



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**Validación de la determinación de ácido acetilsalicílico,
cafeína y paracetamol en tabletas de Excedrin mediante
cromatografía de líquidos**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN QUIMICA INDUSTRIAL**

P R E S E N T A:

ALEJANDRO JAVIER ALVARADO MARTINEZ

ASESOR:

DR. JOSÉ DE JESÚS OLMOS ESPEJEL

Co-ASESOR

DRA. GUADALUPE PEREZ CABALLERO

Cuautitlán Izcalli Estado de México, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Validación de la determinación de ácido acetilsalicílico, cafeína y paracetamol en tabletas de Excedrin mediante cromatografía de líquidos.

Que presenta el pasante: **Alejandro Javier Alvarado Martínez**
Con número de cuenta: **303017055** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Química Industrial**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Septiembre de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M.C. Juan Carlos Rueda Jackson	
VOCAL	M.C. Verónica Altamirano Lugo	
SECRETARIO	Dr. José de Jesús Olmos Espejel	
1er. SUPLENTE	M.C. Dalia Bonilla Martínez	
2do. SUPLENTE	M.C. Martha Angélica Villegas González	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis se realizó gracias al apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) a través del proyecto PAPIME 208418 y del proyecto PIAPI 1651 de la FES Cuautitlán.

Le doy gracias a mi madre por apoyarme en todo momento, por los valores que me inculcó y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida, sobre todo por ser un excelente ejemplo de vida.

En especial a mi esposa Nancy quien es una extraordinaria persona, porque sabe comprender cada cosa en mí, por permitirme estar solo cuando lo precisaba, y por hacerme reír cuando estaba abrumado con la tristeza. Tú eres lo más grande que me ha ocurrido

Todo mi agradecimiento al Dr. José de Jesús Olmos y la Dra. Guadalupe Pérez Caballero, por la dedicación y apoyo que me han brindado en el desarrollo de este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas y por la dirección y el rigor que ha facilitado a las mismas. Gracias por la confianza ofrecida desde que llegué a solicitar ayuda para la tesis.

A los sinodales Juan Carlos Rueda Jackson, Verónica Lugo Altamirano, Dalia Bonilla Martínez, Martha Angélica Villegas Gonzales, por su tiempo y dedicación, así como sus sabios consejos al revisar esta tesis.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1.- Introducción	2
2.- Objetivo general	3
3.- Antecedentes.....	4
3.1- Generalidades sobre validación.	4
3.2 Parámetros y criterios que debe cumplir un método cromatográfico de contenido.	5
3.4 Fundamento de la cromatografía de líquidos de alta resolución	9
3.5. Métodos cromatográficos reportados para los analitos en estudio.	11
4. Parte Experimental.....	13
4.1 Preparación de las Soluciones de referencia y las muestras	13
4.2 Tratamiento de la muestra problema.....	13
4.3 Separación Cromatografica.....	14
4.4 Diseño del plan experimental.	14
4.4.1 Especificidad del método.....	14
4.4.2 Intervalo, linealidad y exactitud del sistema	15
4.4.3 Intervalo, linealidad y exactitud del método.....	15
4.4.4 Precisión del sistema.....	16
4.4.5 Repetibilidad	16
4.4.6 Precisión Intermedia	17
4.4.7 Robustez.....	17
5. Resultados y Análisis.	18
5.1 Especificidad del método.	18
5.2 Rango, linealidad y exactitud del sistema	24
5.3 Rango, linealidad y exactitud del método.....	27
5.4 Adecuabilidad del Sistema.	30
5.5 Precisión del sistema.....	31
5.6 Repetibilidad del método.....	31
5.7 Precisión Intermedia	32
5.8 Robustez	34
5.8.1 Variación del pH de la fase móvil	34
5.8.2 Variación en la Velocidad de flujo.....	34
6. Conclusiones.....	36
7. Aportación/ comentarios adicionales	36

8. Referencias	37
9. Anexos	40
Anexo 1 Resumen de resultados de Linealidad del sistema	40
Anexo 2 Resumen de regresión lineal del sistema de cada Activo.....	42
Anexo 3 Resumen de resultados de Linealidad del Método	46
Anexo 4 Resumen de regresión lineal del Método de cada Activo	47
Anexo 5 Resumen de resultados de precisión intermedia.....	51
Anexo 6 Resumen de resultados de Robustez de cada Activo	52

RESUMEN

Se llevó a cabo la validación de la determinación de fármacos en medicamentos contra la migraña mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)" apeándose a las Guías de la Conferencia Internacional de Armonización ICH Q2 (R1) "VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES:TEXT AND METHODOLOGY". Los fármacos analizados fueron paracetamol, cafeína y ácido acetilsalicílico. Los resultados mostraron que la metodología analítica es específica para los activos, siendo con una buena linealidad presentando valores de coeficiente de determinación $r^2 > 0.99$ para los tres activos, en el intervalo de concentraciones de 14.7 $\mu\text{g/mL}$ a 44.1 $\mu\text{g/mL}$ para ácido acetilsalicílico y paracetamol, y de 3.8 $\mu\text{g/mL}$ a 11.5 $\mu\text{g/mL}$ para cafeína. Se obtuvo una exactitud adecuada en el mismo intervalo de concentraciones al obtener recobros entre 98.0% - 102.0% y buena reproducibilidad con $\%RSD \leq 2.0\%$ al evaluar a diferentes analistas, equipos y días diferentes. La metodología demostró buena robustez a los cambios de flujo en la fase móvil y a valores de pH entre 2.5 y 3.0.

1.- Introducción

Un método analítico es la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico (analito) de una muestra. El desempeño del método debe validarse y debe estimarse la incertidumbre del resultado a un nivel de confianza dado. La validación se define como el establecimiento de pruebas documentales que aportan un alto grado de seguridad de que un proceso planificado proporcionará conformidad con los resultados previstos especificados. Los estudios de validación son aplicables a las pruebas analíticas, los equipos, los sistemas y servicios del establecimiento (como aire, agua, vapor) y procesos (como el de fabricación, limpieza, esterilización, llenado estéril, liofilización, etc.). La incertidumbre deberá ser evaluada y establecida de una forma que sea ampliamente reconocida, consistente de forma interna y fácil de interpretar. La mayor parte de la información requerida para evaluar la incertidumbre se obtiene a partir de la validación del método analítico. (Guía de validación de métodos analíticos, 2002)

Con fines académicos se plantea una validación parcial de la metodología, debido a que, en las prácticas desarrolladas en la sección de química analítica, se emplean fármacos comerciales cuyas formulaciones no se conocen totalmente o no se pueden utilizar debido a que se necesita autorización del fabricante para poder replicarlas. De esta forma, se espera que la validación a desarrollarse en este trabajo permita evaluar las posibles variaciones que se puedan encontrar en el desarrollo de una sesión experimental de laboratorio, tales como: condiciones del sistema cromatográfico, variación en el producto que se analizará, estabilidad de las disoluciones patrón, entre otras.

La validación se llevó a cabo conforme a las Guías de la Conferencia Internacional de Armonización ICH Q2 (R1) "VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES:TEXT AND METHODOLOGY" la cual señala las pruebas que deben considerarse durante la validación de métodos analíticos.

2.- Objetivo general

- Validar la Metodología Analítica para la determinación de ácido acetilsalicílico, cafeína y paracetamol en tabletas de Excedrin mediante cromatografía de líquidos.

2.1- Objetivos particulares

- Validar el método analítico para la determinación de ácido acetilsalicílico, cafeína y paracetamol en tabletas mediante cromatografía de líquidos, siguiendo los parámetros marcados por la ICH Q2 (R1) "VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS"
- Determinar las condiciones críticas o más sensibles del método analítico para obtener resultados satisfactorios.

3.- Antecedentes.

3.1- Generalidades sobre validación.

“Un método analítico es la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico (analito) de una muestra” (Guía de validación de Métodos analíticos, 2002)

La validación es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada; esta actividad se justifica por los siguientes aspectos:

- Moral y Ética,
- Aseguramiento de calidad,
- Económica, y
- Regulatoria.

El objetivo de validar un método analítico debe entenderse claramente, ya que esto regirá las características de validación que se deben evaluar.

Entre las características típicas a evaluar en una validación se encuentran:

Exactitud: Concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia.

Precisión: Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea.

Repetibilidad: Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y métodos.

Precisión intermedia: Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas, en distintos días.

Especificidad: Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés.

Linealidad: Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por una transformación matemática, son proporcionales a la concentración del analito.

Intervalo: Concentraciones incluidas entre la concentración superior e inferior del analito (incluyendo éstas), para las cuales se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

3.2 Parámetros y criterios que debe cumplir un método cromatográfico de contenido.

La Tabla 1 presenta los parámetros de validación a evaluar, así como los criterios de aceptación, determinados conforme a las guías ICH Q2 (R1) "VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS". el objetivo de dicha validación es demostrar que cada analito de interés presenta resultados confiables, cuando se sigue cabalmente la metodología analítica a validar.

Tabla 1. Parámetros y Criterios de Aceptación para la su evaluación.

CUANTIFICACION AL 100%		
Parámetros	Aplica	Criterio de aceptación
Especificidad	<input checked="" type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no	<ul style="list-style-type: none"> Sin interferencia de los excipientes del producto, ni de los componentes de las soluciones reactivo (solventes y diluyentes) e impurezas del principio activo en el intervalo 50 – 150 %. (100 % = 30 µg/mL después de la preparación de la muestra).
intervalo	<input checked="" type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no	<ul style="list-style-type: none"> 50 – 150 %. (100% = 30 µg/mL después de la preparación de la muestra). Debe de cumplir los criterios para Linealidad y Exactitud. Investigar en los siguientes niveles de concentración para cada principio activo: 50, 75, 100, 125 y 150 % Determinar por triplicado.
Linealidad	<input checked="" type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no	<ul style="list-style-type: none"> $r^2 \geq 0.9900$ El intervalo de confianza del intercepto debe incluir el 0 (p 95 %); y/o el intercepto ≤ 3.0 % de la señal del estándar al nivel del 100 %. Suma de residuales (La Suma de Cuadrados de la Regresión debe ser mayor que la Suma de Cuadrados)
Exactitud	<input checked="" type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no	<ul style="list-style-type: none"> El recobro para todos los niveles de concentración debe ser: 97.0 - 103.0 % %RSD ≤ 3.0 % El promedio de recobro por nivel de concentración debe ser: 98.0 - 102.0 % %RSD ≤ 2.0 % Investigar en los siguientes niveles de concentración: 50, 75, 100, 125 y 150 %
Adecuabilidad del sistema	<input checked="" type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no	<ul style="list-style-type: none"> %RSD ≤ 2.0 % de la respuesta del estándar en cada prueba.
Precisión del sistema	<input checked="" type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no	<ul style="list-style-type: none"> %RSD ≤ 2.0 %
Repetibilidad	<input checked="" type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no	<ul style="list-style-type: none"> %RSD ≤ 2.0 %
Precisión intermedia	<input checked="" type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no	<ul style="list-style-type: none"> %RSD por Analista ≤ 2.0 % %RSD Global ≤ 2.0 % y DR Promedio ≤ 2.0 %
Robustez	<input checked="" type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no	<ul style="list-style-type: none"> Variación de los parámetros cromatográficos: DA ≤ 2.0 % Diferencia Absoluta (DA) de cada cambio probado con respecto al control.

Abreviaturas utilizadas durante la validación

%RSD =Desviación estándar relativa, r^2 = coeficiente de determinación, DA= diferencia absoluta.

La diferencia relativa (DR) se calculó con la ecuación 1:

$$DR [X] = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{|\bar{X}_1 + \bar{X}_2|} * 100\% \quad \text{Ec.1}$$

Donde:

DR [X] = Diferencia Relativa.

\bar{X}_1 = Promedio de los resultados del analista 1.

\bar{X}_2 = Promedio de los resultados del analista 2.

La diferencia relativa se evaluará con la ecuación 1:

La diferencia absoluta (DA) se calculó con la ecuación 2:

$$DA = |\bar{X}_1 - \bar{X}_2| \quad \text{Ec.2}$$

Donde:

DA= diferencia absoluta.

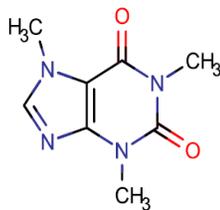
\bar{X}_1 = Valor promedio control.

\bar{X}_2 = Valor promedio de cada cambio.

3.3 Características físicoquímicas de los analitos.

La cafeína es un alcaloide de la familia metilxantinas, cuyos metabolitos incluyen los compuestos teofilina y teobromina, con estructura química similar y similares efectos (aunque de menor intensidad a las mismas dosis). En estado puro es un polvo blanco muy amargo y es fácilmente soluble en cloroformo; ligeramente soluble en agua; poco soluble en alcohol y en éter di etílico. (Robinson, 2000). En la tabla 2 se presentan algunas de las propiedades químicas de la cafeína.

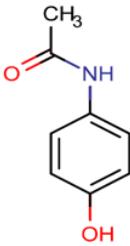
Tabla 2 Propiedades cafeína (Brittain & Prankerd, 2007)

Nombre IUPAC	1,3,7-Trimetil-2,3,6,7-tetrahidro-1 H-Purina-2,6-diona
	
Masa Molar	194.194 g/mol
Formula	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂
pKa	-1.16
LogP	-0.55
LogD	-0.55
Solubilidad Intrínseca (Cloroformo)	70.9 mg/mL
Categoría de solubilidad	Alta

El paracetamol está estructuralmente emparentado con la anilina y con el fenol, compartiendo características químicas de ambos. Desde el punto de vista ácido-base es un ácido muy débil. Forma cristales principalmente como prismas monoclinicos. Es escasamente soluble en agua fría, pero mayormente soluble en agua caliente, soluble en metanol, etanol, dimetilformamida, diclorometano, acetona y acetato de etilo, pero es prácticamente insoluble en éter de petróleo, pentano y benceno, Solubilidad: Una parte de paracetamol es soluble en 70 partes de agua a 25°C y soluble 1 en 20 partes de agua a 100°C. La literatura reporta solubilidades de 14.7 mg/mL a 20°C y 23.7 mg/mL a 37°C. El paracetamol no se ioniza sustancialmente a pH menor a 8, por lo tanto, su solubilidad varía muy poco con los valores de pH fisiológicos. (Rubinson J.F, 2000).

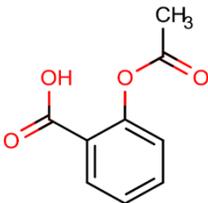
El ácido salicílico o salicilato, producto metabólico de la aspirina, es un ácido orgánico simple con un pKa de 3.4. La aspirina. Tanto la aspirina como el salicilato sódico son igualmente efectivos como antiinflamatorios, aunque la aspirina tiende a ser más eficaz como analgésico, fácilmente soluble en alcohol; soluble en cloroformo y éter di etílico; poco soluble en agua. (Rubinson J.F, 2000)

Tabla 3. Propiedades del Paracetamol (Acetaminofén) (Vollhardt, Peter, Neil, 2005)

Nombre IUPAC	N-(4-Hidroxifenil)etamida
	
Masa Molar	151.165 g/mol
Formula	C ₈ H ₉ NO ₂
pKa	9.46
LogP	0.91
LogD	0.91
Solubilidad Intrínseca (Agua)	11.1 mg/mL
Categoría de solubilidad	Alta

Vollhardt, K. Peter C.; Schore, Neil E. (2005). *Química orgánica*.

Tabla 4. Propiedades Ácido Acetilsalicílico (Vollhardt, Peter, Neil, 2005)

Nombre IUPAC	2-(acetiloxi)ácido benzoico
	
Masa Molar	180.159 g/mol
Formula	C ₉ H ₈ O ₄
pKa	3.41
LogP	1.24
LogD	1.23
Solubilidad Intrínseca (Etanol)	2.55 mg/mL
Categoría de solubilidad	Alta

Vollhardt, K. Peter C.; Schore, Neil E. (2005). *Química orgánica*.

3.4 Fundamento de la cromatografía de líquidos de alta resolución

La cromatografía en fase reversa permite separar moléculas en base a su polaridad. El principio de la cromatografía en fase reversa es semejante al de la cromatografía en capa fina. Sin embargo, aquí la fase estacionaria está conformada por partículas

de sílica químicamente modificadas con hidrocarburos saturados, insaturados o aromáticos de diferentes tipos. Esto convierte a la fase estacionaria en una matriz no polar. Por lo tanto, para este tipo de cromatografías se emplean mezclas de solventes polares, tales como agua, acetonitrilo, acetato de etilo, acetona y alcoholes alifáticos.

Las moléculas se retienen en la columna en virtud de las interacciones hidrofóbicas que establecen con la sílica modificada. Aunque, las interacciones hidrofóbicas son en general bastante débiles, son también a menudo muy numerosas y para eluir las moléculas es casi siempre necesario disminuir la polaridad del disolvente; para ello se puede substituir el agua de la fase móvil con un solvente orgánico cuya concentración se va aumentando gradualmente.

El material de relleno utilizado para la columna de fase reversa se hace a menudo de gel de sílice modificada con un grupo funcional; el más frecuentemente utilizado es el octadecilo. Este el grupo es una cadena recta de 18 carbonos, según la siguiente estructura:

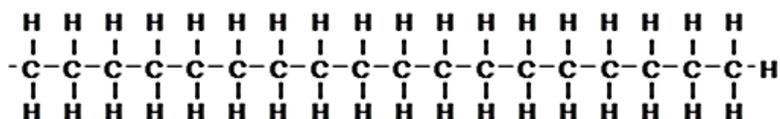


Figura 1. Cadena recta del octadecilo

Un gran número de la cadena de octadecilo de esta cadena de hidrocarburo se une en la superficie del gel de sílice; al observar la estructura pudiera parecer como una cadena muy larga, pero en comparación con el tamaño de gel de sílice, pero es en realidad pequeña. Por lo tanto, un número infinito de cadenas están ligadas en un gel de sílice, más aún, estas cadenas también se encuentran incluso en el interior de los poros del gel de sílice.

Los diferentes compuestos pueden ser “retenidos” por el grupo funcional, en diferente grado lo que define el tiempo de elución de cada componente. Se puede decir “una separación es un resultado de la diferente afinidad entre el gel y los componentes en la muestra”. Esta afinidad se denomina “partición” o “absorción”

por lo que este tipo de separación también se llama cromatografía de partición precisamente cuando se habla del modo de fase reversa la cual es parte de la cromatografía de partición / adsorción.

El gel de base de sílice modificado con grupo funcional octadecilo se llama sílice de octadecilo SOD (ODS siglas en inglés). También la columna rellena con gel ODS se llama columna ODS (o llamada columna C18). Entre las columnas a base de sílice disponibles en el mercado, alrededor del 80% de éstas, son las columnas de ODS.

Teóricamente, toda la superficie del gel de ODS se modifica con grupo funcional C18; sin embargo, habrá espacios restantes que no estén modificados. Estos espacios se denominan “silanol residual” y la presencia de silanoles residuales puede influir en la separación. A menudo para desactivar el residuo de silanol en los geles se aplica un tapado de extremos (end-capping). Casi todas las columnas de ODS hoy en día son desactivadas <<end-capped>>.

3.5. Métodos cromatográficos reportados para los analitos en estudio.

En la Tabla No. 5 se observa que en la mayoría de los métodos analíticos consultados utilizan una columna L1 (C18) debido a que los analitos de interés se retienen mejor en dicha columna que en una C8, para así obtener tiempos de retención y resolución adecuados para el objetivo del método analítico.

Tabla No. 5 se presentan algunos métodos cromatográficos para la cuantificación de los principios activos de interés

REFERENCIA Autor, año	Producto analizado (jarabe, tableta, cápsula, sangre, orina, etc.)	Activo	Temperatura análisis	Columna Cromatografica	Tipo de elución y velocidad de flujo mL/min				Composición de la fase móvil	longitud onda (λ)(nm)	volumen Inyección (μL)
Arroyo, 2016	Tabletas	Cafeína y paracetamol	30 °C	Fenil 150x4.6 mm, 5 μm (Agilent)	gradiente				fosfato monobásico de potasio, se ajustó a pH=3.5	262	20
					min	% buffer	% ACN	Flujo (mL/min)			
					0.0	100	0	0.5			
					7.0	100	0	0.5			
					22.0	80	20	1.0			
					35.0	80	20	1.0			
40.0	100	0	0.5								
FEUM 10ª Edición Pág. 1422	Tabletas, efervescentes	Ácido Acetilsalicílico	25 °C	C18 30x4.0 mm	Isocrático 1.0 mL/min				solución de pentanosulfonato de sodio 0.01M a pH 3.4	280	10
Noralba Sierra M. 1997	Gotas orales	cafeína	25 °C	C18 25x4.0 mm	Isocrático 1.0 mL/min				Metanol: Cloruro de Amonio 0.25M: Buffer acetato de amonio 0.2 M pH=5.0(59:40:1)	273	10
Phazna Devi 2013	Tabletas	Paracetamol	25 °C	C18 25x4.0 mm 5 μm	Isocrático 1.0 mL/min				Acetonitrilo: Agua pH=3.5 (25:75)	207	20
J.T. Franeta 2002	Tabletas	Paracetamol cafeína y Acido acetilsalicílico	25 °C	C18 25x4.0 mm 5 μm	Isocrático 2.0 mL/min				Acetonitrilo: Agua pH=2.5 (25:75)	207	10

4. Parte Experimental.

4.1 Preparación de las Soluciones de referencia y las muestras

Se prepararon disoluciones stock a 1000 µg/mL para el paracetamol y el ácido acetilsalicílico y de 260 µg/mL para la cafeína. Estas disoluciones se prepararon utilizando acetonitrilo como disolvente. Se realizaron las diluciones necesarias para llegar a la concentración de trabajo de cada activo 40 µg/mL de paracetamol, 40 µg/mL de ácido acetilsalicílico y 10 µg/mL de cafeína, utilizando como diluyente final una mezcla de agua desionizada a pH=3.0 ajustada con con H₃PO₄ y metanol HPLC en una proporción (7:3 v/v).

4.2 Tratamiento de la muestra problema.

Se utilizaron tabletas comerciales con las características presentadas en la Tabla 6.

Tabla 6. Producto utilizado en la experimentación. Contenido por tableta.

Medicamento	Paracetamol (mg)	Cafeína (mg)	Ácido Acetilsalicílico (mg)	Peso Promedio Tabletas (mg)
Excedrin	250	65	250	680

Se trituraron 10 tabletas de Excedrin y se pesó el equivalente a 250 mg de paracetamol, 250 mg de ácido acetilsalicílico y 65 mg de cafeína. En un matraz volumétrico de 250 mL se agregaron 150 mL de diluyente (agua pH=3.0: MeOH (7:3)) y se colocaron en el baño de ultrasonidos por 5 minutos. Una vez transcurrido este tiempo fueron aforadas con diluyente agua pH=3.0: MeOH (7:3 v/v) y de esta disolución se tomó una alícuota de 2 mL y se transfirió a un matraz volumétrico de 50 mL. Se llevó al aforo con agua pH=3.0: MeOH (7:3 v/v). Las muestras se centrifugaron a 4,000 rpm durante 10 minutos. Un mililitro del sobrenadante se colocó en viales para automuestreador. Concentración aproximada de 40 µg/mL de Paracetamol, 40 µg/mL de ácido acetilsalicílico y 10 µg/mL de cafeína.

4.3 Separación Cromatografica.

Con base en la literatura revisada, se determinaron cada uno de los parámetros cromatográficos, obedeciendo a las premisas que implica ser un método analítico aplicado a una práctica de laboratorio, donde los alumnos empiezan a tener contacto con la cromatografía de líquidos. Por tanto, el método analítico debe ser reproducible, robusto y con un bajo costo en la experimentación.

En la tabla 7 se muestran las condiciones cromatográficas empleadas, las cuales se tomaron del manual de prácticas de la asignatura de Química Analítica Instrumental de la carrera de Farmacia (Castillo, et al., 2019).

Tabla 7. Condiciones cromatográficas empleadas

Analito	Fase móvil	Gradiente	Columna	Flujo	T (°C)	Volumen de inyección	Longitud de onda	
Paracetamol	Solución A: Metanol grado HPLC Solución B: Agua a pH=3.0 ajustada con H ₃ PO ₄ concentrado.	Tiempo (min)	Xbridge C18 150 x 4.6 mm 5 µm	1.2 mL/min	25 °C	20 µL	230	
Cafeína		%A %B					0 30 70	272
Acido Acetilsalicílico		7 100 0					11 30 70	230

4.4 Diseño del plan experimental.

4.4.1 Especificidad del método

Se prepararon las siguientes disoluciones para evaluar la especificidad de la metodología.

- Diluyente / Fase móvil
- Principio Activo, Ácido salicílico 100 %, equivalente a una concentración de 30 µg/mL.
- Principio Activo, Paracetamol al nivel del 100 %. (30 µg/mL)
- Principio Activo, Cafeína al nivel del 100 %. (8 µg/mL)

- Principio Activo, Ácido acetilsalicílico al nivel del 100 %. (30 µg/mL)
- Soluciones de Referencia preparados a la concentración de trabajo. (30 µg/mL Paracetamol, 30 µg/mL Acido Acetilsalicílico, 6 µg/mL Cafeína)
- Solución Problema, Pesar el equivalente al 100 % de cada activo (producto a la Concentración de trabajo)

Cada disolución se preparó por triplicado y se inyectó en el sistema cromatográfico.

4.4.2 Intervalo, linealidad y exactitud del sistema

En la Tabla 8 se indica la preparación de las soluciones para la linealidad del sistema.

Tabla 8. Preparación de las soluciones para la linealidad del sistema.

Nivel	Solución patrón Paracetamol (mL)	Solución patrón Cafeína (mL)	Solución patrón Acido Acetilsalicílico (mL)	Volumen final (mL)	Concentración Paracetamol (µg/mL)	Concentración Cafeína (µg/mL)	Concentración Acido Acetilsalicílico (µg/mL)
50%	1.0	1.0	1.0	50	20.0	5.0	20.0
75%	1.5	1.5	1.5	50	30.0	7.5	30.0
100%	2.0	2.0	2.0	50	40.0	10	40.0
125%	2.5	2.5	2.5	50	50.0	12.5	50.0
150%	3.0	3.0	3.0	50	60.0	15	60.0

Cada disolución se preparó por triplicado y se analizó con las condiciones cromatográficas óptimas.

4.4.3 Intervalo, linealidad y exactitud del método

Se pesaron y trituraron 10 tabletas del medicamento. Se pesó por triplicado la cantidad adecuada y se le dio el tratamiento mostrado en la Tabla 9.

Tabla 9. Preparación de las soluciones para la linealidad del método

Nivel	Cantidades pesadas	Volumen aforo 1 (mL)	Alícuota (mL)	Volumen aforo 2 (mL)	Concentración Paracetamol ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Cafeína ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Ácido Acetilsalicílico ($\mu\text{g/mL}$)
	mg Tableta						
50 %	50	25	0.1	5	14.7	3.8	14.7
75 %	75	25	0.1	5	22.1	5.7	22.1
100 %	100	25	0.1	5	29.4	7.6	29.4
125 %	125	25	0.1	5	36.8	9.6	36.8
150 %	150	25	0.1	5	44.1	11.5	44.1

Cada disolución se preparó por triplicado y se analizó con las condiciones cromatográficas óptimas.

4.4.4 Precisión del sistema

Se preparó un estándar con los principios activos al nivel del 100% que corresponde a una concentración de los analitos de 40 $\mu\text{g/mL}$ (paracetamol y ácido acetilsalicílico) y 10 $\mu\text{g/mL}$ (cafeína). La disolución se inyectó seis veces y se calculó la media y el coeficiente de variación porcentual (%RSD).

4.4.5 Repetibilidad

Se preparan 6 muestras problemas a la concentración de trabajo, que corresponde a una concentración de los analitos de 30 $\mu\text{g/mL}$ (paracetamol y ácido acetilsalicílico) y 8 $\mu\text{g/mL}$ (cafeína). Las muestras se inyectaron por sextuplicado y se calculó la media y el coeficiente de variación porcentual (%RSD).

4.4.6 Precisión Intermedia

Se preparan 6 soluciones problema a la concentración de trabajo, que corresponde a los niveles del 100 % de los analitos, 30 µg/mL (paracetamol y ácido acetilsalicílico) y 8 µg/mL (cafeína), realizadas por los dos analistas, sin previa calificación, en diferentes días y diferentes equipos. (Equipo No. 1 Varian Bomba 330, Automuestreador 410, Detector UV/VIS y Equipo No. 2 Agilent Modelo 1100 con bomba cuaternaria y detector de arreglo de diodos).

Se calculó el %RSD por analista así como la media global, %RSD global y la diferencia relativa (DR) Promedio

4.4.7 Robustez

Se evaluó la robustez del método considerando los factores de pH y el flujo de la fase móvil.

Se prepararon por triplicado disoluciones al 100 % que equivalen a una concentración de los analitos de 30 µg/mL de paracetamol y ácido acetil salicílico, y 8 µg/mL para cafeína

Para evaluar la influencia de los cambios en el sistema cromatográfico, se inyectaron las disoluciones, utilizando las siguientes condiciones en el sistema cromatográfico:

- pH de la fase móvil: 2.5, 3.0 y 3.5.
- Velocidad de flujo: 1.0, 1.2 y 1.4 mL/min.

Se calculó el recobro obtenido para cada condición y se evaluó si había diferencias significativas entre cada factor para determinar las condiciones que sean críticas para el análisis.

5. Resultados y Análisis.

5.1 Especificidad del método.

A continuación, se presentan los cromatogramas obtenidos con las condiciones indicadas en el apartado 4.4.1. La Figura 2 muestra el cromatograma de una disolución blanco-formada por el diluyente.

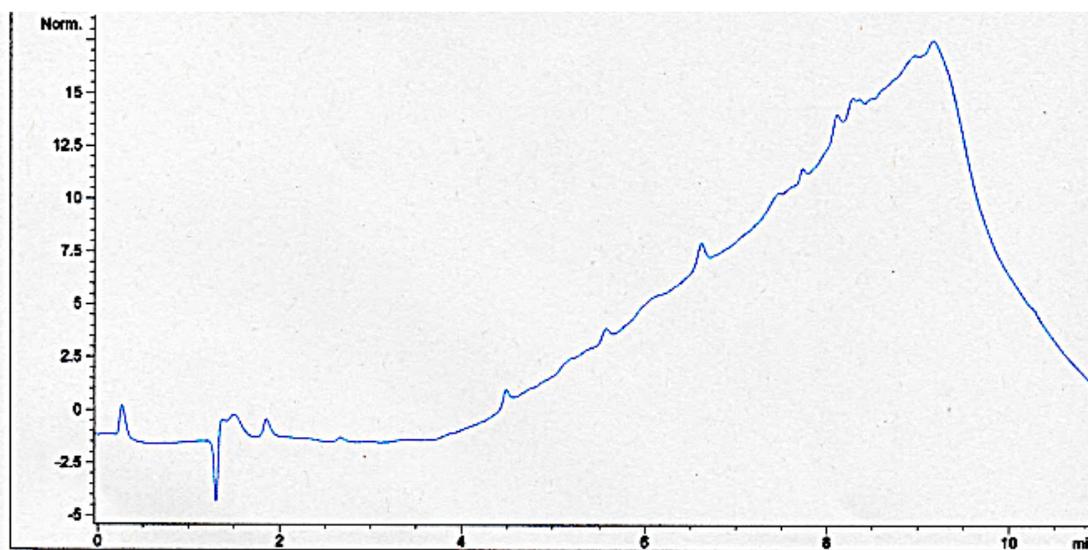


Figura 2. Cromatograma del blanco en las condiciones del analítico.

Se puede apreciar que prácticamente no existen señales en los tiempos de retención de cada activo paracetamol (1.9 min), cafeína (2.7 min) y ácido acetilsalicílico (4.4 min), que interfieran en la cuantificación de cada uno de ellos, por lo que podemos asegurar que el método es específico para cada uno de los analitos de interés.

La Figura 3 exhibe el cromatograma del ácido salicílico con su respectivo espectro UV-VIS (Figura 4), el cual no se cuantifica en este método, pero que es necesario identificar, ya que se puede presentar en el análisis cromatográfico, dado que es un producto de degradación del ácido acetilsalicílico.

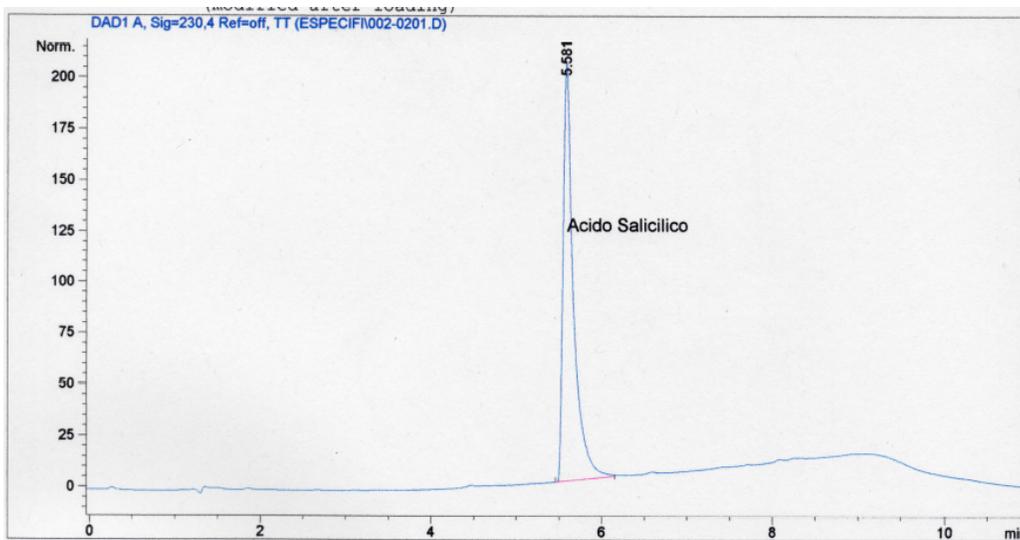


Figura 3. Cromatograma de una disolución estándar de ácido salicílico 30 µg/mL.
Longitud onda=230 nm.

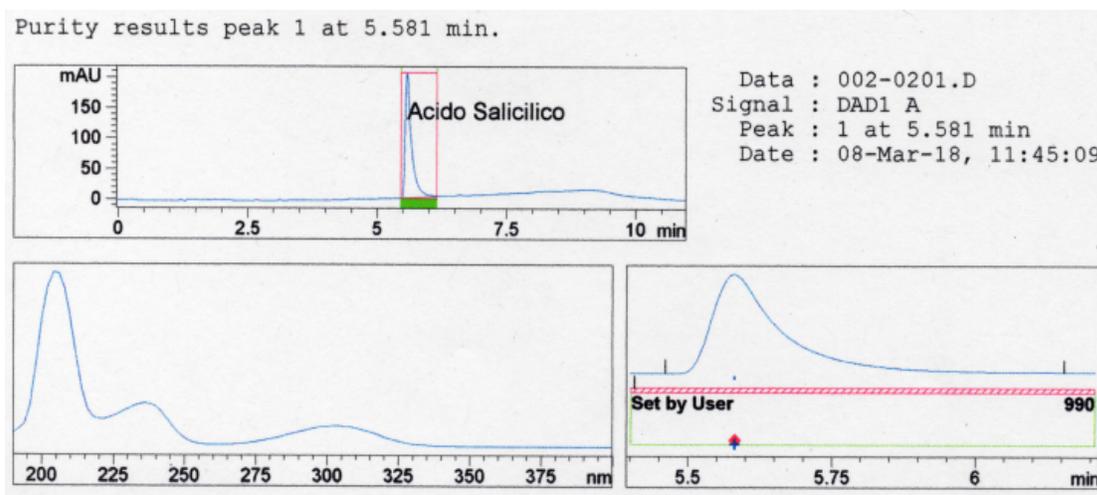


Figura 4. Espectro UV-Vis de Ácido Salicílico. Intervalo de 190 a 400 nm

Las Figuras 5 a 10, corresponden a los cromatogramas y espectros de absorción UV de los analitos paracetamol, cafeína y ácido acetil salicílico, respectivamente. En la Tabla 10 se resumen los tiempos de retención individuales y se puede apreciar que los analitos no interfieren entre sí para su cuantificación.

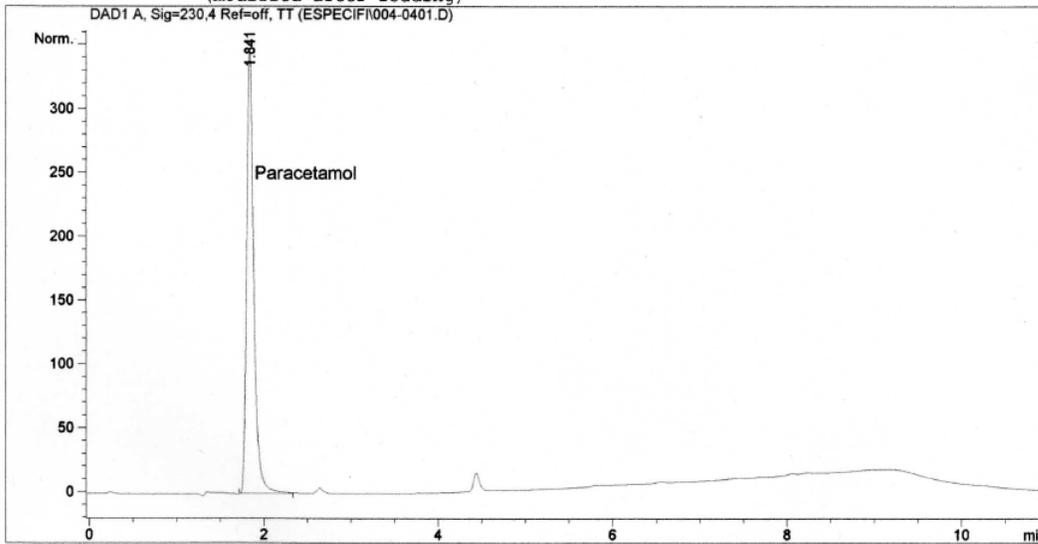
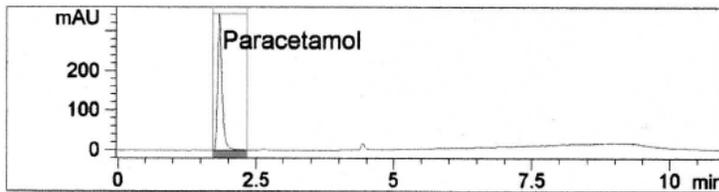


Figura 5. Cromatograma de una disolución estándar de paracetamol 30 µg/mL. Longitud de onda=230 nm.

Purity results peak 1 at 1.841 min.



Data : 004-0401.D
 Signal : DAD1 A
 Peak : 1 at 1.841 min.
 Date : 08-Mar-18, 12:10:16

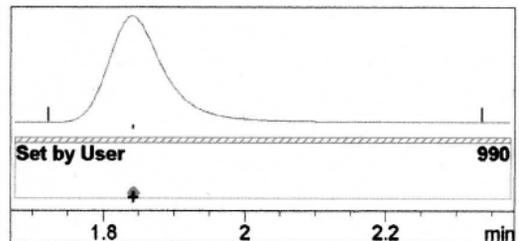
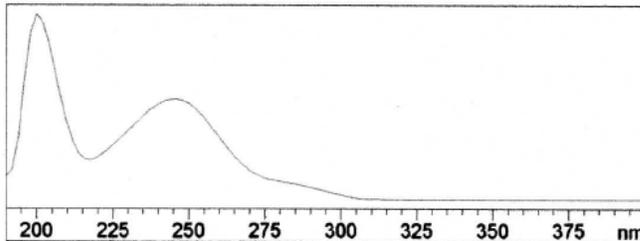


Figura 6. Espectro UV-Vis de paracetamol. Intervalo de 190 a 400 nm.

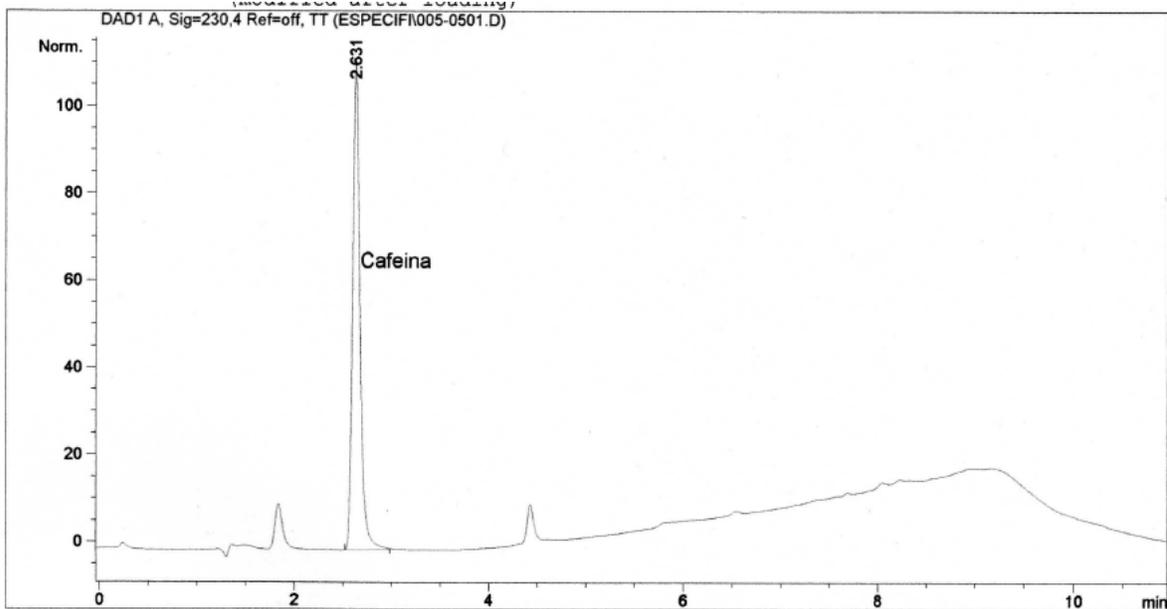


Figura 7. Cromatograma de una disolución estándar de cafeína 8 µg/mL.
Longitud de onda=272 nm.

Purity results peak 1 at 2.631 min.

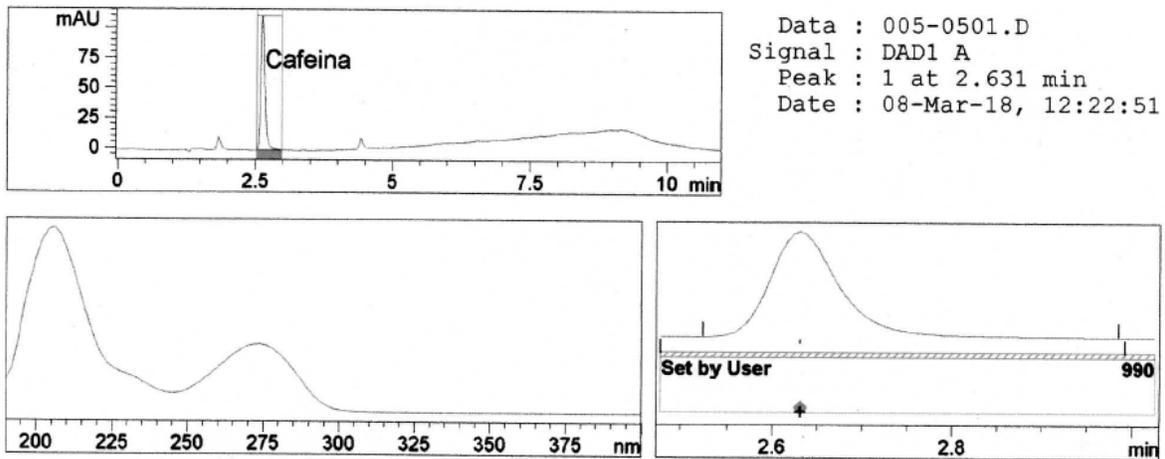


Figura 8. Espectro UV-Vis de cafeína medido en el intervalo de 190 a 400 nm

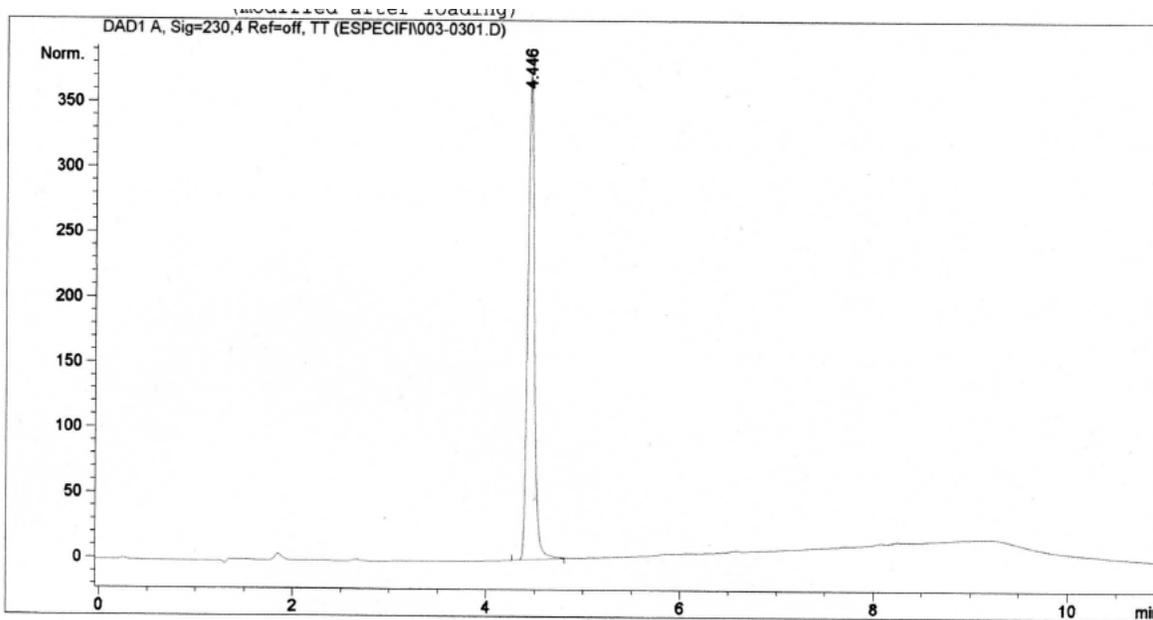


Figura 9. Cromatograma de una disolución estándar de ácido acetilsalicílico 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Longitud de onda=272 nm.

Purity results peak 1 at 4.446 min.

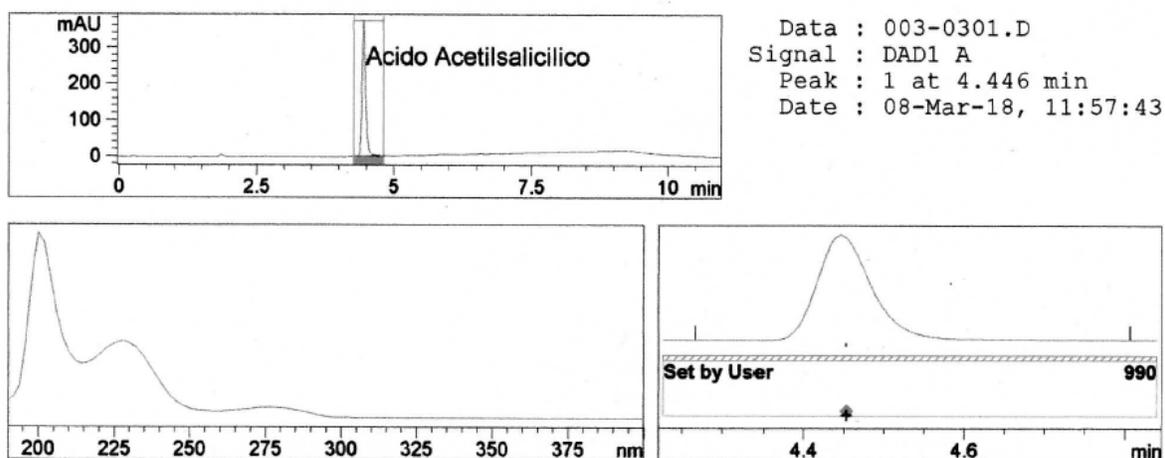


Figura 10. Espectro UV-Vis de ácido acetilsalicílico. Intervalo de 190 a 400 nm

En la Figura 11 se muestra un cromatograma de la mezcla estándar de los analitos y de una muestra problema.

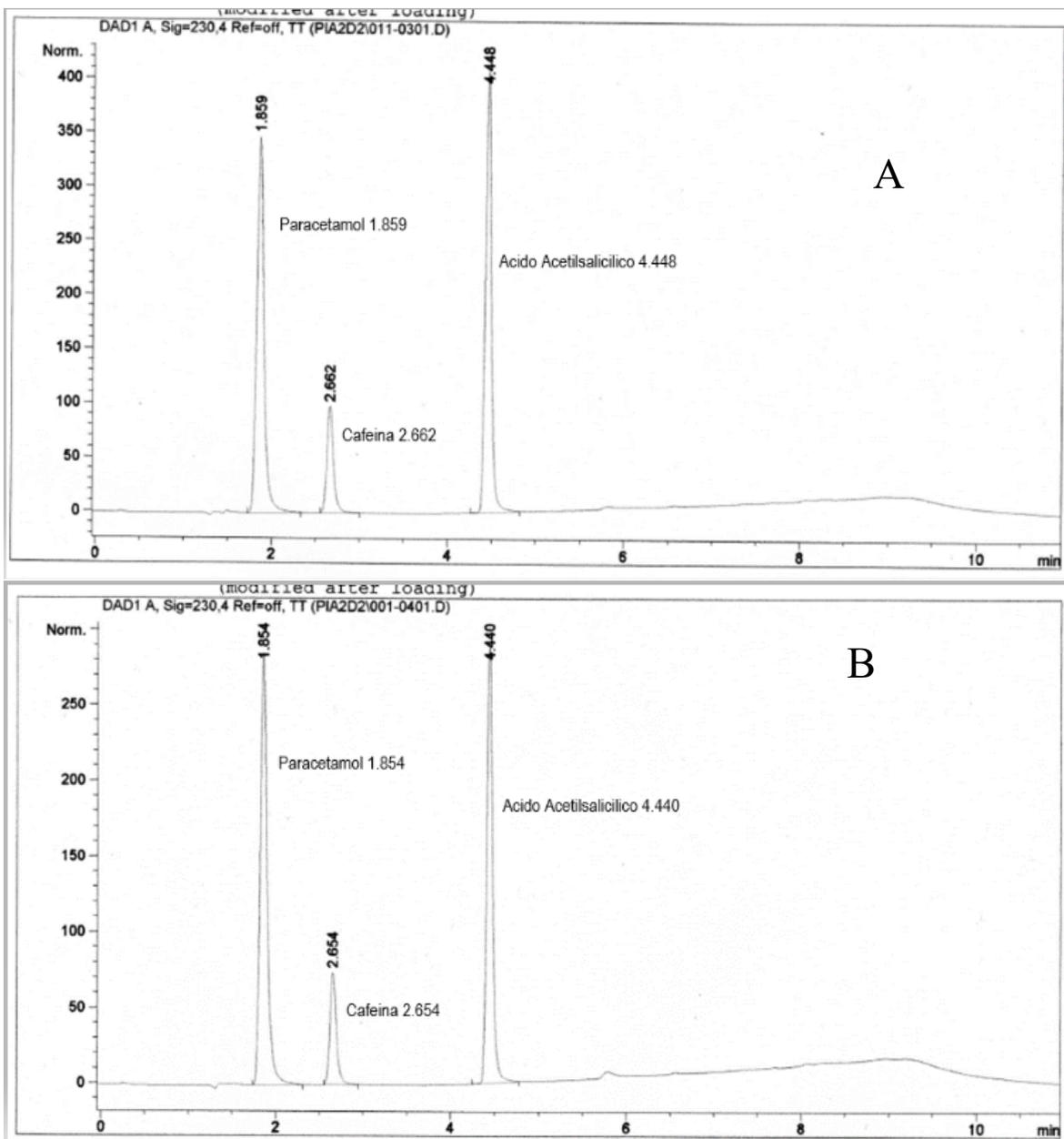


Figura 11. A) Cromatograma con los 3 activos en una disolución estándar de trabajo: cafeína, paracetamol y ácido acetil salicílico. **B)** Cromatograma de muestra problema con los tres analitos. Obtenidos conforme al método analítico.

Dado que los cromatogramas muestran evidencia de que no hay interferencia de los componentes de la formulación (placebo, diluyente y reactivos empleados en el análisis) con los principios activos, se puede concluir que el método analítico es específico.

En la tabla 10 se resume el orden de elución de los analitos con las condiciones cromatográficas óptimas.

Tabla 10. Tiempos de retención bajo condiciones de separación óptimas.

Compuestos	Tiempo de retención (min)
Paracetamol	1.9
Cafeína	2.7
Ácido acetil salicílico	4.4
Ácido salicílico	5.6

5.2 Intervalo, linealidad y exactitud del sistema

Cada activo cumple con los parámetros solicitados en el diseño experimental de la Tabla 1, los cuales son:

- $r^2 \geq 0.9900$
- El intervalo de confianza del intercepto debe incluir el 0 (p 95 %); y/o el intercepto ≤ 3.0 % de la señal del estándar al nivel del 100 %.
- Suma de residuales (La Suma de Cuadrados de la Regresión debe ser mayor que la Suma de Cuadrados Residual).
- Investigar en los siguientes niveles de concentración para cada principio activo: 50, 75, 100, 125 y 150 %
- Determinar por triplicado.

Para intervalo y linealidad, otro parámetro que debe cumplir y de gran importancia es que el valor de p es inferior al nivel de significación; en este caso $p \leq 0.05$ ($p=95$ %) nos indicaría que la hipótesis de partida sea falsa, es decir, que nuestro experimento no es lineal en el intervalo de concentración establecido.

Con base en los resultados mostrados en la Tabla 11, se puede afirmar que el método cumple con los requisitos de linealidad, dado que los valores de r^2 están por arriba de 0.99 y en todos los activos el intervalo de confianza de la ordenada incluye el cero. Otra forma de demostrar que el error sistemático es despreciable, es mediante el cálculo del porcentaje del intercepto contra la señal al 100 %, donde éste debe ser menor del 3 % de la respuesta de la solución estándar, el error típico

sea pequeño en comparación con los valores de las áreas obtenidas, y los valores de F crítico sea menor que los de F calculado.

Tabla 11. Resumen de la regresión lineal del sistema cromatográfico para cada uno de los activos.

		Analito					
		Paracetamol		Cafeína		Ácido Acetilsalicílico	
Ecuación de la recta	Ordenada	4158.8		1760.3		10150.4	
	IC ordenada 95%	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior
		-9741	18059	-2992	6512	-90	20391
	Pendiente	19760418		18727661		15068901	
	IC pendiente 95%	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior
19438689		20082147	18296644	19158677	14836138	15301664	
r ²		0.9993		0.9985		0.9993	
Error típico		8309		2862		6121	
F		17606		8811		19561	
F crítico		9.51E-22		8.52E-20		4.80E-22	
3% de la señal del estándar al 100%:		24174		5884		18878	

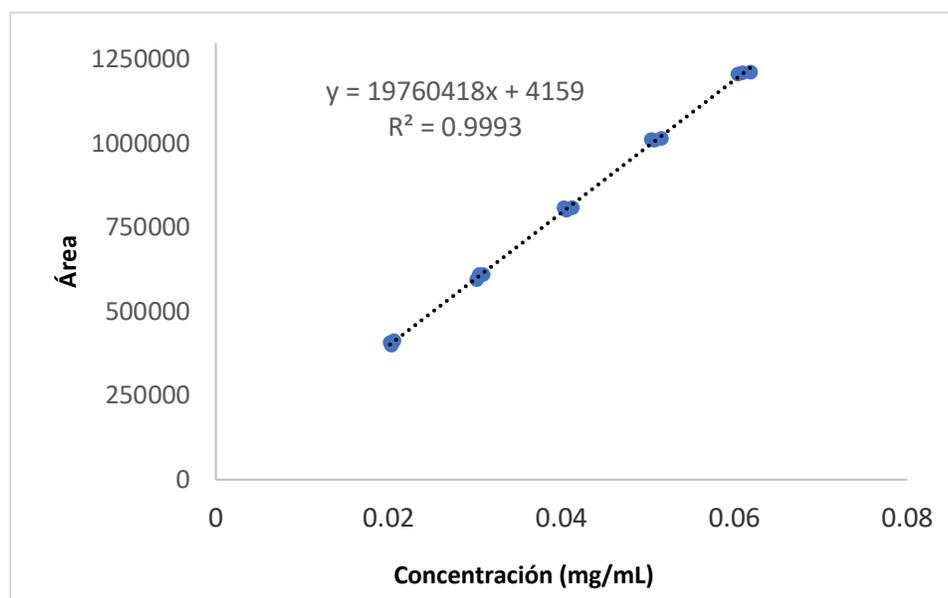


Figura 12. Gráfico de área en función de la concentración resultados linealidad del sistema paracetamol.

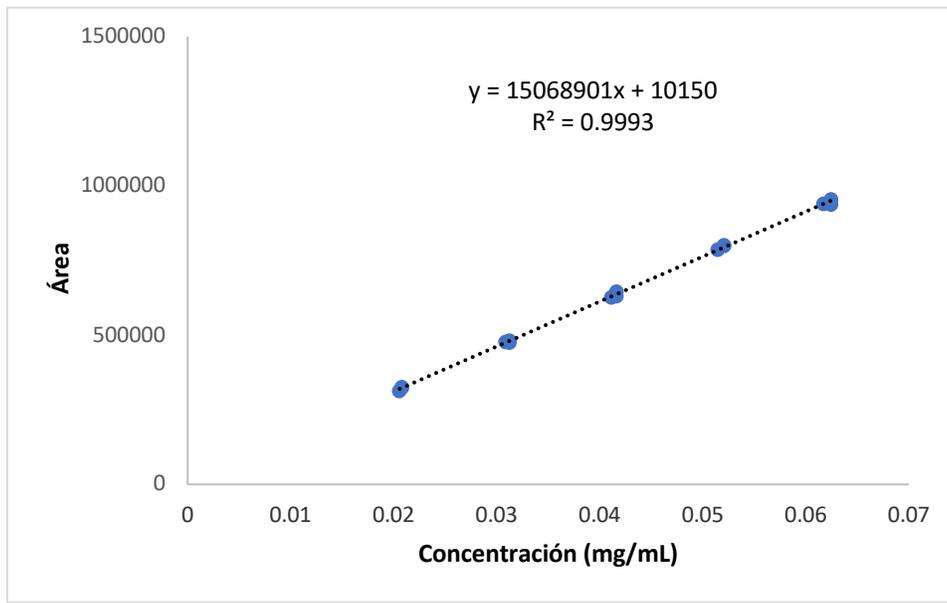


Figura 13. Gráfico de área en función de la concentración resultados linealidad del sistema ácido acetilsalicílico.

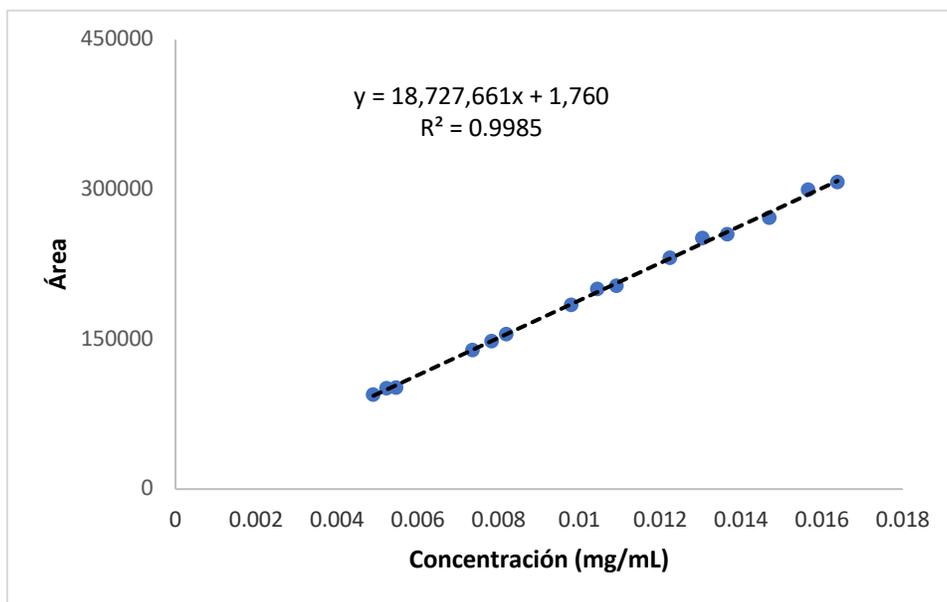


Figura 14. Grafico de área en función de la concentración resultados linealidad del sistema cafeína.

Con la ecuación de la recta de la linealidad del sistema y las áreas obtenidas experimentalmente, se calculan las concentraciones recuperadas y con ello el recobro.

5.3 Intervalo, linealidad y exactitud del método

Cada activo cumple con los parámetros solicitados en el diseño experimental de la Tabla 1, los cuales son:

- $r^2 \geq 0.9900$
- El intervalo de confianza del intercepto debe incluir el 0 (p 95%); y/o el intercepto ≤ 3.0 % de la señal del estándar al nivel del 100%.
- Suma de residuales (La Suma de Cuadrados de la Regresión debe ser mayor que la Suma de Cuadrados Residual).
- Investigar en los siguientes niveles de concentración para cada principio activo: 50, 75, 100, 125 y 150%
- Determinar por triplicado.

La diferencia entre la linealidad del método y la del sistema, es que, en la linealidad del método, además de probar el intervalo y la linealidad, se observa la interacción de los analitos con el placebo, para así asegurar que con el método analítico a validar se extrae el 100 % del activo dentro del intervalo establecido.

Los recobros obtenidos en la linealidad del sistema aseguran que la extracción del de los activos de interés en el producto problema será eficiente, (precisa y exacta), dando resultados confiables, si se siguen las indicaciones del tratamiento de la muestra descritos en esta validación. Con la ecuación de la recta de la linealidad del Método y las áreas obtenidas experimentalmente, se calculan las concentraciones recuperadas y con ello el recobro.

Tabla 12. Resumen de Regresión lineal del método de cada uno de los activos.

		Analito					
		Paracetamol		Cafeína		Ácido Acetilsalicílico	
Ecuación de la recta	Ordenada	6103.307879		4105.028960		9361.675156	
	IC ordenada 95%	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior
		-12071	24277	1350	6859	-5800	21173
	Pendiente	14944045		14441807		11454804	
	IC pendiente 95%	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior
14482380		15405709	14172675	14710937	11148334	11833521	
r^2		0.9973		0.9990		0.9977	
Error típico		10778		1634		7998	
F		4890		13439		5250	
F crítico		3.8865E-18		5.4991E-21		2.4512E-22	
3% de la señal del estándar al 100%:		24174		5884		18878	

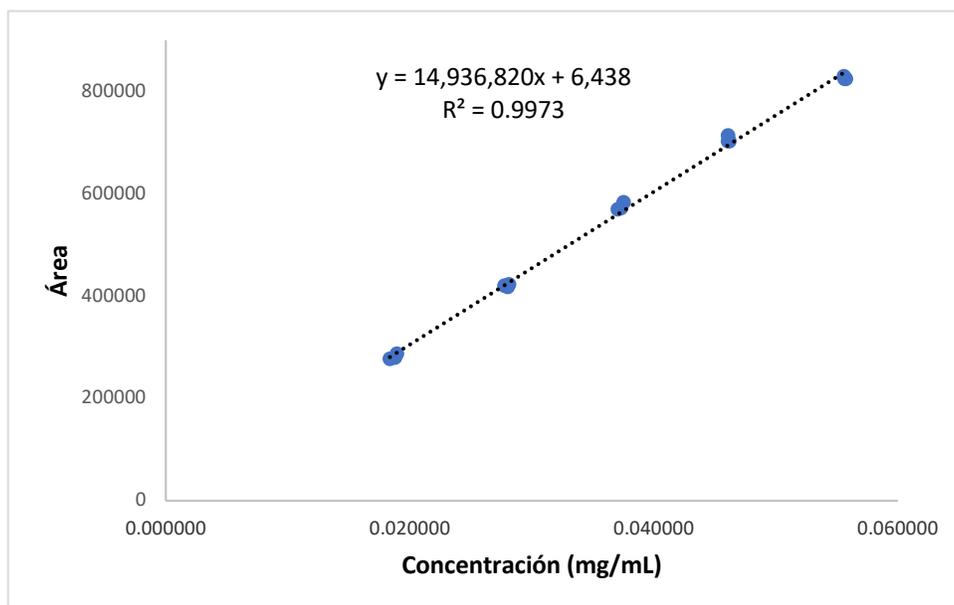


Figura 15. Gráfico de área en función de la concentración resultados linealidad del Método Paracetamol.

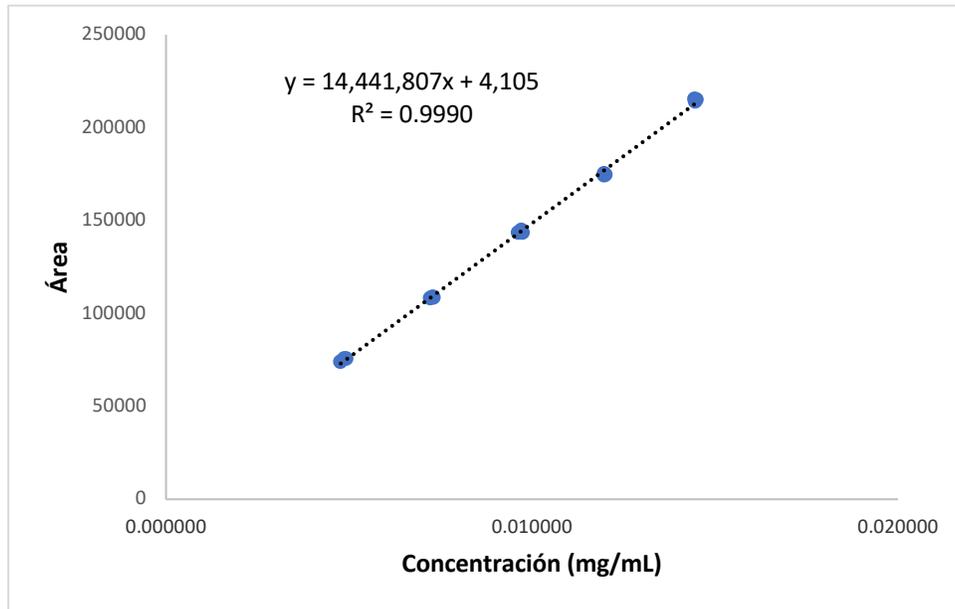


Figura 16. Gráfico de área en función de la concentración resultados linealidad del Método Cafeína.

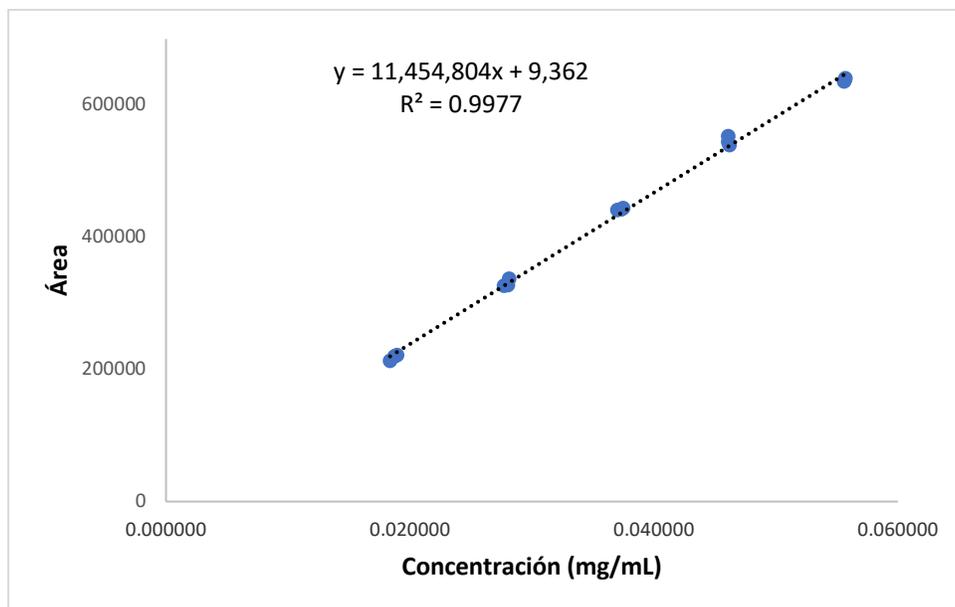


Figura 17. Grafico de área en función de la concentración resultados linealidad del Método Acido Acetilsalicílico.

5.4 Adecuabilidad del Sistema.

Con los datos obtenidos experimentalmente podemos definir criterios de Adecuabilidad del sistema que se deberán cumplir cada que se reproduzca la técnica analítica validada.

Tabla 13. Tabla de Resultados del Estándar a lo largo de la Validación

PRUEBA	Paracetamol		Cafeína		Ácido Acetilsalicílico	
	RSD	tr (min)	RSD	tr (min)	RSD	tr (min)
LIN SISTEMA	0.53	2.00	1.29	2.89	1.35	4.24
LIN METODO	1.59	1.96	0.52	2.85	0.70	4.28
ROBUSTEZ pH=2.5	1.29	1.99	1.59	2.89	1.21	4.35
PI A2D1	0.31	1.96	0.68	2.87	0.06	4.33
PI A1D2	1.22	1.96	0.34	3.03	0.30	4.63
ROB FL 1.0 mL/min	0.05	2.23	0.12	3.44	0.05	5.01
ROB COND NORMAL	0.32	1.94	0.27	2.99	0.85	4.55
ROB FL 1.4 mL/min	0.17	1.69	0.12	2.62	0.14	4.09
PI A2D2	0.18	1.86	0.44	2.66	0.04	4.45
Mínimo=	0.17	1.69	0.12	2.62	0.05	4.09
Máximo=	1.59	2.23	1.59	3.44	1.35	5.01

Tabla 14. Adecuabilidad del sistema

Criterio	Especificación
Platos teóricos	≥ 2000
%RSD	≤ 2.0
Tiempo de retención paracetamol	2.0 min \pm 0.5 min
Tiempo de retención cafeína	3.0 min \pm 0.5 min
Tiempo de retención ácido acetilsalicílico	4.5 min \pm 0.6 min

5.5 Precisión del sistema

En la Tabla 15 se muestran los resultados de la precisión del sistema evaluadas con las áreas obtenidas al inyectar en repetidas ocasiones una disolución de estándar de concentración 30 µg/mL (paracetamol y ácido acetilsalicílico) y 8 µg/mL (cafeína).

Todos los %RSD resultaron menores al 2 % lo cual implica que es sistema cromatográfico cumple con los requisitos de Adecuabilidad, para asegurar que el análisis es confiable, también, cabe mencionar que el %RSD para ácido acetilsalicílico es mayor; esto debido a que como ya se había mencionado el analito es inestable en solución y se degrada rápidamente en ácido salicílico.

Tabla 15. Tabla de Resultados de la prueba de precisión del sistema

	Paracetamol	Cafeína	Ácido Acetilsalicílico
	Área	Área	Área
Estándar 1	811443	195420	632329
Estándar 2	807718	194253	628216
Estándar 3	808931	194260	624713
Estándar 4	806608	194126	624623
Estándar 5	805021	194029	618113
Estándar 6	800864	198153	642757
Promedio=	806764	195040	628459
%RSD=	0.45	0.82	1.34

5.6 Repetibilidad del método

Todos los %RSD resultaron menores al 2 % lo cual implica que el método es exacto y preciso, por lo cual cuidando los parámetros mínimos para llevar a cabo un análisis experimental, se obtendrán resultados confiables.

Tabla 16. Tabla de resultados de Muestra para Repetibilidad

	Paracetamol	Cafeína	Ácido acetilsalicílico
Repetibilidad M1	103.0	99.1	101.3
Repetibilidad M2	101.4	100.5	101.2
Repetibilidad M3	101.7	100.3	101.8
Repetibilidad M4	100.9	97.6	101.5
Repetibilidad M5	101.5	99.3	102.8
Repetibilidad M6	98.8	100.3	101.9
Prom=	101.2	99.5	101.8
%RSD=	1.35	1.09	0.57

Todos los RSD son menores al 2 %

5.7 Precisión Intermedia

Se calculó el porcentaje recuperado de cada analito al realizar diferentes determinaciones con dos analistas en días y equipos diferentes, utilizando la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Activo} = \frac{\text{Area}_{Mta}}{\text{Area}_{std}} \times \frac{\text{Concentracion}_{std}}{\text{Concentracion}_{Mta}} \times 100$$

Tabla 17. Tabla Precisión Intermedia para Paracetamol

	Analista 1	Analista 2	Promedio (días)	%RSD (días)
Día 1	102.7	101.5	100.44	1.47
	101.2	97.8		
	101.5	101.6		
	100.7	100.1		
	101.3	98.8		
	98.6	99.5		
Día 2	101.5	97.7	100.12	1.77
	102.3	98.5		
	101.7	100.9		
	100.1	98.3		
	99.2	97.9		
	102.8	100.5		
Promedio Analistas	101.13	99.43		
%RSD Analistas	1.29	1.46		
Promedio _{global}	100.28			
%RSD _{Global}	1.6028			
DR	1.02			

Tabla 18. Tabla Precisión Intermedia para Cafeína

	Analista 1	Analista 2	Promedio (días)	%RSD (días)
Día 1	100.5	101.1	100.57	1.35
	101.9	101.8		
	101.7	99.0		
	99.0	99.3		
	100.6	98.2		
	101.6	102.1		
Día 2	99.9	97.7	99.99	1.74
	101.9	98.6		
	101.6	102.7		
	101.5	98.0		
	100.5	99.3		
	100.5	97.7		
Promedio Analistas	100.93	99.63		
% RSD Analistas	0.90	1.82		
Promedio _{Global}	100.28			
% RSD _{Global}	1.5510			
DR	1.01			

Tabla 19. Tabla Precisión Intermedia para Ácido Acetilsalicílico

	Analista 1	Analista 2	Promedio (días)	%RSD (días)
Día 1	100.4	98.0	99.73	1.29
	100.3	99.6		
	100.9	98.3		
	100.6	98.4		
	101.9	98.8		
	101.0	98.6		
Día 2	102.6	98.8	100.15	2.04
	99.5	98.1		
	101.8	98.7		
	102.7	97.8		
	102.2	98.6		
	102.7	98.3		
Promedio Analistas	101.38	98.50		
% RSD Analistas	1.06	0.48		
Promedio _{Global}	99.94			
% RSD _{Global}	1.6828			
DR	1.03			

5.8 Robustez

5.8.1 Variación del pH de la fase móvil

En la tabla 20 se muestran los resultados obtenidos al variar el pH de la fase móvil.

Tabla 20. Diferencia Absoluta entre la Condición Normal (pH=3.0) y pH=2.5

	Cambio en el pH de la Fase Móvil		
	Paracetamol	Cafeína	Ácido acetilsalicílico
Cond. Normal	100.3	100.6	98.6
pH=2.5	99.3	98.8	99.2
DA=	0.9	1.8	0.6

La diferencia absoluta fue menor a 2.0, lo cual implica que el método analítico es robusto a cambios de pH menor a 3.0, pero se debe cuidar que el pH no sea mayor de 3.0 ya que los picos se deforman, por consiguiente, la separación no es reproducible arrojando resultados poco confiables.

El método analítico no fue reproducible a pH=3.5, por lo que no se presentan las muestras a esta condición. Los picos a esas condiciones no resultaron bien definidos; esto pudo ser propiciado por un cambio en la elución haciendo que el pico se retuviera más en la fase estacionaria.

5.8.2 Variación en la Velocidad de flujo.

Como se puede observar en la Tabla 21, se puede concluir, que el método analítico es robusto a los cambios en la velocidad del flujo ± 0.2 mL/min, dado que los resultados obtenidos no presentan una diferencia absoluta mayor a 2.0. Sin embargo, se puede observar que el disminuir el flujo afecta más a los recobros por lo que es necesario vigilar este parámetro para poder obtener resultados confiables y reproducibles.

Tabla 21. Tabla Diferencia Absoluta de Condición Normal vs Flujo 1.0 mL/min

	Cambio en la Velocidad de Flujo		
	Paracetamol	Cafeína	Ácido acetilsalicílico
1.2 mL min ⁻¹ Cond. Normal	101.8	101.1	101.3
Flujo 1.0 mL min ⁻¹ Condición baja	100.1	99.2	99.4
DA1=	1.7	1.9	1.9
Flujo 1.4 mL min ⁻¹ Condición alta	100.0	100.3	99.9
DA2=	0.9	1.2	0.2

6. Conclusiones

Se llevó a cabo la validación de un método analítico por cromatografía de líquidos para la determinación de ácido acetilsalicílico, cafeína y paracetamol, mediante la evaluación de los parámetros marcados por la ICH Q2 (R1) "VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES". Se obtuvo adecuada linealidad para ácido acetilsalicílico y paracetamol en el intervalo de 14.7 a 44.1 µg/mL y para la cafeína en el intervalo de 3.8 a 11.5 µg/mL.

El método analítico resultó exacto con recobros entre 99.8 y 100.1 %, preciso con RSD % entre 0.5 y 2.1, y específico para todos los analitos. La evaluación de la robustez mostró que se pueden hacer ligeros cambios en las condiciones cromatográficas de flujo, pero el método fue sensible al cambio del pH de la fase móvil, por lo cual este valor se debe mantener entre 2.5 a 3.0 unidades para obtener resultados confiables y reproducibles.

Posteriormente, se analizaron estos analitos en tabletas del producto Excedrin y no se encontraron diferencia significativas entre el contenido experimental y el marcado en el marbete.

7. Aportación/ comentarios adicionales

La presente tesis será de gran utilidad para ilustrar la aplicación de una Guía de Validación a través de la evaluación de los parámetros de desempeño más importantes en los cursos de análisis instrumental. Con tal propósito, la obtención experimental de cada parámetro, su cálculo e interpretación, han sido descritos de forma detallada y fácil de comprender.

8. Referencias

- 1 GUÍA TRIPARTITA ARMONIZADA DE LA ICH. 27 October 1994 . VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1). En ICH (Current Step 4 version , 1-12) EEUU: ICH.
- 2 Vollhardt, K. Peter C.; Schore, Neil E.. (2005). Química orgánica. Estructura y función. Barcelona. Barcelona: Omega. pp. 1005-1008.
- 3 Harry G. Brittain, Richard J. Pranker. (Feb 2007). Rango de valores del pKa de la cafeína protonada. Academic Press, 33 , 12-4.
- 4 Fisone G, Borgkvist A, Usiello A . (2004). Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. Life Sci, 61 (7–8), 857-872.
- 5 Phazna Devi, Aravind Setti, S. Srikanth, Sivaramaiah Nallapeta, Smita C. Pawar, J. Venkateshwara Rao . (2013). Method development and validation of paracetamol drug by RP-HPLC. Andhra Pradesh, 16, 64-69.
- 6 J.T.FranetaB.D.AgbabaaS.EricaS.PavkovicM.AleksicaS.Vladimirova. (2002). HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets. Life Sci., 22, 1-12.
- 7 Castillo, M. Hernández, P. Ramos, E. Granados, E. Santillán, I. Campo, A. Garrido, C. (2019). MANUAL DE PRÁCTICAS ANÁLISIS INSTRUMENTAL. . En MANUAL DE PRÁCTICAS ANÁLISIS INSTRUMENTAL (1, 25) Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán: Departamento de Ciencias Químicas Sección de Química Analítica.: UNAM.
- 8 A. Villegas, R. Martínez, D. Bonilla, P. Hernández. . (2016). MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE QUÍMICA ANALÍTICA III. CARRERA: INGENIERÍA QUÍMICA. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán: Departamento de Ciencias Químicas Sección de Química Analítica: UNAM.
- 9 M. Castillo, E. Ramos, E. Granados, P. Hernández, I. Santillán, M. Campo N Garrido. (2016). MANUAL DE PRÁCTICAS ANÁLISIS INSTRUMENTAL. CARRERA: BQD. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán: Departamento de Ciencias Químicas Sección de Química Analítica: UNAM.

- 10 Revilla, A. Hernández, P. (2016). MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO, QUIMICA ANALITICA IV QUIMICA INDUSTRIAL. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán: Departamento de Ciencias Químicas Sección de Química Analítica: UNAM.
- 11 Harris, C. (2001). Análisis Químico Cuantitativo. España: Reverte.
- 12 Donald M. West, Douglas A. Skoog. (2015). Química Analítica. EEUU: Mc Graw.
- 13 Rubinson J.F., Rubinson K.A., (2000). *Química Analítica Contemporánea*, Pearson Education
- 14 Miller, J.N., y Miller, J.C. (2002). Estadística y Quimiometría para Química Analítica, La calidad de las medidas analíticas. España.: Pearson Prentice Hall.
- 15 Sweetman, C. Martindale. (2009). Analgesics Anti-inflammatory Drugs and Antipyretics. Aspirin. the Complete Drug Reference, 36, 20.
- 16 Newman, M. (2009). Dermatological Drugs and Sunscreens. Chicago: Pharmaceutical Press.
- 17 Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP) Validation of Compendial procedures <1225>.
- 18 Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) Apéndice III "Validación de métodos analítico".
- 19 Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 10a Edición Pág. 1422
- 20 GUÍA DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS EDITADA POR EL COLEGIO NACIONAL DE QUÍMICOS FARMACÉUTICOS BIÓLOGOS MÉXICO, A. C. (2002)
- 21 Sierra M., Noralba; Angel, Nelson Ivan; Bustos, Manuel Carlos. **Rev. colomb. ciencias quim. farm**; (26): 49-53, oct. 1997. tab, graf. Artigo em Espanhol.

- 22 Jhonel J., Arroyo G. Jun2016., DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE FENILEFRINA CLORHIDRATO, PARACETAMOL, SALICILAMIDA, CAFEÍNA Y CLORFENIRAMINA MALEATO EN TABLETAS Rev Soc Quím Perú.82(2).
- 23 Chemical Book. Ácido salicílico. Extraído el 13 de marzo del 2018 de: http://www.chemicalbook.com/CASEN_69-72-7.htm.

9. Anexos

Anexo 1 Resumen de resultados de Linealidad del sistema

Tabla A1-1. Resultados Estándar y patrón de trabajo para las curvas.

	Paracetamol	Cafeína	Ácido Acetilsalicílico
Peso (mg)	25.1	6.5	25.8
Factor de Dilución	625	625	625
Concentración (mg/mL)	0.0400	0.0104	0.0412
Promedio estándar	805822	196154	629276
% RSD	0.53	1.29	1.35
Peso de los activos en la curva			
Patrón	Paracetamol	Cafeína	Ácido Acetilsalicílico
1	25.1	6.5	26.0
2	25.3	6.8	25.7
3	25.7	6.1	26.0

Tabla A2. Tabla de Resultados Linealidad del sistema Paracetamol

Nivel (%)	Concentración Adicionada (mg/mL)	Área Paracetamol
50	0.020151	407766
	0.020311	400145
	0.020632	413475
75	0.030226	596719
	0.030467	611354
	0.030948	611918
100	0.040301	810251
	0.040622	802265
	0.041264	809554
125	0.050376	1013068
	0.050778	1010917
	0.051581	1015708
150	0.060452	1208207
	0.060933	1210650
	0.061897	1212781

Tabla A3. Tabla de Resultados de Linealidad del sistema Cafeína

Nivel (%)	Concentración Adicionada (mg/mL)	Área Cafeína
50	0.005219	101042
	0.005460	101653
	0.004898	94205
75	0.007829	147961
	0.008190	154953
	0.007347	139334
100	0.010439	200327
	0.010920	203587
	0.009796	184622
125	0.013048	251036
	0.013651	254792
	0.012245	231647
150	0.015658	299584
	0.016381	307208
	0.014694	271781

Tabla A4. Tabla de Resultados de Linealidad del sistema Acido Acetilsalicílico

Nivel (%)	Concentración Adicionada (mg/mL)	Área Ácido Acetilsalicílico
50	0.020821	326746
	0.020581	314412
	0.020821	324352
75	0.031231	475459
	0.030871	478582
	0.031231	481996
100	0.041642	646481
	0.041161	627087
	0.041642	632204
125	0.052052	801847
	0.051451	785960
	0.052052	799401
150	0.062462	955000
	0.061742	941460
	0.062462	937474

Con los datos obtenidos se procede a realizar la gráfica del área obtenida (Y) de cada analito contra de la concentración adicionada (X) y su correspondiente regresión lineal.

Anexo 2 Resumen de regresión lineal del sistema de cada Activo

Tabla A2-1. Tabla de datos del estándar utilizado para Adecuabilidad y cuantificar la corrida analítica correspondiente a la linealidad del sistema

	Paracetamol	Cafeína	Ácido Acetilsalicílico
Peso (mg)	25.1	6.5	25.8
Factor de Dilución	625	625	625
Concentración (mg/mL)	0.0400	0.0104	0.0412
Promedio estándar	757082	189914	612808
% RSD	1.59	0.52	0.70

Regresión lineal Paracetamol linealidad del sistema

Tabla A2-2 Tabla de Regresión Lineal de Paracetamol

Estadísticas de la regresión

Coefficiente de correlación múltiple	0.999631018
Coefficiente de determinación R ²	0.999262172
R ² ajustado	0.999205416
Error típico	8309.177368
Observaciones	15

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	1.21558E+12	1.21558E+12	17606.27211	9.51642E-22
Residuos	13	897551570.9	69042428.53		
Total	14	1.21648E+12			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	4158.824199	6433.773296	0.646405151	0.529264215	-9740.497972	18058.14637
Variable X 1	19760417.63	148923.2187	132.6886284	9.51642E-22	19438688.57	20082146.68

Ecuación de la recta: $y = a + bx$

a= Intercepción 19760417.628587

b= pendiente de la recta= 4158.824199

x= Concentración

Concentración de determinación R² = 0.9993

Intervalo de confianza de la intersección con el eje y= 4158.824199 ± 13899.32217

3% de la señal del estándar al 100%: 24174.6

Regresión lineal cafeína linealidad del sistema

Tabla A2-3 Tabla de Regresión Lineal de Cafeína

Coefficiente de correlación múltiple	0.999263118
Coefficiente de determinación R ²	0.99852678
R ² ajustado	0.998413455
Error típico	2862.106513
Observaciones	15

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	72178355296	72178355296	8811.206871	8.52397E-20
Residuos	13	106491498	8191653.692		
Total	14	72284846794			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	1760.330468	2199.778522	0.800230774	0.437956861	-2992.002101	6512.663038
Variable X 1	18727660.65	199510.5346	93.86802902	8.52397E-20	18296644.34	19158676.96

Resumen de resultados:

Ecuación de la recta: $y = a + bx$

a= Intercepto Y=-18727660.650227

b= pendiente de la recta= 1760.330468

x= Concentración

Concentración de determinación R² = 0.998527

Intervalo de confianza de la intersección con el eje y= 1760.330468 ± 4752.332569

3% de la señal del estándar al 100 %: 5884.62

Regresión lineal Ácido Acetilsalicílico linealidad del sistema

Tabla A2-4 Tabla Regresión Lineal Ácido Acetilsalicílico

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.999667872
Coefficiente de determinación R ²	0.999335854
R ² ajustado	0.999284766
Error típico	6120.672929
Observaciones	15

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	7.32807E+11	7.32807E+11	19561.00248	4.80246E-22
Residuos	13	487014282.3	37462637.1		
Total	14	7.33294E+11			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	10150.40596	4740.48757	2.141215604	0.051779895	-90.79480561	20391.60672
Variable X 1	15068900.75	107742.2444	139.8606538	4.80246E-22	14836137.78	15301663.72

Resumen de resultados:

Ecuación de la recta: $y = a + bx$

a= Intercepto Y=10150.40596

b= pendiente de la recta= 15068900.749266

x= Concentración

Concentración de determinación $R^2 = 0.999336$

Intervalo de confianza de la intersección con el eje y= 10150.40596 ± 10241.20077

3 % de la señal del estándar al 100%: 18878.28

Tabla A2-5. Tabla de Recobros de Cafeína linealidad del sistema

Nivel (%)	Nombre	Concentración Adicionada (mg/mL)	Concentración Recuperada (mg/mL)	Recobro (%)	Promedio	DE	%RSD
25	LIN 50-1	0.005219	0.005337	102.3	100.7	1.7	1.7
	LIN 50-2	0.005460	0.005370	98.3			
	LIN 50-3	0.004898	0.004976	101.6			
50	LIN 75-1	0.007829	0.007816	99.8	100.0	0.1	0.1
	LIN 75-2	0.008190	0.008185	99.9			
	LIN 75-3	0.007347	0.007360	100.2			
70	LIN 100-1	0.010439	0.010582	101.4	99.8	1.2	1.2
	LIN 100-2	0.010920	0.010754	98.5			
	LIN 100-3	0.009796	0.009752	99.6			
100	LIN 125-1	0.013048	0.013261	101.6	100.1	1.2	1.2
	LIN 125-2	0.013651	0.013459	98.6			
	LIN 125-3	0.012245	0.012236	99.9			
120	LIN 150-1	0.015658	0.015825	101.1	99.3	1.4	1.4
	LIN 150-2	0.016381	0.016228	99.1			
	LIN 150-3	0.014694	0.014356	97.7			
Prom=				100.0			
RSD (%) =				1.38			

Tabla A2-10. Tabla de Recobros del Ácido Acetilsalicílico linealidad del sistema

Nivel (%)	Nombre	Concentración Adicionada (mg/mL)	Concentración Recuperada (mg/mL)	Recobro (%)	Promedio	DE	%RSD
25	LIN 50-1	0.020821	0.021413	102.8	101.7	1.1	1.1
	LIN 50-2	0.020581	0.020605	100.1			
	LIN 50-3	0.020821	0.021256	102.1			
50	LIN 75-1	0.031231	0.031159	99.8	100.8	0.8	0.8
	LIN 75-2	0.030871	0.031363	101.6			
	LIN 75-3	0.031231	0.031587	101.1			
70	LIN 100-1	0.041642	0.042366	101.7	100.4	1.0	1.0
	LIN 100-2	0.041161	0.041095	99.8			
	LIN 100-3	0.041642	0.041431	99.5			
100	LIN 125-1	0.052052	0.052548	101.0	100.6	0.3	0.3
	LIN 125-2	0.051451	0.051507	100.1			
	LIN 125-3	0.052052	0.052388	100.6			
120	LIN 150-1	0.062462	0.062585	100.2	99.5	0.8	0.8
	LIN 150-2	0.061742	0.061697	99.9			
	LIN 150-3	0.062462	0.061436	98.4			
Prom=			0.0416290	100.6			
RSD (%) =				1.15			

Se cumplen con los criterios establecidos en la Tabla 5 para Exactitud

Anexo 3 Resumen de resultados de Linealidad del Método

Tabla A3-1. Tabla de Resultados Linealidad del Método Paracetamol

Nivel (%)	Nombre	Concentración Adicionada (mg/mL)	Paracetamol
25	LIN 50-1	0.018774	278961
	LIN 50-2	0.018369	276612
	LIN 50-3	0.018958	286773
50	LIN 75-1	0.028125	422648
	LIN 75-2	0.027757	420149
	LIN 75-3	0.028051	417264
70	LIN 100-1	0.037512	583284
	LIN 100-2	0.037328	571592
	LIN 100-3	0.037033	569015
100	LIN 125-1	0.046089	713875
	LIN 125-2	0.046089	701587
	LIN 125-3	0.046199	701604
120	LIN 150-1	0.055587	828642
	LIN 150-2	0.055660	824360
	LIN 150-3	0.055734	823981

Tabla A3-2. Tabla de Resultados Linealidad del Método Cafeína

Nivel (%)	Nombre	Concentración Adicionada (mg/mL)	Cafeína
50	LIN 50-1	0.004881	75904
	LIN 50-2	0.004776	73991
	LIN 50-3	0.004929	75989
75	LIN 75-1	0.007312	108835
	LIN 75-2	0.007217	108256
	LIN 75-3	0.007293	108967
100	LIN 100-1	0.009753	143731
	LIN 100-2	0.009705	144953
	LIN 100-3	0.009629	143531
125	LIN 125-1	0.011983	174608
	LIN 125-2	0.011983	175410
	LIN 125-3	0.012012	174949
150	LIN 150-1	0.014453	215644
	LIN 150-2	0.014472	214153
	LIN 150-3	0.014491	215113

Tabla A3-3. Tabla de Resultados Linealidad del Método Ácido Acetilsalicílico

Nivel (%)	Nombre	Concentración Adicionada (mg/mL)	Ácido Acetilsalicílico
50	LIN 50-1	0.018774	219990
	LIN 50-2	0.018369	213316
	LIN 50-3	0.018958	221619
75	LIN 75-1	0.028125	337213
	LIN 75-2	0.027757	326324
	LIN 75-3	0.028051	327384
100	LIN 100-1	0.037512	444439
	LIN 100-2	0.037328	441741
	LIN 100-3	0.037033	441006
125	LIN 125-1	0.046089	552751
	LIN 125-2	0.046089	544383
	LIN 125-3	0.046199	539270
150	LIN 150-1	0.055587	635360
	LIN 150-2	0.055660	638057
	LIN 150-3	0.055734	640937

Anexo 4 Resumen de regresión lineal del Método de cada Activo

Tabla A4-1. Tabla de Resultados Linealidad del Método Paracetamol

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
<i>Coefficiente de correlación múltiple</i>	0.998673493
<i>Coefficiente de determinación R²</i>	0.997348747
<i>R² ajustado</i>	0.997144804
<i>Error típico</i>	10777.59131
<i>Observaciones</i>	15

ANÁLISIS DE VARIANZA						
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	
Regresión	1	5.6804E+11	5.6804E+11	4890.341092	3.8865E-18	
Residuos	13	1510034167	116156474			
Total	14	5.6955E+11				

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	6103.307879	8412.63964	0.72549261	0.481006833	-12071.0951	24277.7109
Variable X 1	14944044.81	213697.079	69.9309738	3.88649E-18	14482380.3	15405709.3

Resumen de resultados:

Ecuación de la recta: $y = a + bx$

a= Intercepción a=6103.307879

b= pendiente de la recta= 14944044.808930
 x= Concentración
 Concentración de determinación $r^2 = 0.999336$
 Intervalo de confianza de la intersección con el eje $y = 10150.40596 \pm 10241.20077$
 3% de la señal del estándar al 100%: 22712.46

Tabla A4-2. Tabla de Resultados Linealidad del Método Cafeína

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.999516689
Coefficiente de determinación R ²	0.999033611
R ² ajustado	0.998959274
Error típico	1633.54917
Observaciones	15

ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>	
Regresión		13.5862E+10	3.5862E+10	13439.14329	5.4991E-21	
Residuos		13 34690277.6	2668482.89			
Total		143.5897E+10				

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	4105.02896	1275.09572	3.21938887	0.006712316	1350.35214	6859.70578
Variable X 1	14441806.77	124576.389	115.927319	5.49913E-21	14172675.8	14710937.7

Resumen de resultados:

Ecuación de la recta: $y = a + bx$
 a= Intercepto=4105.02896
 b= pendiente de la recta= 14441806.773320
 x= Concentración
 Concentración de determinación $r^2 = 0.999034$
 Intervalo de confianza de la intersección con el eje $y = 4105.02896 \pm 2754.67682$
 3% de la señal del estándar al 100%: 5517.42

Tabla A4-3. Tabla de Resultados Linealidad del Método Acido Acetilsalicílico

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.998764338
Coefficiente de determinación R ²	0.997530204
R ² ajustado	0.997340219
Error típico	7997.865432
Observaciones	15

ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	3.3586E+11	3.3586E+11	5250.592128	2.4512E-18
Residuos	13	831556069	63965851.5		
Total	14	3.3669E+11			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	7686.310822	6242.87541	1.23121323	0.240053001	-5800.60154	21173.2232
Variable X 1	11490928.14	158580.932	72.4609697	2.45125E-18	11148334.9	11833521.4

Resumen de resultados:Ecuación de la recta: $y = a + bx$

a= Intercepto a=7686.310822

b= pendiente de la recta= 11490928.310822

x= Concentración

Concentración de determinación $r^2 = 0.997530$ Intervalo de confianza de la intersección con el eje $y = 7686.3108 \pm 13486.9126$

3% de la señal del estándar al 100%: 18084.24

Tabla A4-4. Tabla de Recobros de Paracetamol

Nivel (%)	Concentración Adicionada (mg/mL)	Concentración Recuperada (mg/mL)	Recobro (%)	Promedio	DE	%RSD
50	0.018774	0.018245	97.2	98.2	0.8	0.8
	0.018369	0.018088	98.5			
	0.018958	0.018768	99.0			
75	0.028125	0.027865	99.1	99.0	0.7	0.7
	0.027757	0.027697	99.8			
	0.028051	0.027504	98.1			
100	0.037512	0.038619	103.0	102.0	0.7	0.7
	0.037328	0.037836	101.4			
	0.037033	0.037664	101.7			
125	0.046089	0.047362	102.8	101.5	0.9	0.9
	0.046089	0.046539	101.0			
	0.046199	0.046540	100.7			
150	0.055587	0.055045	99.0	98.5	0.4	0.4
	0.055660	0.054759	98.4			
	0.055734	0.054733	98.2			
	Prom=	0.0371510	99.8			
	RSD (%) =		1.80			

Tabla A4-5. Tabla de Recobros de Cafeína

Nivel (%)	Concentración Adicionada (mg/mL)	Concentración Recuperada (mg/mL)	Recobro (%)	Promedio	DE	%RSD
50	0.004881	0.004972	101.8	101.4	0.4	0.4
	0.004776	0.004839	101.3			
	0.004929	0.004977	101.0			
75	0.007312	0.007252	99.2	99.6	0.3	0.3
	0.007217	0.007212	99.9			
	0.007293	0.007261	99.6			
100	0.009753	0.009668	99.1	100.0	0.6	0.6
	0.009705	0.009753	100.5			
	0.009629	0.009654	100.3			
125	0.011983	0.011806	98.5	98.7	0.2	0.2
	0.011983	0.011862	99.0			
	0.012012	0.011830	98.5			
150	0.014453	0.014648	101.4	100.9	0.3	0.3
	0.014472	0.014544	100.5			
	0.014491	0.014611	100.8			
	Prom=	0.0096593	100.1			
	RSD (%) =		1.08			

Tabla A4-6. Tabla de Recobros Ácido Acetilsalicílico

Nivel (%)	Concentración Adicionada (mg/mL)	Concentración Recuperada (mg/mL)	Recobro (%)	Promedio	DE	%RSD
50	0.018774	0.018476	98.4	98.0	0.4	0.4
	0.018369	0.017895	97.4			
	0.018958	0.018618	98.2			
75	0.028125	0.028677	102.0	100.3	1.2	1.2
	0.027757	0.027729	99.9			
	0.028051	0.027822	99.2			
100	0.037512	0.038008	101.3	101.4	0.3	0.3
	0.037328	0.037774	101.2			
	0.037033	0.037710	101.8			
125	0.046089	0.047434	102.9	101.5	1.1	1.1
	0.046089	0.046706	101.3			
	0.046199	0.046261	100.1			
150	0.055587	0.054623	98.3	98.6	0.2	0.3
	0.055660	0.054858	98.6			
	0.055734	0.055109	98.9			
	Prom=	0.0371800	100.0			
	RSD (%) =		1.69			

Se cumplen con los criterios establecidos en la tabla 4.2.1 para Exactitud

Anexo 5 Resumen de resultados de precisión intermedia

Tabla A5-1. Tabla de Resultados del Estándar Analista 1 Día 1

	Paracetamol	Cafeína	Ácido Acetilsalicílico
Peso (mg)	25.1	6.5	25.8
Factor de Dilución	625	625	625
Concentración (mg/mL)	0.04001944	0.01036152	0.04123872
Contenido teórico por tableta (mg)	250	65	260
Peso promedio (10 tabs mg)	679.12		

Tabla A5-2. Tabla de resultados Estándar precisión intermedia Analista 2 Día 1

	Paracetamol	Cafeína	Ácido Acetilsalicílico
Peso (mg)	25.1	6.5	25.8
Factor de Dilución	625	625	625
Concentración (mg/mL)	0.04002	0.01036	0.04124
Promedio estándar	899585.3333	215776.6667	706627.6667
% RSD	0.31	0.68	0.06
Contenido teórico por tableta (mg)	250	65	250
Peso promedio (10 tabs mg)	679.12		

Tabla A5-3. Tabla de resultados Estándar precisión intermedia Analista 1 Día 2

	Paracetamol	Cafeína	Ácido Acetilsalicílico
Peso (mg)	25.1	6.5	25.8
Factor de Dilución	625	625	625
Concentración (mg/mL)	0.04002	0.01036	0.04124
Promedio estándar	1626.80832	244.94606	1621.73819
% RSD	1.22	0.34	0.30
Contenido teórico por tableta (mg)	250	65	250
Peso promedio (10 tabs mg)	679.12		

Tabla A5-4. Tabla de resultados Estándar precisión intermedia Analista 2 Día 2

	Paracetamol	Cafeína	Ácido Acetilsalicílico
Peso (mg)	25.1	6.5	25.8
Factor de Dilución	625	625	625
Concentración (mg/mL)	0.04001944	0.01036152	0.04123872
Promedio estándar	1938.4818	512.4353	1896.1205
% RSD	0.18	0.44	0.04
Contenido teórico por tableta (mg)	250	65	250
Peso promedio (10 tabs mg)	679.12		

Tabla A5-5. Tabla de resultados precisión intermedia para el paracetamol

Ensayo	Recobro % Paracetamol			
	Analista 1		Analista 2	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
1	102.7	101.5	101.5	97.7
2	101.2	102.3	97.0	98.5
3	101.5	101.7	101.6	100.9
4	100.7	100.1	100.1	98.3
5	101.3	99.2	98.8	97.9
6	98.6	102.8	99.5	100.5
Recobro % promedio intradía	101	101.2	99.9	98.9
% RSD intradía	1.3	1.3	1.5	1.4

Anexo 6 Resumen de resultados de Robustez de cada Activo

Cambio en el pH**Tabla A6-1.** Tabla Resultados Estándar Condición Normal

	Paracetamol	Cafeína	Ácido Acetilsalicílico
Peso (mg)	25.1	6.5	25.8
Factor de Dilución	625	625	625
Concentración (mg/mL)	0.04002	0.01036	0.04124
Promedio estándar	899585	215777	706628
% RSD	0.31	0.68	0.06
Contenido teórico por tableta (mg)	250	65	250
Peso promedio (10 tabs mg)	679.12		

Tabla A6-1. Tabla Resultados Muestras Condición Normal

	Área			Peso Muestra (mg)	Dilución	Cuantificación en %		
	Paracetamol	Cafeína	Ácido Acetilsalicílico			Paracetamol	Cafeína	Ácido Acetilsalicílico
Cond. Norm.	717954	172250	524571	106.9	1250	101.5	101.1	98.0
Cond. Norm.	729204	182750	561302	112.6	1250	97.8	101.8	99.6
Cond. Norm.	682576	160297	499594	101.5	1250	101.6	99.0	98.3
					Prom=	100.3	100.6	98.6
					%RSD=	2.1	1.4	0.8

Tabla A6-2. Tabla Resultados Estándar pH=2.5

	Paracetamol	Cafeína	Ácido Acetilsalicílico
Peso (mg)	25.1	6.5	25.8
Factor de Dilución	625	625	625
Concentración (mg/mL)	0.04001944	0.01036152	0.04123872
Promedio estándar	882052	211853	689205
% RSD	1.29	1.59	1.21
Contenido teórico por tableta (mg)	250	65	250
Peso promedio (10 tabs mg)	679.12		

Tabla A6-3. Tabla Resultados Muestras Robustez Fase móvil pH=2.5

	Área			Peso Muestra (mg)	Dilución	Cuantificación en %		
	Paracetamol	Cafeína	Ácido Acetilsalicílico			Paracetamol	Cafeína	Ácido Acetilsalicílico
Rob pH=2.5	683093	167367	521025	106.9	1250	98.4	100.0	99.8
Rob pH=2.5	725107	173387	543427	112.6	1250	99.2	98.4	98.8
Rob pH=2.5	661322	155975	490614	101.5	1250	100.4	98.2	99.0
					Prom=	99.3	98.8	99.2
					%RSD=	1.0	1.0	0.5

Cambio en el Flujo

Tabla A6-4. Tabla de resultados estándar Condición Normal

	Paracetamol	Cafeína	Ácido Acetilsalicílico
Peso (mg)	25.1	6.5	25.8
Factor de Dilución	625	625	625
Concentración (mg/mL)	0.04002	0.01036	0.04124
Área Promedio estándar	1626.8083	244.9461	1621.7382
% RSD	1.22	0.34	0.30
Contenido teórico por tableta (mg)	250	65	250
Peso promedio (10 tabs mg)	679.12		

Tabla A6-5. Tabla de resultados Muestras Condición Normal

	Área			Peso Muestra (mg)	Dilución	Cuantificación en %		
	Paracetamol	Cafeína	Ácido Acetilsalicílico			Paracetamol	Cafeína	Ácido Acetilsalicílico
Cond. Norm.	1221.19189	181.79558	1184.45239	100.5	1250	101.5	99.9	102.6
Cond. Norm.	1266.12134	190.79639	1182.61108	103.4	1250	102.3	101.9	99.5
Cond. Norm.	1256.0094	189.73868	1207.39038	103.2	1250	101.7	101.6	101.8
					Prom=	101.8	101.1	101.3
					%RSD=	0.4	1.1	1.6

Tabla A6-6. Tabla de resultados estándar Velocidad de Flujo 1.0 mL/min

	Paracetamol	Cafeína	Ácido Acetilsalicílico
Peso (mg)	25.1	6.5	25.8
Factor de Dilución	625	625	625
Concentración (mg/mL)	0.04002	0.01036	0.04124
Promedio estándar	2402	642	2344
% RSD	0.05	0.12	0.05
Contenido teórico por tableta (mg)	250	65	250
Peso promedio (10 tabs mg)	679.12		

Tabla A6-7. Tabla de resultados Muestras Velocidad de Flujo 1.0 mL/min

	Área			Peso Muestra (mg)	Dilución	Cuantificación en %		
	Paracetamol	Cafeína	Ácido Acetilsalicílico			Paracetamol	Cafeína	Ácido Acetilsalicílico
Rob Fl1.0mL	1780.371	475.34619	1687.474	100.5	1250	100.2	99.7	101.1
Rob Fl1.0mL	1836.106	489.82938	1689.304	103.4	1250	100.5	99.8	98.4
Rob Fl1.0mL	1817.293	480.74356	1689.962	103.2	1250	99.6	98.2	98.6
					Prom=	100.1	99.2	99.4
					%RSD=	0.4	0.9	1.5

Tabla A6-8. Tabla de resultados estándar Condición Normal

	Paracetamol	Cafeína	Ácido Acetilsalicílico
Peso (mg)	25.1	6.5	25.8
Factor de Dilución	625	625	625
Concentración (mg/mL)	0.04001944	0.01036152	0.04123872
Promedio estándar	1802	472	1817
% RSD	0.32	0.27	0.85
Contenido teórico por tableta (mg)	250	65	250
Peso promedio (10 tabs mg)	679.12		

Tabla A6-9. Tabla de resultados Muestras Condición Normal

	Área			Peso Muestra (mg)	Dilución	Cuantificación en %		
	Paracetamol	Cafeína	Ácido Acetilsalicílico			Paracetamol	Cafeína	Ácido Acetilsalicílico
Cond. Norm.	1320.188	356.54578	1301.255	100.9	1250	98.7	101.2	100.2
Cond. Norm.	1345.417	362.3233	1297.352	102.6	1250	98.9	101.2	98.2
Cond. Norm.	1354.312	366.2868	1331.788	102.6	1250	99.5	102.3	100.8
					Prom=	99.0	101.5	99.7
					%RSD=	0.5	0.6	1.4

Tabla A6-10. Tabla de resultados estándar Velocidad de Flujo 1.4 mL/min

	Paracetamol	Cafeína	Ácido Acetilsalicílico
Peso (mg)	25.1	6.5	25.8
Factor de Dilución	625	625	625
Concentración (mg/mL)	0.04001944	0.01036152	0.04123872
Promedio estándar	1539	407	1539
% RSD	0.17	0.12	0.14
Contenido teórico por tableta (mg)	250	65	250
Peso promedio (10 tabs mg)	679.12		

Tabla A6-11. Tabla de resultados Muestras Velocidad de Flujo 1.4 mL/min

	Área			Peso Muestra (mg)	Dilución	Cuantificación en %		
	Paracetamol	Cafeína	Ácido Acetilsalicílico			Paracetamol	Cafeína	Ácido Acetilsalicílico
RobFL1.4mL	1137.985	303.45554	1104.523	100.9	1250	99.6	100.0	100.4
RobFL1.4mL	1168.128	305.52869	1097.000	102.6	1250	100.5	99.0	98.1
RobFL1.4mL	1160.468	314.69745	1132.871	102.6	1250	99.8	102.0	101.3
					Prom=	100.0	100.3	99.9
					%RSD=	0.5	1.5	1.7