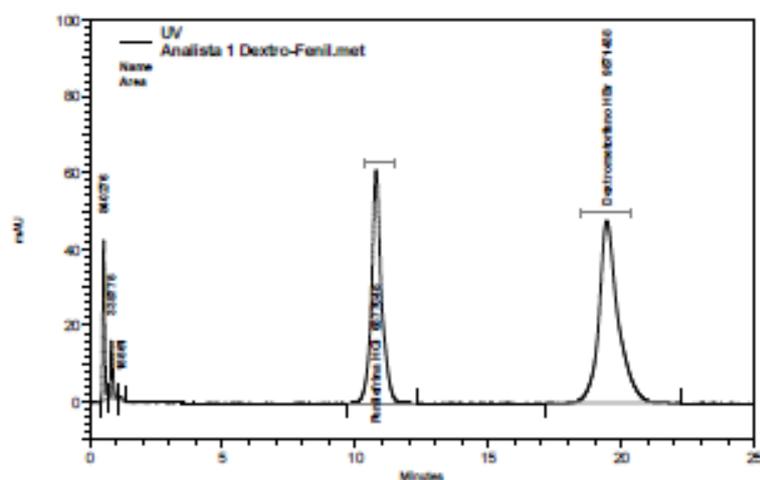
MÉTODO: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Tesis Alvaro\Dextrometorfano y Fenilefrina.met

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Analista 1 Dextro-Fenil.met

FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 12/08/2014 04:52:23 p.m.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: precisión del sistema Alvaro

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results

Nombre del pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración
Fenilefrina HCl	10.700	6877093	588570	100.871
Dextrometorfano HBr	18.458	8871988	180018	100.100
Totals		15849081	768588	200.970

Precisión Intermedia Estándar Dextrometorfano HBr y Fenilefrina HCl Analista 2

RGH, S.A.
Reporte de secuencia

UV		Fenilefrina ...	Dextrometor...	Fenilefrina ...	Dextrometo...
Identificación de la muestra	Vial	Area	Area	ESTD Conc...	ESTD Conc...
Analista 2 Dextro-Fenil.met	2	6610939	10147558	100.59	100.76
Analista 2 Dextro-Fenil.met	2	6626737	10154661	100.84	100.83
Analista 2 Dextro-Fenil.met	2	6675464	10227655	101.58	101.55
Analista 2 Dextro-Fenil.met	2	6700535	10283549	101.96	102.11
Analista 2 Dextro-Fenil.met	2	6740948	10328526	102.57	102.55
Analista 2 Dextro-Fenil.met	2	6765979	10376413	102.95	103.03
Analista 2 Dextro-Fenil.met	2	6828637	10481771	103.91	104.07
Analista 2 Dextro-Fenil.met	2	6856195	10517700	104.33	104.43
Analista 2 Dextro-Fenil.met	2	6886690	10565095	104.79	104.90
Analista 2 Dextro-Fenil.met	2	6937004	10647502	105.56	105.72
Min:		6610939	10147558	100.59	100.76
Max:		6937004	10647502	105.56	105.72
Mean:		6762913	10373043	102.91	103.00
Std D...		111714	174685	1.70	1.73
%RSD:		1.65	1.68	1.65	1.68

REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC

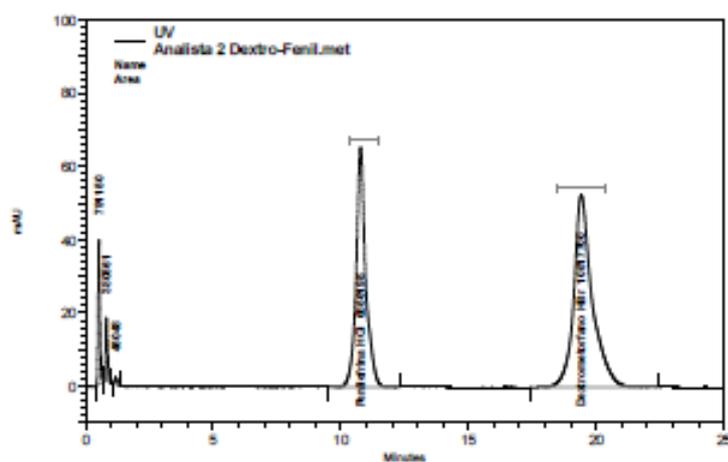
MÉTODO: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Tesis Alvaro\Dextrometorfano y Fenilefrina.met

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Analista 2 Dextro-Fenil.met

FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 13/08/2014 01:14:25 a.m.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: precisión del sistema Renato

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results

Nombre del pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración
Fenilefrina HCl	10.776	6556185	561261	105.827
Dextrometorfano HBr	18.420	10517700	505556	105.861
Totals		17074585	1066817	200.788

Precisión Intermedia muestra Ácido Ascórbico e Ibuprofeno Analista 1

RGH, S.A.
Reporte de secuencia

UV		Acido ascór...	Ibuprofeno	Acido ascór...	Ibuprofeno
Identificación de la muestra	Vial	Area	Area	ESTD Conc...	ESTD Conc...
Analista 1 Muestra001	1	802597	18797807	99.64	100.51
Analista 1 Muestra001	1	790525	18791209	98.14	100.48
Analista 1 Muestra001	1	787904	18793896	97.82	100.49
Analista 1 Muestra001	1	765352	18733853	95.02	100.17
Analista 1 Muestra001	1	766892	18763680	95.21	100.33
Analista 1 Muestra001	1	756423	18776223	93.91	100.40
Analista 1 Muestra001	1	739186	18803127	91.77	100.54
Analista 1 Muestra001	1	764636	18835379	94.93	100.71
Analista 1 Muestra001	1	740454	18825213	91.92	100.66
Analista 1 Muestra001	1	731845	18844179	90.86	100.76
Min:		731845	18733853	90.86	100.17
Max:		802597	18844179	99.64	100.76
Mean:		764581	18796457	94.92	100.51
Std D...		23649	33504	2.94	0.18
%RSD:		3.09	0.18	3.09	0.18

REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC

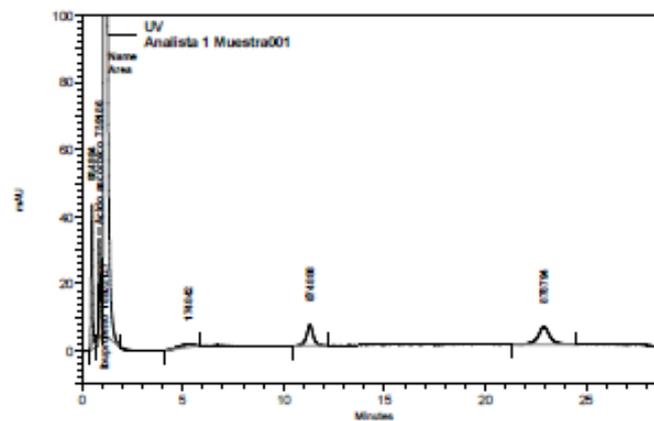
MÉTODO: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Tesis Alvaro\Dextrometorfano y Fenilefrina.met

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Analista 1 Muestra001

FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 01/09/2014 07:06:15 p.m.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: (Data Description)

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results				
Nombre del pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración
Acido ascórbico	0.567	788106	151171	81.760
Ibuprofeno	1.140	15008127	1850816	100.842
Totals		15796233	2011757	182.602

Precisión Intermedia muestra Ácido Ascórbico e Ibuprofeno Analista 2

RGH, S.A.
Reporte de secuencia

UV		Acido ascór...	Ibuprofeno	Acido ascór...	Ibuprofeno
Identificación de la muestra	Vial	Area	Area	ESTD Conc...	ESTD Conc...
Analista 2 Muestra002	2	708778	18823684	99.00	100.74
Analista 2 Muestra002	2	702800	18803193	98.17	100.63
Analista 2 Muestra002	2	701913	18775426	98.04	100.48
Analista 2 Muestra002	2	696981	18781046	97.36	100.51
Analista 2 Muestra002	2	692328	18767609	96.71	100.44
Analista 2 Muestra002	2	688450	18773147	96.16	100.47
Analista 2 Muestra002	2	678435	18777373	94.77	100.49
Analista 2 Muestra002	2	674479	18766535	94.21	100.43
Analista 2 Muestra002	2	668081	18795013	93.32	100.58
Analista 2 Muestra002	2	660024	18799744	92.19	100.61
Analista 2 Muestra002	2	658915	18760213	92.04	100.40
Analista 2 Muestra002	2	653723	18788553	91.31	100.55
Analista 2 Muestra002	2	651937	18820142	91.06	100.72
Analista 2 Muestra002	2	645868	18817877	90.22	100.71
Analista 2 Muestra002	2	639522	18850728	89.33	100.88
Min:		639522	18760213	89.33	100.40
Max:		708778	18850728	99.00	100.88
Mean:		674816	18793352	94.26	100.57
Std D...		22736	25789	3.18	0.14
%RSD:		3.37	0.14	3.37	0.14

REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC

MÉTODO: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Tesis Alvaro\Dextrometorfano y

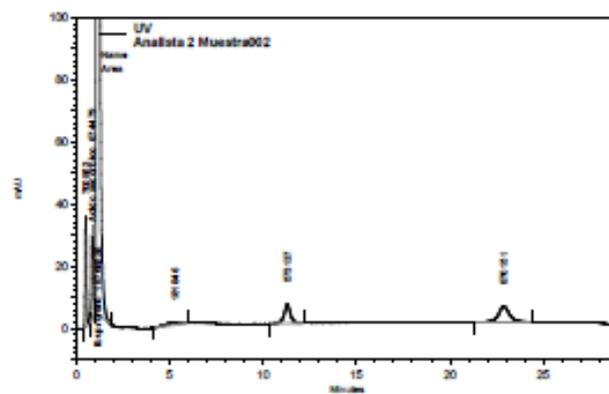
Fenilefrina.met

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Analista 2 Muestra002

FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 02/09/2014 03:13:24 a.m.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: (Data Description)

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results

Nombre del pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración
Acido ascórbico	0.875	674479	106162	100.958
Ibuprofeno	1.147	18766535	1919954	99.848
Totals		19441014	2026096	200.806

Precisión Intermedia muestra Fenilefrina HCl y Dextrometorfano HBr Analista 1

RGH, S.A.

Reporte de secuencia

UV		Fenilefrina ...	Dextrometor...	Fenilefrina ...	Dextrometo...
Identificación de la muestra	Vial	Area	Area	ESTD Conc...	ESTD Conc...
Analista 1 Muestra Dex-Fen001	1	5403730	10213160	101.52	101.17
Analista 1 Muestra Dex-Fen001	1	5395660	10243065	101.37	102.26
Analista 1 Muestra Dex-Fen001	1	5391120	9295753	101.28	102.20
Analista 1 Muestra Dex-Fen001	1	5385007	10159377	101.17	103.57
Analista 1 Muestra Dex-Fen001	1	5375024	9268665	100.98	102.85
Analista 1 Muestra Dex-Fen001	1	5357200	10190550	100.64	103.86
Analista 1 Muestra Dex-Fen001	1	5380875	9300914	101.09	103.46
Analista 1 Muestra Dex-Fen001	1	5381827	10183341	101.11	104.99
Analista 1 Muestra Dex-Fen001	1	5398777	10170120	101.43	105.80
Analista 1 Muestra Dex-Fen001	1	5361531	9265935	100.73	104.85
Min:		5357200	9265935	100.64	101.17
Max:		5403730	10243065	101.52	105.80
Mean:		5383075	9829088	101.13	103.50
Std D...		15293	470822	0.29	1.44
%RSD:		0.28	4.79	0.28	1.39

REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC

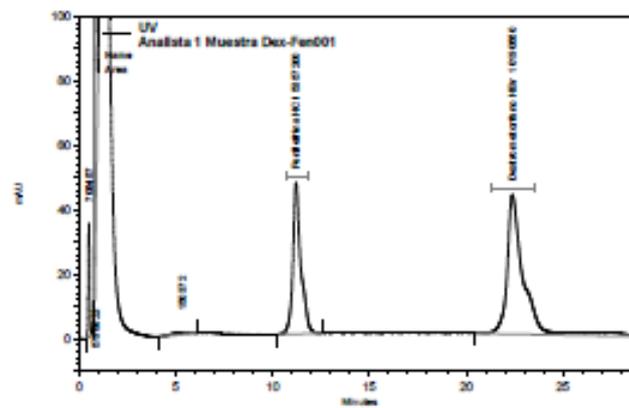
MÉTODO: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Tesis Alvaro\Dextrometorfano y Fenilefrina.met

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Analista 1 Muestra Dex-Fen001

FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 02/09/2014 03:40:46 p.m.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: (Data Description)

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results

Nombre del pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración
Fenilefrina HCl	11.215	5557200	187420	104.259
Dextrometorfano HBr	22.587	10190550	172627	105.865
Totals		15547750	360047	208.101

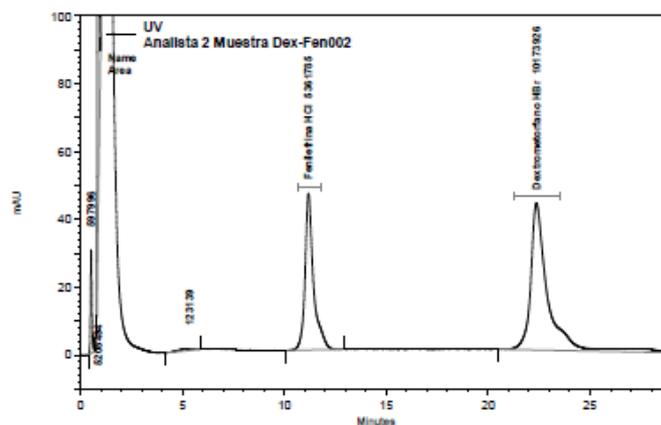
Precisión Intermedia muestra Fenilefrina HCl y Dextrometorfano HBr Analista 2

RGH, S.A.
Reporte de secuencia

UV		Fenilefrina ...	Dextrometor...	Fenilefrina ...	Dextrometo...
Identificación de la muestra	Vial	Area	Area	ESTD Conc...	ESTD Conc...
Analista 2 Muestra Dex-Fen002	2	5374989	9255760	101.16	103.96
Analista 2 Muestra Dex-Fen002	2	5367416	9271518	101.02	104.05
Analista 2 Muestra Dex-Fen002	2	5356117	9256425	100.81	104.06
Analista 2 Muestra Dex-Fen002	2	5371641	9238576	101.10	104.86
Analista 2 Muestra Dex-Fen002	2	5379298	10222193	101.24	104.87
Analista 2 Muestra Dex-Fen002	2	5367120	10232532	101.02	104.20
Analista 2 Muestra Dex-Fen002	2	5344960	10188626	100.60	104.41
Analista 2 Muestra Dex-Fen002	2	5357354	10184133	100.83	104.39
Analista 2 Muestra Dex-Fen002	2	5361785	10173926	100.91	103.04
Analista 2 Muestra Dex-Fen002	2	5371552	9265546	101.10	102.40
Analista 2 Muestra Dex-Fen002	2	5381999	10195532	101.30	103.05
Analista 2 Muestra Dex-Fen002	2	5363227	10181557	100.94	101.75
Analista 2 Muestra Dex-Fen002	2	5336780	10185051	100.44	101.75
Analista 2 Muestra Dex-Fen002	2	5368087	10196862	101.03	102.39
Analista 2 Muestra Dex-Fen002	2	5361560	10183772	100.91	101.76
Min:		5336780	9238576	100.44	101.75
Max:		5381999	10232532	101.30	104.87
Mean:		5364259	9882134	100.96	103.40
Std D...		12108	457433	0.23	1.15
%RSD:		0.23	4.63	0.23	1.11

REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC

MÉTODO: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Tesis Alvaro\Dextrometorfano y Fenilefrina.met
 IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Analista 2 Muestra Dex-Fen002
 FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 03/09/2014 01:19:19 a.m.
 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: (Data Description)
 VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results

Nombre del pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración
Fenilefrina HCl	11.1180	5361765	164473	100.915
Dextrometorfano HBr	22.367	10173926	172933	103.039
Totals		15535711	337406	203.954

Anexo No 4. Linealidad

Linealidad Ibuprofeno y Ácido Ascórbico

REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC

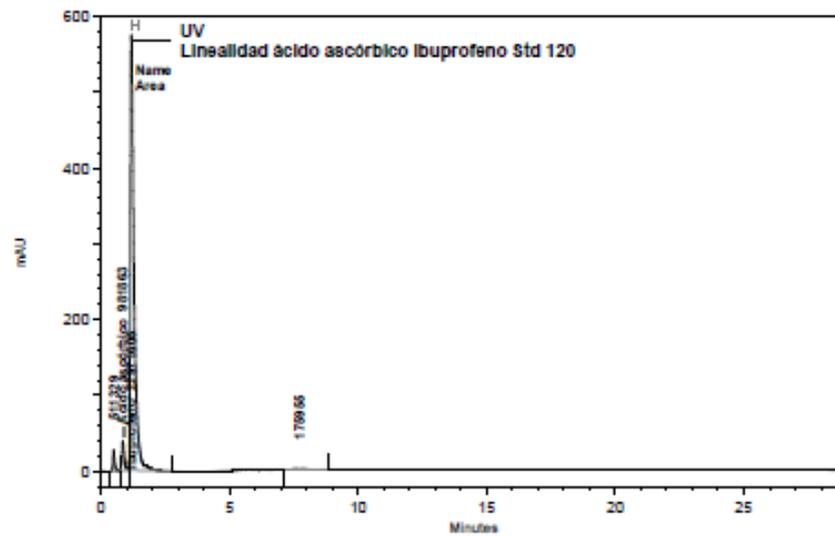
MÉTODO: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Farmamedica\Linealidad ácido ascórbico ibuprofeno.met

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Linealidad ácido ascórbico ibuprofeno Std 120

FECHA DE INYECCIÓN: 22/08/2014

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: Exactitud ácido ascórbico ibuprofeno Estándar al 120%

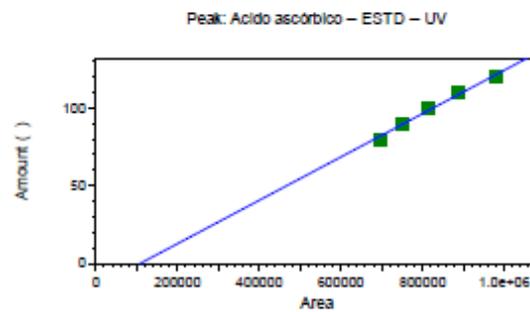
VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results

Nombre del pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración
Acido ascórbico	0.853	981863	153896	120.000 CAL
Ibuprofeno	1.187	22971605	2298089	120.000 CAL
Totals		23953468	2451985	240.000 CAL

Linealidad ácido ascórbico HCl



	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
Amount	80	90	100	110	120
Area	697176	750238	813052	889813	981863
RF	0.0001147486	0.0001199619	0.0001229933	0.0001236214	0.0001222166
Last Area	43097295	3208022	63278118	80018835	43258785
Residual	-1.98591	0.618763	1.86429	1.166	-1.66314
Rep StDev	3376.34	1041.58	4107.23	1626.2	4126.97
Rep %RSD	0.487012	0.138984	0.507644	0.182701	0.420128
Rep 1 Area	691328	748254	804849	888619	978430
Rep 2 Area	691328	749796	809326	891836	986647
Rep 3 Area	697176	750238	813052	889813	981863

Acido ascórbico (UV)

Average RF: 0.000120708 RF StDev: 3.60755e-006 RF %RSD: 2.98865

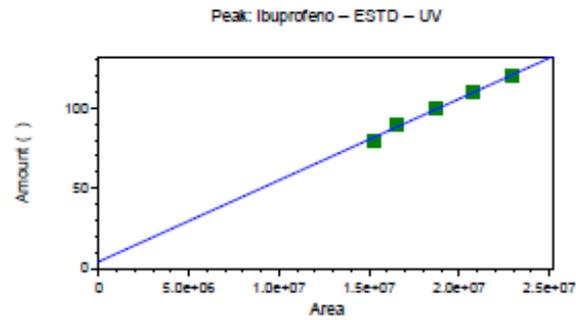
Scaling: None LSQ Weighting: None Force Through Zero: Off

Replicate Mode: Replace

Fit Type: Linear

 $y = 0.000139371x - 15.1805$ Goodness of fit (r^2): 0.988072

Linealidad ibuprofeno



	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
Amount	80	90	100	110	120
Area	15318323	16561773	18728986	20786028	22971605
RF	5.2225037949	5.4342007948	5.3393173554	5.2920163486	5.2238404761
Last Area	6502e-006	0621e-006	6174e-006	7422e-006	0082e-006
Residual	-1.94519	1.73973	0.733143	0.286083	-0.813766
Rep StDev	102022	55077.1	185163	84551.9	136722
Rep %RSD	0.671177	0.3336	0.997807	0.407852	0.595002
Rep 1 Area	15141615	16452099	18361004	20633663	22845259
Rep 2 Area	15141615	16515833	18581023	20773373	23118447
Rep 3 Area	15318323	16561773	18728986	20786028	22971605

Ibuprofeno (UV)

Average RF: 5.30238e-006 RF StDev: 8.85962e-008 RF %RSD: 1.67088

Scaling: None LSQ Weighting: None Force Through Zero: Off

Replicate Mode: Replace

Fit Type: Linear

 $y = 5.07868e-006x + 4.14831$ Goodness of fit (r^2): 0.991908

Linealidad Dextrometorfano HBr y Fenilefrina HCl

Page 1 of 4

REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC

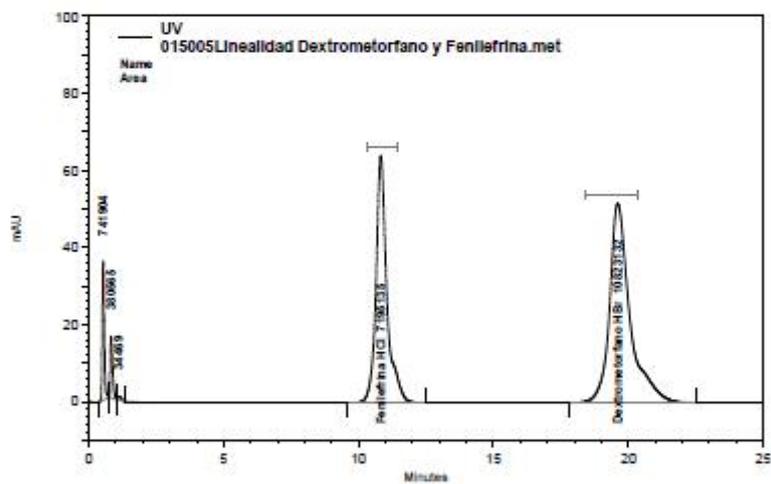
MÉTODO: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Tesis Alvaro\Linealidad Dextrometorfano y Fenilefrina.met

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: 015005Linealidad Dextrometorfano y Fenilefrina.met

FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 21/08/2014 09:26:00 p.m.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: Linealidad Dextrometorfano y Fenilefrina 120%

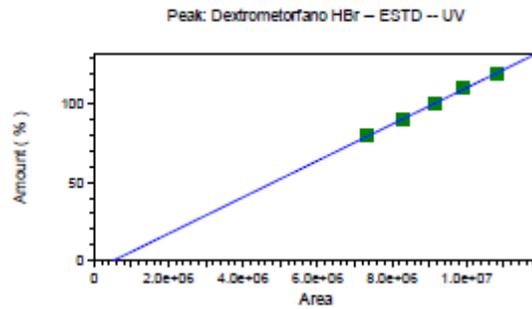
VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results

Nombre del pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración
Fenilefrina HCl	10.827	7195135	255975	120.000 CAL
Dextrometorfano HBr	19.607	10323132	206489	120.000 CAL
Totals		18018267	462363	240.000 CAL

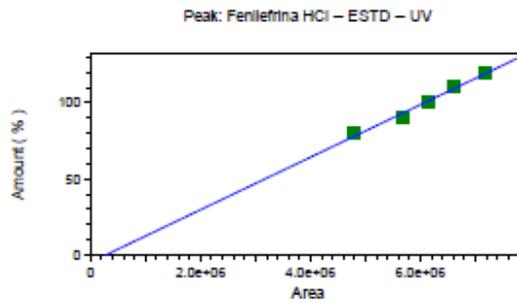
Linealidad Dextrometorfano HBr



	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
Amount	80	90	100	110	120
Area	7346994	8275453	9137970	9915350	10808251
RF	1.088880704	1.087553756	1.094334956	1.109390957	1.110262890
	1356e-005	87591e-005	23207e-005	47533e-005	82295e-005
Last Area					
Residual	0.419993	-0.414972	-0.480404	0.447694	0.0276891
Rep StDev	5598.2	4630.56	7497.07	10183.1	19572.2
Rep %RSD	0.0761971	0.0559553	0.082043	0.1027	0.181086
Rep 1 Area	7341601	8277351	9132477	9907163	10786080
Rep 2 Area	7346604	8278833	9146511	9926753	10815541
Rep 3 Area	7352777	8270175	9134922	9912135	10823132

Dextrometorfano HBr (UV)
 Average RF: 1.09808e-005 RF StDev: 1.10206e-007 RF %RSD: 1.00362
 Scaling: None LSQ Weighting: None Force Through Zero: Off
 Replicate Mode: Wt Average (Weight: 0)
 Fit Type: Linear
 $y = 1.16698e-005x - 6.15821$
 Goodness of fit (r²): 0.999219

Linealidad Fenilefrina HCl



	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
Amount	80	90	100	110	120
Area	4784205	5678268	6155863	6596180	7170791
RF	1.672169031	1.585828286	1.624467601	1.667621871	1.673455628
	76397e-005	63059e-005	0496e-005	78033e-005	23105e-005
Last Area					
Residual	2.26489	-3.08765	-1.36805	1.04552	1.14528
Rep StDev	3735.62	4783.91	1215.41	20556.5	24897.3
Rep %RSD	0.0780866	0.084294	0.0197439	0.311642	0.347204
Rep 1 Area	4780099	5671484	6155960	6573814	7145375
Rep 2 Area	4785114	5673674	6157027	6614247	7171862
Rep 3 Area	4787403	5680645	6154602	6600479	7195135

Fenilefrina HCl (UV)

Average RF: 1.64471e-005 RF StDev: 3.86734e-007 RF %RSD: 2.35138

Scaling: None LSQ Weighting: None Force Through Zero: Off

Replicate Mode: Wt Average (Weight: 0)

Fit Type: Linear

y = 1.72295e-005x - 4.69421

Goodness of fit (r^2): 0.981060

Anexo 5Robustez

Temperatura Ibuprofeno y Ácido Ascórbico

RGH, S.A.

Reporte de secuencia

UV	Acido ascór...	Ibuprofeno	Acido ascór...	Ibuprofeno
Identificación de la muestra	Vial	Area	Area ESTD Conc...	ESTD Conc...
Ibu-AcAsc 25°C	2	803553	18653783	101.45
Ibu-AcAsc 25°C	2	797191	18661629	100.64
Ibu-AcAsc 25°C	2	794170	18649350	100.26
Min:	794170	18649350	100.26	100.28
Max:	803553	18661629	101.45	100.34
Mean:	798305	18654921	100.79	100.31
Std D...	4790	6218	0.60	0.03
%RSD:	0.60	0.03	0.60	0.03

RGH, S.A.

Reporte de secuencia

UV	Acido ascór...	Ibuprofeno	Acido ascór...	Ibuprofeno
Identificación de la muestra	Vial	Area	Area ESTD Conc...	ESTD Conc...
Ibu-AcAsc 35°C	2	795138	18703019	100.39
Ibu-AcAsc 35°C	2	791184	18688324	99.89
Ibu-AcAsc 35°C	2	789055	18651033	99.62
Min:	789055	18651033	99.62	100.29
Max:	795138	18703019	100.39	100.57
Mean:	791792	18680792	99.96	100.45
Std D...	3087	26799	0.39	0.14
%RSD:	0.39	0.14	0.39	0.14

REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC

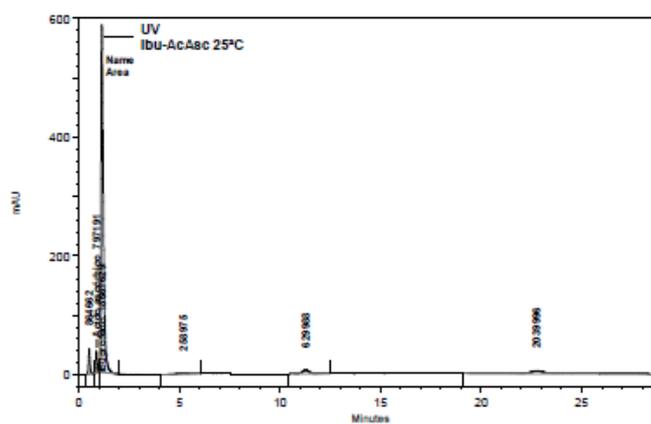
MÉTODO: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Tesis Alvaro\Robustez 2014 08 28.met

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Ibu-AcAsc 25°C

FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 28/08/2014 05:01:57 p.m.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: {Data Description}

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



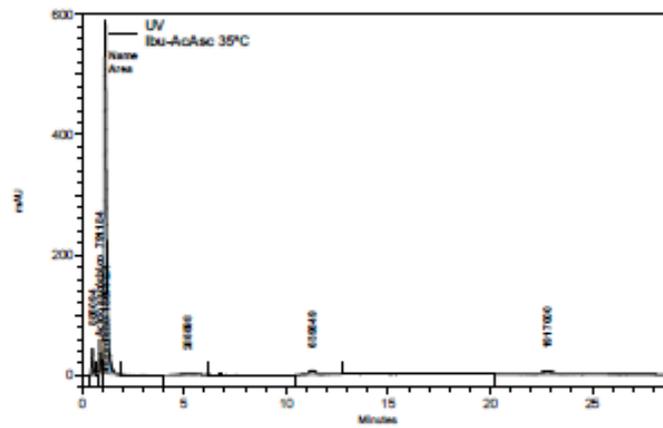
UV Results

Nombre del pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración
Acido ascórbico	0.880	797191	148471	100.645
Ibuprofeno	1.147	18661629	2342369	100.344
Totals		19458820	2490839	200.989

REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC

MÉTODO: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Tesis Alvaro\Robustez 2014 08 28.met

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Ibu-AcAsc 35°C
 FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 28/08/2014 06:33:15 p.m.
 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: (Data Description)
 VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results				
Nombre del pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración
Acido ascórbico	0.500	78110±	14752±	88.00%
Ibuprofeno	1.156	104000±	24088±	100.00%
Totals		182110±	24088±	200.00%

Robustez Temperatura Dextrometorfano HBr y Fenilefrina HCl

RGH, S.A.

Reporte de secuencia

UV		Fenilefrina ...	Dextrometor...	Fenilefrina ...	Dextrometo...
Identificación de la muestra	Vial	Area	Area	ESTD Conc...	ESTD Conc...
Fenil-Dextro 25°C	1	6731397	10036346	102.55	101.92
Fenil-Dextro 25°C	1	6608676	9942915	100.68	100.97
Fenil-Dextro 25°C	1	6629760	9986432	101.00	101.41
	Min:	6608676	9942915	100.68	100.97
	Max:	6731397	10036346	102.55	101.92
	Mean:	6656611	9988564	101.41	101.44
	Std D...	65619	46752	1.00	0.47
	%RSD:	0.99	0.47	0.99	0.47

RGH, S.A.

Reporte de secuencia

UV		Fenilefrina ...	Dextrometor...	Fenilefrina ...	Dextrometo...
Identificación de la muestra	Vial	Area	Area	ESTD Conc...	ESTD Conc...
Fenil-Dextro 35°C	1	6588397	9912533	100.37	100.66
Fenil-Dextro 35°C	1	6632861	9995726	101.04	101.51
Fenil-Dextro 35°C	1	6608876	10092702	100.68	102.49
	Min:	6588397	9912533	100.37	100.66
	Max:	6632861	10092702	101.04	102.49
	Mean:	6610045	10000320	100.70	101.56
	Std D...	22255	90172	0.34	0.92
	%RSD:	0.34	0.90	0.34	0.90

REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC

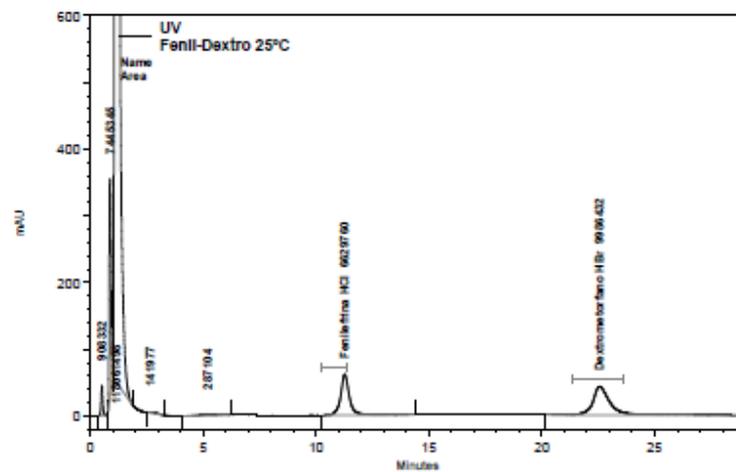
MÉTODO: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Tesis Alvaro\Robustez 2014 08 28.met

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Fenil-Dextro 25°C

FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 28/08/2014 02:29:41 p.m.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: {Data Description}

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results

Nombre del pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración
Fenilefrina HCl	11.267	6629760	243751	100.997
Dextrometorfano HBr	22.360	9996432	171407	101.414
Totals		16616192	415158	202.411

REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC

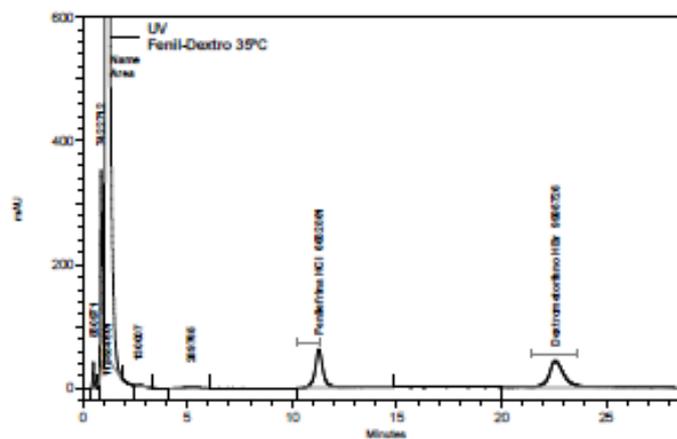
MÉTODO: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Tesis Alvaro\Robustez 2014 08 28.met

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Fenil-Dextro 35°C

FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 28/08/2014 03:30:33 p.m.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: (Data Description)

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results Nombre del pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración
Fenilefrina HCl	11.507	662269	217000	101.000
Dextrometorfano HBr	22.578	186626	170070	101.500
Totals		1000000	221517	202.500

Robustez Flujo Ibuprofeno y Ácido Ascórbico

RGH, S.A.

Reporte de secuencia

UV	Acido ascór...	Ibuprofeno	Acido ascór...	Ibuprofeno
Identificación de la muestra	Vial	Area	Area ESTD Conc...	ESTD Conc...
Robustez flujo 1.9 2014 08 29 ...	2	723187	19697809	99.91 100.12
Robustez flujo 1.9 2014 08 29 ...	2	716574	19675333	98.99 100.00
Robustez flujo 1.9 2014 08 29 ...	2	712912	19726734	98.49 100.26
Min:		712912	19675333	98.49 100.00
Max:		723187	19726734	99.91 100.26
Mean:		717558	19699959	99.13 100.13
Std D...		5208	25768	0.72 0.13
%RSD:		0.73	0.13	0.73 0.13

RGH, S.A.

Reporte de secuencia

UV	Acido ascór...	Ibuprofeno	Acido ascór...	Ibuprofeno
Identificación de la muestra	Vial	Area	Area ESTD Conc...	ESTD Conc...
Robustez flujo 2.1 2014 08 29 ...	2	572529	17910921	99.52 99.43
Robustez flujo 2.1 2014 08 29 ...	2	569053	17938185	98.91 99.58
Robustez flujo 2.1 2014 08 29 ...	2	563849	17923960	98.01 99.50
Min:		563849	17910921	98.01 99.43
Max:		572529	17938185	99.52 99.58
Mean:		568477	17924355	98.81 99.50
Std D...		4369	13636	0.76 0.08
%RSD:		0.77	0.08	0.77 0.08

REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC

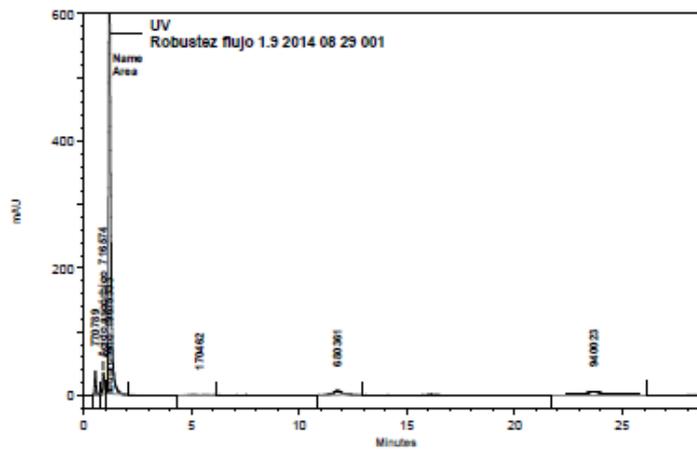
MÉTODO: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Tesis Alvaro\Robustez 2014 08 28.met

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Robustez flujo 1.9 2014 08 29 001

FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 29/08/2014 03:52:42 p.m.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: {Data Description}

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results

Nombre del pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración
Acido ascórbico	0.913	716574	132366	98.993
Ibuprofeno	1.193	19675333	2542027	100.003
Totals		20391907	2674393	198.996

REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC

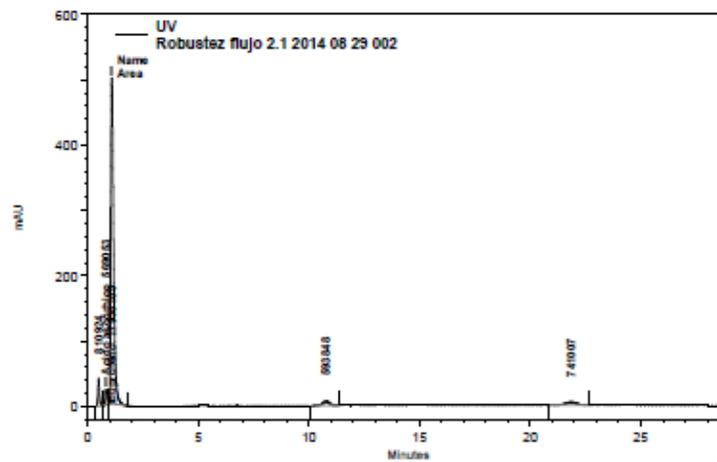
MÉTODO: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Tesis Alvaro\Robustez 2014 08 28.met

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Robustez flujo 2.1 2014 08 29 002

FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 29/08/2014 09:29:03 p.m.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: {Data Description}

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



UV Results

Nombre del pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración
Acido ascórbico	0.333	569053	90594	98.915
Ibuprofeno	1.100	17936165	1994620	99.577
Totals		18507238	2085214	198.492

Robustez Flujo Dextrometorfano HBr y Fenilefrina HCl

RGH, S.A.

Reporte de secuencia

UV	Fenilefrina ...	Dextrometor...	Fenilefrina ...	Dextrometo...
Identificación de la muestra	Vial	Area	Area	ESTD Conc... ESTD Conc...
Robustez flujo 1.9 2014 08 29 ...	1	6781661	9966649	99.51 100.21
Robustez flujo 1.9 2014 08 29 ...	1	6787843	9951204	99.60 100.06
Robustez flujo 1.9 2014 08 29 ...	1	6764684	10059334	99.26 101.14
Min:		6764684	9951204	99.26 100.06
Max:		6787843	10059334	99.60 101.14
Mean:		6778063	9992396	99.46 100.47
Std D...		11991	58482	0.18 0.59
%RSD:		0.18	0.59	0.18 0.59

RGH, S.A.

Reporte de secuencia

UV	Fenilefrina ...	Dextrometor...	Fenilefrina ...	Dextrometo...
Identificación de la muestra	Vial	Area	Area	ESTD Conc... ESTD Conc...
Robustez flujo 2.1 2014 08 29 ...	1	6121815	8148359	100.91 100.69
Robustez flujo 2.1 2014 08 29 ...	1	6110038	8139768	100.72 100.58
Robustez flujo 2.1 2014 08 29 ...	1	6157024	8140483	101.49 100.59
Min:		6110038	8139768	100.72 100.58
Max:		6157024	8148359	101.49 100.69
Mean:		6129626	8142870	101.04 100.62
Std D...		24447	4767	0.40 0.06
%RSD:		0.40	0.06	0.40 0.06

REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC

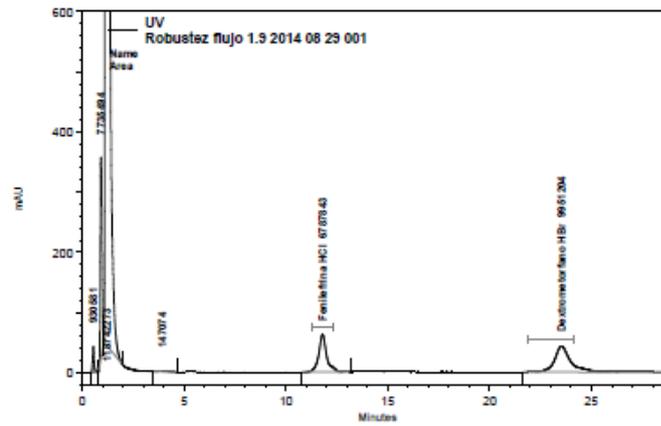
MÉTODO: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Tesis Alvaro\Robustez 2014 08 28.met

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Robustez flujo 1.9 2014 08 29 001

FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 29/08/2014 02:21:22 p.m.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: {Data Description}

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 μ L



UV Results

Nombre del pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración
Fenilefrina HCl	11.900	6737843	246371	99.603
Dextrometorfano HBr	23.527	9951204	171611	100.058
Totals		16739047	419982	199.661

REPORTE DE ANÁLISIS POR HPLC

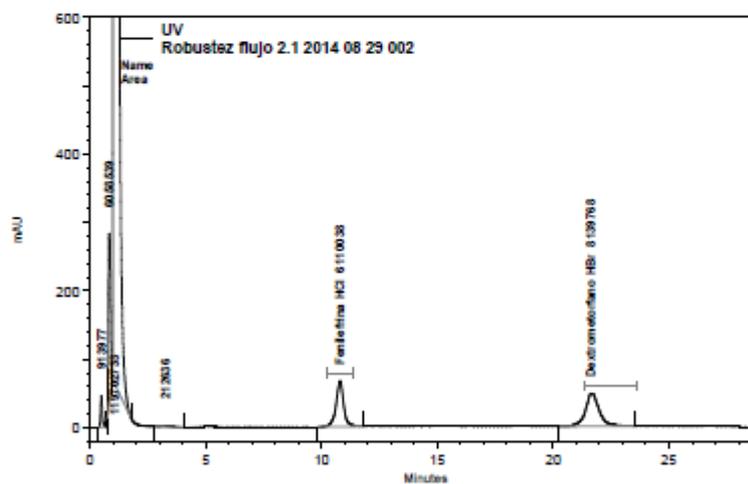
MÉTODO: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Tesis Alvaro\Robustez 2014 08 28.met

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA: Robustez flujo 2.1 2014 08 29 002

FECHA Y HORA DE INYECCIÓN: 29/08/2014 07:57:43 p.m.

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: {Data Description}

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 20 µL



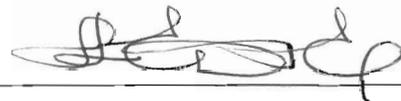
UV Results

Nombre del pico	Tiempo de retención	Área	Altura	Concentración
Fenilefrina HCl	10.807	6110038	267169	100.720
Dextrometorfano HBr	21.633	8139768	192957	100.590
Totals		14249806	460126	201.299



Álvaro Javier García López

Autor



Lic. Jorge Lionel García González

Asesor



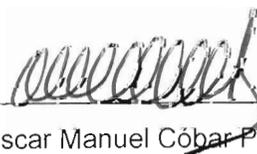
M.Sc. Félix Ricardo Véliz Fuentes

Asesor



Dr. Juan Francisco Pérez Sabino

Director de Escuela



Dr. Oscar Manuel Cobar Pinto

Decano