



UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
MÓDULO DE QUÍMICA ANALÍTICA

OPTIMIZACIÓN DEL ANÁLISIS PARA LA
DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PRINCIPIOS
ACTIVOS DE UN MEDICAMENTO ANTIGRIPIAL EN
CÁPSULA DE GELATINA BLANDA.

Autor: Lic. Christian Alexander Urbina De Miguel

Directora: Dra. Sonia Frutos De Diego

Tutora: Dra. Pilar Fernández Hernando

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

JUNIO 2020



Dra. Pilar Fernández Hernando

Profesora del Máster en Ciencia y Tecnología Química
Dpto. de Química
Facultad de Ciencias
UNED
Paseo Senda del Rey 9
28040 Madrid

Dra. Sonia Frutos de Diego, jefa de laboratorio de Control de Calidad de Berlimed S.A.

CERTIFICA:

Que D. Christian Alexander Urbina De Miguel ha realizado bajo mi dirección en los laboratorios de Control de Calidad de Berlimed S.A. el Proyecto de Investigación titulado "OPTIMIZACIÓN DEL ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PRINCIPIOS ACTIVOS DE UN MEDICAMENTO ANTIGRIPIAL EN CÁPSULA DE GELATINA BLANDA."

Y para que conste a efectos oportunos.

Madrid a 11 de mayo de 2020

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto no podría haberse completado sin la valiosísima colaboración de las siguientes personas: Sonia Frutos De Diego, Silvia Campuzano, Alberto Roca, Rosendo García, Francisco Javier Álvarez, Judith Amezua, Ana Illera, Mario Bollo, Luis Miguel González, Aurora Álvarez, Olga Valverde y Emilio Garriz a quienes agradezco su disposición para ayudar, sus consejos, ideas y opiniones sin las cuales este proyecto no habría salido adelante.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | 1 |
| PARTE 1: MARCO TEÓRICO | 2 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 2. OBJETIVOS DEL TRABAJO | 4 |
| 3. RESFRIADO COMÚN Y GRIPE | 4 |
| 4. HISTORIA DE LOS TRATAMIENTOS PARA RESFRIADOS | 6 |
| 4.1 Edad antigua | 6 |
| 4.2 Edad media | 8 |
| 4.3 Edad moderna | 8 |
| 4.4 Edad contemporánea | 9 |
| 4.5. Algunos remedios populares de fines del siglo XIX y principios del siglo XX | 10 |
| 5. TRATAMIENTO PARA RESFRIADOS HOY EN DÍA: MEDICAMENTOS | |
| ANTIGRIPALES | 12 |
| 5.1 Antiinflamatorios no esteroideos (AINE) | 12 |
| 5.2 Supresores de la tos (antitusígenos o antitusivos) | 13 |
| 5.3 Fármacos mucoactivos | 14 |
| 5.4 Descongestionantes nasales | 15 |
| 5.5 Antihistamínicos | 15 |
| 6. PRINCIPIOS ACTIVOS DE INTERÉS | 16 |
| 6.1 Paracetamol | 16 |
| 6.2 Fenilefrina | 17 |
| 6.3 Dextrometorfano | 18 |
| 6.4 Doxilamina | 19 |
| 7. CONTROL DE CALIDAD EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA | 20 |
| 7.1 Ensayos de control de calidad | 21 |
| 7.2 Secuencia cromatográfica | 22 |
| 7.3 La revisión | 23 |
| 7.4. Cápsulas de gelatina blanda | 24 |
| PARTE 2: PARTE EXPERIMENTAL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN | 25 |
| 1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROYECTO | 26 |
| 2. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS..... | 26 |
| 2.1. Materiales y Equipos | 26 |
| 2.2. Reactivos | 27 |

| | |
|---|----|
| 3. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO ACTUAL PARA EL ANÁLISIS DE CONTENIDO DE PRINCIPIOS ACTIVOS..... | 27 |
| 3.1. Preparación de las soluciones estándar..... | 27 |
| 3.2. Procedimiento completo del análisis..... | 28 |
| 3.3. Condiciones cromatográficas..... | 28 |
| 3.4. Cálculos establecidos para determinar el contenido de los principios activos | 29 |
| 4. PROPUESTAS DE MEJORA | 30 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 31 |
| 5.1. Necesidad de cuantificación a dos longitudes de onda en HPLC-UV | 31 |
| 5.2. Estudio de la técnica de separación | 33 |
| 5.2.1. Técnica de separación HPLC | 33 |
| 5.2.2. Desarrollo de un método alternativo de separación por UPLC | 36 |
| 5.2.3. Comparación de las técnicas HPLC y UPLC | 39 |
| 5.3. Método alternativo de extracción..... | 45 |
| 5.4. Evaluación de las condiciones de temperatura y agitación de la extracción..... | 48 |
| 5.5. Reducción del número de cápsulas | 49 |
| 5.6. Filtros | 49 |
| 5.7. Estudio de la estabilidad de la solución estándar | 50 |
| 5.8. Resumen de los estudios realizados en los métodos propuestos | 52 |
| 6. COMPARACIÓN DE LOS METODOS ACTUAL Y PROPUESTO | 54 |
| 6.1. Mejoras logradas con los métodos propuestos | 55 |
| 6.1.1. Ahorro de tiempo | 55 |
| 6.1.2. Ahorro económico | 55 |
| 6.1.3. Mejoras en ergonomía | 56 |
| 6.2. Investigaciones futuras | 56 |
| 7. CONCLUSIONES | 57 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA | 58 |
| Anexo 1: Datos experimentales de la precisión de método (sección 5.4) | 61 |
| Anexo 2: Datos experimentales de la precisión de método (sección 5.5) | 63 |
| Anexo 3: Resultados del ensayo de comparación de filtros (sección 5.6) | 72 |
| Anexo 4: Resultados de los ensayos de estabilidad de la solución estándar (sección 5.7) | 74 |
| Anexo 5: Resultados de la comparación directa de las 3 soluciones estándar (sección 5.7) | 73 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1: Clasificación de los antiinflamatorios no esteroideos | 13 |
| Tabla 2: Propiedades físico-químicas del paracetamol | 17 |
| Tabla 3: Propiedades físico-químicas de la fenilefrina | 18 |
| Tabla 4: Propiedades físico-químicas del dextrometorfano | 19 |
| Tabla 5: Propiedades físico-químicas de la doxilamina | 20 |
| Tabla 6: Condiciones cromatográficas del método actual para el análisis de contenido de principios activos | 29 |
| Tabla 7: Gradiente de elución del método actual para el análisis de contenido de principios activos | 29 |
| Tabla 8: Áreas obtenidas en función de los volúmenes de inyección en HPLC | 33 |
| Tabla 9: Gradiente de elución con el número de columnas de fase móvil en cada etapa..... | 38 |
| Tabla 10: Gradiente de elución teórico equivalente para el método UPLC | 38 |
| Tabla 11: Gradiente 2 de elución para el método UPLC | 40 |
| Tabla 12: Gradiente 3 de elución para el método UPLC | 40 |
| Tabla 13: Gradiente 4 de elución para el método UPLC | 41 |
| Tabla 14: Gradiente 5 de elución para el método UPLC | 42 |
| Tabla 15: Preparación de las soluciones estándar para el estudio de linealidad | 43 |
| Tabla 16: Áreas de las inyecciones de estándares 1X, 2X y 4X de APAP a 300 nm ... | 44 |
| Tabla 17: Ensayos de precisión de método propuesto respecto al actual | 45 |
| Tabla 18: Resultados del ensayo 1 | 46 |
| Tabla 19: Resultados del ensayo 2 | 46 |
| Tabla 20: Resultados del ensayo 3 | 46 |
| Tabla 21: Resultados del ensayo 4 | 47 |
| Tabla 22: Comparación de los ensayos 1 y 2 | 47 |
| Tabla 23: Comparación de los ensayos 1 y 3 | 47 |
| Tabla 24: Comparación de los ensayos 1 y 4 | 47 |
| Tabla 25: Comparación de los métodos propuestos para la extracción de los analitos | 48 |
| Tabla 26: Preparaciones de los estándares para el estudio de estabilidad | 50 |
| Tabla 27: Concentraciones de los estándares en mg/mL para el estudio de estabilidad | 51 |
| Tabla 28: Métodos de extracción propuestos | 52 |
| Tabla 29: Gradiente óptimo de elución para los métodos propuestos | 53 |
| Tabla 30: Comparación entre los métodos actual y propuestos | 54 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Estructura de la salicilina | 9 |
| Figura 2: Estructura del ácido salicílico | 10 |
| Figura 3: Estructura del ácido acetilsalicílico | 10 |
| Figura 4A: Cigarrillos Marshall's | 11 |
| Figura 4B: Cura para la tos de un minuto | 11 |
| Figura 4C: Publicidad de Vicks VapoRub® | 11 |
| Figura 5: Botella de heroína comercial | 14 |
| Figura 6: Estructura de la histamina | 15 |
| Figura 7: Estructura del paracetamol | 16 |
| Figura 8: Estructura de la fenilefrina | 17 |
| Figura 9: Estructura del dextrometorfano | 18 |
| Figura 10: Estructura de la doxilamina | 19 |
| Figura 11: Espectro UV-VIS en agua de DEX | 32 |
| Figura 12: Espectro UV-VIS en agua de APAP y PHE | 32 |
| Figura 13: Espectro UV-VIS en agua de DOX | 32 |
| Figura 14: Representación gráfica del área de APAP en función del volumen de inyección en HPLC | 34 |
| Figura 15: Representación gráfica del área de DEX en función del volumen de inyección en HPLC | 34 |
| Figura 16: Representación gráfica del área de PHE en función del volumen de inyección en HPLC | 35 |
| Figura 17: Representación gráfica del área de DOX en función del volumen de inyección en HPLC | 35 |
| Figura 18: Cromatograma del método actual por HPLC | 39 |
| Figura 19: Cromatograma obtenido utilizando el gradiente teórico por UPLC | 39 |
| Figura 20: Cromatograma obtenido utilizando el gradiente 2 | 40 |
| Figura 21: Cromatograma obtenido utilizando el gradiente 3 | 41 |
| Figura 22: Cromatograma obtenido utilizando el gradiente 4 | 42 |
| Figura 23: Cromatograma obtenido utilizando el gradiente 5 | 42 |

Las estructuras químicas de los compuestos comentados en esta memoria son de elaboración propia realizadas con ChemSketch®

ÍNDICE DE ECUACIONES

| | |
|---|----|
| Ecuación 1: Fórmula general para el cálculo del porcentaje de contenido de los principios activos | 30 |
| Ecuación 2: Cálculo del volumen de relleno de la columna cromatográfica | 36 |
| Ecuación 3: Volumen de fase móvil que pasa por la columna en una etapa del gradiente | 37 |
| Ecuación 4: Cálculo del factor de respuesta instrumental | 51 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| HPLC | Cromatografía líquida de alta eficacia |
| UPLC | Cromatografía líquida de ultra eficacia |
| COX | Ciclooxigenasa |
| AINE | Antiinflamatorios no esteroideos |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| APAP | Paracetamol / Acetaminofén |
| ALCOA | Atribuible, legible, contemporáneo, original y exacto |
| DEX | Dextrometorfano bromhidrato |
| DOX | Doxilamina succinato |
| PHE | Fenilefrina clorhidrato |
| UV-VIS | Ultravioleta y visible |
| TFA | Ácido trifluoroacético |
| ACN | Acetonitrilo |
| PDA | Arreglo de fotodiodos |
| API | Principio activo |
| GMP | Buenas prácticas de fabricación |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|------------|---|
| ® | Marca registrada |
| g | Gramo |
| °C | Grado Celsius |
| mL | Mililitro |
| µm | Micrómetro |
| mg | Miligramo |
| ± | Más o menos |
| L | Litro |
| nm | Nanómetro |
| cm | Centímetro |
| mm | Milímetro |
| min | Minuto |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| 1X | Concentración declarada |
| 2X | Doble de la concentración declarada |
| 4X | Cuádruple de la concentración declarada |
| µV | Microvoltio |
| s | Segundo |

RESUMEN

Los medicamentos antigripales son preparaciones que contienen mezclas de distintos tipos de medicamentos o principios activos que atacan los síntomas pero no las causas. La fabricación de estos compuestos conlleva un proceso laborioso y en muchos casos costoso. Es por ello, que este trabajo ha centrado sus esfuerzos en conseguir un procedimiento analítico optimizado frente a uno existente (en tiempo de análisis, proceso de extracción y cuantificación, costes, etc.) El medicamento utilizado es un antigripal en cápsula de gelatina blanda cuyos principios activos son: paracetamol, fenilefrina, dextrometorfano y doxilamina. Mediante el uso de un agitador orbital en vez de uno magnético, se consiguió bajar el tiempo de extracción de 180 a 65 minutos y el tiempo total de la separación y cuantificación de 30 a 10 minutos cambiando la técnica de separación de HPLC a UPLC. Así mismo, se logró extender la caducidad de la solución estándar de trabajo de 4 días a 67 días y se ha propuesto un método de extracción equivalente al método actual pero utilizando filtros de jeringa alternativos. En total se propusieron 4 métodos equivalentes de extracción. Todas estas mejoras facilitan el trabajo del analista y del revisor, brindando un significativo ahorro de tiempo de análisis, recursos y costes para la empresa.

Palabras clave: Optimización, principios activos, antigripal, agitación orbital, HPLC, UPLC.

PARTE 1: MARCO TEÓRICO

1. INTRODUCCIÓN

El resfriado común es la enfermedad más frecuente en humanos y ha existido a lo largo de la historia. En promedio un adulto lo padece de dos a tres veces por año y un niño entre 6 y 8 veces. (Eccles y Weber, 2009). Es una enfermedad viral del tracto respiratorio superior que predominantemente afecta la parte nasal de la mucosa respiratoria (Arrol, 2011).

El tratamiento del resfriado común suele ser sintomático, es decir un tratamiento que alivia los síntomas asociados a la enfermedad mientras que el propio sistema inmunológico del individuo contrarresta al virus.

Es importante no confundir el resfriado común con la gripe, aunque los síntomas son parecidos, la gripe es causada por los virus de la familia influenzavirus y a diferencia del resfriado común puede resultar en complicaciones clínicas más severas. (Moghadami, 2017).

En la industria farmacéutica el control de calidad es una de las etapas fundamentales del proceso de producción de un medicamento, aunque no agrega valor al producto, por lo que hacerlo de una manera óptima, sencilla, a prueba de fallos y ahorrando costes en sus etapas es muy importante a nivel de presupuesto y organización de la empresa.

La optimización de procesos es una tendencia global en las empresas. Se busca obtener la mejor relación costo-beneficio posible, al aumentar la producción, disminuyendo tiempos de proceso y consumo de recursos. En un laboratorio de control de calidad farmacéutico esto puede interpretarse como obtener los resultados analíticos (el producto del laboratorio) en el menor tiempo posible y consumiendo la menor cantidad de recursos (humanos, materiales y tiempo) que el proceso permita.

En este proyecto se busca estudiar e implementar mejoras en el método el análisis de contenido de un antigripal en cápsula de gelatina blanda.

Para ello, se ha llevado a cabo la optimización de las diferentes etapas del análisis del contenido de los cuatro principios activos de un medicamento antigripal en cápsula de gelatina blanda empleando la cromatografía líquida de alta eficacia con detección de Ultravioleta (HPLC-UV) y la Ultra cromatografía líquida de alta resolución (Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC) como técnicas de separación y detección de los componentes del medicamento.

2. OBJETIVOS DEL TRABAJO

El objetivo general de este proyecto consiste en la mejora del proceso de análisis para la determinación del contenido de principios activos de un producto antigripal en cápsula de gelatina blanda, centrándose principalmente en la reducción y optimización del tiempo de análisis, ahorro de costes y avances en ergonomía.

De este objetivo general se derivan los siguientes **objetivos específicos**:

- Evaluación del uso de agitador orbital en lugar de agitación magnética en baño de agua con temperatura para la extracción de los principios activos
- Empleo de métodos cromatográficos alternativos (UPLC en lugar de HPLC)
- Estudio de la reducción del volumen de extracción
- Evaluación del riesgo ergonómico
- Optimizaciones de las condiciones de extracción de los principios activos
- Reducción del número de ciclos de agitación y ultrasonificación
- Estudio de la estabilidad de la solución estándar de trabajo

3. RESFRIADO COMÚN Y GRIPE

El resfriado común es una enfermedad infecciosa viral del tracto respiratorio superior, afectando nariz, senos paranasales, laringe y faringe. Se contrae por contacto directo con secreciones de una persona infectada. Los principales patógenos asociados al resfriado común son los rinovirus, causando entre el 52% y el 76% de los resfriados comunes. (Allan y Arrol, 2014).

Entre los síntomas del resfriado común encontramos la congestión nasal, rinorrea, estornudos, tos, irritación de garganta, entre otros, los cuales pueden ir acompañados también de dolor muscular, fatiga, cefalea y pérdida de apetito. Los síntomas aparecen con poca intensidad y van aumentando su severidad a lo largo del tiempo. (Eccles y Weber 2009).

Desde siempre han existido mitos y creencias populares erróneas acerca de las causas del resfriado (exposición al frío, lluvia, etc.) como sus posibles tratamientos (vitamina C, bebidas calientes e incluso antibióticos) (Braun et al, 2000).

El nombre de “resfriado” viene de la creencia popular de que la enfermedad se puede contraer debido a exposición al frío (Eccles y Weber 2009). Es interesante destacar que la palabra “resfriado” no tiene asociación al frío solamente en la lengua castellana, en inglés se denomina

common cold (cold = frío), en alemán Erkältung (Kält = frío), en italiano *raffreddore comune* (freddo = frío), etc.

Esta creencia popular se debe a que existe una estacionalidad de la enfermedad, siendo esta más predominante cuando existen climas fríos y húmedos. Una posible explicación es que en climas fríos suelen reunirse muchas personas en espacios cerrados, lo que en general, son las condiciones perfectas para la transmisión del virus de persona a persona (Eccles y Weber 2009).

Sin embargo, la única causa del resfriado común es la exposición al virus, denominado “rinovirus”.

El tratamiento del resfriado común es sintomático, se busca minimizar los síntomas mientras el propio sistema inmunológico del afectado se encarga de combatir el virus. Existen cientos de tratamientos para el resfriado común, desde los fármacos hasta tratamientos más populares como infusiones, acupunturas, etc.

Actualmente existen los llamados “medicamentos antigripales” que son combinaciones de distintos principios activos en una especie de cóctel que sirve para paliar los diferentes síntomas del resfriado común como la tos, rinitis, fiebre, etc.

La gripe o influenza es una enfermedad infecciosa viral que afecta principalmente los órganos del tracto respiratorio superior. La infección es causada principalmente por los influenzavirus A y/o B. La gripe es una enfermedad estacional que ocurre en todo el mundo con patrones estacionales, epidémicos o pandémicos. (Moghadami, 2017).

A diferencia del resfriado común, los síntomas de la gripe aparecen abruptamente; entre ellos encontramos: sensación de fiebre, escalofríos, cefalea (dolor de cabeza), mialgia (dolor muscular) y malestar general. La intensidad de la mialgia, la cefalea y la fiebre son indicativos de la severidad de la infección. Estos síntomas suelen ir acompañados de las manifestaciones de enfermedades del tracto respiratorio como lo son la tos seca, descarga nasal, y garganta irritada. Estos síntomas pueden tener una intensidad relativa distinta, en algunos pacientes pueden manifestarse sin fiebre los síntomas respiratorios (es decir, mismos síntomas del resfriado común) y otros pacientes pueden padecer predominantemente los síntomas sistémicos (cefalea, fiebre y mialgia) con muy pocos síntomas respiratorios. (Moghadami, 2017).

La gripe puede derivar en algunos pacientes en complicaciones, siendo la principal la neumonía. Cuando esta es producida directamente por el influenzavirus se le denomina *neumonía primaria* y es predominante en individuos con enfermedades cardiovasculares y pulmonares como el asma. La neumonía puede producirse también por otros patógenos distintos al influenzavirus, esta neumonía que suele ser bacteriana se le denomina *neumonía*

bacteriana secundaria en la que el paciente tras detener la enfermedad clásica de la gripe, tiene un período de máximo 2 semanas de mejoría cuando aparece recurrencia de los síntomas como fiebre, tos con flema y disnea. Entre las bacterias causantes de esta enfermedad tenemos la *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*. Por último, existen otras complicaciones aún más inusuales como miocarditis y pericarditis; así como el síndrome Guillain-Barré. (Moghadami, 2017).

El tratamiento de gripes no complicadas es sintomático y similar al del resfriado común, por lo que los mismos medicamentos sirven para tratar los síntomas de ambas patologías.

4. HISTORIA DE LOS TRATAMIENTOS PARA RESFRIADOS

Debido a que tanto la gripe como el resfriado común han estado con el ser humano a lo largo de la historia, siempre han existido tratamientos para estas enfermedades. Por supuesto que al no estar desarrollada la farmacología moderna y al no saberse que la causa de estas infecciones eran agentes microscópicos, algunos de estos remedios hoy en día se considerarían absurdos.

4.1. Edad antigua

Los médicos de la **antigua China** basaban su trabajo en la creencia de que una persona saludable tenía un equilibrio entre dos aspectos: El aspecto luminoso / dinámico (yang) y el oscuro / estático (yin). Este balance podía distorsionarse por causas externas como mala alimentación, frío, viento, emociones fuertes, etc. La medicina tradicional china creía que el resfriado era una enfermedad de “frío y viento” que se producía cuando el frío entraba por la piel y quedaba atrapado dentro del cuerpo; por lo que el tratamiento más utilizado era la acupuntura con el fin de abrir la superficie del cuerpo para expulsar los factores que causan la enfermedad. La acupuntura era acompañada de la administración de plantas medicinales que no eran más que comidas picantes que producían sudoración y por ende lograban el efecto deseado. (Eccles y Weber, 2009).

La **medicina egipcia** se basaba más que todo en magia. Descubiertos en el siglo XIX, por Georg Ebers y Edwin Smith los papiros de Ebers y Smith son los textos médicos más importantes de la civilización egipcia. El primero contiene una descripción de muchas enfermedades y sugerencias de tratamientos como encantamientos y fórmulas. El segundo contiene información sobre medidas quirúrgicas. En este papiro aparece un encantamiento o

hechizo para el resfriado que debía ser leído sobre leche de una mujer en período de lactancia y se recomendaba esparcir en la nariz una mezcla de plomo, incienso y miel por cuatro días para “sacar al frío de la nariz y cabeza” (Eccles y Weber, 2009).

En **Grecia y Roma** entre los siglos V y IV antes de Cristo, el médico griego Hipócrates de Cos, considerado el padre de la medicina, sostenía que el cuerpo humano contenía cuatro *humores* que eran sangre, flema, bilis negra y bilis amarilla. Se consideraba que una persona estaba sana cuando los 4 humores estaban en equilibrio (algo parecido al yin-yang chino). El médico romano Galeno de Pérgamo en los siglos II y III de nuestra era, se basó en los tratados hipocráticos y expendió estos conocimientos. Los trabajos de Hipócrates y Galeno son las referencias más conocidas del mundo greco-romano en lo que a medicina respecta. (Eccles y Weber, 2009). Ambos médicos veían al resfriado como una “acumulación de flema”. Se atribuye a Hipócrates: “La flema aumenta en el cuerpo humano en invierno. Es la más cercana a la naturaleza del invierno puesto que es la más fría” y a Galeno se atribuye: “La sustancia blanca (flema) se acumula en aquellos que han sido enfriados de alguna manera” (Eccles y Weber, 2009).

Los remedios para el resfriado en esta época consistían en devolver a la normalidad el equilibrio entre los humores. Dioscórides en el siglo I de nuestra era afirmaba que, por ejemplo, la mostaza tenía el poder de calentar y diluir la flema, al comerla de purgarla del cuerpo y al ponerla sobre la nariz estimulaba el estornudo. También describía que los rábanos tenían propiedades antiinflamatorias para la garganta y que una mezcla de jugo de cebolla con miel (un remedio casero que aún se utiliza en nuestros días) ayudaban en la descarga de moco. Por último, consideraba el azufre como efectivo para los catarros si se “fumaba” o se tomaba con huevos. (Eccles y Weber, 2009).

Arabia: Sin duda, uno de los avances en el entendimiento del resfriado común viene de los árabes, por ejemplo, Qusta ibn Luqa entre los siglos IX y X consideró como aparecían las enfermedades infecciosas (en general), dijo “El contagio es una chispa que vuela desde un cuerpo enfermo a un cuerpo sano, donde la misma enfermedad se desarrolla tal y como era en el cuerpo enfermo”. (Eccles y Weber, 2009).

El resfriado se discute en algunos tratados árabes. El resfriado se presume causado por el frío del invierno. Sin embargo, un resfriado en verano se explicaba como un “derretimiento” de las secreciones duras del cerebro haciéndolas bajar por la nariz. Se recomendaba evitar alimentos como leche, legumbres y alcohol. Entre las recomendaciones para el tratamiento estaban inhalar esencias aromáticas de cualquier tipo desde clavo hasta agua de rosas. (Eccles y Weber, 2009).

4.2. Edad media

Los textos médicos de la antigüedad fueron copiados y preservados en los monasterios medievales. En este punto se le dio una interpretación cristiana al origen de las enfermedades como un castigo divino. Por ejemplo, se llegó a relacionar el hecho de estornudar con que Satanás jugaba con la nariz del afectado (Eccles y Weber, 2009).

Existen 3 trabajos medievales con cierta importancia relativa al resfriado donde se discuten remedios herbales para las enfermedades; en primer lugar, la farmacopea de Lorsch (finales del siglo VIII) el cual copia muchas partes de trabajos de la antigüedad, así como recetas de medicamentos. El segundo es un plano del siglo IX del monasterio de San Galo que muestra un jardín donde se cultivaban hierbas medicinales cerca del sitio donde se trataba a los monjes enfermos. También, en el siglo IX el abad Walahfried Strabo escribió el poema *Hortulus* donde da nombre las plantas que tenía en su propio monasterio. En esos trabajos se nombran algunos remedios existentes desde la antigüedad como *Aloe vera*, rábano e hinojo para congestión nasal, tos y otras infecciones de garganta. (Eccles y Weber, 2009).

En el siglo X la escuela de medicina de Salerno representaba el pilar fundamental de la medicina europea secular (Eccles y Weber, 2009).

En los siglos XII y XIII los papas acabaron con las actividades médicas en monasterios a través de varios decretos de concilios. Se les prohibió a los clérigos practicar la medicina, actividad que pasó a las escuelas y universidades que estaban en pleno auge.

Entre los siglos XII y XV se crearon varias instituciones para la investigación en algunas ciudades como París, Boloña, Montpellier u Oxford. En el siglo XIII se autodenominaron universidades y tenían cierto estatus privilegiado. Los profesores utilizaban los escritos de autores antiguos (sobre todo los de Galeno) sin ninguna crítica y los estudiantes no solían cuestionar estos conocimientos. La principal forma de ver la medicina era mediante la teoría de los cuatro humores y las medidas terapéuticas eran comúnmente sangrías, provocar el vómito o purgantes con el fin de equilibrar los humores. (Eccles y Weber, 2009).

4.3. Edad moderna

Con la invención de la imprenta por Johannes Gutenberg, el conocimiento en general, incluido el médico se hizo más accesible, se hicieron cambios en la forma de educar y adicionalmente a los libros utilizados en las escuelas de medicina se imprimieron varios volúmenes relacionados con las plantas medicinales. Respecto del resfriado, por ejemplo, se

recomendaba por vía nasal eléboro con mejorana para “limpiar el cerebro” mediante el estornudo. Lo que nos indica que incluso en la edad moderna, se entendía al cerebro como *asiento* de los mocos (flema), otros trabajos también hablan de la expulsión de este humor para librarse de la enfermedad asociada. Lamentablemente, los libros de botánica y medicina herbal solo estaban disponibles para las personas educadas. Los conocimientos herbales de la antigüedad y el medioevo se ampliaron con las plantas traídas a Europa desde el nuevo mundo (Eccles y Weber, 2009).

4.4. Edad contemporánea

Con el desarrollo de la química y la farmacología como ciencia, se pudieron extraer y caracterizar moléculas presentes en plantas, las cuales eran responsables de los efectos deseados, estas moléculas son los hoy en día llamados principios activos.

Una vez extraída y caracterizada la molécula, ésta podía seguirse extrayendo a partir de la planta o sintetizarse, incluso podía mejorarse, sintetizando una nueva molécula parecida a una conocida que potenciara sus efectos terapéuticos o disminuyera sus efectos secundarios.

Un ejemplo de esto es la historia de la aspirina, que a continuación se comenta brevemente:

Se conocen infusiones y brebajes hechos de sauce y otras plantas ricas en salicilatos desde la antigua civilización egipcia (esto se menciona en el papiro de Ebers). No fue hasta la edad contemporánea cuando Johann Buchner aisló el principio activo y lo llamó *salicina*, cuya estructura se encuentra en la figura 1 (Jeffreys, 2010).

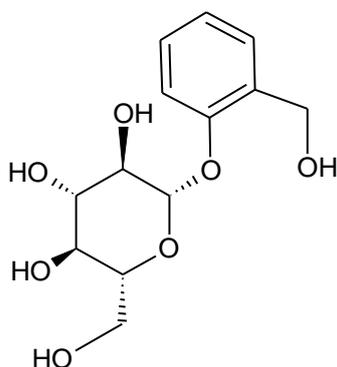


Figura1: Estructura de la salicina.

En 1838 el químico italiano Raffaele Piria pudo hidrolizar la salicina en un azúcar y un aldehído. La oxidación de este aldehído resultó en un compuesto que se denominó *ácido salicílico* (Jeffreys, 2010), cuya estructura se muestra en la figura 2.

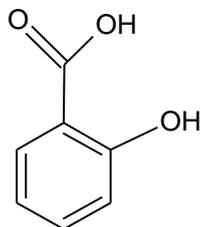


Figura 2: Estructura del ácido salicílico.

En 1853, Charles Frédéric Gerhardt se sintetiza el ácido acetilsalicílico, con la intención de mejorar el sabor y disminuir efectos secundarios como irritación de la mucosa estomacal (González, 1998). Esta molécula es la que conocemos hoy en día como *aspirina* (figura 3).

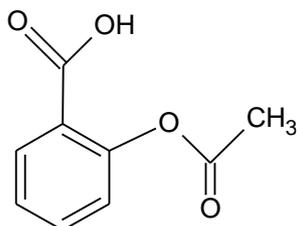


Figura 3: Estructura del ácido acetilsalicílico (aspirina).

En 1897, Felix Hoffman sintetiza la aspirina con gran pureza, en ese momento trabajaba para los laboratorios Bayer®. El farmacéutico Heinrich Dreser describió sus propiedades analgésicas y antiinflamatorias y fue el responsable de su lanzamiento comercial por Bayer®.

4.5. Algunos remedios populares de fines del siglo XIX y principios del siglo XX

A finales del siglo XIX y principios del siglo XX, la química farmacéutica estaba en un punto importante de su desarrollo, donde día a día se aislaban y sintetizaban nuevas moléculas con

potenciales usos farmacológicos; muchos remedios para los resfriados eran comercializados sin ningún tipo de regulaciones. Algunos de estos remedios hoy en día rayan en lo absurdo.

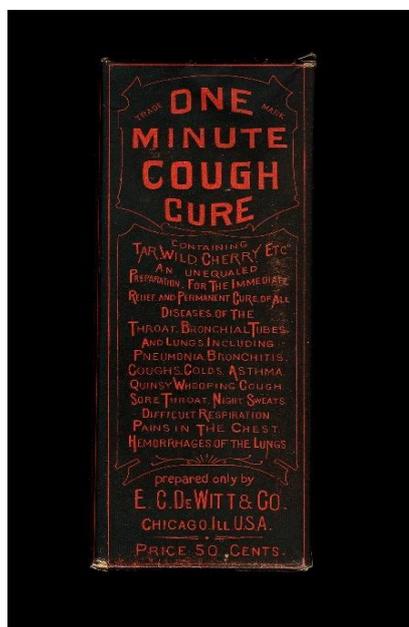
Tal es el caso de los *Cigarrillos Marshall's* (figura 4A): En la década de 1940 eran comercializados en los Estados Unidos de América unos cigarrillos con extracto de cubeba que según los vendedores ayudaba a “aflojar los mocos en los pulmones”. La idea principal es que a través del hecho de fumar se llevaba esta “medicina” a los pulmones. (Anderson, 2015).

Así mismo, a finales del siglo XIX y principios del siglo XX se podía poner prácticamente cualquier cosa en un medicamento, un ejemplo de este es el que vemos a continuación (figura 4B) que contiene *alquitrán, cereza salvaje, etc.* Hoy en día es imposible pensar en el prospecto de un medicamento con un “etc.” en sus ingredientes.

Uno de los remedios populares para los síntomas del resfriado que ha sobrevivido hasta nuestros días es el Vicks VapoRub® (figura 4C) promocionado como un ungüento con ingredientes de “tierras muy lejanas” como *mentol de Japón y alcanfor de las selvas de Formosa*, inventado por el farmacéutico Lunsford Richardson a finales del siglo XIX, sigue siendo muy popular en América Latina. Hoy en día es propiedad de Procter & Gamble® (Bermúdez, 2019).



A



B



C

Figura 4: A: Cigarrillos Marshall's. Museo Smithsonian de historia americana (Anderson, 2015). B: Cura para la tos de un minuto, Museo Smithsonian de historia americana (Anderson, 2015). C: Publicidad de Vicks VapoRub ® (Bermúdez, 2019)

5. TRATAMIENTO PARA RESFRIADOS HOY EN DÍA: MEDICAMENTOS ANTIGRIPALES

El tratamiento para el resfriado común y la gripe no complicada es similar, consiste en aliviar los síntomas mientras que el cuerpo del individuo se libera de la infección. Actualmente los medicamentos se dividen dentro de varias categorías según su efecto, brevemente describiremos algunos de ellos. Podemos encontrar estos medicamentos en presentación única o en presentación combinada.

5.1. Antiinflamatorios no esteroideos (AINE)

Son fármacos cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición de las ciclooxigenasas 1 y 2 (COX-1 y COX-2), como resultado se inhibe la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos. De los AINE, se hace énfasis particularmente en aquellos inhibidores selectivos de la COX-2, ya que se presume que la acción analgésica, antiinflamatoria y antipirética ocurre al inhibirse esta enzima en particular. Por ejemplo, la aspirina inhibe tanto la COX-1 como la COX-2 y se piensa que esta inhibición simultánea es la que causa los efectos secundarios indeseados en la mucosa estomacal como hemorragias y úlceras (Page et al, , 1998).

Los AINE además de su acción antiinflamatoria también tienen acción antipirética (bajan la fiebre), esto se debe a la imposibilidad de sintetizar la prostaglandina E2 (Por inhibición de las COX) que se libera por estimulación de diferentes pirógenos (moléculas que desencadenan reacciones febriles) y actúa alterando el punto fijo de temperatura. Los salicilatos y el ibuprofeno (pero no el paracetamol) inhiben la prostaglandina E2 reduciendo la expresión de la COX-2. (Flórez, 2003) .

Los AINE tienen varias formas de clasificación, globalmente se pueden clasificar según su mecanismo de acción como inhibidores selectivos de la COX-2 e inhibidores no selectivos de la COX-2. Es, sin embargo, más común en la actualidad clasificarlos según su estructura química. Al ser muy extendida la clasificación solo se pondrán un par de ejemplos de cada grupo, a manera informativa. (Hardman et al, , 1996). La tabla 1 muestra la clasificación de los AINE.

Tabla 1: Clasificación de los antiinflamatorios no esteroideos

| Clasificación | Ejemplos |
|--------------------------------|---|
| Salicilatos | Ácido acetilsalicílico (aspirina) Ácido salicílico |
| Derivados aril-acéticos | Alclofenaco Diclofenaco |
| Derivados indol-acéticos | Difenpiramida Oxametacina |
| Ácidos enólicos (oxicanes) | Droxicam Meloxicam |
| Ácidos enólicos (pirazonas) | Metamizol (Dipirona) Fenilbutazona |
| Derivados aril-propiónicos | Ibuprofeno Ketoprofeno |
| Fenematos | Ácido meclofenámico Ácido tolfenámico |
| Otros AINE | Glucosamina Nimesulida |
| Coxibes | Celecoxib Rofecoxib |

El paracetamol o acetaminofén es un caso particular, ya que no posee propiedades antiinflamatorias. Es tradicionalmente clasificado como AINE, aunque esto se utiliza más que todo en casos de hipersensibilidad. Este compuesto será tratado con mayor profundidad en la sección 6.1.

5.2. Supresores de la tos (antitusígenos o antitusivos)

Son fármacos que actúan sobre el sistema nervioso inhibiendo el reflejo natural de la tos, la mayoría de ellos son opiáceos. De estos opiáceos algunos tienen actividad opioide como la morfina y codeína, otros no tienen actividad opioide como el dextrometorfano y folcodina. Otros antitusígenos son antihistamínicos como la difenilhidramina, estos últimos inhiben la tos actuando como sedantes. (Eccles y Weber, 2009).

Los antitusígenos con actividad opioide como la codeína, pueden llegar a causar adicción (por su propia actividad opioide) y se han utilizado como drogas recreativas, esto puede resultar en alucinaciones e incluso en la muerte.

Como dato curioso, a finales del siglo XIX y comienzos del siglo XX, se comercializó la heroína (un derivado sintético de la morfina) como antitusígeno, se pensaba que tendría menos potencial adictivo. Bayer® llegó a promocionar la heroína como “la mejor cura para la bronquitis de tus hijos” (figura 5) (Nash, 2014).



Figura 5: Botella de heroína comercial como fármaco (Nash, 2014)

5.3. Fármacos mucoactivos

Los fármacos mucoactivos tienen como propósito principal la expulsión del esputo y/o reducir la hipersecreción de mocos. Existen muchos fármacos mucoactivos que se clasifican según su mecanismo de acción:

Expectorantes o mucocinéticos: Los expectorantes son aquellos fármacos que inducen la expulsión de moco mediante la acción de tos o estornudos. Su mecanismo de acción no está del todo claro, se presume que la textura del moco se hace menos viscosa y se favorece la excreción pudiendo ser expulsado más fácilmente. Entre los más utilizados están aerosol salino hipertónico, guaiacolato de gliceril (guaifenesina) y modificadores de canales iónicos (Balsamo et al, , 2010).

Mucoreguladores: Se denominan mucoreguladores a aquellos fármacos que tienen la capacidad de regular la secreción de moco, entre ellos encontramos la carbocisteína, anticolinérgicos, glucocorticoides y antibióticos macrólidos (Balsamo et al, , 2010).

Mucolíticos: Son fármacos que disminuyen la viscosidad del moco, se clasifican de la siguiente forma según Balsamo et al, (2010):

- Mucolíticos clásicos: Despolimerizan glicoproteínas de las mucinas
- Mucolíticos péptidos: Despolimerizan redes de polímeros ADN y F-actina.

5.4. Descongestionantes nasales

Los descongestionantes actúan por constricción de las venas nasales grandes en la parte anterior de la nariz. Estas controlan la resistencia al flujo del aire (Eccles y Weber, 2009).

Los descongestionantes más comunes hoy en día son la pseudoefedrina y la fenilefrina.

5.5. Antihistamínicos

Los antihistamínicos, comúnmente también llamados antialérgicos son una familia de medicamentos que actúan como antagonista de los receptores H1 de histamina. Esto lo logran mediante una inhibición reversible en la cual el antihistamínico se une al receptor H1 en lugar de la histamina (figura 6), evitando la reacción alérgica.

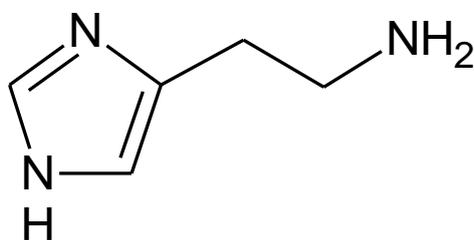


Figura 6: Estructura de la histamina.

6. PRINCIPIOS ACTIVOS DE INTERÉS

Dado que el objetivo principal de este trabajo es la optimización del análisis de contenido de un medicamento antigripal que contiene un antiinflamatorio, un descongestionante, un antitusígeno (opiáceo) y un antihistamínico, vamos a pasar a describir brevemente los 4 principios activos:

6.1. Paracetamol

El paracetamol o acetaminofén (N-acetil-para-aminofenol) conocido también con las siglas APAP (*N-Acetyl-Para-AminoPhenol*) es un analgésico y antipirético utilizado en todo el mundo para tratar el dolor leve y moderado, así como la fiebre. La figura 7 muestra su estructura química.

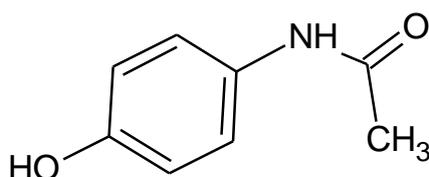


Figura 7 Estructura del paracetamol.

Su mecanismo de acción no está del todo claro, a diferencia de los AINE, el paracetamol no inhibe ninguna de las enzimas COX fuera del sistema nervioso central, por lo que no presenta actividad antiinflamatoria. Aparentemente, el paracetamol inhibe selectivamente las actividades de las COX en el cerebro, lo que en teoría contribuye a su efecto analgésico y antipirético. Su actividad no parece una inhibición por bloqueo de sitios activos sino por una reducción de la enzima que debe estar oxidada para funcionar (Ghanem et al, 2016).

Su toxicidad es relativamente baja, la Agencia de Medicamentos y Alimentación de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) recomienda una dosis máxima de 4 gramos en 24 horas.

En la tabla 2, se resumen algunas de sus propiedades químicas más relevantes de este compuesto:

Tabla 2: Propiedades físico-químicas del paracetamol. (Valores obtenidos de PubChem®, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetaminophen>)

| Propiedad | Valor |
|---|-----------|
| Masa molar (g/mol) | 151,16 |
| Punto de fusión (°C) | 169 – 172 |
| Punto de ebullición (°C) | > 500 |
| Solubilidad en agua (g / 100 mL a 20°C) | 1,4 |
| Densidad (g / mL a 20°C) | 1,3 |

6.2. Fenilefrina

La fenilefrina se usa como descongestionante nasal en el tratamiento de síntomas de resfriados y gripes no complicadas. Su estructura química se muestra en la figura 8.

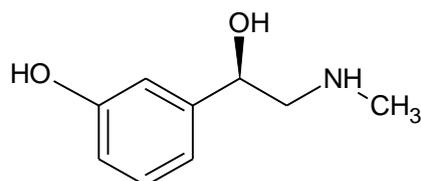


Figura 8: Estructura de la fenilefrina.

Su mecanismo de acción consiste en la vasoconstricción del tejido suave muscular, disminuyendo la hinchazón en la mucosa nasal, lo que permite un mejor flujo de aire. Puede producir un efecto rebote de la congestión una vez suspendido el tratamiento. Como efecto secundario puede disminuir la difusión por los tejidos de los anestésicos locales (Saeb-Parsy et al, 1999)

Recientemente, la fenilefrina ha ido sustituyendo a la pseudoefedrina como descongestionante nasal debido a que esta última se utiliza como compuesto de partida en la síntesis ilegal de metanfetamina. En la tabla 3 a continuación se resumen algunas de sus propiedades físicoquímicas más relevantes.

Tabla 3: Propiedades físico-químicas de la fenilefrina. (Valores de ChemSpider®: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5818.html>)

| Propiedad | Valor |
|--------------------------|-------------|
| Masa molar (g/mol) | 167,2 |
| Punto de fusión (°C) | 174 |
| Punto de ebullición (°C) | 314 – 368 |
| Solubilidad en agua | Muy soluble |
| Densidad (g / mL a 20°C) | 1,2 |

6.3. Dextrometorfano

El dextrometorfano es un antitusígeno opiáceo sin actividad opiode. Su mecanismo de acción es a nivel de sistema nervioso central, consiguiendo una depresión de la actividad del centro bulbar de la tos. Su efecto antitusígeno es comparable al de la codeína, pero con la ventaja de que no produce depresión respiratoria ni del sistema nervioso central. A diferencia de la codeína no tiene acción analgésica ni capacidad adictiva. Es común su elección en niños y cuando se quiere evitar un efecto sedante (Batlle y De Conte, 2001). Su estructura química se muestra en la figura 9 y en la tabla 4 se resumen algunas de sus propiedades físicoquímicas más relevantes.

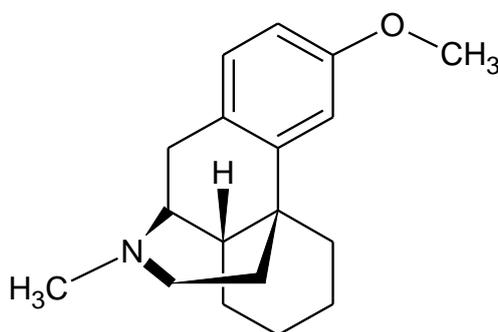


Figura 9: Estructura del dextrometorfano.

Tabla 4: Propiedades físico-químicas del dextrometorfano. (Valores de PubChem®: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/dextromethorphan>)

| Propiedad | Valor |
|--|-----------------------------|
| Masa molar (g/mol) | 271,4 |
| Punto de fusión (°C) | 109 – 111 |
| Punto de ebullición (°C) | Se descompone al calentarlo |
| Solubilidad en agua (mg / 100 mL a 25°C) | 7,47 |

6.4. Doxilamina

La doxilamina, cuya estructura química se muestra en la figura 10, es un antihistamínico de primera generación, por lo que traspasa la barrera hematoencefálica produciendo somnolencia. Su mecanismo de acción consiste en ser un antagonista del receptor H1 produciendo su efecto antialérgico y sedante.

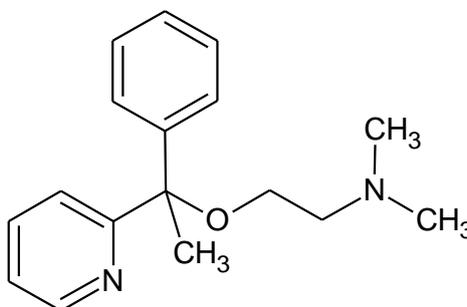


Figura 10: Estructura de la doxilamina.

Debido a su poder sedante, la doxilamina (en ausencia de otros fármacos para el resfriado) se utiliza para tratar el insomnio no crónico (Ringdahl et al, 2004).

Como se observa en la imagen, la doxilamina es quiral, se comercializa una mezcla de los dos enantiómeros, aunque se sabe que el enantiómero D, tiene más potencia antihistamínica que el L (Lien et al, 2006).

En la tabla 5 se resumen algunas de sus propiedades físico-químicas más relevantes.

Tabla 5: Propiedades físico-químicas de la doxilamina. (Valores de PubChem®, disponibles en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Doxylamine>)

| Propiedad | Valor |
|-------------------------------------|---------------|
| Masa molar (g/mol) | 270,37 |
| Punto de fusión (°C) | < 25 |
| Punto de ebullición (°C) a 0,5 mmHg | 137 – 141 |
| Solubilidad en agua (g / mL a 25°C) | 1 (succinato) |

7. CONTROL DE CALIDAD EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

El control de calidad es una etapa fundamental del proceso de producción de un fármaco. Los medicamentos deben poder comercializarse con cierta seguridad, manteniendo una premisa muy simple: El medicamento debe lograr el efecto terapéutico deseado de una manera segura, es decir debe tener la dosis adecuada de principio activo y no tener alguna contaminación o excipiente no deseado que pueda dañar al paciente.

En esta memoria no es posible abordar el tema de calidad en su totalidad y cubrir todos los conceptos del mismo. Por lo que en esta sección se comentarán brevemente algunos conceptos relevantes del control de calidad de la industria farmacéutica.

En primer lugar, se definirá el concepto de especificación de calidad, donde quedan incluidos los criterios de aceptabilidad de cada uno de los parámetros de calidad que se analizan. Estos criterios pueden ser de diferentes tipos dependiendo el análisis que se haga, pueden ser criterios cualitativos o cuantitativos, en el caso de los cuantitativos, pueden ser un rango o mayor / menor a cierta cantidad.

Es importante indicar que en la industria farmacéutica no solo se realizan ensayos de control de calidad del producto terminado; dado que antes de fabricar el producto, se analizan las materias primas (tanto principios activos como excipientes) y una vez que estas están conformes, se fabrica el producto. También se analiza el material de acondicionamiento primario y secundario (frascos, tapones, blisters, cajas, etc.)

El segundo concepto importante en esta sección es el de norma de análisis. Esta contiene los pasos que el analista debe seguir para llevar a cabo el análisis requerido, indicando todos los detalles necesarios, de principio a fin del proceso analítico.

La documentación en control de calidad es el tercer aspecto importante. Todas las acciones deben estar perfectamente documentadas de manera que todo el proceso sea trazable y auditable, sabiendo quién realizó cada acción y en qué momento. Esto es parte de las llamadas *normas de correcta documentación* que se resumen en un acrónimo: *ALCOA* (Bargaje, 2011)

- **Atribuible:** Se sabe quién realiza la acción
- **Legible:** Cualquier persona puede leerlo sin dificultad
- **Contemporáneo:** La acción se documenta al momento
- **Original:** El registro es el primero hecho por el analista (o una copia verdadera)
- **Exacto (Accurate en inglés):** Representa la verdad

7.1. Ensayos de control de calidad

En un laboratorio de control de calidad, se realizan ensayos de distinta naturaleza, entre los que podemos encontrar:

- **Ensayos de identificación:** Son ensayos cualitativos donde se determina inequívocamente la presencia o ausencia de un analito.
- **Ensayos de contenido:** Son ensayos cuantitativos con el fin de determinar si el contenido de un principio activo está dentro de la especificación de calidad.
- **Ensayos de disolución:** Son ensayos cuantitativos con el fin de determinar si el contenido de un comprimido o una cápsula blanda se disuelve en condiciones de extracción suave similares a las del sistema digestivo humano.
- **Ensayos de impurezas y sustancias relacionadas:** Son ensayos cuantitativos que buscan determinar y cuantificar sustancias de degradación o subproductos de la síntesis de los principios activos. Por lo general algunas de ellas o la suma de todas tienen una cota superior en la especificación de calidad.

7.2. Secuencia cromatográfica

La secuencia cromatográfica del análisis tiene un orden específico y varias partes, esto no es algo al azar, sino que cada parte de la secuencia tiene un propósito específico que permite dar garantía de que los resultados analíticos que se generan son confiables. Esto más allá de las regulaciones típicas de cada empresa, aparecen en las buenas prácticas de fabricación (GMP por sus siglas en inglés) que son un conjunto de regulaciones que rigen a la industria farmacéutica, incluido el control de calidad.

Se tienen en cuenta ciertos aspectos de calidad del análisis que determinan si los resultados generados son válidos o no, tanto si son resultados conformes como si son resultados fuera de especificación, esto supone un costo importante para la empresa, que discutiremos un poco más adelante cuando veamos el orden de inyecciones en este análisis.

Preparación del sistema: Es el primer paso crítico para garantizar la calidad de los resultados generados, se deben purgar todos los canales involucrados con los disolventes que se van a utilizar en la cromatografía, de forma que no queden burbujas de aire que puedan llegar al detector, también se purga el inyector con la fase móvil lo cual es sumamente importante ya que de no hacerse se pueden producir ensanchamientos de picos y perfiles cromatográficos no deseados. Cabe destacar que para esta preparación se debe asegurar la compatibilidad de lo que hay en cada canal con lo que se va a colocar en el análisis a realizar, ejemplos de esto es purgar primero con agua si hay presente una solución salina y se va a colocar un alcohol, o purgar con isopropanol si el canal está en un solvente polar y se quiere colocar un disolvente apolar o viceversa.

Una vez realizado esto se debe dejar suficiente tiempo de equilibrado a la columna en caso de un método isocrático o realizar varios ciclos de gradiente (si la elución utiliza el gradiente) de forma que el perfil cromatográfico sea reproducible.

Inyección de disolvente: Es el segundo paso importante, esto sirve para verificar entre otras cosas una línea base uniforme y que no haya contaminación cruzada de un análisis anterior que resulte en picos que puedan interferir con la detección o cuantificación de los analitos presentes en la muestra.

Adecuabilidad del sistema: Este tercer ensayo es esencial para garantizar los resultados, consiste en una serie de inyecciones (típicamente 5 o 6) de un estándar de trabajo donde se

busca verificar que el equipo inyecta correctamente y los resultados generados son reproducibles.

El orden típico de las inyecciones es el siguiente:

Disolvente -> Adecuabilidad (5 o 6 inyecciones) -> Estándar 1 -> Estándar 2 -> Muestra 1 preparación 1 -> Muestra 1 preparación 2 -> Se repite hasta máximo 3 muestras -> Estándar 1 -> Estándar 2 -> (más muestras si aplica).

Como se dijo anteriormente, esto tiene un coste importante para la empresa, ya que por ejemplo si se va a analizar solo un lote de un producto, al seguir la secuencia del párrafo anterior se tendrían al menos 11 inyecciones de las cuales solo 2 son la muestra, lo que quiere decir que más del 80% del tiempo que está el cromatógrafo en funcionamiento, está garantizando la calidad del resultado más que generando un resultado en sí.

Esta breve discusión de la secuencia está relacionada más con el tema del control de calidad que con la parte experimental en sí. Los detalles de la metodología experimental se encuentran en la parte 2.

7.3. La revisión

El último aspecto que discutiremos sobre el control de calidad es la revisión. Una vez que los resultados han sido generados, otra persona debe revisar todo el proceso, debido a las normas de correcta documentación, la revisión consiste entre otras cosas verificar que todo esté documentado al momento que se realizó, que no quedó ningún detalle por fuera, que todo es legible, en fin, que cumple los principios ALCOA. Se revisan que las pesadas estén dentro de norma, que las transcripciones sean correctas, que los cálculos sean correctos y que los resultados entren en conformidad con la especificación, se revisa que no se hayan generado resultados paralelos o que se haya omitido o destruido información. Una vez que la revisión está conforme, se da el proceso de análisis por terminado.

7.4. Cápsulas de gelatina blanda

A continuación se hace una breve descripción de este producto, dado que es el que se empleará en el desarrollo de la parte experimental.

Las capsulas de gelatina blanda son una forma farmacéutica que consiste en una cápsula hermética de una sola pieza hecha de gelatina con un relleno que puede ser una solución o una suspensión, entre sus ventajas está una mayor biodisponibilidad del producto, ya que la cápsula se abre en relativamente poco tiempo y libera el producto total o parcialmente disuelto. En lo que a control de calidad respecta, una de las ventajas de usar este tipo de presentación es que, al dosificar una solución o una suspensión en vez de un polvo (como en el caso de un comprimido), la uniformidad de contenido entre cápsulas es mejor. (Augsburger y Hoag, 2017).

PARTE 2: PARTE EXPERIMENTAL
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

La mejora continua de procesos es uno de los pilares fundamentales del concepto actual de calidad a nivel de empresas. Entre las mejoras que se pueden lograr está la optimización, es decir conseguir los resultados de una forma más simple y más rápida.

Una adecuada mejora de un proceso analítico, supone un beneficio tanto para la empresa como para el empleado. El analista puede hacer su trabajo de una forma más simple, rápida y ergonómica y la empresa obtiene el beneficio del ahorro de costes asociado a la mejora.

El **objetivo principal** del proyecto de investigación es la mejora en el análisis de control de calidad de un antigripal en cápsula de gelatina blanda, la mejora busca principalmente hacer el proceso de una forma más rápida y gastando la menor cantidad de recursos posibles. Los objetivos generales y específicos se definieron en la sección 2 de la primera parte de esta memoria.

El producto cuyo análisis se busca optimizar es un antigripal en cápsula de gelatina blanda que contiene 4 principios activos:

- Paracetamol: 325 mg por cápsula
- Dextrometorfano hidrobromuro: 10 mg por cápsula
- Doxilamina hidrogeno succinato: 6,25 mg por cápsula
- Fenilefrina hidrocloreuro: 5 mg por cápsula

La especificación de calidad del producto indica que el contenido de los principios activos debe estar entre 90,0% y 110,0% de la cantidad declarada.

El análisis de contenido de los 4 principios activos se realiza a través de una extracción con agua, seguido por una separación y cuantificación mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección por espectroscopía de absorción molecular ultravioleta-visible (UV-VIS). La calibración es externa cuantificando por factor de respuesta con dos soluciones estándar preparadas al 100% de la cantidad declarada.

2. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.1. Materiales y Equipos

- HPLC Waters® Alliance® Modelo 2694 con detector UV-VIS Waters ® modelo 2487
- Columna Kinetex C18 (4,6 x 150) mm, 2,6 µm

- Equipo: Waters® Acquity® UPLC® System con administrador binario de solventes y detector de PDA.
- Baño para calentar la muestra a 50°C
- Agitador magnético
- Baño de ultrasonidos
- Material volumétrico de vidrio topacio clase A
- Filtros de PVDF de 0,45 µm
- Viales topacios para cromatografía
- Jeringas desechables de 10 mL

2.2. Reactivos

- Paracetamol (APAP)
- Dextrometorfano HBr (DEX)
- Doxilamina hidrogeno succinato (DOX)
- Fenilefrina HCl (PHE)
- Agua purificada para cromatografía
- Ácido trifluoroacético (TFA)
- Acetonitrilo (ACN) pureza HPLC gradiente
- Metanol pureza HPLC gradiente
- Solución saturada de KCl

3. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO ACTUAL PARA EL ANÁLISIS DE CONTENIDO DE PRINCIPIOS ACTIVOS

3.1. Preparación de las soluciones estándar

Solución estándar de PHE, DOX y DEX: En un matraz aforado topacio de 50 mL que contiene 500 µL de solución saturada de KCl se agregan, exactamente pesados, (25 ± 1) mg de PHE; (31,25 ± 1) mg de DOX y (50 ± 1) mg de DEX. Se añaden 25 mL de agua, se somete a ultrasonidos hasta la completa disolución de los patrones y se enrasa con agua.

Solución estándar de trabajo: En un matraz aforado de 50 mL se agregan, exactamente pesados; (162,5 ± 1) mg de APAP y 5 mL de la solución estándar de PHE, DOX y DEX. Se

agregan 25 mL de agua, se somete a ultrasonidos hasta la completa disolución del APAP y se enrasa con agua.

La solución se pasa a vial topacio estándar para cromatografía utilizando filtros de PVDF de 0,45 μm , descartando los primeros 5 mL del filtrado. Las soluciones estándar se preparan por duplicado y son estables por 4 días en refrigerador entre 2°C y 8°C (según validación del método).

3.2. Procedimiento completo del análisis

Para la preparación de las muestras se sigue el siguiente procedimiento:

En un matraz volumétrico de 1000 mL que contiene 100 μL de solución saturada de KCl se colocan 10 cápsulas pesadas individualmente. Se añaden aproximadamente 400 mL de agua y se calienta en baño con agitación magnética a 50°C durante 45 minutos. A continuación se somete a una frecuencia de ultrasonidos durante 15 minutos y se agita sin temperatura durante un tiempo de 45 minutos. De nuevo, se vuelve a colocar en el baño de ultrasonidos por 15 minutos.

Se repiten los ciclos de agitación y ultrasonidos una vez más y se deja reposar la muestra hasta temperatura ambiente. Finalmente, una vez sacado el agitador, se enrasa el matraz de 1000 mL con agua. Se trasvasa al vial de cromatografía mediante jeringa con filtro de PVDF de 0,45 μm desechando los primeros 5 mL.

Cada muestra o lote se prepara por duplicado.

3.3. Condiciones cromatográficas

La preparación de las fases móviles se llevó a cabo de la siguiente manera:

Fase móvil A: Se añaden 3,0 mL de TFA en un matraz volumétrico aforado con 2L de agua

Fase móvil B: Se añaden 0,5 mL de TFA en un matraz volumétrico aforado con 2L de ACN

La tabla 6 muestra los parámetros cromatográficos optimizados para la separación de los 4 principios activos objeto de análisis, y en la tabla 7 se indica el gradiente de elución utilizado.

Tabla 6: Condiciones cromatográficas del método actual para el análisis de contenido de principios activos

| Condición | Valor |
|--------------------------------|-------------------------------------|
| Flujo (mL / min) | 1,0 |
| Volumen de inyección (µL) | 3 |
| Columna | Kinetex® C18 (4,6 x 150) mm, 2,6 µm |
| Tipo de elución | Gradiente en fase reversa |
| Temperatura de la columna (°C) | (30 ± 5) |
| Temperatura de la muestra | Ambiente / No controlada |
| Longitud de onda (nm) | 300 (APAP) / 270 (PHE, DOX y DEX) |
| Lavado de sellos | Agua |
| Lavado de aguja | Agua |

Tabla 7: Gradiente de elución del método actual para el análisis de contenido de principios activos

| Tiempo (min) | % de fase móvil A | % de fase móvil B |
|--------------|-------------------|-------------------|
| 0 | 100 | 0 |
| 3,7 | 95 | 5 |
| 19 | 60 | 40 |
| 19,5 | 60 | 40 |
| 20,5 | 55 | 45 |
| 21,5 | 50 | 50 |
| 23 | 50 | 50 |
| 23,5 | 100 | 0 |
| 30 | 100 | 0 |

3.4. Cálculos establecidos para determinar el contenido de los principios activos

Adecuabilidad del sistema: El coeficiente de variación de las áreas de 6 inyecciones de la misma preparación de estándar debe ser menor a 2,0%. El factor de simetría de todos los picos de los principios activos debe ser menor a 2 y la resolución entre el pico de DEX y el más cercano debe ser mayor a 1,5.

Precisión entre estándares: El coeficiente de variación de las áreas de 2 inyecciones de cada una de las 2 preparaciones de la solución estándar debe ser menor a 2%

% de principio activo: El cálculo del porcentaje de contenido de los principios activos según la norma de análisis del producto, se realiza aplicando la siguiente ecuación:

$$\%API = \frac{\overline{A}_M \times P_{STD} \times R \times Fd_M}{\overline{A}_{STD} \times N \times Fd_{STD} \times C_D}$$

Ecuación 1: Fórmula general para el cálculo del porcentaje de contenido de los principios activos

Donde:

\overline{A}_M = Promedio de las áreas de la disolución de muestra

P_{STD} = Peso del estándar en mg

R = Riqueza del estándar en tanto por ciento

Fd_M = Factor de dilución de la muestra en mL

\overline{A}_{STD} = Promedio de las áreas de la disolución estándar

N = Número de cápsulas añadidas

Fd_{STD} = Factor de dilución del estándar en mL

C_D = Cantidad declarada de principio activo en mg / cápsula

En esta ecuación, el factor de 100 en el cálculo del porcentaje queda anulado con la cifra 100 que se utiliza para pasar la riqueza de porcentaje a tanto por uno.

4. PROPUESTAS DE MEJORA

Analizando cada uno de los pasos del método para la separación y detección de los compuestos del medicamento, pueden encontrarse diversos puntos donde potencialmente se producen retrasos innecesarios o donde pueden ocurrir problemas que resulten en un error analítico. Por ejemplo:

- 1 Las cápsulas son pesadas individualmente con el fin de dejar evidencia de que se añadieron 10 cápsulas, pero el dato del peso no se utiliza en el cálculo de porcentaje de contenido.
- 2 El baño de agua no se mantiene exactamente a 50°C, la temperatura puede variar.
- 3 El agitador magnético puede detenerse o saltar erráticamente sin que el analista lo vea.

- 4 Existe un periodo de tiempo empleado en mover los matraces del baño térmico al de ultrasonidos y de este a la placa de agitación.
- 5 Los matraces de 1 L son pesados. Agitar varios al día manualmente (para homogeneizar al enrasar) puede llevar a lesiones a largo plazo.
- 6 Los tiempos de extracción son sumamente largos, al menos 3 horas sin considerar los tiempos de llenado, transporte, enrase y agitación manual.

Con objeto de mejorar y optimizar las etapas del procedimiento de análisis, es interesante estudiar diferentes parámetros como: longitudes de onda de detección, posible reducción del número de cápsulas por preparación, tipos de filtros, reducción del volumen de extracción, necesidad de utilizar la extracción con ultrasonidos, técnicas de separaciones cromatográficas alternativas, estabilidad de las disoluciones estándar, etc.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Necesidad de cuantificación a dos longitudes de onda en HPLC-UV

Inicialmente, se llevaron a cabo unos ensayos para estudiar la necesidad de realizar los análisis a dos longitudes de onda. Para ello, se preparará una solución estándar y aplicando el método actual se inyectó en HPLC modificando el volumen de inyección de 3 μL a 12,5 μL y se estudió la linealidad de los resultados con el fin de evaluar si a 270 nm se produce una saturación del detector con la señal del APAP y por ende si es necesario cuantificar a 300 nm.

Las siguientes figuras 11, 12 y 13 muestran los espectros de ultravioleta de los principios activos.

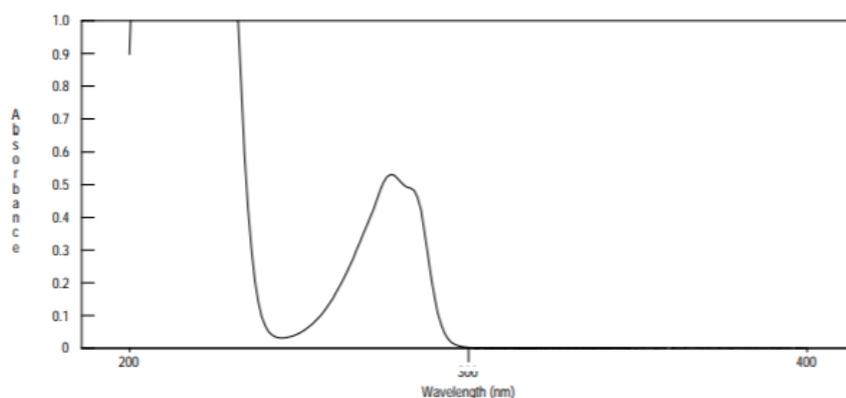


Figura 11: Espectro UV-VIS en agua de DEX (Sigma-Aldrich®)

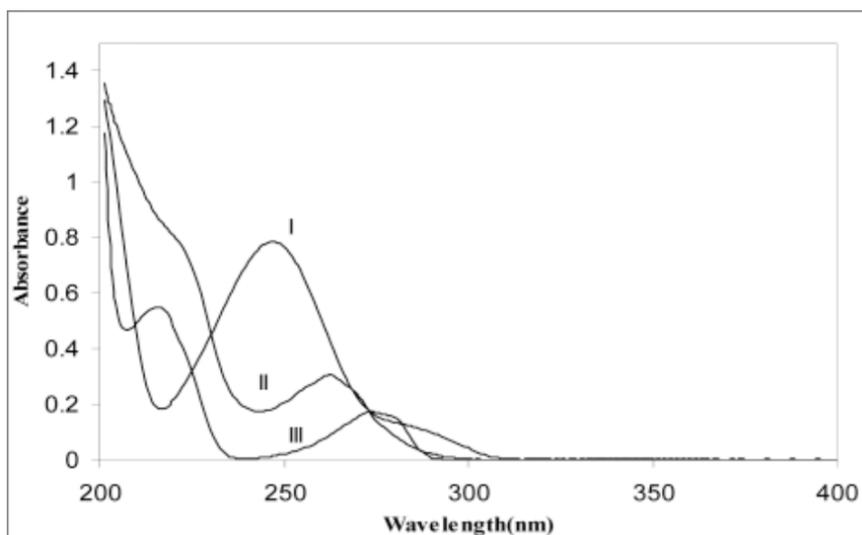


Figura 12: Espectro UV-VIS en agua de APAP (I) y PHE (II) (Reza et al, 2010)

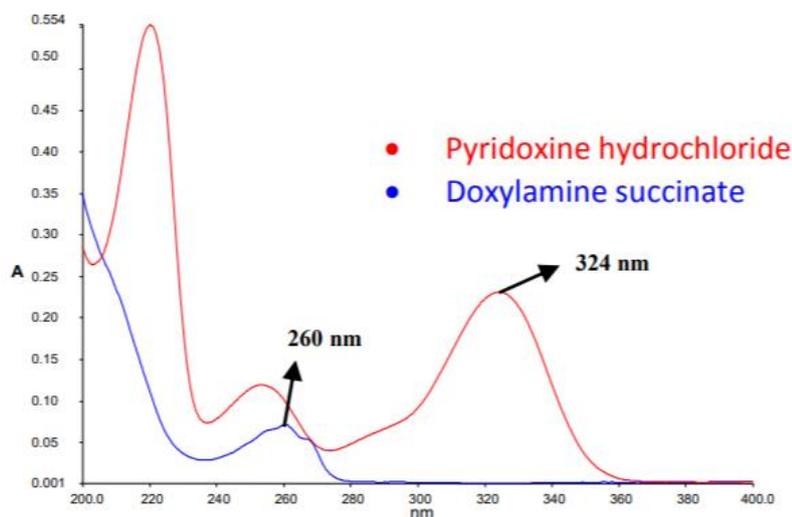


Figura 13: Espectro UV-VIS en agua de DOX (azul) (Premkumara et al, 2019)

Puede observarse en los espectros que todos los analitos absorben en la zona de 270 nm. El APAP se encuentra en una concentración muy superior al resto de los analitos y además, tiene una alta sensibilidad a 270 nm. Por tanto, para evitar la saturación del detector se optó por medir a dos longitudes de onda: 270 nm para todos los compuestos excepto para APAP que se midió su absorbancia a 300 nm (dado que su absorbancia a 300 nm es considerablemente menor que a 270 nm).

5.2. Estudio de la técnica de separación

Se llevó a cabo la comparativa entre métodos utilizando como técnicas de separación HPLC y UPLC

5.2.1. Técnica de separación HPLC

El método actual utiliza la técnica de HPLC-UV para la separación y cuantificación por absorbancia de los analitos. Para evaluar la respuesta del detector, se preparó una solución estándar de trabajo siguiendo el procedimiento detallado en la sección 3.1 de esta parte de la memoria. Para ello se pesaron 25,588 mg de PHE, 49,964 mg de DEX, 31,306 mg de DOX y 162,794 mg de APAP. Se realizaron 5 inyecciones en el cromatógrafo, analizando la absorbancia únicamente a 270 nm. En estas condiciones, se elaboraron los gráficos correspondientes y se calculó el coeficiente de correlación de la recta de respuesta de cada uno de los analitos. Los áreas obtenidas para cada uno de los analitos en función del volumen inyectado se resumen en la tabla 8.

Tabla 8: Áreas obtenidas en función de volúmenes de inyección en HPLC.

| Volumen de inyección (µL) | Área (µV s) | | | |
|---------------------------|-------------|--------|--------|--------|
| | APAP | PHE | DEX | DOX |
| 3 | 1115549 | 72012 | 58727 | 212513 |
| 5 | 1868275 | 121228 | 99213 | 356557 |
| 7,5 | 2827920 | 184763 | 151654 | 542398 |
| 10 | 3706104 | 246799 | 203247 | 724200 |
| 12,5 | 4603903 | 309492 | 252764 | 905550 |

Con los datos anteriores, se elaboran los gráficos correspondientes, que se muestran en las figuras 14 - 17.

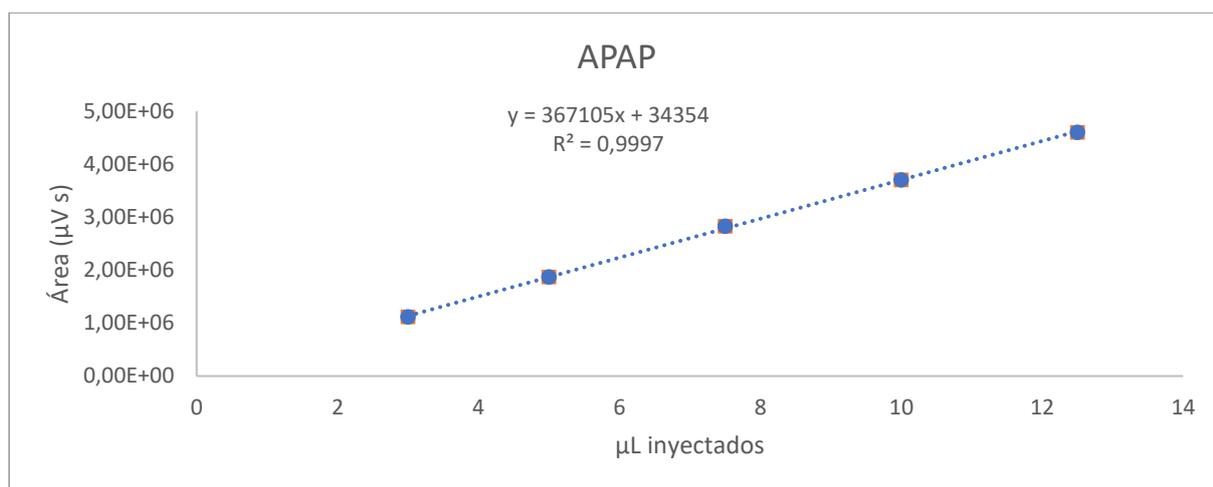


Figura 14: Representación gráfica del área de APAP en función del volumen de inyección en HPLC

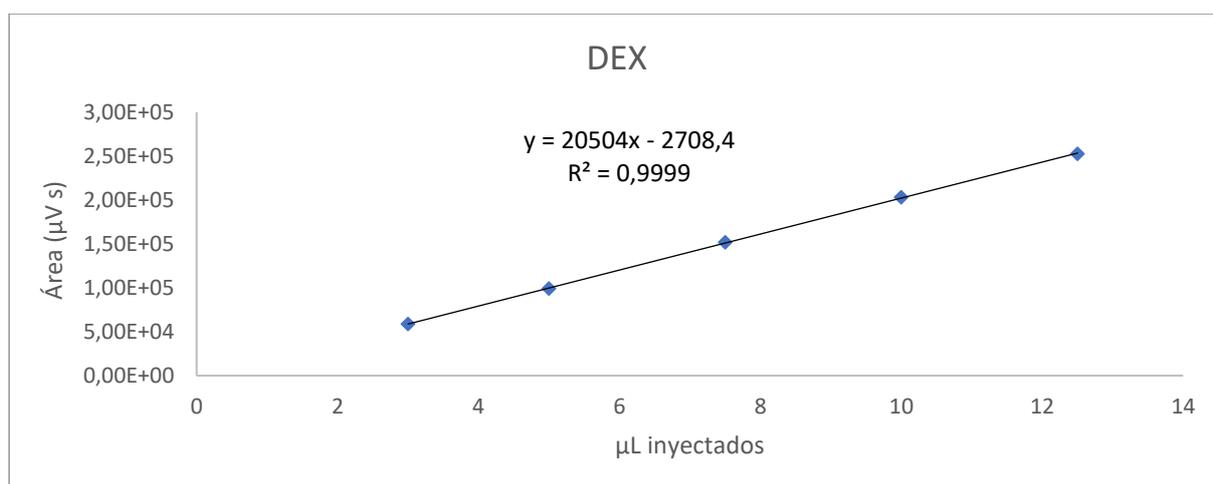


Figura 15: Representación gráfica del área de DEX en función del volumen de inyección en HPLC

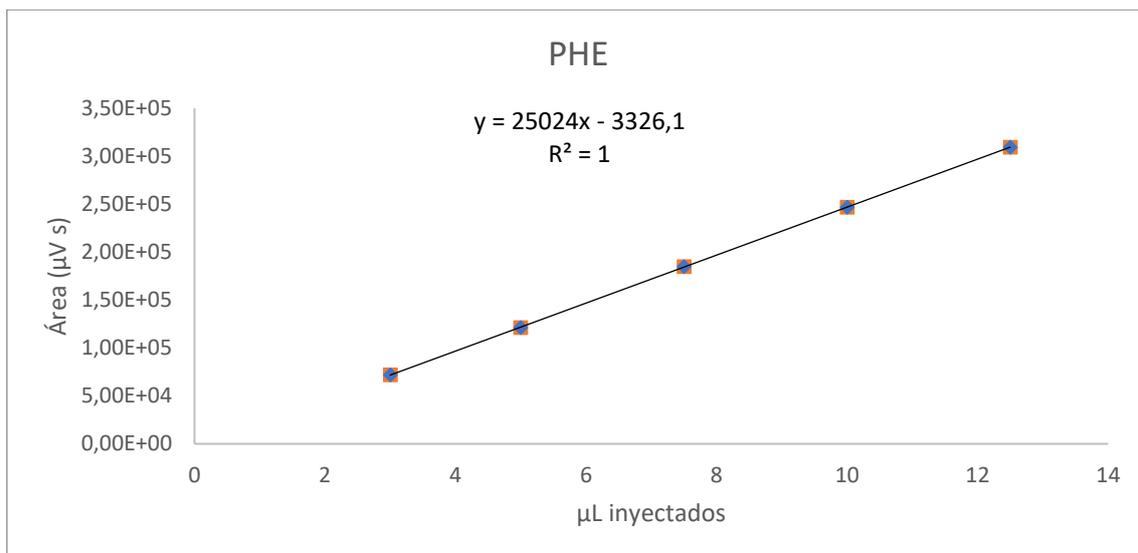


Figura 16: Representación gráfica del área de PHE en función del volumen de inyección en HPLC

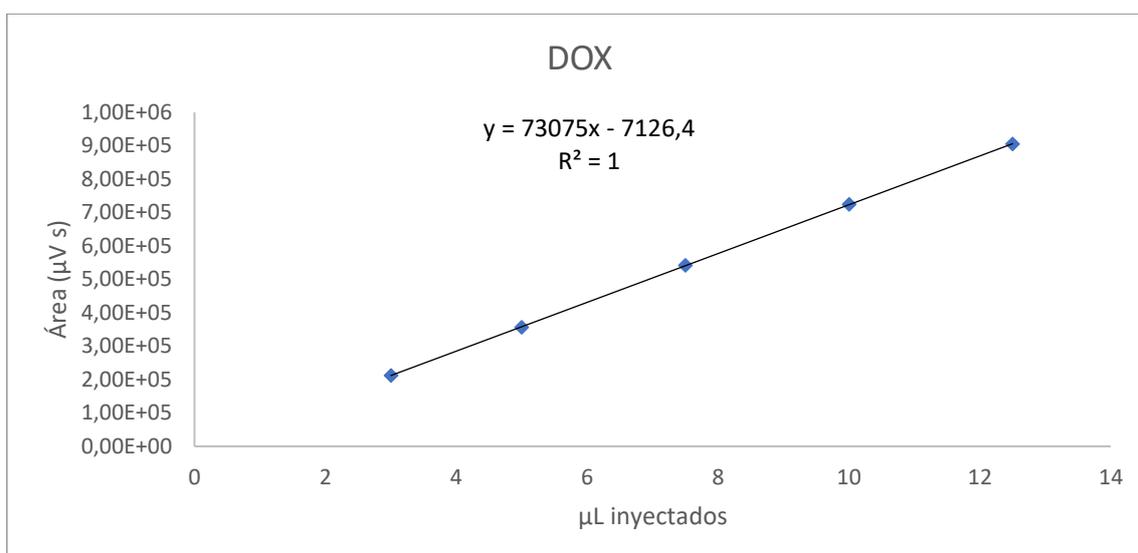


Figura 17: Representación gráfica del área de DOX en función del volumen de inyección en HPLC

El método actual, utilizando HPLC, indica que la respuesta es lineal desde un volumen de inyección de 3µL, hasta al menos 12,5µL para todos los analitos a 270 nm, por lo que se puede prescindir de la cuantificación a dos longitudes de onda, lo que ahorra espacio en la memoria del software y hace el procesamiento de los resultados una tarea más simple ya que solo debe procesarse un canal y no dos.

Por otra parte, es posible rebajar el volumen de disolución de los analitos de 1000 mL a 500 mL e incluso a 250 mL (para 10 capsulas) dado que la concentración y por tanto el resultado,

sería el mismo simplemente inyectando en el cromatógrafo 6 μL o 12 μL en lugar de 3 μL (que son los que se emplean en el método actual).

5.2.2. Desarrollo de un método alternativo de separación por UPLC

Se estudió la separación con la técnica UPLC de Waters® la cual es una técnica cromatográfica líquida con columnas de menor tamaño de poro y equipos que trabajan a presiones más altas, con volúmenes de inyección mucho más bajos y flujos de fase móvil menores. Para ello se hizo la conversión del gradiente utilizado en HPLC a estas condiciones nuevas y se evaluó la efectividad de la separación.

Se buscan realizar cambios mínimos en el método, por lo que las fases móviles se conservan tan cual están en el método y se optimizarán parámetros como el volumen de inyección, gradiente de elución y de ser necesario temperaturas de columna y muestras.

La columna seleccionada para este estudio es una Waters® Acquity® UPLC BEH C18 2,1 x 100 mm x 1,7 μm .

Para llevar el gradiente del método actual a un equivalente en esta nueva columna, se calculó el volumen de relleno de la columna en cada una de las etapas. Para este cálculo del volumen se asume teóricamente que la fase estacionaria está compuesta de partículas esféricas. Esto significa que ordenadas de forma aleatoria, estas esferas ocupan un 66% del volumen del cilindro. (Bursteva et al, 2015) La fórmula para el cálculo de volumen es la siguiente:

$$V_r = \pi \times L \times (D_i \div 2)^2 \times 0,66 \text{ columna}^{-1}$$

Ecuación 2: Cálculo del volumen de relleno de la columna cromatográfica

Puede verse que es la fórmula del volumen de un cilindro, considerando el espacio que ocupa la fase estacionaria.

Donde:

V_r = Volumen de relleno de la columna en cm^3 / columna

π = número pi (aprox. 3,1416)

L = Longitud de la columna en cm

D_i = Diámetro interno de la columna en cm

Una vez obtenido el volumen de relleno de la columna, se calculan cuantos volúmenes de relleno de fase móvil pasan por la columna en cada una de las etapas del gradiente utilizando esta fórmula:

$$c_f = f \times (t_2 - t_1) / V_r$$

Ecuación 3: Volumen de fase móvil que pasa por la columna en una etapa del gradiente

Donde:

c_f = Columnas de fase móvil

f = Flujo de fase móvil en $\text{cm}^3 / \text{minuto}$

t_2 = Tiempo final de la etapa de gradiente en minutos

t_1 = Tiempo inicial de la etapa de gradiente en minutos

V_r = Volumen de relleno de columna en $\text{cm}^3 / \text{columna}$

A modo de ejemplo calcularemos el volumen de fase que pasa por la primera etapa del método actual (ver tabla 7)

$$V_r = \pi \times L \times (D_i \div 2)^2 \times 0,66 \text{ columna}^{-1}$$

Sustituimos valores:

$$V_r = \pi \times 15 \text{ cm} \times (0,46 \text{ cm} \div 2)^2 \times 0,66 \text{ columna}^{-1} = 1,65 \frac{\text{cm}^3}{\text{columna}}$$

Como la primera etapa va del minuto 0 al minuto 3,7:

$$c_f = f \times (t_2 - t_1) / V_r$$

Sustituimos valores:

$$V = 1,0 \frac{\text{cm}^3}{\text{min}} (3,7 \text{ min} - 0 \text{ min}) \div 1,65 \frac{\text{cm}^3}{\text{col}} = 2,25 \text{ col}$$

De forma que el cálculo de columnas de fase móvil para cada etapa del gradiente se muestra en la tabla 9:

Tabla 9: Gradiente de elución con el número de columnas de fase móvil en cada etapa

| Tiempo (min) | % de fase móvil A | % de fase móvil B | Columnas de fase móvil en la etapa |
|--------------|-------------------|-------------------|------------------------------------|
| 0 | 100 | 0 | - |
| 3,7 | 95 | 5 | 2,25 |
| 19 | 60 | 40 | 9,30 |
| 19,5 | 60 | 40 | 0,30 |
| 20,5 | 55 | 45 | 0,61 |
| 21,5 | 50 | 50 | 0,61 |
| 23 | 50 | 50 | 0,91 |
| 23,5 | 100 | 0 | 0,30 |
| 30 | 100 | 0 | 3,95 |

Utilizando estos datos, se puede construir un gradiente teórico. El flujo de 1 mL/min resulta en una sobrepresión en el sistema UPLC por lo que se escogió un flujo de 0,31 mL/min para calcular el gradiente teórico. Utilizando la ecuación 3 y despejando t_2 se obtienen los datos mostrados en la tabla 10.

Tabla 10: Gradiente de elución teórico equivalente para el método UPLC.

| Tiempo (min) | % de fase móvil A | % de fase móvil B |
|--------------|-------------------|-------------------|
| 0 | 100 | 0 |
| 1,64 | 95 | 5 |
| 8,44 | 60 | 40 |
| 8,66 | 60 | 40 |
| 9,11 | 55 | 45 |
| 9,55 | 50 | 50 |
| 10,22 | 50 | 50 |
| 10,44 | 100 | 0 |
| 13,33 | 100 | 0 |

Se procedió, entonces, a evaluar la separación con este gradiente teórico probando a inyectar 0,2 μ L que es el volumen mínimo que recomienda el fabricante para la técnica. Con base en

estos resultados obtenidos, se realizaron ajustes posteriores. Para este ensayo se inyectaron soluciones estándar

5.2.3. Comparación de las técnicas HPLC y UPLC

A continuación, se muestran los cromatogramas obtenidos por el método actual por HPLC (figura 18) comparados con los de UPLC (figura 19). Para poder comparar todos los picos de los analitos, el cromatograma se presenta en detalle, aunque el pico de APAP quede cortado en su altura máxima por su elevado tamaño de la señal.

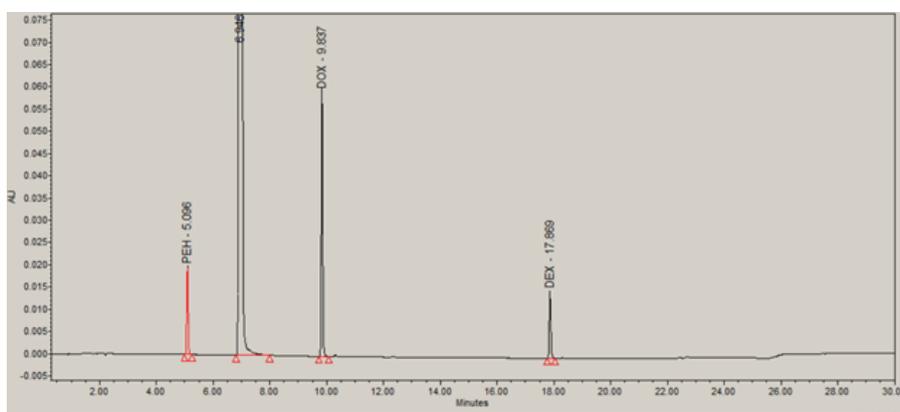


Figura 18.: Cromatograma del método actual por HPLC

Aplicando el gradiente teórico por UPLC (tabla 10) se obtiene el siguiente cromatograma:

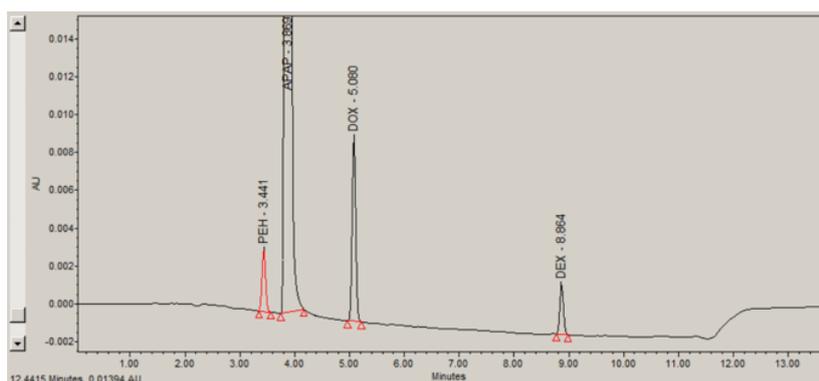


Figura 19: Cromatograma obtenido utilizando el gradiente teórico por UPLC

Aunque este gradiente consigue una separación eficiente, se intentó mejorar la separación entre los picos de PHE y APAP, juntando los picos, con objeto de disminuir el tiempo del cromatograma y por tanto el tiempo de análisis.

Para ello se realizó un segundo ajuste de gradiente que se muestra en la tabla 11:

Tabla 11: Gradiente 2 de elución para el método UPLC.

| Tiempo (min) | % de fase móvil A | % de fase móvil B |
|--------------|-------------------|-------------------|
| 0 | 100 | 0 |
| 1,68 | 95 | 5 |
| 5,00 | 60 | 40 |
| 8,00 | 40 | 60 |
| 13,60 | 100 | 0 |

Con este gradiente se obtiene el siguiente cromatograma (figura 20):

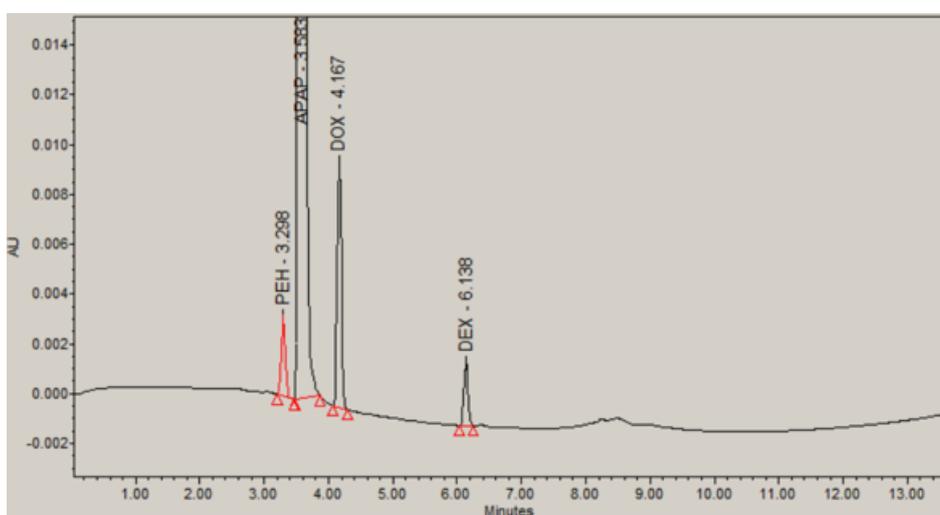


Figura 20: Cromatograma obtenido utilizando el gradiente 2

Se observa que, si bien con este gradiente se acorta en 2 minutos el tiempo de retención del DEX, la separación ahora entre PHE y APAP no es tan buena como en el gradiente anterior. Por ello, se realiza un nuevo ajuste del gradiente (gradiente 3) que se muestra en la tabla 12. Con este gradiente se busca mejorar la separación entre PHE y APAP, pero al estar la fase acuosa en mayor concentración, se espera que el tiempo de retención de DEX aumente un poco respecto del gradiente anterior. Por último, se intentó bajar a 10 minutos el tiempo de análisis.

Tabla 12: Gradiente 3 de elución para el método UPLC.

| Tiempo (min) | % de fase móvil A | % de fase móvil B |
|--------------|-------------------|-------------------|
| 0 | 100 | 0 |
| 1,68 | 95 | 5 |
| 5,40 | 76,2 | 23,8 |
| 8,00 | 50 | 50 |
| 10 | 100 | 0 |

Se obtiene el siguiente cromatograma (figura 21).

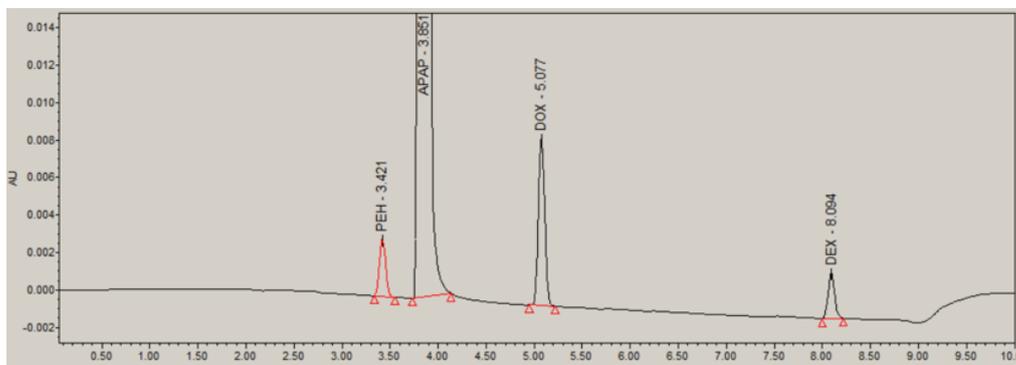


Figura 21: Cromatograma obtenido utilizando el gradiente 3

Tal cual se esperaba teóricamente, mejora la separación entre PHE y APAP, pero el DEX se atrasa un poco.

Con la intención de adelantar un poco el pico de DEX, se desarrolla otro gradiente (gradiente 4). En todos los gradientes anteriores, el cambio de condiciones era lineal, en este caso, es lineal hasta el minuto 6 y luego instantáneo en el minuto 6 para dejar 4 minutos de equilibrado de la columna con las condiciones iniciales.

El gradiente se muestra en la tabla 13 y su cromatograma en la figura 22:

Tabla 13: Gradiente 4 de elución para el método UPLC.

| Tiempo (min) | % de fase móvil A | % de fase móvil B |
|--------------|-------------------|-------------------|
| 0 | 100 | 0 |
| 1,68 | 95 | 5 |
| 5,40 | 76,2 | 23,8 |
| 6 | 50 | 50 |
| 10 | 100 | 0 |

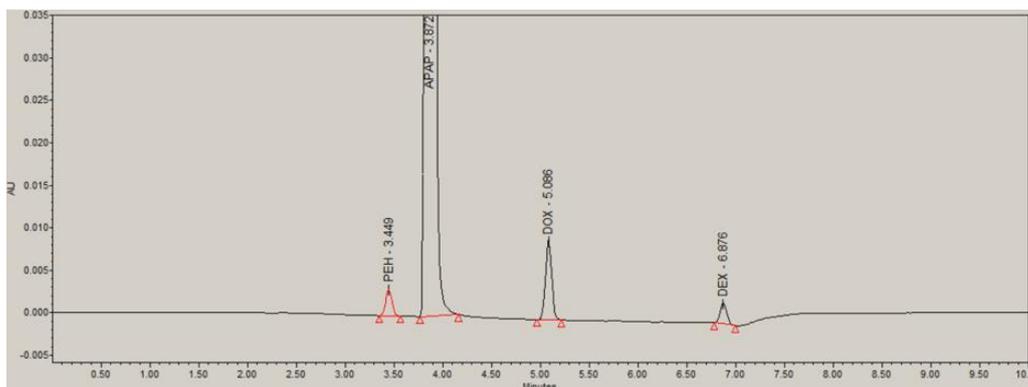


Figura 22: Cromatograma obtenido utilizando el gradiente 4.

Se observa que el pico de DEX está muy cerca de la fluctuación de la línea base debido al cambio abrupto de gradiente, por lo que pueden producirse errores al estimar su área, por lo que se desarrolla un gradiente (gradiente 5) con la misma curva y una pequeña corrección de la composición de la fase cerca del tiempo de retención del DEX para evitar este problema. El gradiente se muestra en la tabla 14 y su cromatograma en la figura 23.

Tabla 14: Gradiente 5 de elución para el método UPLC.

| Tiempo (min) | % de fase móvil A | % de fase móvil B |
|--------------|-------------------|-------------------|
| 0 | 100 | 0 |
| 1,68 | 95 | 5 |
| 5,40 | 76,2 | 23,8 |
| 6 | 40 | 60 |
| 10 | 100 | 0 |

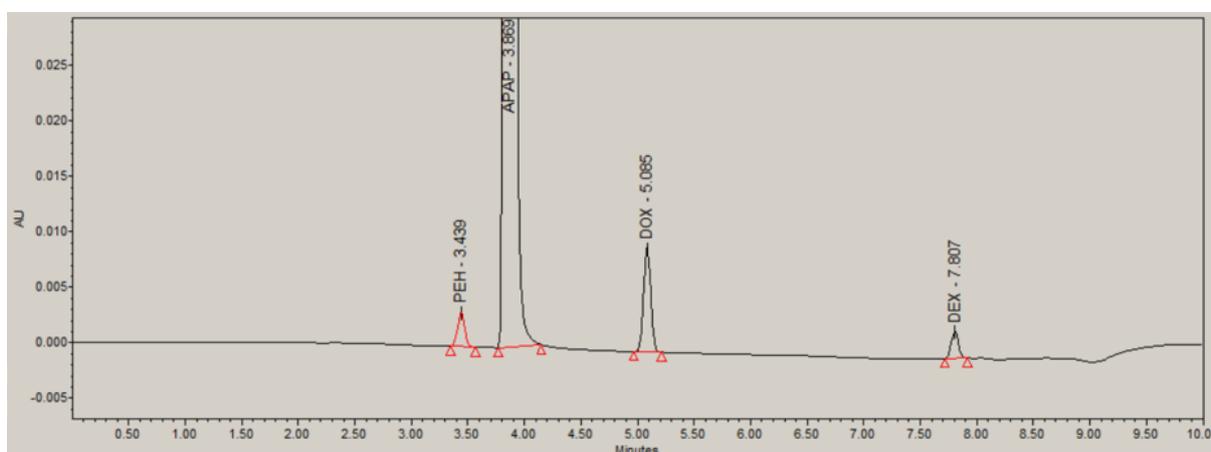


Figura 23: Cromatograma obtenido utilizando el gradiente 5

Con este gradiente, se resuelven los problemas del anterior y se considera satisfactorio. Queda así desarrollado el método de separación por UPLC que logra bajar el tiempo de análisis de 30 a 10 minutos rebajando, a su vez, la fase móvil de 30 mL a 3,1 mL, lo que representa un ahorro de recursos significativos respecto del método actual. Por esta razón se eligió esta técnica como forma de separación óptima de los analitos estudiados y se procedió a la optimización de parámetros.

Optimización del volumen de inyección: Una vez escogido el gradiente, se optimizó el volumen de inyección teniendo en cuenta que 0,2 μL es el volumen mínimo que recomienda el fabricante. Se realizaron 6 inyecciones de la solución estándar utilizando 0,2 μL y 6 más con 0,4 μL .

El APAP con volumen de 0,2 μL dio un coeficiente de variación de áreas de 2,65% (inaceptable) que mejoró al pasar a 0,4 μL hasta 0,83% (aceptable) por lo que se decide tomar 0,4 μL como volumen de inyección todos los ensayos.

Evaluación de la linealidad del método UPLC: Se preparó un calibrado con distintas concentraciones de los 4 componentes. Para ello se partió de disoluciones patrón de PHE, DEX, y DOX preparadas pesando 25,050 mg de PHE, 49,984 de DEX y 31,340 mg de DOX y llevándolas a un volumen de 50 mL. De ahí se toman diferentes alícuotas que se enrasan a los volúmenes finales indicados en la tabla 15. Las disoluciones de APAP se prepararon pesando las cantidades indicadas en la tabla y llevándolas a los distintos volúmenes.

Tabla 15: Preparación de las soluciones estándar para el estudio de linealidad

| Concentración relativa a la cantidad declarada | Volumen final (mL) | Alícuota de solución de PHE, DEX y DOX (mL) | Pesada de APAP (mg) |
|--|--------------------|---|---------------------|
| 1X | 50 | 5 | 162,80 |
| 2X | 25 | 5 | 325,92 |
| 4X | 25 | 10 | 326,65 |

El APAP, al tener una concentración muy superior a los demás componentes, presenta una linealidad peor, dado que su señal está cerca de la saturación del detector. Además, la preparación de las disoluciones presentan problemas de solubilidad.

Se realizaron medidas de 6 inyecciones de cada uno de los 3 estándares, cuantificando el APAP a 270 nm y a 300 nm se obtuvieron coeficientes de variación similares entre ambos ensayos, sin embargo, se obtuvo un coeficiente de regresión lineal relativamente bajo (0,9725) para 270 nm y uno aceptable (0,9996) para 300 nm. Evaluando los datos es evidente que esto

se debe a la saturación de la señal del detector al usar el estándar 4X, por lo que la cuantificación a 270 nm sería aceptable para métodos que mantengan la concentración actual o la incrementen como máximo al doble. Más allá de esta concentración, se debe hacer detección y cuantificación dual. Los resultados obtenidos del calibrado a 300 nm se muestran en la tabla 16 y figura 24.

Tabla 16: Áreas de las inyecciones de estándares 1X, 2X y 4X de APAP a 300 nm

| Inyección | Área ($\mu\text{v s}$) | | |
|-----------------|--------------------------|------------|------------|
| | 1X | 2X | 4X |
| 1 | 533981 | 1029581 | 1998318 |
| 2 | 527820 | 1045955 | 1998605 |
| 3 | 531324 | 1051169 | 2017305 |
| 4 | 530177 | 1039553 | 1998308 |
| 5 | 532400 | 1051467 | 1992113 |
| 6 | 540524 | 1045532 | 1949772 |
| Promedio | 532704,33 | 1043876,17 | 1992403,50 |
| Desv. Estándar | 4359,34 | 8257,25 | 22565,09 |
| Coef. Variación | 0,82 | 0,79 | 1,13 |

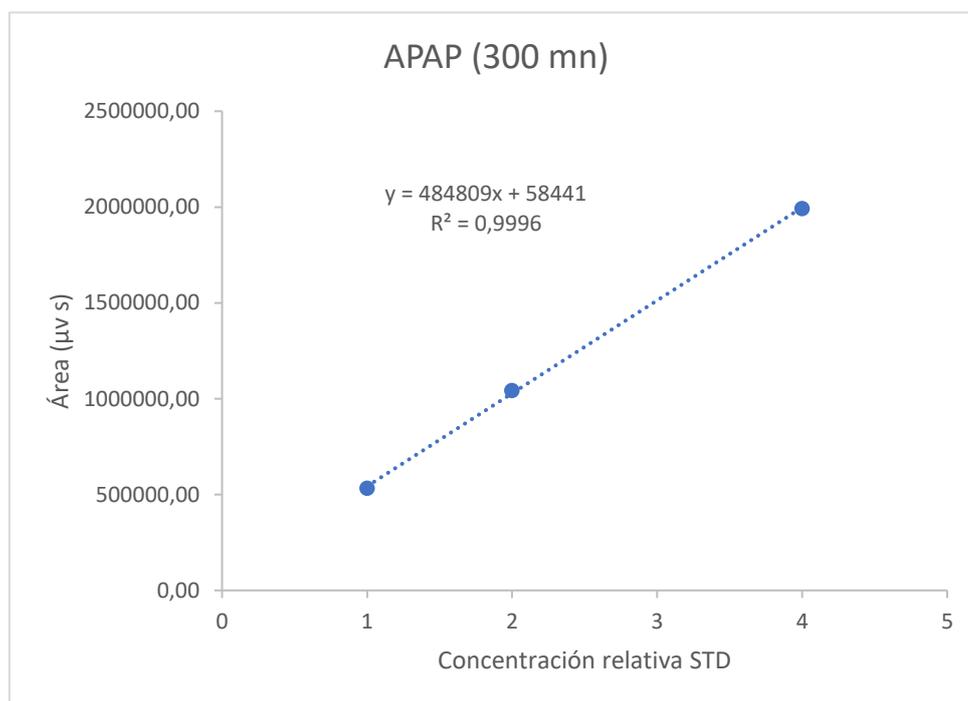


Figura 24: Respuesta del detector en función de la concentración relativa de APAP.

5.3 Método alternativo de extracción

Con objeto de mejorar el método actual se optimizó la extracción de los analitos contenidos en las capsulas. Para ello se estudiaron los siguientes parámetros: volumen de extracción, temperatura y agitación, número de capsulas del ensayo, filtros, etc. En todos los casos la elección de los mejores resultados estuvo sujeta a los siguientes criterios de aceptación.

Criterios de aceptación:

- 1 En cada ensayo individual, el coeficiente de variación de los resultados de las 6 inyecciones no debe superar el 2,0%
- 2 Comparando cada ensayo propuesto con la norma, el coeficiente de variación de los 12 resultados (los 6 del método propuesto y los 6 del método actual) no debe superar el 2,0%
- 3 Todos los ensayos deben cumplir los requerimientos de adecuabilidad del sistema que aparecen en la 3.4 de esta parte de la memoria.
- 4 Los resultados deben estar entre 90% y 110% de la cantidad declarada.

Aparte de lo mencionado, se estudió disminuir el volumen de disolvente a 500 mL y 250 mL, lo cual en teoría es posible según el estudio de linealidad del método UPLC que admite el doble y el cuádruple de la concentración declarada.

La cuantificación se realizó con los estándares de la sección anterior y con el fin de obtener la mayor cantidad de datos posibles, se llevaron a cabo las medidas a las dos longitudes de onda, a 270 nm y a 300 nm. Se realizaron 24 preparaciones, añadiendo 10 cápsulas en cada una, tal como se muestra en la tabla 17. La descripción del método propuesto está en la sección 5.4.

Tabla 17: Ensayos de precisión de método propuesto respecto al actual

| Ensayo | Método | Volumen de extracción (mL) | Volumen final (mL) |
|--------|-----------|----------------------------|--------------------|
| 1 | Actual | 400 | 1000 |
| 2 | Propuesto | 400 | 1000 |
| 3 | Propuesto | 200 | 500 |
| 4 | Propuesto | 150 | 250 |

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 18 a 24 en tanto por ciento de principio activo calculado según la ecuación 1 (sección 3.4 de esta parte de la memoria).

Los datos que cumplen los criterios se muestran de color **verde**, mientras los que no los cumplen se muestran de color **rojo**.

Tabla 18: Resultados del ensayo 1

| ENSAYO 1: MÉTODO ACTUAL | | | | | |
|-------------------------|---------|----------|----------|---------|---------|
| Muestra | PHE | APAP 270 | APAP 300 | DOX | DEX |
| 1 | 101,581 | 101,434 | 101,340 | 102,642 | 102,900 |
| 2 | 99,355 | 99,793 | 99,836 | 100,981 | 101,111 |
| 3 | 99,648 | 99,946 | 100,122 | 101,187 | 101,043 |
| 4 | 99,790 | 99,772 | 100,119 | 100,825 | 100,791 |
| 5 | 99,041 | 99,374 | 99,472 | 100,832 | 100,516 |
| 6 | 98,666 | 99,196 | 99,239 | 100,499 | 100,254 |
| Promedio | 99,680 | 99,919 | 100,021 | 101,161 | 101,103 |
| Desv. Estándar | 1,017 | 0,794 | 0,736 | 0,760 | 0,938 |
| Coef. Variación | 1,020 | 0,795 | 0,736 | 0,751 | 0,927 |

Tabla 19: Resultados del ensayo 2

| ENSAYO 2: MÉTODO PROPUESTO (1000 mL) | | | | | |
|--------------------------------------|---------|----------|----------|---------|---------|
| Muestra | PHE | APAP 270 | APAP 300 | DOX | DEX |
| 1 | 100,440 | 100,021 | 99,948 | 101,228 | 101,091 |
| 2 | 101,237 | 100,886 | 100,879 | 102,005 | 101,816 |
| 3 | 102,018 | 101,817 | 101,953 | 102,637 | 102,899 |
| 4 | 100,443 | 100,270 | 100,159 | 101,429 | 101,178 |
| 5 | 101,789 | 101,310 | 101,327 | 102,726 | 102,435 |
| 6 | 99,99 | 99,832 | 99,983 | 100,849 | 100,909 |
| Promedio | 100,986 | 100,689 | 100,708 | 101,812 | 101,721 |
| Desv. Estándar | 0,819 | 0,781 | 0,821 | 0,771 | 0,807 |
| Coef. Variación | 0,811 | 0,776 | 0,815 | 0,757 | 0,794 |

Tabla 20: Resultados del ensayo 3

| ENSAYO 3: MÉTODO PROPUESTO (500 mL) | | | | | |
|-------------------------------------|--------|----------|----------|--------|--------|
| Muestra | PHE | APAP 270 | APAP 300 | DOX | DEX |
| 1 | 98,465 | 99,284 | 99,348 | 98,573 | 98,232 |
| 2 | 98,694 | 99,425 | 99,431 | 98,544 | 98,241 |
| 3 | 99,310 | 99,993 | 99,950 | 99,439 | 98,991 |
| 4 | 98,127 | 99,008 | 99,127 | 98,329 | 98,043 |
| 5 | 98,189 | 99,060 | 99,321 | 98,149 | 97,892 |
| 6 | 98,315 | 99,041 | 99,116 | 98,540 | 98,179 |
| Promedio | 98,517 | 99,302 | 99,382 | 98,596 | 98,263 |
| Desv. Estándar | 0,439 | 0,376 | 0,305 | 0,445 | 0,381 |
| Coef. Variación | 0,446 | 0,378 | 0,307 | 0,451 | 0,387 |

Tabla 21: Resultados del ensayo 4

| ENSAYO 4: MÉTODO PROPUESTO (250 mL) | | | | | |
|-------------------------------------|--------|----------|----------|--------|--------|
| Muestra | PHE | APAP 270 | APAP 300 | DOX | DEX |
| 1 | 95,735 | 98,409 | 96,473 | 95,657 | 95,265 |
| 2 | 94,151 | 97,937 | 95,032 | 94,217 | 93,707 |
| 3 | 98,493 | 99,655 | 99,093 | 98,44 | 97,95 |
| 4 | 97,002 | 98,894 | 98,154 | 97,083 | 96,835 |
| 5 | 97,305 | 99,534 | 97,851 | 97,167 | 96,303 |
| 6 | 96,400 | 98,167 | 97,100 | 96,307 | 95,984 |
| Promedio | 96,514 | 98,766 | 97,284 | 96,479 | 96,007 |
| Desv. Estándar | 1,482 | 0,717 | 1,422 | 1,450 | 1,441 |
| Coef. Variación | 1,536 | 0,726 | 1,462 | 1,502 | 1,501 |

Tabla 22: Comparación de los ensayos 1 y 2

| Ensayos 1 y 2 | PHE | APAP 270 | APAP 300 | DOX | DEX |
|-----------------|---------|----------|----------|---------|---------|
| PROMEDIO | 100,333 | 100,304 | 100,365 | 101,487 | 101,412 |
| DESV. ESTÁNDAR | 1,114 | 0,852 | 0,825 | 0,805 | 0,895 |
| COEF. VARIACIÓN | 1,110 | 0,849 | 0,822 | 0,793 | 0,882 |

Tabla 23: Comparación de los ensayos 1 y 3

| Ensayos 1 y 3 | PHE | APAP 270 | APAP 300 | DOX | DEX |
|-----------------|--------|----------|----------|--------|--------|
| PROMEDIO | 99,098 | 99,611 | 99,702 | 99,878 | 99,683 |
| DESV. ESTÁNDAR | 0,963 | 0,674 | 0,632 | 1,465 | 1,632 |
| COEF. VARIACIÓN | 0,971 | 0,677 | 0,634 | 1,467 | 1,637 |

Tabla 24: Comparación de los ensayos 1 y 4

| Ensayos 1 y 4 | PHE | APAP 270 | APAP 300 | DOX | DEX |
|-----------------|--------|----------|----------|--------|--------|
| PROMEDIO | 98,097 | 99,343 | 98,653 | 98,820 | 98,555 |
| DESV. ESTÁNDAR | 2,050 | 0,940 | 1,791 | 2,683 | 2,902 |
| COEF. VARIACIÓN | 2,090 | 0,946 | 1,816 | 2,715 | 2,945 |

El primer y tercer criterio se cumplieron en todos los ensayos. El segundo criterio solo se cumplió en los ensayos 2 y 3, por lo que se puede decir que los métodos propuestos utilizando 10 cápsulas en 1000 mL y 500 mL respectivamente son equivalentes al método actual.

5.4. Evaluación de las condiciones de temperatura y agitación de la extracción

Se evaluó la extracción sustituyendo el baño térmico y la agitación magnética con un agitador orbital Eppendorf® Innova S44i. Se colocaron las muestras con un programa de dos fases, una fase de extracción de 45 minutos a 40°C y 150 rpm y una fase de atemperado a 20°C y 150 rpm por 20 minutos. Por lo demás se siguió el protocolo actual eliminando los pasos de ultrasonidos y sin pesar las cápsulas individualmente.

Se modificó el método de extracción de manera de aplicar condiciones un poco más fuertes (tabla 25) de extracción para lograr extraer los analitos en menor volumen:

Tabla 25: Comparación de los métodos propuestos para la extracción de los analitos

| Método | Temperatura inicial | Ciclo de extracción | Ciclo de atemperado |
|--------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1 | Ambiente | 150 rpm / 40°C / 45 minutos | 150 rpm / 20°C / 20 minutos |
| 2 | 50°C | 200 rpm / 50°C / 45 minutos | 200 rpm / 20°C / 20 minutos |

Debido a que se demostró que aplicando el método 1 con volumen final de 500 mL y 1000 mL (sección anterior) se obtienen resultados equivalentes al método actual, se realizaron 18 preparaciones utilizando 10 cápsulas: 6 con el método 1 y 6 con el método 2 con volumen final de 500 mL más 6 preparaciones con el método 2 con volumen final de 250 mL para evaluar la equivalencia de estos métodos.

No se pudo demostrar la equivalencia en ningún caso utilizando el método 2, en el caso de 500 mL el DEX no cumple los criterios de aceptación entre los métodos (criterio 2) y en el caso de 250 mL no los cumple el APAP, en este caso es evidente que el APAP no puede cuantificarse a 270 nm. Pero a 300 nm tampoco cumple, esto puede deberse a saturación de la solución de extracción. Curiosamente el DEX sí cumple en el método 2 con 250 mL. Se descartan preparaciones a más allá del doble la concentración del método original. Los datos individuales se encuentran en el anexo 1.

5.5. Reducción del número de cápsulas

Debido a que no se puede reducir el volumen a 250 mL manteniendo las 10 cápsulas, la alternativa que queda por probar es reducir también el número de cápsulas. Las cápsulas empleadas en este ensayo provienen de una mezcla de lotes ya analizados y conformes, de forma que no se puede trazar los resultados directamente a algún lote en específico y brindan la cantidad de cápsulas suficientes para el ensayo. Se espera lógicamente que estos experimentos resulten válidos debido a que se mantiene la concentración original.

Se prepararon 18 muestras, 6 utilizando 10 cápsulas en 1000 mL, 6 utilizando 5 cápsulas en 500 mL y 6 utilizando 2 cápsulas en 200 mL. En todos los casos se usó el estándar 1X para la cuantificación y el método 1 propuesto. Como era de esperarse los métodos son equivalentes entre sí independientemente de su desviación estándar por ensayo. Los resultados individuales están en el anexo 2.

5.6. Filtros

También se estudiaron distintos modelos de filtro con el fin de evaluar la posibilidad de sustituir los actuales por un modelo más económico. Debido a que se gasta un filtro por cada preparación es importante saber si existen alternativas válidas que permitan ahorrar costos. Para esto se compararán dos filtros, inyectando 6 preparaciones de muestra sin filtrar, 6 utilizando el filtro utilizado para UPLC (Phenomenex® AF8-6706-12 Clarify PVDF 25 mm 0,2 μm) y 6 de ellas utilizando un filtro similar pero mucho más económico (Análisis Vínicos® E0053B-1 PVDF 25 mm 0,2 μm).

Se realizó el ensayo utilizando el método propuesto 1 con 10 cápsulas en 1000 mL. Ambos filtros resultaron ser equivalentes, cuando se comparan a la solución sin filtrar, sin embargo, los ensayos con el filtro de jeringa de Análisis Vínicos®, presentaron en un coeficiente de variación considerablemente menor para todos los principios activos. Una consideración alternativa de que este filtro es un 60% más económico que el resto. Los resultados individuales están en el anexo 3.

5.7. Estudio de la estabilidad de la solución estándar

Se parte de una pureza de los estándares de: APAP y PHE: 99,9%; DEX: 95,11% y DOX: 99,2%. Se prepararon 2 disoluciones estándar según el procedimiento descrito en la sección 3.1, para un volumen de 50 mL tanto para la solución de PHE, DOX y DEX como para la solución final con el APAP. Los pesos se indican en la tabla 26:

Tabla 26: Preparaciones de estándares para el estudio de estabilidad

| Preparación / disolución | Peso PHE (mg) | Peso DOX (mg) | Peso DEX (mg) | Peso APAP (mg) |
|-----------------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| 1 | 25,050 | 31,340 | 49,984 | 162,80 |
| 2 | 25,432 | 31,431 | 50,428 | 162,588 |

Una vez preparados, se trasvasaron a vial y se colocaron bajo una suave corriente de nitrógeno y el vial se sella con una cápsula metálica con septum hermético, de manera que el estándar se mantiene en atmósfera inerte y se congeló a -20°C hasta el momento del análisis.

El estudio de la disolución 1 se hizo a los 7, 20 y 35 días y el de la disolución 2 a los 0, 7, 17 y 28 días. Las razones por las cuales los días son tan aleatorios se deben a la poca disponibilidad del equipo ya que se utilizaba en la propia rutina de la empresa. Para cada estudio se realizan 6 inyecciones del mismo vial de estándar.

Se evaluó la variación de las áreas en el tiempo, en cada estudio individual no se consideró el peso ni el factor de dilución porque siempre era el mismo, por lo que cualquier cambio en la composición o concentración del estándar se reflejaría como un cambio en el área.

En ambos casos no aparece una tendencia clara de subida o bajada continua de la señal, sino resultados fluctuantes que mantienen un coeficiente de variación aceptable en cada uno de los ensayos. La normalización de las áreas dividiendo las áreas de los 4 principios activos entre el área del APAP a 300 nm demuestran la estabilidad de los patrones a lo largo del tiempo.

Cabe destacar que aún con esa normalización, el coeficiente de variación del DEX caía por fuera de los criterios de aceptación en la disolución 2, de forma que se decidió hacer un ensayo adicional, preparando una nueva solución estándar e inyectando las otras 2 junto con esta, de esta forma se compararía la solución 1 que tenía 67 días para el momento y la solución 2 que tenía 39 días para el momento con una solución recién preparada.

Para el tercer estándar, se pesaron las siguientes cantidades: PHE: 24,960 mg, APAP: 163,072 mg, DOX: 31,331 mg y DEX: 49,474 mg para 50 mL de ambas soluciones (la madre de DEX, DOX y PHE y la solución de trabajo con APAP). Se realizaron 6 inyecciones de cada uno de los estándares. En este caso si se toman en cuenta los pesos y diluciones porque las tres soluciones tienen concentraciones diferentes, por lo que comparar solo las áreas sería un error. Para ello se calcula un factor de respuesta (ecuación 4).

$$F_r = \frac{A_s}{C_s}$$

Ecuación 4: Cálculo del factor de respuesta instrumental.

Donde:

F_r = Factor de respuesta

A_s = Área del estándar ($\mu\text{V s}$)

C_s = Concentración del estándar en mg / mL

La utilidad de este factor es que se relaciona la respuesta instrumental con la cantidad de sustancia. En la tabla 27 se muestran las concentraciones de los estándares en mg/mL utilizadas en este ensayo.

Tabla 27: Concentraciones de los estándares en mg/mL para el estudio de estabilidad.

| Preparación | Concentración APAP (mg/mL) | Concentración PHE (mg/mL) | Concentración DOX (mg/mL) | Concentración DEX (mg/mL) |
|-------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1 (67 días) | 3,252744 | 0,050050 | 0,062617 | 0,099868 |
| 2 (39 días) | 3,247909 | 0,050813 | 0,062799 | 0,100755 |
| 3 (0 días) | 3,258179 | 0,049870 | 0,062161 | 0,094619 |

El resultado de este ensayo dio un coeficiente de variación global menor a 0,85% para todos los analitos, de forma que con este resultado se puede garantizar inequívocamente la

estabilidad de la solución estándar al menos 67 días, en las condiciones de almacenaje propuestas. Esto representa un ahorro importante, no solo en los estándares como tal sino en tiempo de analista, ya que estas soluciones toman bastante tiempo de preparar y documentar.

Los resultados individuales de este ensayo se encuentran en los anexos 4 y 5.

5.8. Resumen de los estudios realizados en los métodos propuestos

Una vez analizados todos los datos, se proponen 4 métodos alternativos de extracción (utilizando el agitador orbital) para que la empresa decida cual aplicar para sustituir el método actual. Los 4 métodos se muestran en la tabla a 28:

Tabla 28: Métodos de extracción propuestos

| Criterio / Método | Método 1 | Método 2 | Método 3 | Método 4 |
|---|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Cápsulas analizadas | 10 | 10 | 5 | 2 |
| Volumen inicial (mL) | 400 – 500 | 200 – 250 | 200 – 250 | 80 - 100 |
| Ciclo 1 | 40°C / 150 rpm / 45 min |
| Ciclo 2 | 20°C / 150 rpm / 20 min |
| Volumen final (mL) | 1000 | 500 | 500 | 200 |
| Concentración del estándar para cuantificar | 1X | 1X / 2X | 1X | 1X |

El método cromatográfico de separación UPLC para los analitos proporciona mejores resultados en cuanto a separación y tiempo del análisis frente al de HPLC.

Condiciones de extracción: Agitador orbital en dos ciclos, un primer ciclo de 40°C a 150 rpm por 45 minutos y un segundo ciclo de atemperado de 20°C a 150 rpm por 20 minutos, tiempo total de extracción 1 hora y 5 minutos. El volumen de extracción será entre 40% y 50% de la capacidad nominal del matraz. En ningún caso se requiere someter la muestra a ultrasonidos.

Estándares y fases móviles: No se modifican con relación al método actual.

Número de cápsulas:

Los métodos que mantienen la concentración original al:

- Agregar 10 cápsulas a un matraz de 1000 mL que contiene 100 µL de solución saturada de KCl y proceder con la extracción.
- Agregar 5 cápsulas a un matraz de 500 mL que contiene 50 µL de solución saturada de KCl y proceder con la extracción.
- Agregar 2 cápsulas a un matraz de 200 mL que contiene 20 µL de solución saturada de KCl y proceder con la extracción.

Gradiente cromatográfico: El gradiente óptimo de fase móvil de UPLC se muestra en la tabla 29.

Tabla 29: Gradiente óptimo de elución de los métodos propuestos.

| Tiempo (min) | % de fase móvil A | % de fase móvil B |
|--------------|-------------------|-------------------|
| 0 | 100 | 0 |
| 1,68 | 95 | 5 |
| 5,40 | 76,2 | 23,8 |
| 6 | 40 | 60 |
| 10 | 100 | 0 |

Filtros: Análisis Vínicos® E0053B-1 PVDF de 25 mm y 0,2 µm

Mejoras adicionales: No hace falta precalentar el disolvente, se puede añadir el matraz con las cápsulas a temperatura ambiente y someterlo a los ciclos de extracción. Tampoco se pesaron las cápsulas individualmente, se colocaron en gradillas con espacios, con el fin de

asegurarse que siempre se añadía el número adecuado de ellas. En caso de necesidad se puede realizar también el análisis cromatográfico utilizando el método actual por HPLC detectando todo a 270 nm.

6. COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS ACTUAL Y PROPUESTO

En la tabla 30, se resumen las condiciones estudiadas comparando el método actualmente en uso con el método propuesto:

Tabla 30: Comparación entre los métodos actual y propuestos

| Criterio a comparar | Método actual | Métodos propuestos |
|--|---|-----------------------------|
| Pesada de las cápsulas | Sí, individual | No |
| Cápsulas analizadas | 10 | 2, 5 o 10 |
| Ciclos de extracción | 6, con cambio manual | 2, con cambio automático |
| Uso de imán agitador | Sí | No |
| Temperatura | 50°C | 40°C |
| Ultrasonidos | Sí | No |
| Tiempo de extracción | Al menos 3 horas (180 min) | 1 hora y 5 minutos (65 min) |
| Equipo | HPLC | UPLC |
| Detección | Dual a 270 nm y 300 nm | Un solo canal a 270 nm |
| Cromatogramas generados | 2 | 1 |
| Gasto de fase móvil | 30 mL por inyección | 3,1 mL por inyección |
| Generación de residuos por lote | 2 L | Entre 400 mL y 2 L |
| Tiempo de análisis | 30 minutos | 10 minutos |
| Estabilidad de la solución estándar de trabajo | 4 días | Al menos 67 días |
| Riesgo ergonómico | Riesgo de lesión a largo plazo en hombros y espalda | Menor riesgo |

6.1. Mejoras logradas con los métodos propuestos

6.1.1. Ahorro de tiempo

La vida útil de la solución estándar de trabajo pasa de 4 días hasta al menos 67 días. Esto supone un ahorro de tiempo en la preparación de los patrones (pesada con precisión, disolución, alícuotas, documentos a verificar, etc.) y, evidentemente, una mejora de la precisión del método, dado que no se tienen que preparar tantos patrones (que supone una elevada manipulación) en los numerosos ensayos a realizar. Con esta extensión se pueden utilizar los estándares en bastantes ensayos con solo realizar estos pasos una vez.

Se ahorra tiempo con el método de extracción propuesto, ya que con el método actual no solo los ciclos de extracción tienen una mayor duración en el tiempo, sino que el analista debe mover los matraces de un sitio a otro, lo cual también toma tiempo. Se elimina la pesada individual de las cápsulas lo cual toma mucho tiempo si se están haciendo varios lotes a la vez.

También, escogiendo un método con volumen reducido hace que se puedan colocar más matraces en el agitador, permitiendo un mayor número de lotes a analizar, al ser las secuencias más rápidas, se pueden analizar más lotes en menos tiempo.

Eliminando la necesidad de cuantificación a dos longitudes de onda se ahorra tiempo de procesado y revisión de los resultados pues se tendrían que procesar y revisar la mitad de los cromatogramas. También al adquirir solo a 270 nm, los datos son menos pesados, por lo que el manejo del archivo y los tiempos de procesado y firmas electrónicas pueden acortarse.

6.1.2. Ahorro económico

El ahorro de electricidad es importante, ya que el tiempo de extracción es mucho más corto y es solo un equipo el que se usa.

Se ahorra también a la hora de gestionar residuos, debido a que, si se implementa un método equivalente con reducción de volumen, se puede reducir la generación de residuos entre un 50% y un 80% comparado con el método actual.

Extender la caducidad de la solución estándar disminuye la compra de patrones de los principios activos, que cuando son de un alto grado de pureza o de uso según alguna farmacopea específica pueden llegar a ser muy caros.

Aunque estos ahorros puedan parecer pequeños, cuando se realizan miles de análisis por año, suponen una cantidad importante del presupuesto analítico que se puede desviar a otros usos.

6.1.3. Mejoras en ergonomía

Los matraces de 1 litro son pesados cuando están llenos; y si se considera el hecho de la agitación para la homogeneización final, más el traslado, subidas y bajadas a lo largo de los 6 ciclos de agitación del método actual, puede resultar en cansancio para el analista (sobre todo si se hacen muchos lotes el mismo día) y en lesiones a mediano o largo plazo en hombros y espalda. Reduciendo el volumen a 500 mL o 200 mL, se nota bastante el cambio en el peso de los matraces, haciendo el trabajo de agitación y transporte mucho más sencillo para el analista.

Finalmente, el último ahorro significativo es el posible uso de filtros de jeringa más económicos que a largo plazo suponen un ahorro importante.

6.2. Investigaciones futuras

Las mejoras de los métodos propuestos en este proyecto se puede pensar en extender a otros métodos dentro del mismo producto, ya que este aparte del análisis de contenido de los principios activos, lleva ensayo de disolución, impurezas y sustancias relacionadas tanto del paracetamol como de todos los principios activos.

Puede evaluarse la extensión a otras familias de antigripales de la empresa, una de ellas es de aplicación automática porque solo contiene APAP, DEX y PHE por lo que el análisis de contenido desarrollado es válido para este. Otras familias sustituyen el DEX por guaifenesina o DOX por clorfeniramina, por lo que deben evaluarse, aparte del método de extracción, el gradiente cromatográfico y la estabilidad del estándar para adaptar los métodos nuevos a estos productos.

Finalmente, tal y como se discutió antes, la forma más adecuada de estudiar en este caso la estabilidad del estándar es hacer la preparación en cada punto del estudio medirla frente a una recién preparada, se puede empezar a realizar y ver hasta qué punto dejan de ser equivalentes y fijar inequívocamente una fecha de estabilidad de la solución estándar de trabajo.

7. CONCLUSIONES

Se proponen 4 métodos alternativos de extracción para el análisis de contenido de los principios activos de un antigripal en cápsula de gelatina blanda (tabla 28).

Se propone un método alternativo de separación cromatográfica utilizando la técnica UPLC.

Se propone un método alternativo de cuantificación a una sola longitud de onda por HPLC.

La agitación orbital permite una extracción cuantitativa de los principios activos en dos ciclos, con duración de 1 hora y 5 minutos.

No es necesario someter la muestra a ultrasonidos para la extracción de los principios activos.

Se logran importantes mejoras en ergonomía, así como ahorro importante de tiempos de extracción (de más de 3 horas a 1 hora y 5 minutos), de análisis (de 30 a 10 minutos), de procesado y revisión (se genera un cromatograma en vez de 2). También se genera un importante ahorro de dinero ya que se generan menos residuos para gestionar (entre 50% y 80% menos), se utiliza un solo equipo en vez de varios.

La solución estándar de trabajo es estable en congelador a -20°C por al menos 67 días.

8. BIBLIOGRAFÍA

- (Allan y Arrol, 2014): Allan M, Arrol B. *Prevention and treatment of the common cold: making sense of the evidence* CMAJ; 2014 186 (3) pp 190-199.
- (Anderson, 2015): Anderson, M. *Six Cold and Flu Medicines you're Not Taking Today (And for Good Reason)*. <https://insider.si.edu/2015/01/six-cold-flu-medicines-youre-not-taking-today-good-reason/>. 27/01/2015 (consultado el 29/04/2020)
- (Arrol, 2011). Arrol B. *Common cold*. BMJ clinical evidence. 2011;1510.
- (Augsburger y Hoag, 2017): Augsburger L, Hoag S. *Pharmaceutical Dosage Forms*. Primera Edición, CRC Press, 2017
- (Balsamo et al, 2010): Balsamo R, Lanata L y Egan C. *Mucoactive drugs*. European Respiratory Review Jun 2010, 19 (116) 127-133 DOI: 10.1183/09059180.00003510
- (Bargaje, 2011): Bargaje C. *Good documentation practice in clinical research*. Perspect Clin Res 2011, (Abr – Jun) (2) 59 – 63.
- (Batlle y De Conte, 2001): Batlle C, De Conte O. *Antitusígenos. Alivio y descanso* Farmacia Profesional 15, 2001 (11) 58-60
- (Bermúdez, 2019): Bermúdez E, *Column One: 'Vivaporu': For many Latinos, memories of Vicks VapoRub are as strong as the scent of eucalyptus*". Los Angeles Times 26/04/2019. Disponible en <https://www.latimes.com/local/california/la-me-col1-vicks-vaporub-20190326-htmllstory.html>
- (Braun et al, 2000): Braun B, Fowles J, Solberg L, Kind E, Healey M, Anderson R. *Patient beliefs about the characteristics, causes and care of the common cold*. J Fam Pract 2000; 29: 153-6.
- (Bursteva et al, 2015): Bursteva L, Valdez B, Werner F, Petranovskii V. *Packing of monosized pheres in a cylindrical container: models and approaches*. Revista Mexicana de Física 61 (2015) 20 – 27
- (Eccles y Weber, 2009). Eccles, K y Weber, O. *Common Cold*, Birkäuser Basel, 2009
- (Flórez, 2003): Flórez, J. *Farmacología humana*. Elsevier, España, 2003
- (Ghanem et al, 2016): Ghanem C, Perez M, Manautou J, Mottino A. *Acetaminophen from liver to brain: New insights into drug pharmacological action and toxicity*. Pharmacological Research 2016 (109) 119-131 DOI: 10.1016/j.phrs.2016.02.020
- (González, 1998): González M. *Sana que te sana, culito de rana Historia de la Medicina*, Ediciones de la Torre, Madrid 1998
- (Hardman et al, 1996): Hardman J, Limbird L, Goodman G. *Goodman & Gilman, las bases farmacológicas de la terapéutica*. 9^{na} edición McGraw-Hill Interamericana, México DF, 1996

- (Jeffreys, 2010): Jeffreys D. *Aspirin: The Extraordinary Story of a Wonder Drug*, Bloomsbury Publishing, 2010.
- (Lien et al, 2006): Lien A, Hua H, Chuong P. *Chiral Drugs: An Overview*. Int J Biomed Sci. 2006; 2 (2): 85-100)
- (Moghadami, 2017). Moghadami, Mohsen. *A Narrative Review of Influenza: A Seasonal and Pandemic Disease*. Iran J Med Sci 2017 42 (1): 2-13.
- (Nash, 2014): Nash, P. *Heroin Addiction's Fraught History*. The Atlantic 24/02/2014 Disponible en: <https://www.theatlantic.com/health/archive/2014/02/heroin-addictions-fraught-history/284001/>
- (Page et al, 1998): Page C, Curtis M y Sutter M. *Farmacología integrada*. Elsevier, España 1998
- (Premkumara et al, 2019): Premkumara S, Karunakarana A, Murugesana V, Munusamy J, Jayaprakasha R, Murugesanb R. *Validated UV-Spectrophotometric Method for the Simultaneous Estimation of Pyridoxine Hydrochloride and Doxylamine Succinate in Bulk and in Pharmaceutical Dosage form*. Advanced Journal of Chemistry Section-A, 2019 2 (3) 245 – 255
- (Reza et al, 2010): Reza M, Abdollahi H, Ghaffari A, Shariatpanahi M, Farzanegan H. *Simultaneous spectrophotometric determination of paracetamol, phenylephrine and chlorpheniramine in pharmaceuticals using chemometric approaches*. Daru-Journal of Faculty Pharmacy 2010 – 18 (4) 292 – 297.
- (Ringdahl et al, 2004). Ringdahl E, Pereira S, Delzell J. *Treatment of primary insomnia*. The Journal of the American Board of Family Practice 17, 2004 (3) 212-219. DOI: 10.3122/jabfm.17.3.212.
- (Saeb-Parsy et al, 1999): Saeb-Parsy K, Assomull R, Khan F, Saeb-Parsy K, Kelly E. *Instant Pharmacology* John Wiley & Sons, Inglaterra 1999.

Páginas Web consultadas

- PubChem®: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetaminophen>
- ChemSpider®: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5818.html>
- PubChem®: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/dextromethorphan>
- PubChem®: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Doxylamine>

- Sigma-Aldrich®: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Datasheet/d1053-46h9440dat.pdf>

Anexo 1: Datos experimentales de la precisión de método (sección 5.4)

Tabla A1-1: Resultados 10 cápsulas en 500 mL (Método 1)

| 10 CÁPSULAS EN 500 mL – MÉTODO 1 | | | | | |
|----------------------------------|--------|----------|----------|--------|--------|
| Muestra | PHE | APAP 270 | APAP 300 | DOX | DEX |
| 1 | 98,465 | 99,284 | 99,348 | 98,573 | 98,232 |
| 2 | 98,694 | 99,425 | 99,431 | 98,544 | 98,241 |
| 3 | 99,310 | 99,993 | 99,950 | 99,439 | 98,991 |
| 4 | 98,127 | 99,008 | 99,127 | 98,329 | 98,043 |
| 5 | 98,189 | 99,060 | 99,321 | 98,149 | 97,892 |
| 6 | 98,315 | 99,041 | 99,116 | 98,540 | 98,179 |
| Promedio | 98,517 | 99,302 | 99,382 | 98,596 | 98,263 |
| Desv. Estándar | 0,439 | 0,376 | 0,305 | 0,445 | 0,381 |
| Coef. Variación | 0,446 | 0,378 | 0,307 | 0,451 | 0,387 |

Tabla A1-2: Resultados 10 cápsulas en 500 mL (Método 2)

| 10 CÁPSULAS EN 500 mL – MÉTODO 2 | | | | | |
|----------------------------------|--------------------|----------|----------|---------|---------|
| Muestra | PHE | APAP 270 | APAP 300 | DOX | DEX |
| 1 | 100,140 | 97,159 | 98,787 | 99,899 | 102,251 |
| 2 | ERROR DE INYECCIÓN | | | | |
| 3 | 97,722 | 94,952 | 96,326 | 97,825 | 99,918 |
| 4 | 100,213 | 97,794 | 99,175 | 100,577 | 102,954 |
| 5 | 99,920 | 97,449 | 99,193 | 100,420 | 102,043 |
| 6 | 100,252 | 97,715 | 99,282 | 100,468 | 102,605 |
| Promedio | 99,649 | 97,014 | 98,553 | 99,838 | 101,954 |
| Desv. Estándar | 1,085 | 1,179 | 1,259 | 1,155 | 1,190 |
| Coef. Variación | 1,089 | 1,215 | 1,278 | 1,157 | 1,167 |

Tabla A1-3: Resultados 10 cápsulas en 250 mL (Método 2)

| 10 CÁPSULAS EN 250 mL – MÉTODO 2 | | | | | |
|----------------------------------|--------|----------|----------|--------|---------|
| Muestra | PHE | APAP 270 | APAP 300 | DOX | DEX |
| 1 | 95,632 | 77,263 | 91,138 | 96,754 | 99,467 |
| 2 | 94,999 | 76,648 | 90,526 | 95,355 | 98,351 |
| 3 | 97,928 | 77,435 | 92,918 | 98,079 | 101,329 |
| 4 | 98,052 | 77,122 | 91,908 | 97,397 | 100,259 |
| 5 | 96,599 | 77,243 | 91,948 | 97,051 | 99,331 |
| 6 | 98,957 | 78,053 | 93,857 | 99,141 | 101,857 |
| Promedio | 97,028 | 77,294 | 92,049 | 97,296 | 100,099 |
| Desv. Estándar | 1,538 | 0,457 | 1,200 | 1,277 | 1,317 |
| Coef. Variación | 1,585 | 0,592 | 1,304 | 1,312 | 1,316 |

Tabla A1-4: Comparación de los métodos 1 y 2 (500 mL)

| Métodos 1 y 2 (500 mL) | PHE | APAP 270 | APAP 300 | DOX | DEX |
|------------------------|--------|----------|----------|--------|--------|
| Promedio | 99,032 | 98,262 | 99,005 | 99,160 | 99,941 |
| Desv. Estándar | 0,958 | 1,433 | 0,932 | 1,026 | 2,087 |
| Coef. Variación | 0,967 | 1,459 | 0,941 | 1,035 | 2,088 |

Tabla A1-5: Comparación de los métodos 1 (500 mL) y 2 (250 mL)

| Método 1 (500 mL) y método 2 (250 mL) | PHE | APAP 270 | APAP 300 | DOX | DEX |
|--|--------|----------|----------|--------|--------|
| Promedio | 97,772 | 88,298 | 95,716 | 97,946 | 99,181 |
| Desv. Estándar | 1,290 | 11,426 | 3,888 | 1,103 | 1,300 |
| Coef. Variación | 1,319 | 12,940 | 4,062 | 1,126 | 1,311 |

Anexo 2: Datos experimentales de la precisión de método (sección 5.5)

Tabla A2-1: Resultados 10 cápsulas en 1000 mL

| 10 CÁPSULAS EN 1000 mL | | | | | |
|------------------------|--------|----------|----------|--------|--------|
| Muestra | PHE | APAP 270 | APAP 300 | DOX | DEX |
| 1 | 99,390 | 99,912 | 99,843 | 98,746 | 98,303 |
| 2 | 99,495 | 99,391 | 99,413 | 98,165 | 97,956 |
| 3 | 97,888 | 98,232 | 98,158 | 97,317 | 96,503 |
| 4 | 97,572 | 98,025 | 97,765 | 96,866 | 96,091 |
| 5 | 98,634 | 99,247 | 99,159 | 98,058 | 97,064 |
| 6 | 98,713 | 99,253 | 99,344 | 98,154 | 97,636 |
| Promedio | 98,615 | 99,010 | 98,947 | 97,884 | 97,259 |
| Desv. Estándar | 0,775 | 0,728 | 0,805 | 0,676 | 0,859 |
| Coef. Variación | 0,786 | 0,735 | 0,814 | 0,690 | 0,883 |

Tabla A2-2: Resultados 5 cápsulas en 500 mL

| 5 CÁPSULAS EN 500 mL | | | | | |
|----------------------|---------|----------|----------|--------|--------|
| Muestra | PHE | APAP 270 | APAP 300 | DOX | DEX |
| 1 | 98,470 | 98,648 | 98,744 | 97,098 | 97,39 |
| 2 | 98,094 | 98,646 | 98,658 | 96,919 | 97,167 |
| 3 | 97,855 | 98,342 | 98,631 | 96,579 | 97,235 |
| 4 | 99,746 | 99,850 | 99,747 | 98,406 | 98,590 |
| 5 | 99,172 | 100,083 | 100,067 | 98,820 | 98,857 |
| 6 | 100,262 | 100,833 | 100,632 | 99,198 | 99,472 |
| Promedio | 98,933 | 99,400 | 99,413 | 97,837 | 98,119 |
| Desv. Estándar | 0,955 | 0,998 | 0,855 | 1,106 | 0,981 |
| Coef. Variación | 0,966 | 1,004 | 0,860 | 1,130 | 1,000 |

Tabla A2-3: Resultados 2 cápsulas en 200 mL

| 2 CÁPSULAS EN 200 mL | | | | | |
|----------------------|---------|----------|----------|--------|---------|
| Muestra | PHE | APAP 270 | APAP 300 | DOX | DEX |
| 1 | 98,449 | 99,233 | 99,413 | 97,317 | 97,254 |
| 2 | 100,136 | 100,215 | 100,091 | 98,410 | 98,447 |
| 3 | 99,825 | 100,139 | 100,033 | 98,738 | 98,689 |
| 4 | 100,270 | 100,914 | 100,692 | 99,447 | 99,166 |
| 5 | 101,571 | 100,894 | 100,529 | 99,844 | 100,021 |
| 6 | 100,317 | 100,960 | 100,971 | 99,724 | 99,767 |
| Promedio | 100,095 | 100,393 | 100,288 | 98,913 | 98,891 |
| Desv. Estándar | 1,004 | 0,676 | 0,558 | 0,963 | 1,004 |
| Coef. Variación | 1,003 | 0,673 | 0,556 | 0,974 | 1,015 |

Tabla A2-4: Comparación de los métodos de 10 cápsulas en 1000 mL y 5 cápsulas en 500 mL

| 10 cápsulas en 1000 mL y 5 cápsulas en 500 mL | PHE | APAP 270 | APAP 300 | DOX | DEX |
|---|--------|----------|----------|--------|--------|
| Promedio | 98,774 | 99,205 | 99,180 | 97,861 | 97,689 |
| Desv. Estándar | 0,846 | 0,857 | 0,828 | 0,874 | 0,987 |
| Coef. Variación | 0,856 | 0,864 | 0,835 | 0,893 | 1,011 |

Tabla A2-5: Comparación de los métodos de 10 cápsulas en 1000 mL y 2 cápsulas en 500 mL

| 10 cápsulas en 1000 mL y 2 cápsulas en 500 mL | PHE | APAP 270 | APAP 300 | DOX | DEX |
|---|--------|----------|----------|--------|--------|
| Promedio | 99,355 | 99,701 | 99,618 | 98,399 | 98,075 |
| Desv. Estándar | 1,152 | 0,985 | 0,963 | 0,958 | 1,233 |
| Coef. Variación | 1,160 | 0,988 | 0,966 | 0,974 | 1,257 |

Anexo 3: Resultados del ensayo de comparación de filtros (sección 5.6)

Tabla A3-1: Resultados del ensayo sin filtrar las soluciones de muestras

| Sin filtro | PHE | APAP 270 | DOX | DEX |
|-----------------|-----------|-------------|-----------|-----------|
| 1 | 26394 | 3969749 | 79618 | 21448 |
| 2 | 26847 | 3963029 | 79496 | 21476 |
| 3 | 26911 | 3969984 | 79741 | 21533 |
| 4 | 26816 | 3956299 | 79527 | 21394 |
| 5 | 26926 | 3972984 | 79820 | 21482 |
| 6 | 26913 | 3972476 | 79785 | 21556 |
| Promedio | 26801,167 | 3967420,167 | 79664,500 | 21481,500 |
| Desv. Estándar | 204,088 | 6503,493 | 137,123 | 58,329 |
| Coef. Variación | 0,761 | 0,164 | 0,172 | 0,272 |

Tabla A3-2: Resultados del ensayo utilizando filtros Phenomenex®

| Phenomenex® | PHE | APAP 270 | DOX | DEX |
|-----------------|-----------|-------------|-----------|-----------|
| 1 | 26966 | 3989571 | 79158 | 21375 |
| 2 | 26893 | 3980481 | 78941 | 21334 |
| 3 | 26810 | 3963976 | 78671 | 21351 |
| 4 | 27789 | 4102599 | 81627 | 22215 |
| 5 | 26904 | 3980248 | 78934 | 21337 |
| 6 | 27068 | 4002948 | 79456 | 21570 |
| Promedio | 27071,667 | 4003303,833 | 79464,500 | 21530,333 |
| Desv. Estándar | 361,732 | 50293,894 | 1091,379 | 347,147 |
| Coef. Variación | 1,336 | 1,256 | 1,373 | 1,612 |

Tabla A3-3: Resultados del ensayo utilizando filtros Análisis Vínicos®

| Análisis Vínicos® | PHE | APAP 270 | DOX | DEX |
|-------------------|-----------|-------------|-----------|-----------|
| 1 | 26868 | 3962261 | 79255 | 21644 |
| 2 | 26917 | 3972913 | 79542 | 21776 |
| 3 | 26919 | 3972674 | 79446 | 21622 |
| 4 | 27117 | 3992766 | 79928 | 21861 |
| 5 | 26909 | 3974154 | 79532 | 21759 |
| 6 | 26901 | 3966338 | 79327 | 21585 |
| Promedio | 26938,500 | 3973517,667 | 79505,000 | 21707,833 |
| Desv. Estándar | 89,388 | 10490,384 | 236,090 | 107,009 |
| Coef. Variación | 0,332 | 0,264 | 0,297 | 0,493 |

Tabla A3-4: Comparación del filtro Phenomenex con la muestra sin filtrar

| Phenomenex | PHE | APAP 270 | DOX | DEX |
|-----------------|-----------|-------------|-----------|-----------|
| Promedio | 26936,417 | 3985362,000 | 79564,500 | 21505,917 |
| Desv. Estándar | 313,633 | 38989,240 | 748,912 | 238,694 |
| Coef. Variación | 1,164 | 0,978 | 0,941 | 1,110 |

Tabla A3-5: Comparación del filtro Análisis Vínicos® con la muestra sin filtrar

| Phenomenex | PHE | APAP 270 | DOX | DEX |
|-----------------|-----------|-------------|-----------|-----------|
| Promedio | 26869,833 | 3970468,917 | 79584,750 | 21594,667 |
| Desv. Estándar | 166,458 | 8909,935 | 202,041 | 143,953 |
| Coef. Variación | 0,619 | 0,224 | 0,254 | 0,667 |

Anexo 4: Resultados de los ensayos de estabilidad de la solución estándar (sección 5.7)

Tabla A4-1: Áreas absolutas de la preparación 1 (7 días)

| Inyección | Área absoluta ($\mu\text{V s}$) | | | | |
|-----------------|-----------------------------------|-----------|----------|----------|----------|
| | APAP 270 | APAP 300 | PHE | DOX | DEX |
| 1 | 4264087 | 535275 | 28679 | 85884 | 23235 |
| 2 | 4222463 | 529538 | 28329 | 85183 | 22911 |
| 3 | 4242163 | 532192 | 28530 | 85539 | 23141 |
| 4 | 4241208 | 531508 | 28540 | 85579 | 23086 |
| 5 | 4266128 | 533722 | 28731 | 86119 | 23182 |
| 6 | 4324149 | 541846 | 29058 | 87134 | 23532 |
| Promedio | 4260033,00 | 534013,50 | 28644,50 | 85906,33 | 23181,17 |
| Desv. Estándar | 35354,40 | 4304,65 | 246,26 | 680,91 | 204,76 |
| Coef. Variación | 0,83 | 0,81 | 0,86 | 0,79 | 0,88 |

Tabla A4-2: Áreas relativas a APAP a 300 nm de la preparación 1 (7 días)

| Inyección | Área relativa a APAP (300 nm) | | | | |
|-----------------|-------------------------------|----------|--------|--------|--------|
| | APAP 270 | APAP 300 | PHE | DOX | DEX |
| 1 | 7,9662 | 1,0000 | 0,0536 | 0,1604 | 0,0434 |
| 2 | 7,9739 | 1,0000 | 0,0535 | 0,1609 | 0,0433 |
| 3 | 7,9711 | 1,0000 | 0,0536 | 0,1607 | 0,0435 |
| 4 | 7,9796 | 1,0000 | 0,0537 | 0,1610 | 0,0434 |
| 5 | 7,9932 | 1,0000 | 0,0538 | 0,1614 | 0,0434 |
| 6 | 7,9804 | 1,0000 | 0,0536 | 0,1608 | 0,0434 |
| Promedio | 7,9774 | 1,0000 | 0,0536 | 0,1609 | 0,0434 |
| Desv. Estándar | 0,009 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Coef. Variación | 0,118 | 0,000 | 0,213 | 0,188 | 0,171 |

Tabla A4-3: Áreas absolutas de la preparación 1 (20 días)

| Inyección | Área absoluta ($\mu\text{V s}$) | | | | |
|-----------------|-----------------------------------|-----------|----------|----------|----------|
| | APAP 270 | APAP 300 | PHE | DOX | DEX |
| 1 | 3941736 | 494948 | 26327 | 78939 | 21504 |
| 2 | 3937442 | 494440 | 26259 | 78784 | 21315 |
| 3 | 3956951 | 496717 | 26455 | 79489 | 21579 |
| 4 | 3981529 | 500180 | 26601 | 79975 | 21860 |
| 5 | 3967846 | 498068 | 26538 | 79658 | 21715 |
| 6 | 3968320 | 498074 | 26553 | 79645 | 21782 |
| Promedio | 3958970,67 | 497071,17 | 26455,50 | 79415,00 | 21625,83 |
| Desv. Estándar | 16968,54 | 2155,02 | 136,09 | 459,51 | 200,41 |
| Coef. Variación | 0,43 | 0,43 | 0,51 | 0,58 | 0,93 |

Tabla A4-4: Áreas relativas a APAP a 300 nm de la preparación 1 (20 días)

| Inyección | Área relativa a APAP (300 nm) | | | | |
|-----------------|-------------------------------|----------|--------|--------|--------|
| | APAP 270 | APAP 300 | PHE | DOX | DEX |
| 1 | 7,9639 | 1,0000 | 0,0532 | 0,1595 | 0,0434 |
| 2 | 7,9634 | 1,0000 | 0,0531 | 0,1593 | 0,0431 |
| 3 | 7,9662 | 1,0000 | 0,0533 | 0,1600 | 0,0434 |
| 4 | 7,9602 | 1,0000 | 0,0532 | 0,1599 | 0,0437 |
| 5 | 7,9665 | 1,0000 | 0,0533 | 0,1599 | 0,0436 |
| 6 | 7,9673 | 1,0000 | 0,0533 | 0,1599 | 0,0437 |
| Promedio | 7,965 | 1,000 | 0,053 | 0,160 | 0,044 |
| Desv. Estándar | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Coef. Variación | 0,033 | 0,000 | 0,141 | 0,175 | 0,528 |

Tabla A4-5: Áreas absolutas de la preparación 1 (35 días)

| Inyección | Área absoluta ($\mu\text{V s}$) | | | | |
|-----------------|-----------------------------------|-----------|----------|----------|----------|
| | APAP 270 | APAP 300 | PHE | DOX | DEX |
| 1 | 4526522 | 567206 | 30252 | 92552 | 24204 |
| 2 | 4523876 | 567721 | 30263 | 92951 | 24296 |
| 3 | 4535623 | 567579 | 30251 | 93032 | 24310 |
| 4 | 4549958 | 570439 | 30718 | 93625 | 24454 |
| 5 | 4558446 | 570801 | 30736 | 93982 | 24573 |
| 6 | 4538413 | 568042 | 30538 | 93465 | 24356 |
| Promedio | 4538806,33 | 568631,33 | 30459,67 | 93267,83 | 24365,50 |
| Desv. Estándar | 13372,99 | 1567,81 | 234,34 | 518,63 | 130,36 |
| Coef. Variación | 0,29 | 0,28 | 0,77 | 0,56 | 0,54 |

Tabla A4-6: Áreas relativas a APAP a 300 nm de la preparación 1 (35 días)

| Inyección | Área relativa a APAP (300 nm) | | | | |
|-----------------|-------------------------------|----------|--------|--------|--------|
| | APAP 270 | APAP 300 | PHE | DOX | DEX |
| 1 | 7,9804 | 1,0000 | 0,0533 | 0,1632 | 0,0427 |
| 2 | 7,9685 | 1,0000 | 0,0533 | 0,1637 | 0,0428 |
| 3 | 7,9912 | 1,0000 | 0,0533 | 0,1639 | 0,0428 |
| 4 | 7,9762 | 1,0000 | 0,0538 | 0,1641 | 0,0429 |
| 5 | 7,9861 | 1,0000 | 0,0538 | 0,1646 | 0,0431 |
| 6 | 7,9896 | 1,0000 | 0,0538 | 0,1645 | 0,0429 |
| Promedio | 7,982 | 1,000 | 0,054 | 0,164 | 0,043 |
| Desv. Estándar | 0,009 | 0,000 | 0,000 | 0,001 | 0,000 |
| Coef. Variación | 0,109 | 0,000 | 0,521 | 0,333 | 0,288 |

Tabla A4-7: Comparación de las áreas absolutas de la preparación 1 a lo largo del estudio

| Preparación 1 | Área absoluta ($\mu\text{V s}$) | | | | |
|-----------------|-----------------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| | APAP 270 | APAP 300 | PHE | DOX | DEX |
| Promedio | 4252603,333 | 533238,667 | 28519,889 | 86196,389 | 23057,500 |
| Desv. Estándar | 244673,673 | 30191,678 | 1696,193 | 5846,965 | 1166,957 |
| Coef. Variación | 5,754 | 5,662 | 5,947 | 6,783 | 5,061 |

Tabla A4-8: Comparación de las áreas relativas a APAP a 300 nm de la preparación 1 a lo largo del estudio

| Preparación 1 | Área relativa a APAP (300 nm) | | | | |
|-----------------|-------------------------------|----------|-------|-------|-------|
| | APAP 270 | APAP 300 | PHE | DOX | DEX |
| Promedio | 7,975 | 1,000 | 0,053 | 0,162 | 0,043 |
| Desv. Estándar | 0,010 | 0,000 | 0,000 | 0,002 | 0,000 |
| Coef. Variación | 0,130 | 0,000 | 0,471 | 1,171 | 0,768 |

Tabla A4-9: Áreas absolutas de la preparación 2 (0 días)

| Inyección | Área absoluta ($\mu\text{V s}$) | | | | |
|-----------------|-----------------------------------|-----------|----------|----------|----------|
| | APAP 270 | APAP 300 | PHE | DOX | DEX |
| 1 | 4371241 | 544811 | 29424 | 87695 | 24305 |
| 2 | 4375193 | 545111 | 29539 | 87601 | 24428 |
| 3 | 4354767 | 542232 | 29420 | 87172 | 24297 |
| 4 | 4347034 | 541727 | 29261 | 87314 | 24177 |
| 5 | 4368876 | 544099 | 29418 | 87559 | 24362 |
| 6 | 4387373 | 546034 | 29582 | 87850 | 24474 |
| Promedio | 4367414,00 | 544002,33 | 29440,67 | 87531,83 | 24340,50 |
| Desv. Estándar | 14497,92 | 1693,00 | 112,38 | 249,12 | 105,67 |
| Coef. Variación | 0,33 | 0,31 | 0,38 | 0,28 | 0,43 |

Tabla A4-10: Áreas relativas a APAP a 300 nm de la preparación 2 (0 días)

| Inyección | Área relativa a APAP (300 nm) | | | | |
|-----------------|-------------------------------|----------|--------|--------|--------|
| | APAP 270 | APAP 300 | PHE | DOX | DEX |
| 1 | 8,0234 | 1,0000 | 0,0540 | 0,1610 | 0,0446 |
| 2 | 8,0262 | 1,0000 | 0,0542 | 0,1607 | 0,0448 |
| 3 | 8,0312 | 1,0000 | 0,0543 | 0,1608 | 0,0448 |
| 4 | 8,0244 | 1,0000 | 0,0540 | 0,1612 | 0,0446 |
| 5 | 8,0296 | 1,0000 | 0,0541 | 0,1609 | 0,0448 |
| 6 | 8,0350 | 1,0000 | 0,0542 | 0,1609 | 0,0448 |
| Promedio | 8,03 | 1,00 | 0,0541 | 0,161 | 0,0447 |
| Desv. Estándar | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Coef. Variación | 0,06 | 0,00 | 0,19 | 0,10 | 0,22 |

Tabla A4-11: Áreas absolutas de la preparación 2 (7 días)

| Inyección | Área absoluta ($\mu\text{V s}$) | | | | |
|-----------------|-----------------------------------|-----------|----------|----------|----------|
| | APAP 270 | APAP 300 | PHE | DOX | DEX |
| 1 | 4548958 | 569434 | 30336 | 90079 | 23343 |
| 2 | 4545076 | 569148 | 30275 | 89816 | 23233 |
| 3 | 4531169 | 567213 | 30329 | 89895 | 23082 |
| 4 | 4537367 | 566357 | 30236 | 89924 | 23176 |
| 5 | 4542099 | 568701 | 30281 | 90085 | 23529 |
| 6 | 4540565 | 569259 | 30204 | 89822 | 23224 |
| Promedio | 4540872,33 | 568352,00 | 30276,83 | 89936,83 | 23264,57 |
| Desv. Estándar | 6182,07 | 1266,98 | 51,41 | 119,89 | 154,89 |
| Coef. Variación | 0,14 | 0,22 | 0,17 | 0,13 | 0,67 |

Tabla A4-12: Áreas relativas a APAP a 300 nm de la preparación 2 (7 días)

| Inyección | Área relativa a APAP (300 nm) | | | | |
|-----------------|-------------------------------|----------|--------|--------|--------|
| | APAP 270 | APAP 300 | PHE | DOX | DEX |
| 1 | 7,9886 | 1,0000 | 0,0533 | 0,1582 | 0,0410 |
| 2 | 7,9858 | 1,0000 | 0,0532 | 0,1578 | 0,0408 |
| 3 | 7,9885 | 1,0000 | 0,0535 | 0,1585 | 0,0407 |
| 4 | 8,0115 | 1,0000 | 0,0534 | 0,1588 | 0,0409 |
| 5 | 7,9868 | 1,0000 | 0,0532 | 0,1584 | 0,0414 |
| 6 | 7,9763 | 1,0000 | 0,0531 | 0,1578 | 0,0408 |
| Promedio | 7,99 | 1,00 | 0,0533 | 0,158 | 0,0409 |
| Desv. Estándar | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Coef. Variación | 0,15 | 0,00 | 0,27 | 0,25 | 0,58 |

Tabla A4-13: Áreas absolutas de la preparación 2 (17 días)

| Inyección | Área absoluta ($\mu\text{V s}$) | | | | |
|-----------------|-----------------------------------|-----------|----------|----------|----------|
| | APAP 270 | APAP 300 | PHE | DOX | DEX |
| 1 | 4518656 | 569089 | 30186 | 89385 | 24226 |
| 2 | 4512072 | 566371 | 30063 | 89468 | 24261 |
| 3 | 4530692 | 569108 | 30157 | 89921 | 24450 |
| 4 | 4526855 | 568455 | 30225 | 89833 | 24478 |
| 5 | 4551053 | 571960 | 30334 | 90346 | 24551 |
| 6 | 4550644 | 571831 | 30287 | 90456 | 24545 |
| Promedio | 4531662,00 | 569469,00 | 30208,67 | 89901,50 | 24418,50 |
| Desv. Estándar | 16206,79 | 2130,01 | 96,45 | 439,28 | 141,39 |
| Coef. Variación | 0,36 | 0,37 | 0,32 | 0,49 | 0,58 |

Tabla A4-14: Áreas relativas a APAP a 300 nm de la preparación 2 (17 días)

| Inyección | Área relativa a APAP (300 nm) | | | | |
|-----------------|-------------------------------|----------|--------|--------|--------|
| | APAP 270 | APAP 300 | PHE | DOX | DEX |
| 1 | 7,9402 | 1,0000 | 0,0530 | 0,1571 | 0,0426 |
| 2 | 7,9666 | 1,0000 | 0,0531 | 0,1580 | 0,0428 |
| 3 | 7,9610 | 1,0000 | 0,0530 | 0,1580 | 0,0430 |
| 4 | 7,9634 | 1,0000 | 0,0532 | 0,1580 | 0,0431 |
| 5 | 7,9569 | 1,0000 | 0,0530 | 0,1580 | 0,0429 |
| 6 | 7,9580 | 1,0000 | 0,0530 | 0,1582 | 0,0429 |
| Promedio | 7,96 | 1,00 | 0,0530 | 0,158 | 0,0429 |
| Desv. Estándar | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Coef. Variación | 0,12 | 0,00 | 0,14 | 0,25 | 0,39 |

Tabla A4-15: Áreas absolutas de la preparación 2 (28 días)

| Inyección | Área absoluta ($\mu\text{V s}$) | | | | |
|-----------------|-----------------------------------|-----------|----------|----------|----------|
| | APAP 270 | APAP 300 | PHE | DOX | DEX |
| 1 | 4352887 | 546137 | 29128 | 82255 | 23171 |
| 2 | 4338180 | 544282 | 29022 | 85029 | 23162 |
| 3 | 4352126 | 545036 | 29145 | 85323 | 23096 |
| 4 | 4350451 | 545069 | 29179 | 85376 | 23144 |
| 5 | 4348938 | 546638 | 29079 | 85110 | 23207 |
| 6 | 4357603 | 546203 | 29174 | 85128 | 23144 |
| Promedio | 4350030,83 | 545560,83 | 29121,17 | 84703,50 | 23154,00 |
| Desv. Estándar | 6506,89 | 900,82 | 60,60 | 1206,86 | 36,68 |
| Coef. Variación | 0,15 | 0,17 | 0,21 | 1,42 | 0,16 |

Tabla A4-16: Áreas relativas a APAP a 300 nm de la preparación 2 (28 días)

| Inyección | Área relativa a APAP (300 nm) | | | | |
|-----------------|-------------------------------|----------|---------|--------|--------|
| | APAP 270 | APAP 300 | PHE | DOX | DEX |
| 1 | 7,9703 | 1,0000 | 0,0533 | 0,1506 | 0,0424 |
| 2 | 7,9705 | 1,0000 | 0,0533 | 0,1562 | 0,0426 |
| 3 | 7,9850 | 1,0000 | 0,0535 | 0,1565 | 0,0424 |
| 4 | 7,9815 | 1,0000 | 0,0535 | 0,1566 | 0,0425 |
| 5 | 7,9558 | 1,0000 | 0,0532 | 0,1557 | 0,0425 |
| 6 | 7,9780 | 1,0000 | 0,0534 | 0,1559 | 0,0424 |
| Promedio | 7,97 | 1,00 | 0,05338 | 0,155 | 0,0424 |
| Desv. Estándar | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Coef. Variación | 0,13 | 0,00 | 0,23 | 1,49 | 0,16 |

Tabla A4-17: Comparación de las áreas absolutas de la preparación 2 a lo largo del estudio

| Preparación 2 | Área absoluta ($\mu\text{V s}$) | | | | |
|-----------------|-----------------------------------|-------------|------------|------------|------------|
| | APAP 270 | APAP 300 | PHE | DOX | DEX |
| Promedio | 4447494,7917 | 556846,0417 | 29761,8333 | 88018,4167 | 23794,3917 |
| Desv. Estándar | 91618,50969 | 12429,5529 | 511,27102 | 2277,8722 | 609,8407 |
| Coef. Variación | 2,060 | 2,232 | 1,718 | 2,588 | 2,563 |

Tabla A4-18: Comparación de las áreas relativas a APAP a 300 nm de la preparación 2 a lo largo del estudio

| Preparación 2 | Área relativa a APAP (300 nm) | | | | |
|-----------------|-------------------------------|----------|-------|-------|-------|
| | APAP 270 | APAP 300 | PHE | DOX | DEX |
| Promedio | 7,9873 | 1,000 | 0,053 | 0,159 | 0,043 |
| Desv. Estándar | 0,028 | 0,000 | 0,000 | 0,002 | 0,000 |
| Coef. Variación | 0,353 | 0,000 | 0,793 | 1,471 | 3,265 |

Anexo 5: Resultados de la comparación directa de las 3 soluciones estándar (sección 5.7)

Tabla A5-1: Áreas absolutas de la preparación 1

| Inyección | Área absoluta ($\mu\text{V s}$) | | | |
|-----------------|-----------------------------------|------------|----------|----------|
| | PHE | APAP | DOX | DEX |
| 1 | 28536 | 4298518 | 85330 | 22981 |
| 2 | 28405 | 4279998 | 85065 | 23042 |
| 3 | 28579 | 4309568 | 85657 | 23138 |
| 4 | 28873 | 4349025 | 86486 | 23431 |
| 5 | 28652 | 4310000 | 85868 | 23170 |
| 6 | 28231 | 4254290 | 84493 | 22877 |
| Promedio | 28546,00 | 4300233,17 | 85483,17 | 23106,50 |
| Desv. Estándar | 218,38 | 31894,68 | 687,42 | 191,26 |
| Coef. Variación | 0,77 | 0,74 | 0,80 | 0,83 |

Tabla A5-2: Factores de respuesta de la preparación 1

| Inyección | Factor de respuesta | | | |
|-----------------|---------------------|------------|------------|-----------|
| | PHE | APAP | DOX | DEX |
| 1 | 570150,99 | 1321505,2 | 1362722 | 230113,68 |
| 2 | 567533,6 | 1315811,5 | 1358490 | 230724,48 |
| 3 | 571010,13 | 1324902,3 | 1367944,2 | 231685,75 |
| 4 | 576884,27 | 1337032,7 | 1381183,4 | 234619,62 |
| 5 | 572468,68 | 1325035,1 | 1371313,9 | 232006,17 |
| 6 | 564057,07 | 1307908 | 1349355,1 | 229072,3 |
| Promedio | 570350,79 | 1322032,46 | 1365168,08 | 231370,33 |
| Desv. Estándar | 4363,35 | 9805,47 | 10978,14 | 1915,15 |
| Coef. Variación | 0,77 | 0,74 | 0,80 | 0,83 |

Tabla A7-3: Áreas absolutas de la preparación 2

| Inyección | Área absoluta ($\mu\text{V s}$) | | | |
|-----------------|-----------------------------------|------------|----------|----------|
| | PHE | APAP | DOX | DEX |
| 1 | 28821 | 4265366 | 85091 | 23157 |
| 2 | 28907 | 4271933 | 85172 | 23224 |
| 3 | 28814 | 4247247 | 84828 | 23067 |
| 4 | 28519 | 4221000 | 84190 | 22921 |
| 5 | 28804 | 4252608 | 84847 | 23118 |
| 6 | 28721 | 4248296 | 84677 | 23029 |
| Promedio | 28764,33 | 4251075,00 | 84800,83 | 23086,00 |
| Desv. Estándar | 133,92 | 17711,70 | 350,22 | 105,78 |
| Coef. Variación | 0,47 | 0,42 | 0,41 | 0,46 |

Tabla A5-4: Factores de respuesta de la preparación 2

| Inyección | Factor de respuesta | | | |
|-----------------|---------------------|------------|------------|-----------|
| | PHE | APAP | DOX | DEX |
| 1 | 567195,85 | 1313265,3 | 1354970,8 | 232980,68 |
| 2 | 568888,33 | 1315287,2 | 1356260,7 | 233654,77 |
| 3 | 567058,09 | 1307686,6 | 1350782,9 | 232075,2 |
| 4 | 561252,51 | 1299605,4 | 1340623,5 | 230606,31 |
| 5 | 566861,29 | 1309337,2 | 1351085,4 | 232588,31 |
| 6 | 565227,86 | 1308009,6 | 1348378,4 | 231692,89 |
| Promedio | 566080,66 | 1308865,25 | 1350350,28 | 232266,36 |
| Desv. Estándar | 2635,52 | 5453,26 | 5576,89 | 1064,21 |
| Coef. Variación | 0,47 | 0,42 | 0,41 | 0,46 |

Tabla A5-5: Áreas absolutas de la preparación 3

| Inyección | Área absoluta ($\mu\text{V s}$) | | | |
|-----------------|-----------------------------------|------------|----------|----------|
| | PHE | APAP | DOX | DEX |
| 1 | 28132 | 4268787 | 84929 | 22973 |
| 2 | 27986 | 4259405 | 84581 | 22823 |
| 3 | 28029 | 4268939 | 84850 | 22950 |
| 4 | 27913 | 4245468 | 84248 | 22809 |
| 5 | 27930 | 4248913 | 84287 | 22832 |
| 6 | 28028 | 4257002 | 84690 | 22869 |
| Promedio | 28003,00 | 4258085,67 | 84597,50 | 22876,00 |
| Desv. Estándar | 79,57 | 9783,37 | 283,21 | 69,52 |
| Coef. Variación | 0,28 | 0,23 | 0,33 | 0,30 |

Tabla A6-6: Factores de respuesta de la preparación 3

| Inyección | Factor de respuesta | | | |
|-----------------|---------------------|------------|------------|-----------|
| | PHE | APAP | DOX | DEX |
| 1 | 564105,77 | 1310175,9 | 1356707,6 | 231129,48 |
| 2 | 561178,17 | 1307296,4 | 1351148,5 | 229620,34 |
| 3 | 562040,41 | 1310222,5 | 1355445,6 | 230898,07 |
| 4 | 559714,36 | 1303018,8 | 1345828,9 | 229479,48 |
| 5 | 560055,25 | 1304076,2 | 1346451,9 | 229710,89 |
| 6 | 562020,35 | 1306558,8 | 1352889,7 | 230083,14 |
| Promedio | 561519,05 | 1306891,44 | 1351412,05 | 230153,57 |
| Desv. Estándar | 1595,62 | 3002,71 | 4524,16 | 699,48 |
| Coef. Variación | 0,28 | 0,23 | 0,33 | 0,30 |

Tabla A5-7: Comparación de los factores de respuesta de las tres preparaciones de estándares.

| Comparación global | Factor de respuesta | | | |
|--------------------|---------------------|------------|------------|-----------|
| | PHE | APAP | DOX | DEX |
| Promedio | 565983,50 | 1312596,38 | 1355643,47 | 231263,42 |
| Desv. Estándar | 4707,55 | 9354,31 | 9941,87 | 1532,83 |
| Coef. Variación | 0,83 | 0,71 | 0,73 | 0,66 |