

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS Y AMBIENTALES**

**PROYECTO DE TITULACIÓN**

**PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:**

**“MAGÍSTER EN GESTIÓN INTEGRAL DE LABORATORIOS DE  
QUÍMICA”**

**TEMA:**

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA  
CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE ACETAMINOFÉN, ÁCIDO  
ACETILSALICÍLICO Y BROMHEXINA EN UN PRODUCTO FARMACÚTICO EN  
SOLUCIÓN ORAL POR CROMATOGRFIA LÍQUIDA HPLC

**AUTOR:**

**JIMENA LISSETTE TORO MAYORGA**

**Guayaquil - Ecuador**

**2024**

## RESUMEN

Con el desarrollo de un nuevo producto farmacéutico es ineludible utilizar un método analítico específico que permita identificar y cuantificar los principios activos en la nueva formulación, y, para asegurar su confiabilidad y reproducibilidad es necesario validarlo. En este trabajo, se desarrolló y validó un método analítico que permitió identificar y cuantificar simultáneamente acetaminofén, ácido acetilsalicílico y bromhexina en solución oral, sin interferencias entre ellos ni con los excipientes. El método es reproducible, confiable, rápida y de bajo costo que puede ser aplicado en análisis de rutina. El desarrollo de la metodología fue mediante cromatografía líquida de alto rendimiento HPLC en la cual se ensayaron variaciones tanto en fase móvil, solventes, longitudes de onda, volúmenes de inyección, temperatura, flujo, etc., hasta obtener la metodología definitiva. Para demostrar la idoneidad del método, este fue sometido a validación bajo los siguientes parámetros: especificidad, linealidad, exactitud, precisión y robustez. Los resultados pasaron finalmente a una evaluación estadística que nos permitió demostrar que el método es selectivo, lineal, exacto y preciso y que aseguran la calidad, eficacia del fármaco.

## **ABSTRACT**

When the development of a new pharmaceutical product, it is mandatory to use a specific analytical method that allows the identification and quantification of the active ingredients in the new formulation, in order to ensure its reliability and reproducibility it is necessary to validate it. In this work, an analytical method was developed and validated to allow the simultaneous identification and quantification of acetaminophen, acetylsalicylic acid and bromhexine in oral solution, without interference between them or with the excipients. The method is reproducible, reliable, fast and low-cost manner can be applied in routine analysis. The development of the methodology was through high-performance liquid chromatography (HPLC) in which variations in mobile phase, solvents, wavelengths, injection volumes, temperature, flow, etc. were tested until the definitive methodology was obtained. To demonstrate the suitability of the method, it was subjected to validation under the following parameters: selectivity, linearity, accuracy, precision and robustness. The results were finally subjected to a statistical evaluation that demonstrate that the method is selective, linear, exact, precise and that it ensures the quality and effectiveness of the drug.

## **DEDICATORIA**

A Dios por las infinitas bendiciones recibidas; a Mitchell por su impulso, confianza y ánimo constante; Emma y Javier por ser mi inspiración y gran apoyo.

## **AGRADECIMIENTO**

A IFAVET S.A. por permitirme desarrollar este trabajo en sus instalaciones.

A la Escuela Superior Politécnica del Litoral por la formación recibida y de manera especial al Dr. Joan Vera, por su tiempo y sus muy valiosos aportes en el desarrollo de este trabajo.

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

La responsabilidad por los hechos y doctrinas expuestas en este Proyecto de Titulación, me corresponde exclusivamente y ha sido desarrollado respetando derechos intelectuales de terceros conforme las citas que constan en el documento, cuyas fuentes se incorporan en las referencias o bibliografías. Consecuentemente este trabajo es de mi total autoría. El patrimonio intelectual del mismo, corresponde exclusivamente a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance del Trabajo de Titulación referido.

---

Jimena Lissette Toro Mayorga

# TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

---

Joel Vielma Puente Ph.D.  
PRESIDENTE

---

Joan Vera Villalobos Ph.D.  
TUTOR

---

César Araque Molina Ph.D.  
DOCENTE EVALUADOR

## ABREVIATURAS O SIGLAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
ACN	Acetonitrilo
AINES	Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos
ANOVA	Análisis de varianza
CV	Coefficiente de variación
DS	Desviación estándar
HPLC	High performance liquid chromatography
ICH	International Conference on Harmonization
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
mg	Miligramo
ml	Mililitro
MRC	Material de referencia certificado
ODS	Octadecilsilano o C18
PDA	Detector de arreglo de fotodiodos
pH	Potencial de Hidrógeno.
ppm	Partes por millón
SD	Desviación estándar
R	Recobro
RSD	Desviación estándar relativa
St	Estándar
Tailing	Efecto de cola. Término usado en cromatografía
TEA	Trietilamina
TR	Tiempo de retención
USP	United States Pharmacopoeia
UA	Unidades de absorbancia
UV	Ultravioleta
VIS	Visible



# TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1 .....	1
1.INTRODUCCION .....	1
1.1 Antecedentes .....	1
1.2 Descripción del problema .....	2
1.3 Objetivos .....	3
1.3.1 Objetivo General.....	3
1.3.2 Objetivos Específicos .....	3
1.4 Hipótesis .....	3
1.5 Alcance .....	4
CAPÍTULO 2 .....	5
2.MARCO TEÓRICO .....	5
2.1 Medicamentos en solución oral.....	5
2.2 Componentes de productos farmacéuticos .....	5
2.2.1 Principios activos .....	5
2.2.2 Excipientes .....	5
2.3 Cromatografía .....	5
2.3.1 Cromatografía líquida de alta resolución HPLC. ....	5
2.3.1.1 Fase estacionaria.....	5
2.3.1.2 Recipientes para la fase móvil .....	5
2.3.1.3 Sistemas de bombeo.....	5
2.3.1.4 Sistemas de inyección de muestra.....	5
2.3.1.5 Columnas .....	5
2.3.1.6 Detectores.....	5
2.3.2 Aplicabilidad cromatografía líquida en la Industria farmacéutica. ....	5
2.4 Validación de métodos analíticos .....	5
2.4.1 Especificidad / Selectividad .....	6
2.4.2 Límite de detección LOD .....	6
2.4.3 Límite de cuantificación LOQ.....	6
2.4.4 Linealidad .....	6
2.4.5 Exactitud .....	7
2.4.6 Precisión .....	7
2.4.7 Robustez.....	8
2.5 Principios activos componentes de la formulación .....	9
2.5.1 Acetaminofén.....	9

2.5.2	Ácido acetilsalicílico.....	10
2.5.3	Bromhexina.....	12
CAPÍTULO 3	.....	14
3.1	Enfoque de la investigación .....	14
3.1.1	Tipo de investigación .....	14
3.1.2	Diseño de investigación .....	14
3.2	Metodología .....	14
3.2.1	Diseño experimental .....	14
3.2.2	Recolección de datos .....	15
3.2.2.1	Métodos y técnicas .....	15
3.2.2.1.1	Desarrollo de la metodología .....	15
3.2.2.2	Validación del método analítico.....	15
3.2.2.2.1	Especificidad .....	16
3.2.2.2.2	Linealidad y rango de trabajo .....	17
3.2.2.2.3	Efecto matriz.....	18
3.2.2.2.4	Límite de detección LOD .....	18
3.2.2.2.5	Límite de cuantificación LOQ.....	19
3.2.2.2.6	Exactitud .....	19
3.2.2.2.7	Precisión.....	19
3.2.2.2.8	Robustez .....	20
3.2.2.3	Recursos .....	21
3.2.2.3.1	Equipos, materiales y reactivos .....	21
3.2.2.3.2	Sistema cromatográfico y condiciones de equipo.....	22
3.2.2.4	Preparación de fase móvil, muestras, estándares y cálculos.....	23
3.2.3	Análisis estadístico .....	25
CAPÍTULO 4	.....	28
4.	RESULTADOS.....	28
4.1	Desarrollo del método .....	28
4.1.1	Parámetros cromatográficos para desarrollo de la metodología.....	28
4.1.2	Desarrollo de la metodología .....	28
4.2	Pretratamiento de la muestra .....	38
4.3	Validación del método .....	38
4.3.1	Especificidad.....	38
4.3.2	Linealidad .....	40
4.3.3	Efecto Matriz.....	44
4.3.4	Límite de detección.....	45

4.3.5 Límite de cuantificación .....	46
4.3.6 Exactitud .....	46
4.3.7 Repetibilidad .....	47
4.3.8 Robustez.....	50
CAPÍTULO 5 .....	55
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	55
5.1 CONCLUSIONES.....	55
5.2 RECOMENDACIONES .....	56
6. REFERENCIAS.....	57
7. APÉNDICES Y ANEXOS .....	61

## LISTADO DE FIGURAS

Fig. 2.1. Estructura molecular de acetaminofén .....	10
Fig. 2.2. Estructura molecular ácido acetilsalicílico .....	11
Fig. 2.3. Estructura molecular bromhexina .....	13
Fig. 2.4. Esquema general para desarrollo y validación del método .....	15
Fig. 4.1 Cromatograma de la muestra con la técnica acetaminofén, aspirina tabletas USP.....	29
Fig. 4.2: Cromatograma de la muestra con la variante en el solvente para la técnica acetaminofén, aspirina tabletas USP. ....	30
Fig. 4.3 Estándar de bromhexina en fase móvil original .....	30
Fig. 4.4 Solución del estándar madre de bromhexina en fase móvil original 50% y 50% ACN.....	31
31	
Fig. 4.5 Solución del estándar madre de bromhexina en fase móvil original 50% y 50%metanol .....	32
Fig. 4.6 Muestra en fase móvil buffer fosfatos, metanol, acetonitrilo .....	32
Fig. 4.7 Muestra en fase móvil buffer fosfatos, metanol, acetonitrilo ajustado pH 5.5	33
33	
Fig. 4.8 Cromatograma del estándar de acetaminofén, aspirina y ácido acetilsalicílico en fase móvil de trietilamina 0.015M y acetonitrilo (57:43).....	33
Fig. 4.9 Cromatograma del estándar de acetaminofén, aspirina y ácido acetilsalicílico en fase móvil de trietilamina 0.007M y acetonitrilo (57:43).....	34
Fig. 4.10 Cromatograma del estándar de acetaminofén, aspirina y ácido acetilsalicílico en fase móvil de trietilamina 0.015M y acetonitrilo (65:35).....	34
Fig. 4.11 Cromatograma del estándar de acetaminofén, aspirina y ácido acetilsalicílico en fase móvil de trietilamina pH 3 0.015M y acetonitrilo (65:35)	35
Fig. 4.12 Cromatograma del estándar de acetaminofén, aspirina y ácido acetilsalicílico en fase móvil de trietilamina pH3 0.015M y acetonitrilo (60:40)	35

Fig. 4.13 Cromatograma del estándar de acetaminofén, aspirina y ácido acetilsalicílico en fase móvil de trietilamina pH3 0.015M y acetonitrilo (60:40)	36
Fig. 4.14 Cromatograma del estándar de acetaminofén, aspirina y ácido acetilsalicílico, fase móvil: buffer trietilamina pH3 0.05 M y acetonitrilo (50:50)	36
Fig. 4.15 Cromatograma de la muestra, fase móvil: buffer trietilamina pH3 0.05 M y acetonitrilo (50:50)	36
Fig. 4.16 Cromatograma de a.) estándar b.) muestra en fase móvil de trietilamina pH3 0.007M y acetonitrilo (60:40)	37
Fig. 4.17 Cromatograma UV/VIS de muestra	37
Fig. 4.18 Cromatograma del solvente/fase móvil.	38
Fig. 4.19 Cromatograma sin presentar interferencias entre los tres principios activos	39
Fig. 4.20 Cromatograma sin presentar interferencias en la muestra	39
Fig. 4.21 Curvas de regresión lineal para acetaminofén	41
Fig.4.22 Curvas de regresión lineal para ácido acetilsalicílico	41
Fig. 4.23 Curvas de regresión lineal para bromhexina	42
Fig. 4.24 Análisis de residuales de acetaminofén	43
Fig. 4.25 Análisis de residuales de ácido acetilsalicílico	43
Fig. 4.26 Análisis de residuales de ácido acetilsalicílico	44

## LISTADO DE TABLAS

TABLA 2.1 Características de desempeño vs tipos de aplicación analítica .....	5
TABLA 2.2 Información química acetaminofén .....	9
TABLA 2.4 Información química bromhexina .....	12
TABLA 3.1 Criterios de aceptación para validación .....	16
TABLA 3.2 Parámetros de prueba para análisis de robustez de Younden y Steiner .....	20
TABLA 3.3 Esquema Younden y Steiner para robustez.....	20
TABLA 3.4 Esquema de prueba para ensayo de robustez del método .....	21
TABLA 4.1 Ensayo 1 de variantes en gradiente al método 1 .....	31
TABLA 4.2 Datos de evaluación de la adaptabilidad del sistema.....	39
TABLA 4.3 Concentración final teórica utilizada para linealidad del sistema ...	40
TABLA 4.4 Comparación de valores estadísticos obtenidos de las curvas de calibración de acetaminofén.....	42
TABLA 4.5 Comparación de valores estadísticos obtenidos de las curvas de calibración ácido acetilsalicílico.....	42
TABLA 4.6 Comparación de valores estadísticos obtenidos de las curvas de calibración de bromhexina.....	43
TABLA 4.7 Comparación de regresión lineal entre solvente y matriz para acetaminofén.....	44
TABLA 4.8 Comparación de regresión lineal entre solvente y matriz para ácido acetilsalicílico .....	45
TABLA 4.9 Comparación de regresión lineal entre solvente y matriz para bromhexina	45
TABLA 4.10 Porcentaje de recuperación para acetaminofén, ácido acetilsalicílico y aspirina.....	47

TABLA 4.11 Resultados de repetibilidad para acetaminofén .....	48
TABLA 4.12 Resultados de repetibilidad para ácido acetilsalicílico .....	48
TABLA 4.13 Resultados de repetibilidad para bromhexina .....	50
TABLA 4.14 Esquema Youden y Steiner establecido para análisis de robustez	51
TABLA 4.15 Resultados de ensayo de robustez .....	51
TABLA 4.16 Resultados prueba de robustez de Youden y Steiner para acetaminofén 52	
TABLA 4.17 Resultados prueba de robustez de Youden y Steiner para ácido acetilsalicílico .....	53
TABLA 4.18 Tabla resultados prueba de robustez de Youden y Steiner para bromhexina.....	53

## CAPÍTULO 1

### 1.INTRODUCCION

#### 1.1 Antecedentes

El uso apropiado de los métodos analíticos permite identificar y cuantificar si los principios activos dentro de un medicamento cumplen con los límites de aceptación establecidos. La validación de los métodos analíticos, que son utilizados en el control de calidad de medicamentos, tiene una función muy importante, ya que de ellos depende la determinación confiable y reproducible de la calidad de las materias primas y productos terminados, lo que contribuye de manera notable al aseguramiento de calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos.

Las características de desempeño o los parámetros de validación del método determinan la idoneidad para el uso previsto. Ellos definen qué puede hacer el método en condiciones optimizadas de solución matriz, aislamiento de analitos, ajustes instrumentales y otras características experimentales. La inclusión de parámetros particulares de validación en un protocolo de validación depende de la aplicación, muestras de prueba, el objetivo del método y las directrices o reglamentos nacionales o internacionales, según corresponda. Estas características son exploradas y optimizadas en el laboratorio que inicialmente propone, desarrolla y perfecciona el procedimiento analítico, es entonces cuando el método puede ser probado en el estudio inter-laboratorio por un grupo de colaboradores. Si la prueba es exitosa, el método se adopta como método oficial.

El proceso de desarrollo de un nuevo medicamento en un laboratorio farmacéutico nacional demanda la implementación de una metodología analítica que permita determinar la concentración de tres principios activos; acetaminofén, ácido acetilsalicílico y bromhexina, presentes en un único producto en solución oral.

Las monografías oficiales existentes sugieren abordar el análisis de cada principio activo mediante metodologías separadas, utilizando insumos, reactivos y solventes diferentes para cada uno, lo cual resulta un aumento de los costos y tiempo de análisis.



En el análisis bibliográfico existe disponibilidad de metodologías para el análisis de acetaminofén y aspirina en tabletas [1], algunas de ellas incluyen los principios activos mencionados junto con otros distintos, como validación simultánea de paracetamol y tramadol HCl en tabletas por HPLC [2], la estimación simultánea de paracetamol y etoricoxib en tabletas por HPLC [3], validación de paracetamol e ibuprofeno por HPLC [4], análisis de bromhexina HCl [5], [6], determinación simultánea de bromhexina clorhidrato y metil y propil hidroxibenzoato en jarabe por cromatografía líquida de alta resolución [7], tesis validación de un método de análisis cuantitativo de bromhexina tabletas por HPLC [8], validación por HPLC para determinar niveles de bromhexina HCl, clorfeniramina maleato, dextrometorfano bromhidrato y guaifenesina en sus formas farmacéuticas [9], desarrollo y validación por RP-HPLC método de determinación simultánea de amoxicilina trihidrato y bromhexina HCl en suspensión oleosa [10], desarrollo y validación de un método HPLC para la determinación simultánea de paracetamol, ácido acetilsalicílico y cafeína en productos farmacéuticos [1]; en ninguna se encuentra técnica analítica para la determinación de estos tres principios activos de manera simultánea y en solución, lo cual requiere el desarrollo de esta nueva metodología.

Actualmente en el medio no existe un producto con estas características y concentración, lo cual le otorga a este producto una mayor especialización en lo que el mercado para uso veterinario requiere y mediante el desarrollo de una metodología validada se brinda al medio pecuario un nuevo medicamento que cumpla con la concentración, calidad, eficacia requerida para lo que fue formulado.

## **1.2 Descripción del problema**

Evaluar al nuevo medicamento, mediante ensayos en el laboratorio para asegurar que el producto terminado, contiene las mismas cantidades de principios activos y parámetros fisicoquímicos con el que fue formulado, es fundamental, por lo cual, es imperativo contar con un método analítico específico, exacto y confiable. Este método debe determinar con precisión la presencia de acetaminofén, ácido acetilsalicílico y aspirina, asegurando que no haya pérdidas, degradación, interacciones o interferencias. Sin cumplir con estos requisitos, el medicamento no

puede ser lanzado al mercado, lo que no solo representa pérdidas económicas para el laboratorio en términos de la inversión en desarrollo y equipamiento de laboratorio, sino que también afecta a la comunidad, que se ve privada de un medicamento que cumple con la composición, forma farmacéutica y concentración requerida.

Según lo expuesto, se plantea esta pregunta: ¿Cómo se puede desarrollar un método analítico que garantice la presencia no comprometida de los principios activos, asegurando así su calidad y cumplimiento con los requisitos regulatorios antes de su entrada al mercado?

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo General**

Validar el método analítico mediante cromatografía líquida para cuantificación simultánea de acetaminofén, ácido acetilsalicílico y bromhexina en un producto farmacéutico en solución oral.

#### **1.3.2 Objetivos Específicos**

Desarrollar un método cromatográfico que permita el análisis simultáneo de acetaminofén, ácido acetilsalicílico y bromhexina en solución oral.

Demostrar mediante validación que el método se encuentra dentro del cumplimiento de requisitos de desempeño según la guía ICH Q2 (R2).

Comprobar que el método desarrollado permita la determinación cualitativa y cuantitativa simultánea de acetaminofén, ácido acetilsalicílico y bromhexina de una manera efectiva, rápida y de bajo costo para ser aplicado en el análisis de rutina.

### **1.4 Hipótesis**

El método desarrollado por HPLC para cuantificación simultánea de acetaminofén, ácido acetilsalicílico y bromhexina permite identificar y cuantificar de manera precisa, ofreciendo resultados rápidos, confiables y reproducibles. La fiabilidad de los resultados de la validación asegurara un alto nivel de confianza del método para la

aprobación del medicamento por parte del laboratorio de control de calidad.

### **1.5 Alcance**

- Se recopiló suficiente información bibliográfica de metodologías con principios activos similares para facilitar su desarrollo.
- Se definió reactivos y materiales requeridos para el desarrollo de la metodología.
- Se solicitó a un proveedor certificado la verificación de la calibración de los equipos e instrumentos de mediada a emplearse en la validación.
- Se evaluó los resultados obtenidos en las pruebas del desarrollo del método.
- Se estableció criterios para la ejecución de cada uno de los parámetros de validación y sus resultados.
- Se validó la metodología desarrollada a través de pruebas de Especificidad, Linealidad, Exactitud, Precisión y Robustez.
- Se realizó análisis estadístico de los resultados.
- Se evaluó si la metodología ha cumplido con los requisitos particulares a los que se ha sometido el método para garantizar la utilización específica prevista.

## CAPÍTULO 2

**TABLA 2.1 Características de desempeño vs tipos de aplicación analítica**

Tipo de medida atributo del producto	IDENTIDAD	IMPUREZAS (PUREZA) Otras medidas cuantitativas (1)		ENSAYO contenido/potencia Otras medidas cuantitativas (1)
		Cuantificación	Límite	
Procedimiento Analítico Desempeño Características a ser demostradas (2)				
Especificidad (3) Prueba de especificidad	+	+	+	+
Rango de trabajo Idoneidad del modelo de calibración Límite rango inferior Verificación	-	+  QL (DL)	-  DL	+  -
Exactitud (4) Ensayo de exactitud	-	+	-	+
Precisión (4) Repetibilidad Precisión intermedia	- - -	+  +( 5)	- - -	+  +( 5)

**Nota:** Características de rendimiento típicas y pruebas de validación relacionadas para los atributos medidos del producto.[23]

- Significa que este ensayo normalmente no es evaluado
- + Significa que este ensayo es normalmente evaluado.
- ( ) Significa que este ensayo normalmente no es evaluado, pero en algunos casos complejos es recomendado.

QL, DL: Límite de cuantificación, límite de detección.

- (1) Otras mediciones cuantitativas pueden seguir el esquema de prueba de impurezas, si el rango de trabajo está cerca de los límites de detección o cuantificación de la tecnología; de lo contrario, se recomienda seguir el esquema de ensayo.
- (2) Algunas características de desempeño pueden ser sustituidas con justificación inherente a la tecnología o calificación en el caso de ciertos procedimientos analíticos para propiedades fisicoquímicas.
- (3) Se puede utilizar un enfoque combinado como alternativa a la evaluación de la exactitud y la precisión por separado.
- (4) La falta de especificidad de un procedimiento analítico podría compensarse con uno o más procedimientos analíticos de apoyo.
- (5) La reproducibilidad y la precisión intermedia se pueden realizar como un solo conjunto de experimentos.

A lo largo del estudio de validación, se deben utilizar materiales de referencia adecuadamente caracterizados, con identidad y pureza documentadas o cualquier otra característica que sea necesaria. El grado de pureza necesario para el material

de referencia depende del uso previsto.

#### **2.4.1 Especificidad / Selectividad**

De acuerdo a la Guía Eurachem la selectividad analítica se relaciona con “el grado en el que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar” [21, p. 19]

La selectividad podría demostrarse cuando el procedimiento analítico no es específico. Sin embargo, la prueba para identificar o cuantificar un analito en presencia de una posible interferencia debe minimizar esa interferencia y demostrar que la prueba es adecuada para el propósito.

La especificidad/ selectividad se puede mostrar demostrando que la identificación y/o cuantificación de un analito no se ve afectada por la presencia de otras sustancias (p. ej. impurezas, productos de degradación, sustancias relacionadas, matriz u otros compuestos presentes en el medioambiente del proceso operativo) [23, p.7]

#### **2.4.2 Límite de detección LOD**

De acuerdo a la ICH, “el límite de detección (DL)son las concentraciones mínimas a las que el analito puede detectarse de forma fiable, una relación, señal ruido de 3:1 generalmente se considera aceptable para estimar el límite de detección.” [23]

#### **2.4.3 Límite de cuantificación LOQ**

La Guía Eurachem define LOQ como el mínimo nivel de analito que puede ser determinado con desempeño aceptable. [21, p. 21]

La ICH define al límite de cuantificación (QL) como la cantidad más baja del analito en una muestra que se puede determinar cuantitativamente con precisión y exactitud adecuadas. El límite de cuantificación es un parámetro utilizado para ensayos cuantitativos para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra y en particular, se utiliza para la determinación de impurezas y/o productos de degradación.[23, p. 19]

#### **2.4.4 Linealidad**

Debe evaluarse una relación lineal entre la concentración del analito y la respuesta a lo largo del rango de trabajo del procedimiento analítico para confirmar la idoneidad del procedimiento para el uso previsto.

Inicialmente, la linealidad se puede evaluar con un gráfico de señales en función de la concentración o el contenido del analito. Los resultados de las pruebas deben evaluarse mediante métodos estadísticos apropiados (p. ej., mediante el cálculo de una línea de regresión mediante el método de los mínimos cuadrados). [23, p. 9]

“La linealidad es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra de laboratorio”. [22, p.28]

Para el establecimiento de la linealidad, es recomendable el uso de mínimo cinco concentraciones adecuadamente distribuidas a lo largo del rango; sin embargo, es posible que se requieran concentraciones adicionales para modelos más complejos.

#### **2.4.5 Exactitud**

La exactitud es el grado de concordancia entre el valor de referencia y el valor del resultado en el ensayo.

“El término “exactitud”, esta aplicado a un conjunto de resultados de un ensayo, y supone una combinación de componentes aleatorios y un componente común de error sistemático o sesgo”.

Cuando se aplica a un método de ensayo el término “exactitud” se refiere a la combinación de veracidad y precisión. “[...]” Entre más veraz y preciso sea un resultado analítico, es más exacto. [22, p. 37].

#### **2.4.6 Precisión**

La precisión es una medida de cuan cerca están los resultados entre sí. Por lo general, se expresa mediante parámetros estadísticos que describen la propagación de los resultados, típicamente la desviación estándar (o desviación estándar relativa), calculada a partir de los resultados obtenidos mediante la realiza con de mediciones repetidas en un material adecuado en condiciones específicas. [21, p. 35]

“La precisión podrá establecerse en términos de repetibilidad y reproducibilidad. El

grado de precisión se expresa habitualmente en términos de imprecisión y se calcula como desviación estándar de los resultados”.[22, p. 42]

La precisión debe establecerse en todo el rango de trabajo de procedimiento analítico y generalmente se demuestra mediante la comparación de los resultados medidos con un valor esperado.

La precisión debe demostrarse en condiciones de prueba regulares del procedimiento analítico, en presencia de matriz de muestra y usando los pasos habituales de preparación de muestra.

**Repetibilidad:** Es la precisión bajo las condiciones de repetibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de análisis independientes se obtienen con el mismo método en ítems de análisis idénticos en el mismo laboratorio por el mismo operador utilizando el mismo equipamiento dentro de intervalos cortos de tiempo. [22, p. 42]

#### **Precisión Intermedia**

La medida en que debe establecerse una precisión intermedia depende de las circunstancias las que se pretenda utilizar el procedimiento. Las variaciones típicas a estudiar incluyen diferentes días, condiciones ambientales, analistas y equipos, según corresponda. [22, p. 42]

### **Reproducibilidad**

Es la precisión bajo las condiciones de reproducibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de los análisis se obtienen con el mismo método, en ítem idénticos de análisis en condiciones diferentes ya sea de laboratorio, diferentes operadores, usando distintos equipos, entre otros.

Cuando se desea determinar la reproducibilidad inter laboratorios para fines de validación de un método, deben participar diferentes laboratorios, se debe tener en consideración que estos utilicen el mismo método y misma muestra, en un intervalo de tiempo preferentemente establecido, se determina de este modo la desviación estándar de los resultados obtenidos por los diferentes laboratorios.[22. p. 43]

#### **2.4.7 Robustez**

La Guía Eurachem la define como “una medida de su capacidad para permanecer no afectado por pequeñas variaciones premeditadas de los parámetros del método. La robustez proporciona una indicación de la fiabilidad del método durante su uso

normal”. [21, p. 38]

“El objetivo de la prueba de robustez es optimizar el método analítico desarrollado o implementado por el laboratorio y describir bajo qué condiciones analíticas (incluidas sus tolerancias), se pueden obtener a través de este, resultados confiables”. [22, p. 45]

## 2.5 Principios activos componentes de la formulación

### 2.5.1 Acetaminofén

El acetaminofén (paracetamol, N-acetil-p-aminofenol) es el metabolito activo de la fenacetina, el analgésico derivado del alquitrán.

” [...]” El acetaminofén puede utilizarse eficazmente en vez de la aspirina como agente analgésico-antipirético; sin embargo, son mucho más débiles sus efectos antiinflamatorios. El fármaco se distribuye con relativa uniformidad en casi todos los líquidos corporales.

” [...]” Está indicado para aliviar el dolor en sujetos con osteoartritis no inflamatoria, pero no constituye un sustitutivo idóneo de la aspirina ni de otros NSAID en trastornos inflamatorios crónicos como la artritis reumatoide. El fármaco es bien tolerado y es pequeña su incidencia de efectos adversos gastrointestinales. Se expende sin receta y se utiliza como analgésico casero común. Sin embargo, en dosis excesivas y a muy breve plazo puede originar daño intenso del hígado, y va en aumento el número de casos de intoxicación accidental o deliberada con este producto. El uso prolongado de menos de 2 g/día de acetaminofén no se acompaña típicamente de disfunción hepática. El efecto adverso agudo más grave en las sobredosis de acetaminofén es la necrosis hepática, que puede ser fatal. [24, p. 694]

**TABLA 2.2 Información química acetaminofén**

Nombre	ACETAMINOFÉN Paracetamol 4´-Hidroxiacetanilida p-Acetilaminofenol N-(4-Hidroxifenil) acetamida
CAS	103-90-2
CE	203-157-5
Fórmula	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> HOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NHCOCH <sub>3</sub>
Masa molecular:	151.2
Punto de fusión:	169-170°C
Densidad:	1.3 g/cm <sup>3</sup>



Solubilidad en agua g/100 ml a 20°C | 1.4 (moderada)

Nota: Ficha informativa Acetaminofén [25]

Fórmula estructural

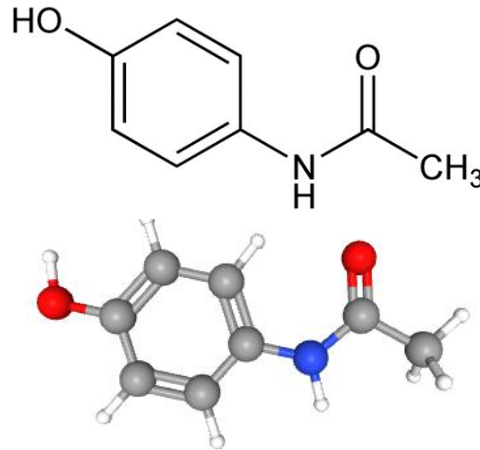


Fig. 2.1. Estructura molecular de acetaminofén

### 2.5.2 Ácido acetilsalicílico

El ingrediente activo de la corteza del sauce era un glucósido amargo llamado salicina, aislado por primera en forma pura por Leroux, en 1829, quien también demostró sus acciones antipiréticas. Por hidrólisis, la salicina produce glucosa y alcohol salicílico. Éste puede convertirse en ácido salicílico, ya sea in vivo o por manipulación química. El salicilato de sodio se utilizó primero para el tratamiento de la fiebre reumática y como antipirético en 1875 y pronto siguió el descubrimiento de sus efectos uricosúricos y su utilidad en el tratamiento de la gota. El enorme éxito de esta droga motivó a Hoffman, un químico empleado por Bayer, a preparar ácido acetilsalicílico (AAS) sobre la base del trabajo previo, pero olvidado, de Gerhardt en 1853. Después de la demostración de sus efectos antiinflamatorios, este compuesto fue introducido en la medicina en 1899 por Dreser con el nombre de Aspirina®. [26]

Pertenece a la familia de los AINE, y dentro de esta clasificación está dentro de los salicilatos. El ácido acetilsalicílico es un inhibidor no selectivo de ambas isoformas de la ciclooxigenasa; a dosis bajas (100 mg/día), inhibe irreversiblemente la COX de las plaquetas, produciendo un efecto antiagregante plaquetario.

El ácido acetilsalicílico se convierte en ácido salicílico durante la absorción y después de la misma (la CL y t<sub>1/2</sub> del salicilato son dependientes de la dosis; la semivida varía

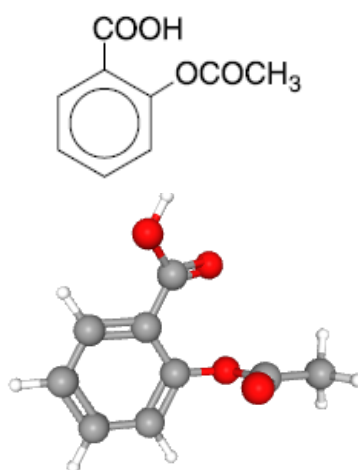
de 2.4 h luego de una dosis de 300 mg, hasta 19 h cuando hay intoxicación). B Después de administrar una dosis única de 1.2 g por vía oral en adultos.[24, p. 1794] Por su relación con el síndrome de Reye, están contraindicada la aspirina en niños y adultos menores de 20 años.

**TABLA 2.3 Información química ácido acetilsalicílico**

Nombre	ÁCIDO 2-(ACETILOXI) BENZOICO Ácido acetilsalicílico Ácido 2- acetoxibenzoico Aspirina
CAS	50-78-2
CE	200-064-1
Fórmula	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> COOH
Masa molecular:	180.2
Punto de fusión:	135 °C
Densidad:	1.4 g/cm <sup>3</sup>
Solubilidad en agua g/100 ml a 15°C	0.25 (escasa)
Presión de vapor, Pa a 25°C	~ 0.004

Nota: Ficha informativa Ácido acetilsalicílico [25]

Fórmula estructural



**Fig. 2.2. Estructura molecular ácido acetilsalicílico**

### 2.5.3 Bromhexina

La bromhexina deriva de un alcaloide de la nuez de malabar (*Adhatoda vasica*). El ambroxol, uno de sus metabolitos activos. A dosis altas pueden ejercer cierta acción estimulante de la secreción de las glándulas mucosas bronquiales. In vitro ejercen acción mucolítica por despolimerización de las sialomucinas, con reducción de la viscosidad. En animales y a dosis altas se ha observado cierta acción regeneradora de las células epiteliales ciliadas.[28]

Se encuentra dentro de la clasificación como mucolítico, los cuales son agentes secretolíticos, mucocinéticos y fluidificantes de secreciones de la vía respiratoria respiratoria, disminuyen la viscosidad de las secreciones y facilita la eliminación. Esta función la pueden realizar estos fármacos por ruptura de las glicoproteínas del moco por apertura de los enlaces disulfuros de estas.[29]

“Se absorben bien por vía oral y difunden a los tejidos, incluido el epitelio bronquial, donde alcanzan concentraciones suficientes para actuar localmente, siempre que las dosis sean suficientemente elevadas, hecho que no siempre se cumple. Pueden producir molestias gastrointestinales”. [28, p. 275]

**TABLA 2.4 Información química bromhexina**

Nombre	BROMHEXINE Benzenemethanamine, 2-amino-3,5-dibromo-N-cyclohexyl-N-methyl- Bromhexina Bromhexinum
CAS	3572-43-8
Fórmula	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>2</sub>
Masa molecular:	376.13 g/mol
Punto de fusión:	232-235
Densidad:	1.57
Presión de vapor, mmHg a 25°C	0.0±1.0

Nota: Ficha informativa Bromhexina [27]

Fórmula estructural

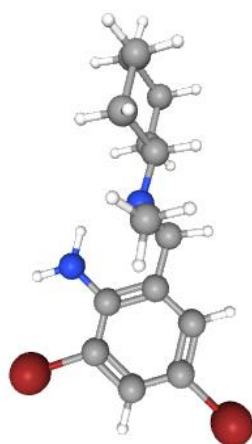
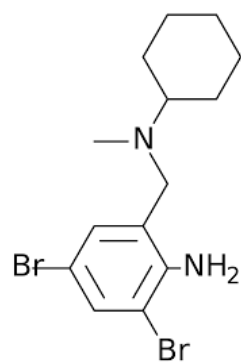


Fig. 2.3. Estructura molecular bromhexina

## **CAPÍTULO 3**

### **3.1 Enfoque de la investigación**

#### **3.1.1 Tipo de investigación**

Se planteó una investigación de base experimental empleando un proceso lógico, metódico y secuencial que permitió desarrollar la validación bajo los siguientes parámetros: (especificidad, efecto matriz, rango de trabajo, exactitud, repetibilidad, robustez); de manera complementaria, es también una investigación documental ya que se ha requerido una revisión bibliográfica en distintas fuentes mediante las cuales se recopiló información, se analizó y permitió generar las bases para el desarrollo de la metodología.

#### **3.1.2 Diseño de investigación**

La clasificación del diseño experimental se basó en los objetivos del experimento, de la siguiente manera:

Diseño para estudiar las características fisicoquímicas, de cada uno de los principios activos.

Diseño para comparar metodologías existentes.

Diseño para estudiar el efecto de los factores sobre la(s) respuesta(s).

Diseño para determinar el tratamiento de la muestra.

Diseño para determinar los parámetros óptimos para operación del equipo.

Diseño para establecer la metodología sin interferencias.

Diseño para determinar los requisitos de desempeño para validar el método.

Diseño estadístico para evaluación de los parámetros de validación.

El diseño experimental y los requisitos que debe tener el método, brinda las bases para determinar los factores que determinen el punto óptimo de la metodología y parámetros a validar.

### **3.2 Metodología**

#### **3.2.1 Diseño experimental**

El trabajo se realizó bajo el siguiente esquema.

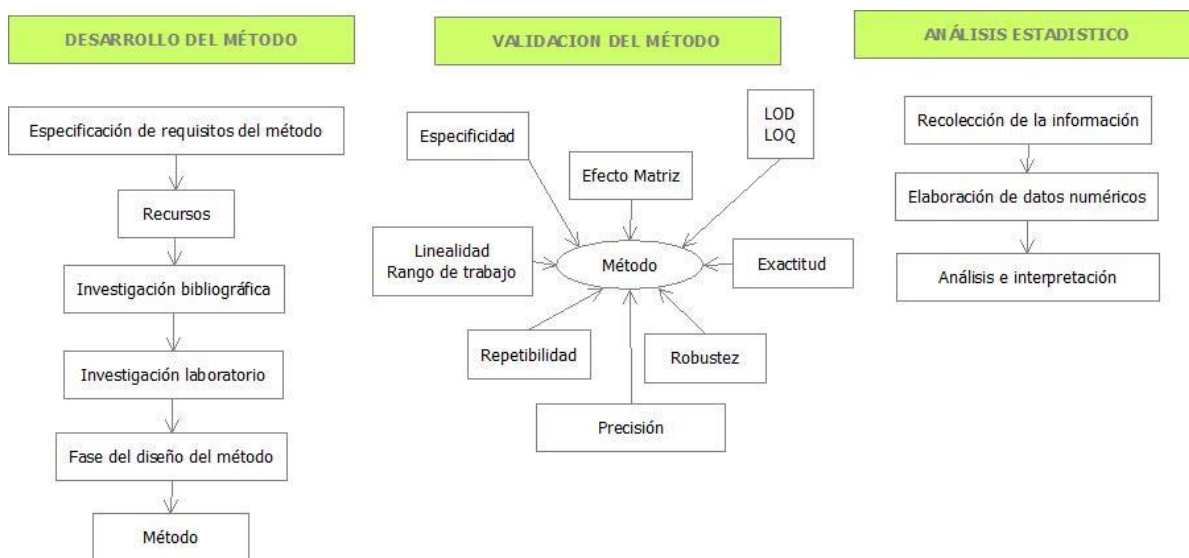


Fig. 2.4. Esquema general para desarrollo y validación del método

### 3.2.2 Recolección de datos

#### 3.2.2.1 Métodos y técnicas

Según el esquema anteriormente planteado se realizó el siguiente procedimiento.

##### 3.2.2.1.1 Desarrollo de la metodología

Se acudió a búsqueda bibliográfica de metodologías de productos similares que contengan los analitos de interés y se realizan pruebas en el cromatógrafo líquido en la búsqueda de una metodología en la que, impurezas, excipientes que están presentes en la muestra o solventes, fase móvil no produzcan interferencias; se quiere obtener un método que sea capaz de identificar y cuantificar acetaminofén, ácido acetilsalicílico y bromhexina de una manera satisfactoria aún bajo estas condiciones.

##### 3.2.2.2 Validación del método analítico

La validación se realizó de acuerdo a los siguientes parámetros propuestos por la ICH: Especificidad, linealidad/rango de trabajo, exactitud, precisión (repetibilidad) y robustez.

**TABLA 3.1 Criterios de aceptación para validación**

<b>Requisito de desempeño</b>	<b>Criterio de aceptación</b>
Especificidad	No hay interferencia cromatográfica con los analitos de estudio. Resolución $\geq 1.5$
Linealidad y rango de trabajo	Coeficiente de correlación $\geq 0.99$ Análisis residuales: aleatoriedad $F_{cal} < F_{Crítico}$
LOD	$LOD < 50\%LC$
LOQ	$LOQ \leq 50\%$ valor medio
Efecto matriz	Coeficiente de correlación $\geq 0.99$ placebo Coeficiente de correlación $\geq 0.99$ estándar $F_{cal} < F_{crítico}$ $t_{cal} < t_{crítico}$
Exactitud	Porcentaje de recobro entre 90-110%
Precisión (Repetibilidad)	$RSD \leq 2\%$
Robustez	Verificación del desempeño del método en 8 muestras y mínimo 5 variaciones $(X - \bar{x}) < \sqrt{2}DS$

### 3.2.2.2.1. Especificidad

Se realizó el análisis de los tres principios activos utilizando MRC agregados al solvente y a la matriz, por triplicado por cinco días en la concentración objetivo (0.2mg/ml que es en la que se trabaja la muestra). También se realizó análisis de testigos de reactivos: fase móvil /solvente por triplicado por 3 días.

*Criterio de aceptación:*

Se comparan las lecturas (señales de medición) obtenidas tanto en solvente como en matriz y se evalúa que no haya interferencia de manera visual y mediante la resolución mayor o igual a 1 de la señal que brindan los tres analitos principales de interés en relación con los excipientes y demás interferentes.

### 3.2.2.2.2. Linealidad y rango de trabajo

La determinación del rango lineal se realizó bajo los siguientes requisitos: cada nivel por triplicado, en 5 niveles de concentración por 5 días, en el intervalo es de 50%, 75%, 100%, 125%, 150% correspondientes a 0.1mg/ml, 0.15mg/ml, 0.20 mg/ml, 0.25mg/ml y 0.3 mg/ml respectivamente, quedando de esta manera dos puntos por arriba y dos por debajo de la concentración objetivo (0.20 mg/ml).

#### **Método de análisis:**

Pesar exactamente 50 mg de Acetaminofén RS transferir a un matraz volumétrico de 5 ml, pesar exactamente 50 mg de Ácido acetilsalicílico RS y transferir a otro matraz volumétrico de 5 ml, pesar exactamente 50 mg de Bromhexina HCl RS y transferir a otro matraz volumétrico de 5 ml, disolver completamente con fase móvil y enrasar. Esta será la solución stock de estándar.

De cada solución stock tomar 100 µl y colocar en un mismo matraz volumétrico de 10 ml y enrasar con fase móvil (0.10 mg/ml) de cada estándar.

De cada una de las soluciones stock tomar 150 µl y colocar en un mismo matraz volumétrico de 10 ml y enrasar con fase móvil (0.15 mg/ml) de cada uno de los estándares.

De cada solución stock tomar 200 µl y colocar en un mismo matraz volumétrico de 10 ml y enrasar con fase móvil (0.20 mg/ml) de cada estándar.

De cada solución stock tomar 250 µl y colocar en un mismo matraz volumétrico de 10 ml y enrasar con fase móvil (0.25 mg/ml) de cada estándar.

De cada solución stock tomar 300 µl y colocar en un mismo matraz volumétrico de 10 ml y enrasar con fase móvil (0.30 mg/ml) de cada estándar.

#### *Criterio de aceptación:*

El método de mínimos cuadrados, se utiliza para calcular la recta de regresión lineal, donde la concentración (eje de abscisas) y la respuesta en unidades de absorbancia (eje de ordenadas) se obtiene de la curva de calibración donde el coeficiente de correlación  $r^2$  debe ser mayor o igual a 0.99.

Además, se evalúan los puntos experimentales de la curva de regresión lineal medidas en la dirección paralela al eje de las ordenadas, con graficas de análisis



residual, que deberán estar aleatoriamente distribuidos indicando de esta manera un grado de linealidad. Si por el contrario los puntos siguen una tendencia determinada, al no estar regularmente distribuidos a ambos lados de la coordenada X, se pondrá en duda la linealidad.

### **3.2.2.2.3. Efecto matriz**

Se realizó la evaluación de muestras en cinco niveles por 3 días de los tres analitos con MRC fortificadas en placebo y solvente al 50%, 75%, 100%, 125%, 150% correspondientes a 0.1mg/ml, 0.15mg/ml, 0.20 mg/ml, 0.25mg/ml y 0.3 mg/ml respectivamente.

#### *Criterio de aceptación:*

El coeficiente de correlación  $r^2 \geq 0.99$  en las curvas tanto del estándar como del placebo fortificado.

Al comparar la curva de calibración estándar en solvente orgánico, con la curva de adición en placebo; las pendientes de ambas curvas deben ser similares, se utiliza la herramienta estadística de análisis de varianza, la cual, nos permite hacer esta comparación bajo la premisa de hipótesis nula que indica que no hay diferencias significativas entre las dos si,  $F_{cal} < F_{crítico}$ .

Mediante la prueba t de student con un porcentaje de confiabilidad del 95% de confianza, es decir, un valor  $\alpha$  de 0.05, se puede determinar si no existe diferencias estadísticamente significativas entre el analito agregado al solvente y el analito agregado a la matriz. Si el t calculado es inferior al t crítico, entonces, no existirá diferencias significativas entre las dos curvas.

### **3.2.2.2.4 Límite de detección LOD**

El límite de detección se determinó analizando la matriz por triplicado fortificados con MRC en 5 puntos de concentración, el cálculo se realizó teniendo en cuenta el valor promedio de la señal.

$$LOD = \frac{3.3 DS}{S}$$

Donde: DS = Desviación estándar de la respuesta

S = Pendiente de calibración de la curva

*Criterio de aceptación:* LOD <50% LOQ

#### **3.2.2.2.5 Límite de cuantificación LOQ**

El límite de detección se determinó analizando la matriz por triplicado fortificados con MRC en 5 puntos de concentración, el cálculo se realizó teniendo en cuenta el valor promedio de la señal.

$$LOQ = \frac{10 DS}{S}$$

Donde: DS = Desviación estándar de la respuesta

S = Pendiente de calibración de la curva

*Criterio de aceptación:* LOQ ≤ 50% Valor medio

#### **3.2.2.2.6 Exactitud**

Se evaluó en tres niveles de concentración cubriendo el intervalo: 50% (5mg/ml), 100% (10 mg/ml) y 150% (15 mg/ml) por triplicado, es decir 9 determinaciones, utilizando MRC en la matriz. Se calcula el porcentaje de recobro.

*Criterio de aceptación:*

El porcentaje de recuperación debe estar entre 90 y 110%

RSD ≤2

#### **3.2.2.2.7 Precisión**

Se prepararon 9 soluciones de trabajo diarias en tres concentraciones por arriba, de la concentración en la que normalmente se reporta la muestra esto es 1.5%; en la concentración en la que normalmente se cuantifica la muestra 1% y por abajo de la concentración en la que normalmente se reporta la muestra 0.5%, por triplicado durante cinco días de análisis.

- ❖ Repetibilidad: Bajo las condiciones para cada día: mismo laboratorio, mismo analista, mismo día. Se calcula el promedio de los resultados en porcentaje de lo declarado.

*Criterio de aceptación*

Repetibilidad, precisión intermedia.

- RSD ≤2

### 3.2.2.2.8 Robustez

Para proporcionar una indicación de fortaleza del procedimiento en el uso normal del método se aplica el Test de Youden y Steiner en la cual se evalúa cinco variables con ocho análisis de muestra. Para proceder a realizar el estudio de robustez se identifican aquellos factores del método que posiblemente afectarían los resultados finales.

**TABLA 3.2 Parámetros de prueba para análisis de robustez de Youden y Steiner**

N.º	Variación	Valor inferior -	Valor superior +
1	Volumen de inyección	5 µl	15 µl
2	Variación de la longitud de onda	220 nm	240 nm
3	pH de FM	2	4
4	Solvente orgánico en FM	35% ACN - 65% buffer	45% ACN - 55% buffer
5	Variación solvente muestra	35% ACN - 65% buffer	45% ACN - 55% buffer

A partir de los resultados se calcula el efecto de cada variable haciendo la media de las cuatro. A partir de los resultados, se calcula el efecto de cada variable haciendo la media de los cuatro análisis que contienen la variable en su valor más alto (mayúscula) y aquellas que corresponden al valor más bajo (minúscula).

**TABLA 3.3 Esquema Youden y Steiner para robustez**

Valor de la condición variable	ANÁLISIS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A, a	A	A	A	A	a	a	a	a
B, b	B	B	b	b	B	B	b	b
C, c	C	c	C	c	C	c	C	c
D, d	D	D	d	d	d	d	D	D
E, e	E	e	E	e	e	E	e	E
RESULTADOS	s	t	u	v	w	x	y	z

Nota: Tabla de Robustez Youden y Steiner [22]

$$A = \frac{s+t+u+v}{4} = \frac{4A}{4}$$

$$a = \frac{w+x+y+z}{4} = \frac{4a}{4}$$

Al hacer las siete comparaciones posibles, es decir las diferencias entre la variable de mayor valor versus la de menor valor:

(A – a), (B – b), (C – c), (D – d), (E – e), (F – f) y (G – g)

De este modo se puede conocer el efecto de cada variable. En este sentido, cuanto mayor sea la diferencia de los resultados entre el valor mayor y el valor menor ( $\Delta = X-x$ ), mayor influencia tendrá dicha variable en el método analítico.

**TABLA 3.4 Esquema de prueba para ensayo de robustez del método**

Variable	Valor inferior	Valor superior	ANÁLISIS							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Volumen de inyección	5	15	A	A	A	A	a	a	a	a
Longitud de onda	220	240	B	B	b	b	B	B	b	b
pH solución TEA	2	4	C	c	C	c	C	c	C	c
ACN en fase móvil	35	45	D	D	d	d	d	d	D	D
ACN en solvente muestra	35	45	E	e	E	e	e	E	e	E
<b>RESULTADOS</b>			<b>s</b>	<b>t</b>	<b>u</b>	<b>v</b>	<b>w</b>	<b>x</b>	<b>y</b>	<b>z</b>

Criterio de aceptación

Se considera que la diferencia entre el valor alto y el valor bajo sea superior a  $\sqrt{2}$  de la desviación estándar de la precisión del método (S), es decir:

$$(X - x) < \sqrt{2}DS$$

**3.2.2.3 Recursos**

**3.2.2.3.1 Equipos, materiales y reactivos**

**Equipos**

- HPLC Waters Aliance con detector UV-VIS
- Balanza analítica OHAUS Adventurer AR3130.
- Potenciómetro Mettler Toledo Seven Easy

### **Material de referencia certificado**

- Estándar acetaminofén Supelco Lote: LRAC6466
- Estándar ácido acetilsalicílico Supelco Lote: LRAC6517
- Estándar bromhexina Supelco Lote: LRAD0575

### **Consumibles**

- Columna Nova Pak C18 4 $\mu$ m (3.9mm x 300mm)
- Filtros de jeringa de PVDF 25 mm x 0.45 $\mu$ m
- Filtros de membrana PVDF 47 mm x 0.48 $\mu$ m
- Material de Vidrio de uso común en el laboratorio
- Bomba al vacío Millipore
- Equipo de filtración
- Viales de 1.5 ml con tapa rosca
- Micropipeta mono canal Nichiryo 100- 1000  $\mu$ l
- Puntas para micropipeta 100- 1000  $\mu$ l
- Matraces de vidrio de 10ml, 25ml, 50ml
- Pipeta aforada de 1 ml.
- Ultrasonido digital Ultrasonic.

### **Reactivos**

- Ácido orto fosfórico 85% Fisher Chemical
- Trietilamina extra puro AR 99.5% SRL
- Acetonitrilo HPLC JT Baker
- Agua ultra pura.

#### **3.2.2.3.2. Sistema cromatográfico y condiciones de equipo**

Se utilizó cromatografía en fase inversa (o reversa), en donde la fase estacionaria que se empleo es no polar, basada en sílice, el embalaje es C18 octadecylsilano (ODS), la fase móvil es una mezcla de buffer trietilamina 0.05M ajustada a pH 3 con ácido fosfórico en proporción de 60%, y acetonitrilo HPLC en proporción del 40%. El detector espectrofotométrico es de diodos, la detección se estableció en 230 nm para los tres principios activos.

Las dimensiones de la columna son 3.9 mm (diámetro interno) x 300 mm y la sílice (tamaño de partícula de 4 µm).

El flujo de la fase móvil se establece en 1,0 ml/min, y el tiempo de corrida es de 10 minutos, el tiempo de retención para cada analito fue de 2.2 para acetaminofén, 3.0 para ácido acetilsalicílico y 8 para bromhexina.

#### **3.2.2.4. Preparación de fase móvil, muestras, estándares y cálculos**

##### **Solución de trietilamina**

Colocar 2.08 ml de trietilamina en un balón aforado de 1000 ml y enrasar, homogenizar y mezclar bien la solución, ajustar a pH 3 con ácido fosfórico.

##### **Preparación de la fase móvil**

De la solución de trietilamina; medir 600 ml y mezclar con 400 ml de acetonitrilo. Filtrar, desgasificar la solución y llevar al equipo. Esta misma solución será el solvente para las muestras.

##### **Preparación del estándar.**

Pesar exactamente 10 mg de cada uno de los estándares Acetaminofén, Ácido acetilsalicílico, Bromhexina HCl MRC en matraces separados de 10 ml, diluir con fase móvil. Transferir una alícuota de 5 ml de cada uno de los estándares a un matraz volumétrico de 25 ml, diluir con solución de fase móvil, disolver completamente y enrasar.

Concentración de acetaminofén en estándar: 0.20 mg/ml

Concentración de ácido acetilsalicílico en estándar: 0.20 mg/ml

Concentración de bromhexina HCl en estándar: 0.20 mg/ml

##### **Preparación de las muestras**

Con una pipeta volumétrica, tomar 1ml de muestra y llevar a 50 ml con fase móvil, filtrar con filtro jeringa a un vial. 6

Concentración en la muestra de acetaminofén: 0.20 mg/ml

Concentración en la muestra de ácido acetil salicílico: 0.20 mg/ml

Concentración en la muestra de bromhexina: 0.20 mg/ml

\* Para fines de la validación, la concentración de 0.2 mg/ml será considerada la concentración objetivo ya que es la cantidad que contienen los analitos en 1 ml de muestra y disuelta en 50 ml.

### **Preparación de la curva de calibración**

Pesar exactamente 50 mg de Acetaminofén MRC transferir a un matraz volumétrico de 5 ml, pesar exactamente 50 mg de Ácido acetilsalicílico MRC y transferir a otro matraz volumétrico de 25 ml, pesar exactamente 50 mg de Bromhexina HCl MRC y transferir a otro matraz volumétrico de 5 ml, disolver completamente con fase móvil y enrasar. Esta será la solución stock de cada estándar.

Concentración de la solución stock: (10mg/ml)

- De cada una de las soluciones stock tomar 100  $\mu$ l y colocar en un mismo matraz volumétrico de 10 ml y enrasar con fase móvil.  
Concentración estándar N1: (0.10 mg/ml) de cada uno de los estándares.
- De cada una de las soluciones stock tomar 150  $\mu$ l y colocar en un mismo matraz volumétrico de 10 ml y enrasar con fase móvil.  
Concentración estándar N2 (0.15 mg/ml) de cada uno de los estándares.
- De cada una de las soluciones stock tomar 200  $\mu$ l y colocar en un mismo matraz volumétrico de 10 ml y enrasar con fase móvil.  
Concentración estándar N3 (0.20 mg/ml) de cada uno de los estándares.
- De cada una de las soluciones stock tomar 250  $\mu$ l y colocar en un mismo matraz volumétrico de 10 ml y enrasar con fase móvil.  
Concentración estándar N4 (0.25 mg/ml) de cada uno de los estándares.
- De cada una de las soluciones stock tomar 300  $\mu$ l y colocar en un mismo matraz volumétrico de 10 ml y enrasar con fase móvil.  
Concentración estándar N5 (0.3 mg/ml) de cada uno de los estándares.

### **Cálculos**

Los resultados del análisis pueden ser obtenidos de dos maneras, ya sea por el cálculo directo del equipo o por cálculos manuales.

Para los cálculos manuales se requiere las áreas que nos da el cromatógrafo líquido. Para los dos casos los resultados se expresan en porcentaje de acetaminofén,

porcentaje de ácido acetilsalicílico y porcentaje de Bromhexina.

Fórmula para cálculo en %:

$$\% = \frac{\text{AM} \times \text{PSt} \times \text{AlSt} \times \text{DM} \times \text{Pur St} \times 100}{\text{ASt} \times \text{D1St} \times \text{D2St} \times \text{CM}}$$

Donde:

AM = Área de la muestra

ASt = Área del estándar

PSt = Peso del estándar

AlSt = Alícuota del estándar

D2St = Dilución 2 del estándar

D1St = Dilución 1 estándar

CM = Concentración de la muestra

DM = Dilución de la muestra

Pur St= Pureza del estándar

\* Solo para Bromhexina = Multiplicar por el factor de corrección de 0.9116 para transformación de Bromhexina HCl a Bromhexina.

### 3.2.3 Análisis estadístico

Para los fines de esta validación se utilizarán mediciones estadísticas para establecer si el método se encuentra dentro de los parámetros establecidos.

#### Media, media aritmética o promedio[22]

$$X = \frac{\sum Xi}{n}$$

Donde:

Xi = Valor de una lectura

n = Número de lecturas

#### Desviación estándar (S): [22]

$$S = \frac{\sqrt{\sum_{n-1} (Xi - X)^2}}{n - 1}$$

Donde:

Xi = Valor de una lectura

n = Número de lecturas



X = Promedio del total de las lecturas

**Coefficiente de variación (CV).** También es conocida como desviación estándar relativa (RSD). El coeficiente de variación puede ser expresado en porcentaje:[22]

$$\%CV = \frac{S}{X} \times 100$$

Donde:

S = Desviación estándar de las lecturas

X = Promedio del total de las lecturas

**Varianza:** [22]

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - X)^2}{n-1}$$

Donde:

S = Desviación estándar de las lecturas

X = Promedio del total de las lecturas

X<sub>i</sub> = Valor de una lectura

n = Número de lecturas

**t experimental** [22]

$$t \text{ exp} = \left( \frac{100 - R}{CV \times \sqrt{n}} \right)$$

Donde:

CV = Coeficiente de variación

t = t experimental

R = Valor de recuperación para cada nivel

n = Número de lecturas

**t calculado** [22]

$$t \text{ cal} = \left( \frac{100 - \%R}{CV \times \sqrt{n}} \right)$$

Donde:

CV = Coeficiente de variación

t = t experimental

%R = Porcentaje de recuperación para cada nivel

n = Número de lecturas

**Pruebas de Significancia** [22]

Se utiliza prueba F- (de Fisher) para identificar errores aleatorios (precisiones). Mediante esta prueba se comprueba la veracidad de la hipótesis experimental

llamada “hipótesis alternativa  $H_1$ ” (sin hay diferencia) con respecto a la “hipótesis nula  $H_0$ ” no hay diferencia.

Esta prueba será utilizada para comprobar si la hipótesis nula puede o no ser rechazada.

Si el valor de F calculado  $< F$  tabla se admite  $H_0$ .

### **Análisis de varianza (ANOVA) [22]**

Para realizar el análisis e interpretación de los resultados, se emplearon herramientas estadísticas que son necesarias para interpretar y visualizar datos que deben ser relacionados, esto se llevó a cabo con el software Microsoft Excel.

Mediante este análisis estadístico se comparó más de dos medias entre sí, y se puede evaluar las diferencias entre y dentro de cada grupo. Se determinó el valor crítico de tabla para un  $\alpha=0.05$  y se basará en que si el F calculado  $> F$  crítico habrá diferencias significativas.

### **Recuperación [22]**

$$R = \left( \frac{C_e - C_o}{C_a} \right)$$

Donde:

R = Recuperación

$C_e$  = Concentración del analito de la muestra enriquecida

$C_o$  = Concentración del analito medida en la muestra sin adicionar

$C_a$  = Concentración del analito adicionado a la muestra enriquecida

### **Porcentaje de recuperación %R [22]**

$$\%R = [R] \times 100$$

## CAPÍTULO 4

### 4. RESULTADOS

#### 4.1 Desarrollo del método

Para poder cuantificar acetaminofén, ácido acetil salicílico se han encontrado en la bibliografía el estudio de métodos que incluyen estos dos principios activos, solos o asociados con otro tipo de moléculas y en distintos tipos de formas farmacéuticas a través de varias metodologías analíticas como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [1], espectrofotometría UV/VIS, titulación, pero no se ha logrado encontrar una metodología que tenga los tres principios activos, acetaminofén, ácido acetilsalicílico y bromhexina en solución oral por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El proceso que se adoptó para el desarrollo del método fue el siguiente:

##### 4.1.1 Parámetros cromatográficos para desarrollo de la metodología.

- Selección de la técnica:

Para desarrollar el método se decidió utilizar cromatografía líquida de alto rendimiento HPLC, ya que es una técnica de separación con capacidad para analizar multicomponentes en tiempo real, y compatible con las características de la muestra problema. El equipo puede analizar, obtener separación y visualización de cromatogramas en minutos y con alta resolución; es ideal para desarrollar el método porque modifica gradientes, flujo, volumen de inyección, temperatura, solventes, para lograr separar la muestra.

##### 4.1.2 Desarrollo de la metodología

Inicialmente se abordó el problema estableciendo las condiciones iniciales de separación mediante búsqueda en la literatura de métodos de separación por HPLC de muestras similares que contienen los tres principios activos que se desean identificar y cuantificar.

Se inició el desarrollo del método con la técnica de la USP [1] para análisis de acetaminofén y ácido acetilsalicílico en tabletas, bajo los siguientes parámetros:

La solución A: Cloroformo, metanol y ácido acético glacial (78:20:2)

Fase móvil: Transferir 225 mg de hidróxido de tetrametilamonio pentahidratado a un matraz de 1000 ml en agua, 125 ml de metanol, 125 ml de acetonitrilo y 1 ml de ácido acético glacial.

Estándar interno: 20 mg/ml de ácido benzoico en solución A.

Solución estándar: 3.25 mg/ml de ER acetaminofén USP y de ER Aspirina USP, y 2 mg/ml de ácido benzoico, a partir de solución de estándar interno, en solución A.

Solución muestra: Nominalmente 3.25 mg/ml de acetaminofén en solución A, transferir 325 mg de acetaminofén de la solución en un matraz de 100 ml, agregar 10 ml de solución estándar interno, diluir a volumen con solución A.

Sistema cromatográfico: Detector: UV 280 nm. Columna 3.9 mm x 30 cm; relleno L1. Velocidad de flujo 2 ml/min. Volumen de inyección: 5 µL [1]

La primera variante que se realizó al primer método ensayado fue la eliminación de cloroformo del solvente ya que este formó una emulsión con la muestra problema. Se procedió a inyectar la muestra y los estándares para conocer todas las señales que emite la muestra y mediante la inyección de los estándares de los tres analitos de interés en una misma muestra, se identificó a cada uno de los analitos de interés mediante la inyección de MRC individual de cada analito y es así como se pudo identificar cuáles son las señales propias de la matriz. Con la identificación de los tiempos de retención de los analitos y que no hubo superposición de picos, se juzgó que no se necesitaba hacer un procedimiento previo a la muestra; pero, se realizó un cambio en el solvente: 91% metanol y 9% ácido acético debido a que no se puede utilizar cloroformo. Mediante esta técnica se identificaron picos separados de los excipientes, se obtuvo los tiempos de retención que indica la técnica para acetaminofén 2 minutos y ácido acetil salicílico 3 minutos, pero no se obtuvo respuesta analítica para bromhexina hasta los 20 minutos, como se puede observar en la figura 4.1

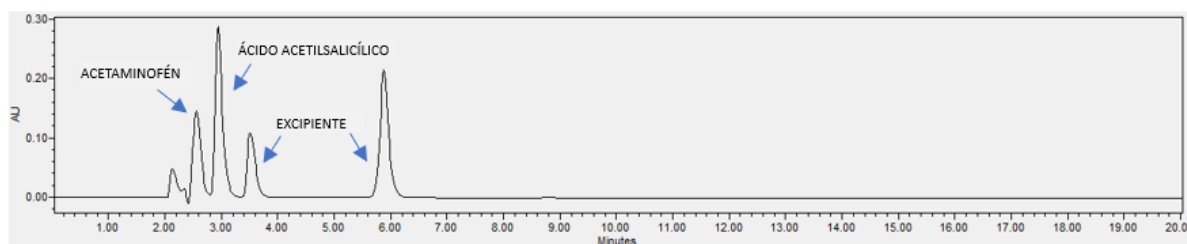
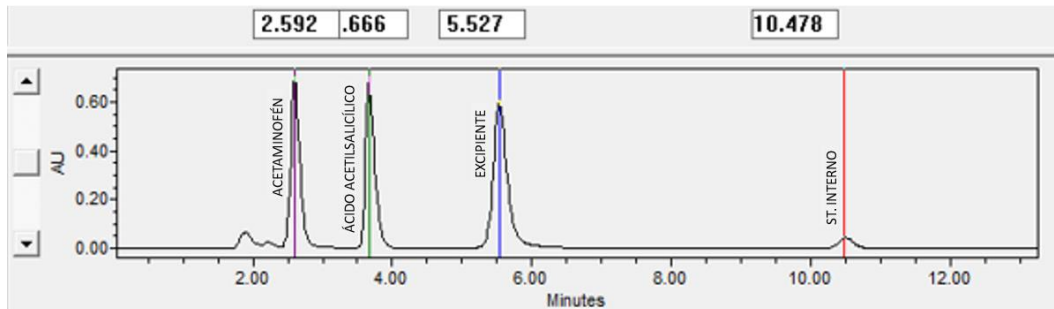


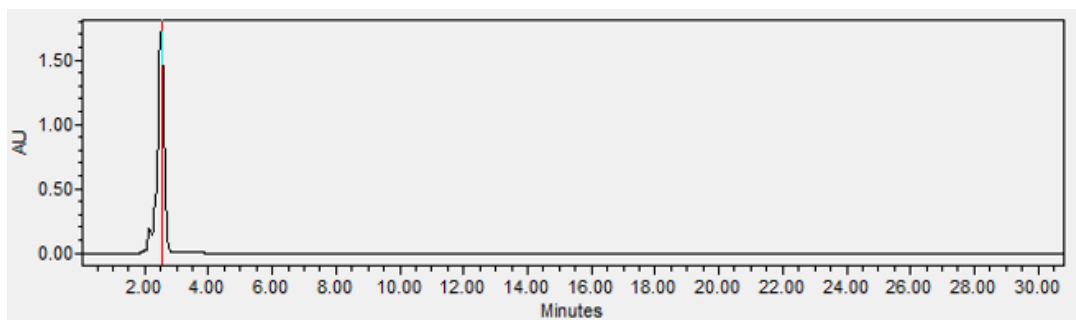
Fig. 4.1 Cromatograma de la muestra con la técnica acetaminofén, aspirina tabletas USP.

Se realizó un cambio en solvente de las muestras: Metanol 20%, Agua purificada 78% y ácido acético 2% como se muestra en la figura 4.2. Mejoran los tiempos de retención de los dos primeros analitos, pero no hay una respuesta favorable para el tercer analito bromhexina.



**Fig. 4.2: Cromatograma de la muestra con la variante en el solvente para la técnica acetaminofén, aspirina tabletas USP.**

Se inyectó solución de estándar de bromhexina, sin respuesta hasta los 30 minutos como se observa en la figura 4.3



**Fig. 4.3 Estándar de bromhexina en fase móvil original**

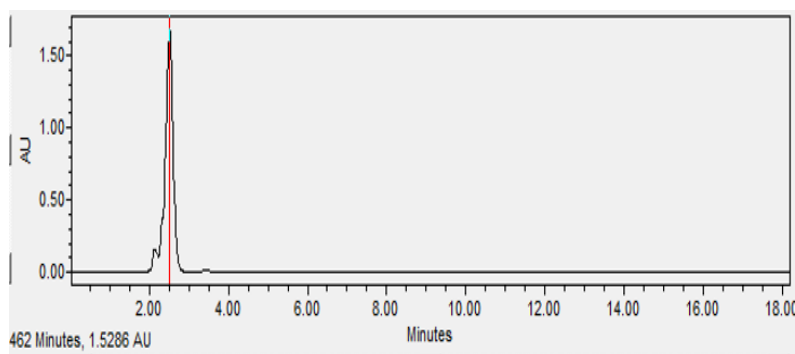
Con el objetivo de buscar respuesta analítica del método para la bromhexina, se utilizó la fase móvil en modo isocrático hasta el minuto 8 ya que hasta ese tiempo los dos componentes de interés, así como excipientes ya han eluido, y desde este tiempo, y como se conoce, que cuando aumenta la proporción de la fase orgánica, disminuyen los tiempos de retención de los analitos, por lo tanto un cambio ligero en el porcentaje de acetonitrilo o metanol tal vez nos permita acortar el tiempo de retención del pico cromatográfico de bromhexina, se trabajó entonces en modo

gradiente como se indica en la tabla 4.1 bajo las mismas condiciones anteriores salvo la variación de la concentración de la fase móvil desde el minuto 8.

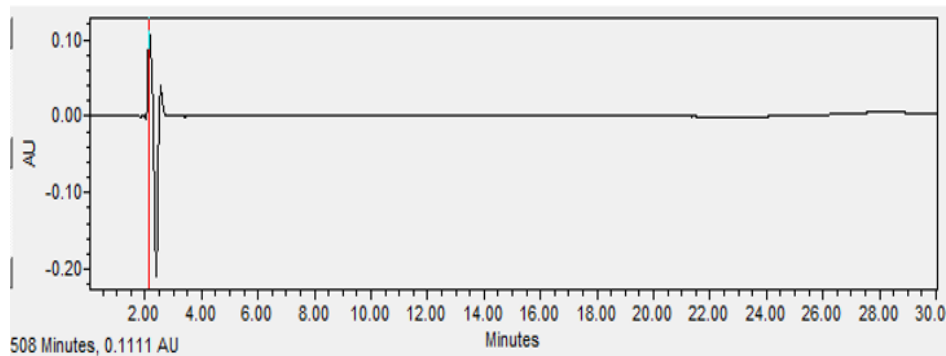
**TABLA 4.1 Ensayo 1 de variantes en gradiente al método 1**

Prueba		Fase móvil	Acetonitrilo 50% Metanol 50%	Acetonitrilo	Metanol	Respuesta Bromhexina 30 minutos
1	Gradiente	90	10	-	-	No
2	Gradiente	70	30	-	-	No
3	Gradiente	50	50	-	-	No
4	Gradiente	30	70	-	-	No
5	Gradiente	90	-	10	-	No
6	Gradiente	70	-	30	-	No
7	Gradiente	50	-	50	-	No
8	Gradiente	90	-	-	10	No
9	Gradiente	70	-	-	30	No
10	Gradiente	50	-	-	50	No

Se puede apreciar los cambios en la fase móvil 50% con 50% de acetonitrilo y fase móvil 50% con 50% de metanol que se establecen en la tabla 4.1 y que corresponden a las figuras 4.4 y 4.5 respectivamente.



**Fig. 4.4 Solución del estándar madre de bromhexina en fase móvil original 50% y 50% ACN**



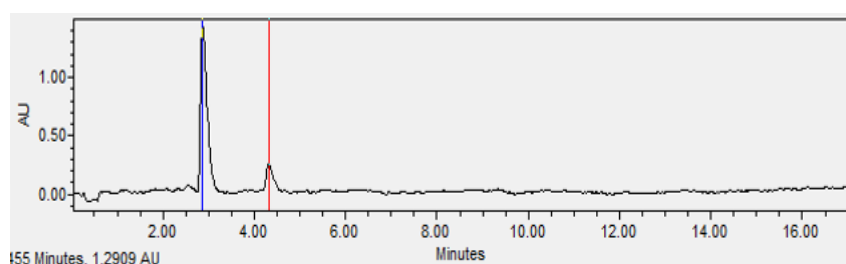
**Fig. 4.5 Solución del estándar madre de bromhexina en fase móvil original 50% y 50% metanol**

A pesar de los cambios que se hicieron ninguno tuvo respuesta cromatográfica para bromhexina.

Se decidió probar otra metodología debido a que tiempos superiores a 30 minutos (en caso de eluir Bromhexina posterior a este tiempo) no es viable con los objetivos por el tiempo de corrida extenso.

Adicionalmente se decidió disminuir la concentración de la muestra, ya que los cromatogramas en las últimas inyecciones empezaron a presentar ruido en la línea base y asimetría en los picos debido a la naturaleza y viscosidad de los excipientes que saturaron la columna, por lo que se hizo un proceso de limpieza en la misma.

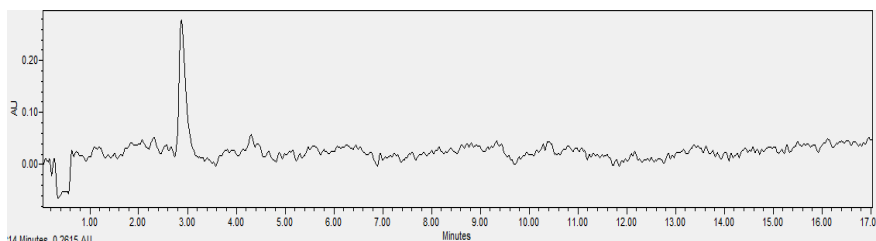
Se ensayó una segunda metodología, esta vez, específica para bromhexina, se encontró una técnica para bromhexina tabletas [8] en la cual se utiliza como solvente y fase móvil buffer fosfato y la fase orgánica metanol y acetonitrilo (18:41:41), con lecturas a 254 nm, para esta metodología se indica columna C8 zorbax, pero se utilizó columna C18, 3.9 mm x 30 cm; relleno L1. Velocidad de flujo 1 ml/min. Al disolver la muestra en la fase móvil forma una solución blanca, se baja el pH de la fase móvil a 3 para evitar enturbiamiento, siendo este mínimo que se elimina mediante filtración con filtro de jeringa de 0.45  $\mu\text{m}$ , pero no existe una buena respuesta del cromatograma, como se observa en la figura 4.6



**Fig. 4.6 Muestra en fase móvil buffer fosfatos, metanol, acetonitrilo**

Se probó una tercera metodología para bromhexina, clorfenamina y dextrometorfano [9] usando una fase móvil que consiste en metanol, acetonitrilo buffer fosfato 0.025 M (50:25:25) ajustado a pH 5.5 con ácido fosfórico, usando una columna C18 (25cm x 4.6 mm i.d x 5 $\mu\text{m}$ ) con detección a 265 nm. Solvente metanol. Se sigue la técnica

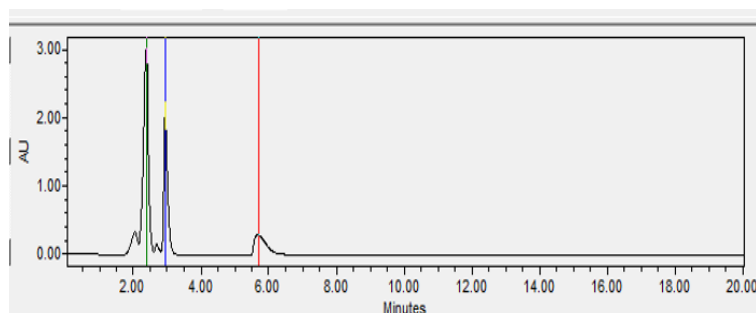
con la única variante, la columna, se utilizó C18, 3.9 mm x 30 cm. No hubo respuesta cromatográfica y con línea base inestable. Se decidió no hacer más pruebas con buffer fosfatos, dado el inconveniente de interacción de la muestra en presencia de fosfatos.



**Fig. 4.7 Muestra en fase móvil buffer fosfatos, metanol, acetonitrilo ajustado pH 5.5**

Se realizó la revisión bibliográfica para determinación de una cuarta metodología, bromhexina clorhidrato y metil y propil hidroxibenzoato [7] en donde se utilizó una fase móvil de trietilamina 0.015M y acetonitrilo (57:43) utilizando una columna C18 ajustados a pH 3.9 y detección de los analitos a 245 nm.

Se preparó muestras con la primera dilución en metanol debido a la fácil solubilidad de los analitos en este solvente, y la segunda dilución en fase móvil, se obtiene un cromatograma con interferencia en el primer pico que corresponde al acetaminofén. Como se observa en la figura 4.8

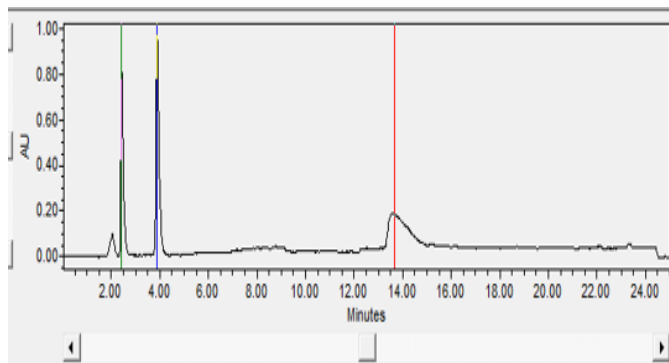


**Fig. 4.8 Cromatograma del estándar de acetaminofén, aspirina y ácido acetilsalicílico en fase móvil de trietilamina 0.015M y acetonitrilo (57:43)**

Se empezó a evaluar el origen de la interferencia al inicio del cromatograma; se disminuyó a la mitad la concentración de TEA 0.007M con la finalidad de evaluar si la solución de TEA es la interferencia en el primer pico, se vio inestabilidad en la línea base, no cumple el parámetro de asimetría en el tercer pico (2.5) y la



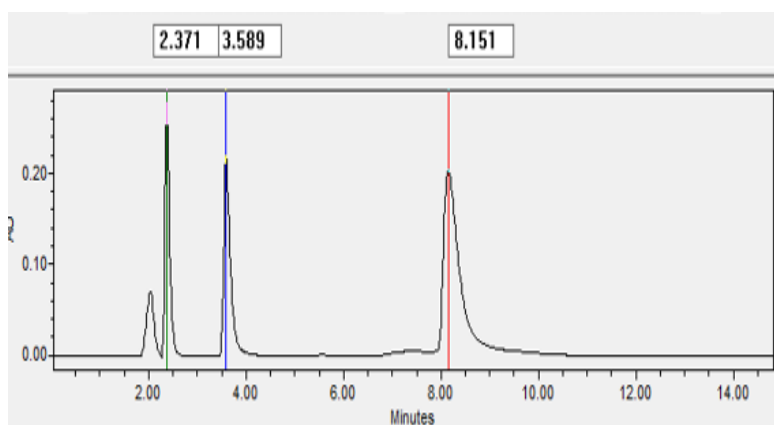
interferencia en el pico inicial continua como se observa en la figura 4.9



**Fig. 4.9** Cromatograma del estándar de acetaminofén, aspirina y ácido acetilsalicílico en fase móvil de trietilamina 0.007M y acetonitrilo (57:43)

Se prepararon la solución de TEA y acetonitrilo en recipientes por separado con la finalidad de realizar las mezclas con ayuda del equipo y poder encontrar el punto de equilibrio en la que la fase móvil no interfiere en la resolución del primer pico, se evaluó trietilamina: acetonitrilo (70:30) y evaluó trietilamina: acetonitrilo (60:40) sin la presencia de picos.

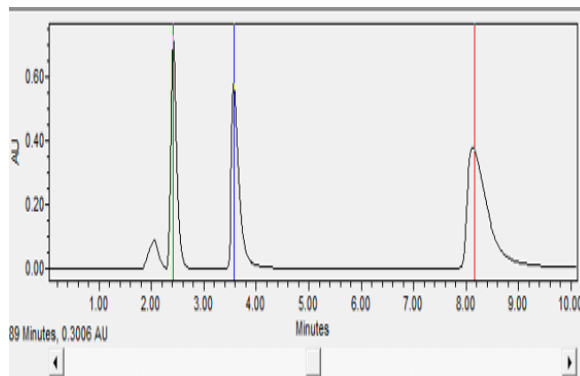
Se regresó la preparación de la fase móvil en las condiciones originales TEA a concentración de 0.015M pH 3.9 en proporción de 65 y disminuyendo la fase orgánica, esto con el fin de lograr la separación del frente del solvente de la primera señal del cromatograma, como se aprecia en la figura 4.10



**Fig. 4.10** Cromatograma del estándar de acetaminofén, aspirina y ácido acetilsalicílico en fase móvil de trietilamina 0.015M y acetonitrilo (65:35)

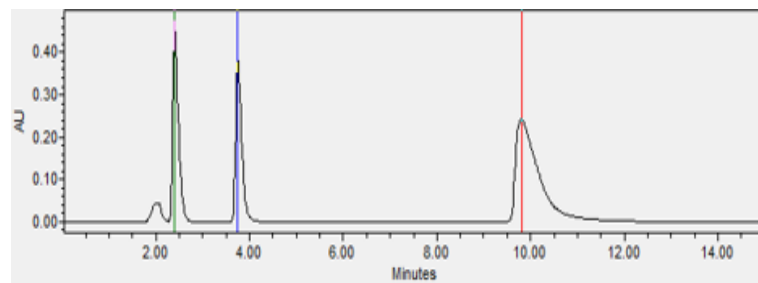
Se disminuyó el pH a 3 bajo las condiciones anteriores y se mejora la separación, y

la línea base, teniendo entonces el parámetro pH3 el primer valor fijo en el método, como se observa en la figura 4.11



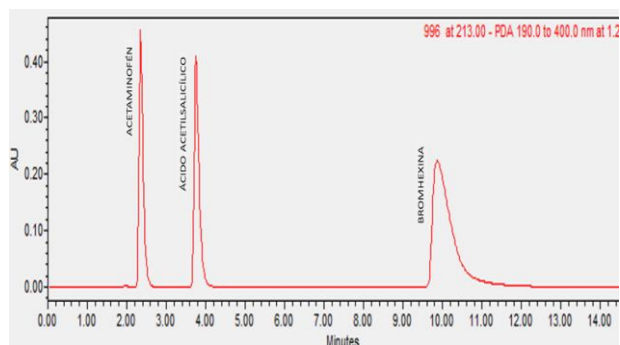
**Fig. 4.11 Cromatograma del estándar de acetaminofén, aspirina y ácido acetilsalicílico en fase móvil de trietilamina pH 3 0.015M y acetonitrilo (65:35)**

Bajo los parámetros de fase móvil TEA 0.015M pH 3 y acetonitrilo (60:40) y utilizando como solvente todo metanol para la preparación de la muestra, se tuvo un cromatograma similar al anterior y aumento de los tiempos de retención. Se evidenció así que el último parámetro a evaluar, metanol, es responsable de la primera señal en el cromatograma. Figura 4.12



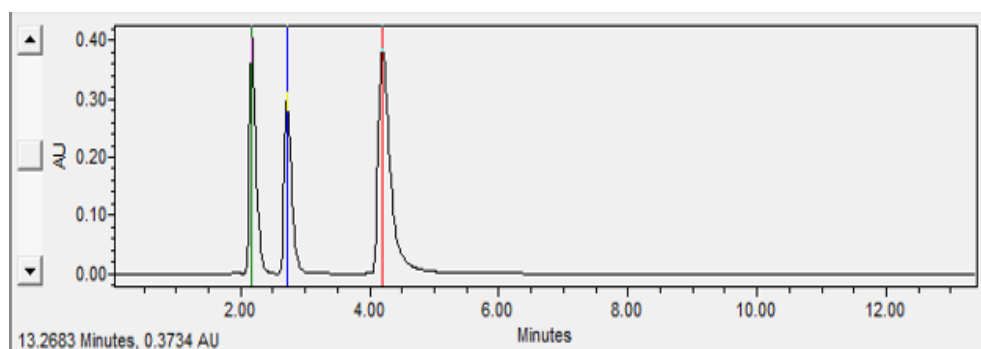
**Fig. 4.12 Cromatograma del estándar de acetaminofén, aspirina y ácido acetilsalicílico en fase móvil de trietilamina pH3 0.015M y acetonitrilo (60:40)**

Se realizó una prueba con fase móvil TEA 0.015M pH 3 y acetonitrilo (60:40) y utilizando como solvente siempre fase móvil en la preparación de la muestra, se elimina así la primera interferencia en el cromatograma y se puede visualizar los 3 picos de los analitos de interés que se colocaron en el estándar sin otra interferencia. Se procede entonces a realizar inyecciones nuevamente de cada uno de los estándares para poder confirmar sus tiempos de retención como se observa en la figura 4.13

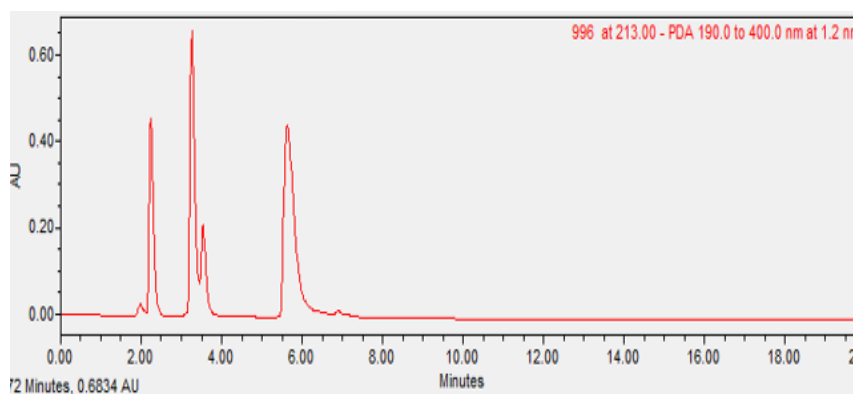


**Fig. 4.13 Cromatograma del estándar de acetaminofén, aspirina y ácido acetilsalicílico en fase móvil de trietilamina pH3 0.015M y acetonitrilo (60:40)**

Se quiso mejorar aún más el tiempo de corrida, mediante el incremento de la fase orgánica al 50%, probando bajo los parámetros anteriores, pero con fase móvil, buffer 50% y ACN 50%, mejoran los tiempos de retención y anchos de pico en el estándar, figura 4.14 pero se produce sobreposición de picos en la muestra cómo se observa en la figura 4.15

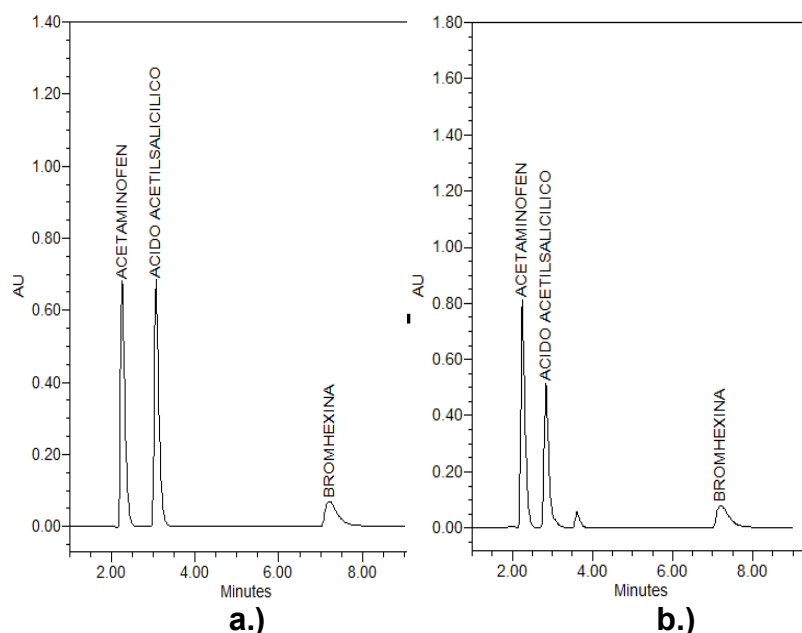


**Fig. 4.14 Cromatograma del estándar de acetaminofén, aspirina y ácido acetilsalicílico, fase móvil: buffer trietilamina pH3 0.05 M y acetonitrilo (50:50)**

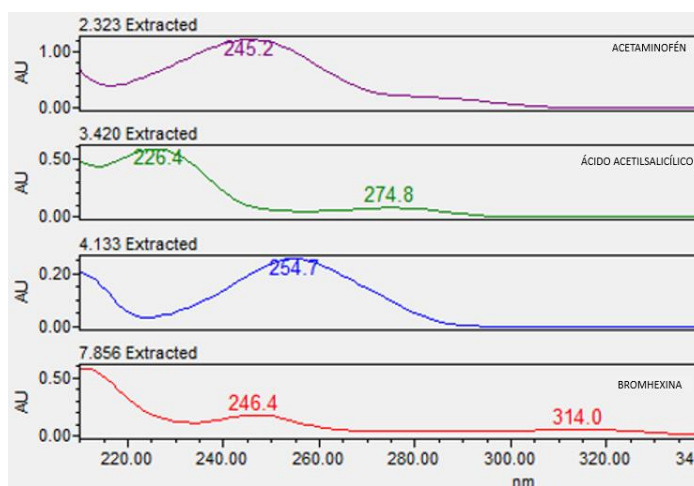


**Fig. 4.15 Cromatograma de la muestra, fase móvil: buffer trietilamina pH3 0.05 M y acetonitrilo (50:50)**

Finalmente se modificó la fase móvil en la proporción de TEA 0.05M pH3, acetonitrilo (60:40), longitud de onda 230 nm en la cual se puede cuantificar correctamente los 3 analitos de interés, solvente el mismo de la fase móvil. Se estableció la longitud de onda a 230 nm, pese a que a valores superiores tiene mayor sensibilidad el acetaminofén y bromhexina y a valor inferior aspirina; 230 nm fue escogida para minimizar la interferencia de un excipiente del pico junto al ácido acetilsalicílico.



**Fig. 4.16** Cromatograma de a.) estándar b.) muestra en fase móvil de trietilamina pH3 0.007M y acetonitrilo (60:40)



**Fig. 4.17** Cromatograma UV/VIS de muestra

Podremos resumir, que, mediante el empleo del sistema de ensayo y error, variando la fuerza de la fase móvil hasta alcanzar el rango de detección, selectividad

adecuada; gradiente, concentración, volumen de inyección, hasta obtener una buena resolución, asimetría y un tiempo de retención adecuado.

## 4.2 Pretratamiento de la muestra

La muestra requiere una dilución volumétrica previo al análisis, no requiere un pretratamiento, separación parcial, ser extraída, se encuentra en estado líquido, fluido y claro. Se filtró la muestra con filtro jeringa 0.45  $\mu\text{m}$  antes del ingreso al vial.

## 4.3 Validación del método

Para la validación del método se tomó como referencia la guía de validación ICH (Q2 R2), la metodología a seguir se especifica en el capítulo 3, donde se señalan también los criterios de aceptación.

### 4.3.1 Especificidad

Se evidenció mediante el cromatograma tanto de la muestra como del estándar, que no hay interferencia entre los 3 analitos de interés ni con impurezas, solventes, o excipientes como se aprecia en la figura 4.19 y figura 4.20

Con ayuda del detector de diodos nos permitió ver en tercera dimensión la detección espectrofotométrica, y se realizó el cálculo de pureza de pico mediante el cual se atribuye la señal únicamente a cada componente, como se aprecia en la tabla 4.2.

El análisis de placebo y cada uno de los estándares de los analitos de interés fue requerido para poderlos identificar.

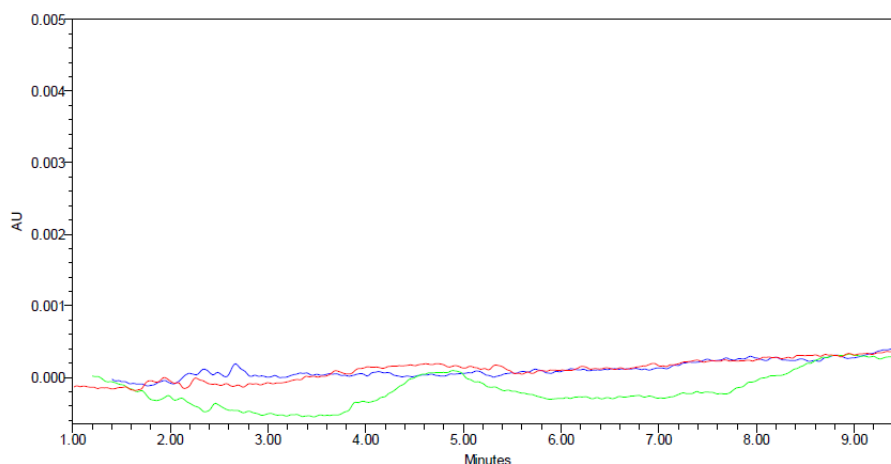
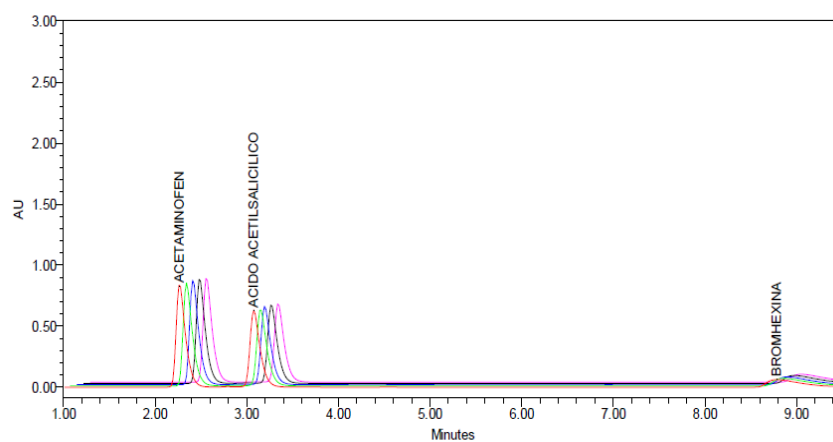
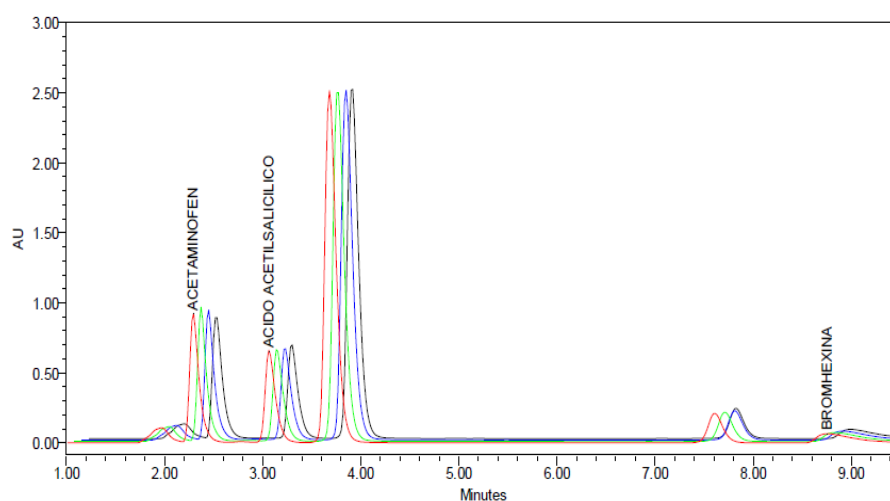


Fig. 4.18 Cromatograma del solvente/fase móvil.



**Fig. 4.19** Cromatograma sin presentar interferencias entre los tres principios activos



**Fig. 4.20** Cromatograma sin presentar interferencias en la muestra

Se calcularon parámetros cromatográficos que nos indican la adaptabilidad del sistema cromatográfico y nos permiten comprobar que el método y el sistema funciona apropiadamente y es adecuado para realizar esta determinación simultánea de los tres analitos. Los parámetros que fueron considerados para evaluar la adaptabilidad del sistema se resumen en la tabla 4.2

**TABLA 4.2** Datos de evaluación de la adaptabilidad del sistema

PARÁMETROS	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN	ACETAMINOFÉN		ACIDO ACETILSALICÍLICO		BROMHEXINA	
		MUESTRA	ESTANDAR	MUESTRA	ESTANDAR	MUESTRA	ESTANDAR
ÁREA	N/A	5863008.36	5984742.67	4149193.12	4642647.27	1303230.12	1357353.92
ALTURA	N/A	906751	844157	625576	622268	60556	59056

PLATOS TEORICOS	>2000	2.84 E+003	2.31E+003	4.463 E+003	3.767E+003	3.324E+003	3.139E+003
TAILING	≤ 1.8	1.433	1.539	1.349	1.434	1.738	1.772
FACTOR DE CAPACIDAD K	≤ 10	6.655	6.56	9.233	9.265	2.821	2.829
PURITY ANGLE	< Purity Threshold	0.542	0.216	0.091	0.082	0.067	0.059
PURITY THRESHOLD	> Purity Angle	1.505	1.006	1.512	1.013	1.542	1.042
RESOLUCIÓN	> 1.5	N/A	N/A	4.175	3.939	1.423E+001	1.36E+001

### 4.3.2 Linealidad

La linealidad se estableció en el intervalo completo del procedimiento analítico, como se indica en la figura 4.3.

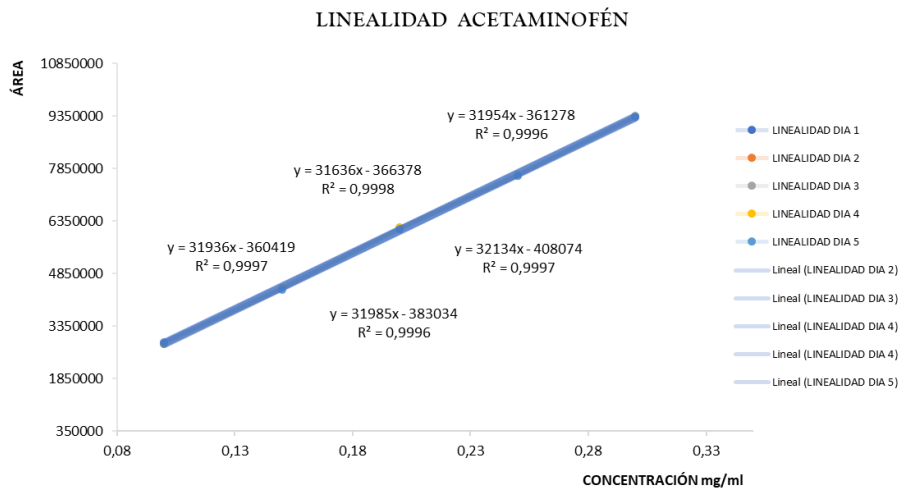
**TABLA 4.3 Concentración final teórica utilizada para linealidad del sistema**

PORCENTAJE %	CONCENTRACIÓN mg/ml
	Acetaminofén
	Ácido acetilsalicílico
	Bromhexina
50	0.10
75	0.15
100	0.20
125	0.25
150	0.30

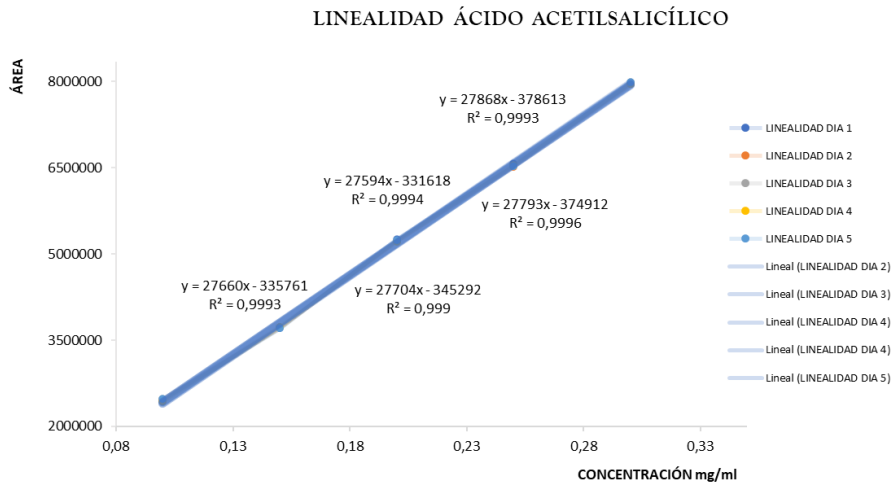
### Cálculo estadístico:

La curva de regresión se determinó sobre los puntos individuales por el método de los mínimos cuadrados, en el eje de las abscisas se coloca la concentración de los analitos y en el eje de las ordenadas la respuesta analítica que será el área. Los estimadores de regresión para un nivel de significación ( $\alpha=0.05$ ) fue el coeficiente de determinación, siendo para acetaminofén 0.9996, ácido acetilsalicílico 0.9990 y para bromhexina 0.9997; estos valores señalan el grado en el que la variable dependiente cambia de acuerdo a los cambios en la variable independiente siendo muy próximos a 1, como se puede observar en las figuras 4.21, 4.22 y 4.23; lo cual nos permite considerar que el método es lineal; se observa también una correlación lineal evaluada de manera visual y se confirma con el coeficiente de correlación lineal de Pearson, el cual para los tres principios activos fue mayor a 0.99, como se indica en las tablas 4.4; 4.5 y 4.6

Al realizar la comparación de las rectas de regresión de los tres analitos la probabilidad fue superior a 0.05, por lo tanto, con un nivel de confianza del 95% se puede decir que las curvas de regresión son paralelas, comparten el mismo origen y tienen la misma pendiente.

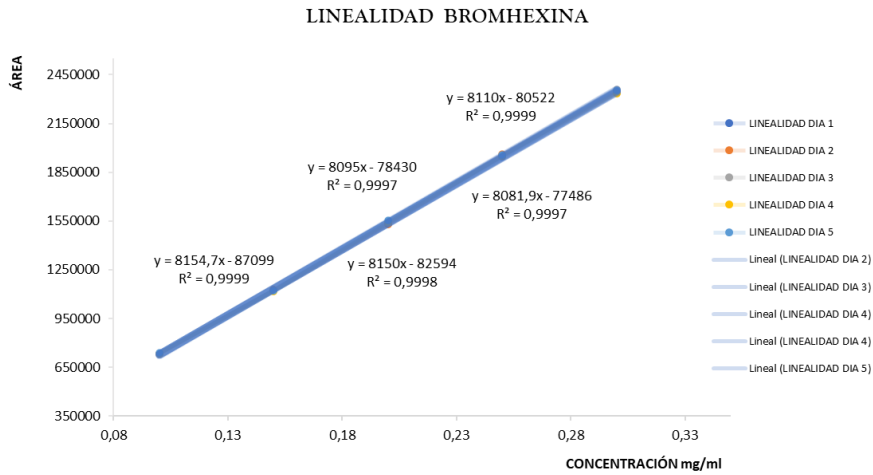


**Fig. 4.21** Curvas de regresión lineal para acetaminofén



**Fig.4.22** Curvas de regresión lineal para ácido acetilsalicílico





**Fig. 4.23** Curvas de regresión lineal para bromhexina

**TABLA 4.4** Comparación de valores estadísticos obtenidos de las curvas de calibración de acetaminofén

ACETAMINOFÉN	Pendiente	Ordenada al origen	Coefficiente de correlación lineal r	Coefficiente de determinación r <sup>2</sup>
Curva 1	31954.0779	-361278.26	0.9997	0.9996
Curva 2	31635.8629	-366378.31	0.9999	0.9998
Curva 3	31932.4170	-360419.27	0.9998	0.9997
Curva 4	32134.2604	-408073.628	0.9998	0.9997
Curva 5	31984.5280	-383034.13	0.9997	0.9996

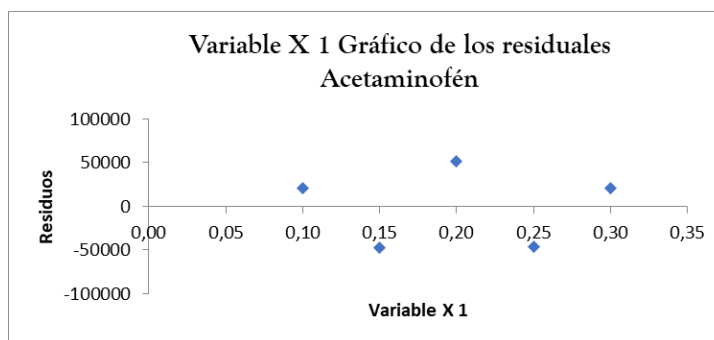
**TABLA 4.5** Comparación de valores estadísticos obtenidos de las curvas de calibración ácido acetilsalicílico

ÁCIDO ACETILSALICÍLICO	Pendiente	Ordenada al origen	Coefficiente de correlación lineal r	Coefficiente de determinación r <sup>2</sup>
Curva 1	27868.093	-378613.21	0.9996	0.9993
Curva 2	27594.1901	-331618.13	0.9996	0.9994
Curva 3	27659.549	-335761.35	0.9996	0.9993
Curva 4	27792.584	-374912.01	0.9997	0.9996
Curva 5	27704.391	-345292.47	0.9995	0.9990

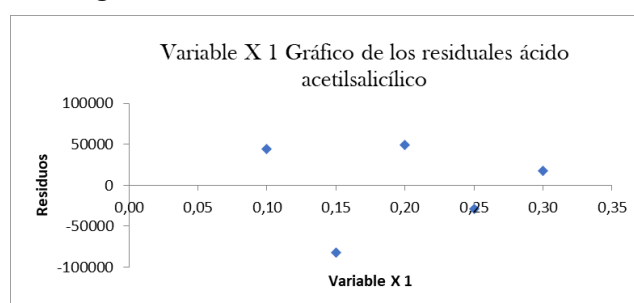
**TABLA 4.6 Comparación de valores estadísticos obtenidos de las curvas de calibración de bromhexina**

BROMHEXINA	Pendiente	Ordenada al origen	Coefficiente de correlación lineal r	Coefficiente de determinación r <sup>2</sup>
Curva 1	8110.84381	-80522.4448	0.9999	0.9999
Curva 2	8095.49413	-78429.569	0.9998	0.9997
Curva 3	8154.74196	-87098.7065	0.9999	0.9999
Curva 4	8081.94229	-77485.7786	0.9998	0.9997
Curva 5	8149.9902	-82594.147	0.9998	0.9998

Se realizó el análisis de varianza, con la finalidad de comparar las curvas de calibración; de los resultados obtenidos, se concluye que el valor que se obtuvo de F calculado para acetaminofén, ácido acetil salicílico y bromhexina es 2.82E-05, 3.41E-05 y 1.2E-04 respectivamente, son menores al valor de F crítico 2.866; esto indica que hay evidencia suficiente para concluir que las desviaciones estándar son iguales y que las curvas tienen el mismo error aleatorio, ya que t calculado es menor a t tabla, por lo cual se concluyó que las medias de las curvas de calibración de los tres analitos son estadísticamente iguales, con una probabilidad del 95% de certeza. Mediante el análisis de residuales de cada uno de los analitos en los estudios de linealidad nos permitió comparar si las suposiciones del modelo de regresión se cumplen, los cuales no muestran ninguna tendencia como se puede apreciar en las figuras 4.24; 4.25 y 4.26



**Fig. 4.24 Análisis de residuales de acetaminofén**



**Fig. 4.25 Análisis de residuales de ácido acetilsalicílico**

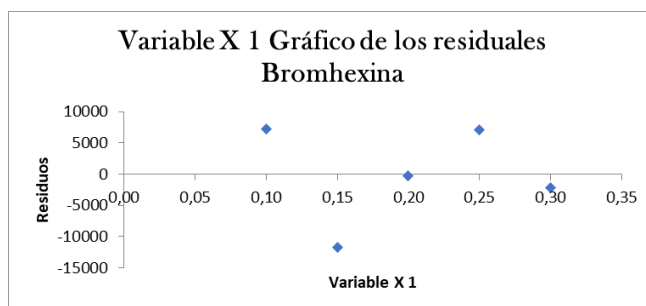


Fig. 4.26 Análisis de residuales de ácido acetilsalicílico

### 4.3.3 Efecto Matriz

Se evaluó que la matriz no distorsionó, aumentó o disminuyó la señal instrumental, en los tres analitos de interés mediante la construcción de 3 curvas de calibración tanto en solvente como en la matriz en 5 puntos en 3 días diferentes, para cada uno de los principios activos. Como se puede observar en el Anexo G.

Se obtuvo un  $r^2 \geq 0.99$  en los tres principios activos, y cuando se realizó análisis de varianza se evidenció que el F calculado es  $<$  que el F crítico, lo cual nos indicó que no hay diferencias significativas entre la curva con solvente y con la matriz. Como se resume en la tabla 4.7

**TABLA 4.7 Comparación de regresión lineal entre solvente y matriz para acetaminofén.**

ACETAMINOFÉN				
	PENDIENTE	COEFICIENTE DE DETERMINACION	VALOR CRÍTICO F	F
SOLVENTE	27390,072	0,9998	5,3176	0,00023
MATRIZ	27143,526	0,9997		
SOLVENTE	27506,724	0,9996		0,00001
MATRIZ	27111,198	0,9991		
SOLVENTE	29925,576	0,9991		0,00005
MATRIZ	29977,001	0,9989		

**TABLA 4.8 Comparación de regresión lineal entre solvente y matriz  
para ácido acetilsalicílico**

ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

		PENDIENTE	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	VALOR CRÍTICO F	F
CURVA 1	SOLVENTE	22766,822	0,9998	5,3176	0,00658
	MATRIZ	22581,203	0,9997		
CURVA 2	SOLVENTE	21823,392	0,9998		
	MATRIZ	21702,918	0,9997		
CURVA 3	SOLVENTE	24088,62	0,9997		
	MATRIZ	24253,74	0,9999		

**TABLA 4.9 Comparación de regresión lineal entre solvente y matriz  
para bromhexina**

BROMHEXINA

		PENDIENTE	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	VALOR CRÍTICO F	F
CURVA 1	SOLVENTE	5669,5257	0,9999	5,3176	0,00650
	MATRIZ	5655,7001	0,9998		
CURVA 2	SOLVENTE	6641,6026	0,9995		
	MATRIZ	6642,0220	0,9999		
CURVA 3	SOLVENTE	8191,7143	0,9991		
	MATRIZ	8168,4567	0,9996		

Mediante la prueba de t-student se compararon las medias de las curvas de calibración de las muestras con y sin placebo con la finalidad de determinar si entre esos parámetros las diferencias son estadísticamente diferentes, concluyendo que  $F$  calculado es  $< F$  crítico por lo cual se concluye que no son significativamente diferentes. Los  $t$  calculados son inferiores a los  $t$  críticos como se observa en el Anexo F.

#### 4.3.4 Límite de detección

Para acetaminofén fue de 0.0048 mg/ml.

Para ácido acetilsalicílico fue de 0.0052 mg/ml.

Para bromhexina fue de 0.0023 mg/ml.

Para los tres analitos fue inferior al límite de cuantificación.

#### **4.3.5 Límite de cuantificación**

Para acetaminofén fue de 0.0146 mg/ml.

Para ácido acetilsalicílico fue de 0.0157 mg/ml.

Para bromhexina fue de 0.0348 mg/ml.

Para los tres analitos fue inferior al 50% del valor medio.

#### **4.3.6 Exactitud**

La exactitud se evaluó mediante el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada en relación a la cantidad añadida a la muestra, las mismas que de acuerdo a la USP deben estar dentro del 90%-110% [1]. En la tabla 4.10 se resumen los resultados obtenidos.

Con la finalidad de conocer si la exactitud es aceptable, se realizó el test de “t” student para determinar si el valor medio hallado y el valor considerado verdadero no difieren significativamente para un grado de probabilidad determinado, para lo cual y se obtuvo el t calculado utilizando la formula:

$$t \text{ calc} = \frac{100 - \%R}{s \times \sqrt{n}} \quad [22]$$

En donde, el t calc es el t observado o calculado, % R es el porcentaje de recuperación, s es la desviación estándar de las lecturas del porcentaje de recuperación y n es el número de lecturas o valores observados.

**TABLA 4.10 Porcentaje de recuperación para acetaminofén, ácido acetilsalicílico y aspirina**

Nº	ACETAMINOFÉN			ÁCIDO ACETILSALICÍLICO			BROMHEXINA		
	NIVEL 1 5 mg/ml	NIVEL 2 10 mg/ml	NIVEL 3 15 mg/ml	NIVEL 1 5 mg/ml	NIVEL 2 10 mg/ml	NIVEL 3 15 mg/ml	NIVEL 1 5 mg/ml	NIVEL 2 10 mg/ml	NIVEL 3 15 mg/ml
1	100,48	100,29	100,21	99,78	100,31	100,30	99,92	99,98	100,34
2	100,56	99,90	99,90	99,92	100,10	99,91	100,30	100,20	100,40
3	101,19	99,99	99,69	99,90	100,65	100,16	100,02	100,39	99,24
4	100,31	100,14	99,71	100,07	100,44	100,20	99,42	99,74	100,43
5	100,14	99,20	99,76	100,12	100,13	100,81	100,14	100,73	100,87
6	100,30	99,30	99,52	100,20	99,93	100,77	100,15	100,02	100,56
7	101,22	99,30	100,25	100,61	100,23	100,90	99,31	100,26	100,09
8	101,93	98,96	99,20	99,68	100,58	99,38	100,28	99,38	99,82
9	100,10	99,56	99,47	100,00	100,44	100,25	100,25	100,60	100,96
10	100,36	100,36	99,39	100,57	100,19	100,58	100,66	100,40	100,43
11	99,57	98,70	99,71	100,42	100,12	100,61	100,75	100,29	100,78
12	99,93	98,76	99,62	100,11	100,76	100,58	100,36	100,52	100,35
13	100,03	99,06	99,56	100,39	99,95	100,24	100,17	100,90	100,37
14	100,15	99,58	99,81	99,91	99,96	100,29	99,88	100,24	100,96
15	100,33	99,08	100,13	100,02	99,61	100,56	100,95	100,23	100,42
MEDIA	100,44	99,48	99,73	100,11	100,23	100,37	100,17	100,26	100,40
ST. DESV	0,5925	0,5481	0,2981	0,2775	0,3103	0,3911	0,4419	0,3817	0,4489
Coef variac	0,0059	0,0055	0,0030	0,0028	0,0031	0,0039	0,0044	0,0038	0,0045
% RSD	0,5899	0,5510	0,2989	0,2772	0,3096	0,3897	0,4411	0,3807	0,4471
t calculado	<b>0,1921</b>	<b>0,2458</b>	<b>0,2342</b>	<b>0,1046</b>	<b>0,1887</b>	<b>0,2437</b>	<b>0,0989</b>	<b>0,1749</b>	<b>0,2309</b>

El t- student teórico para grados de libertad n-1 y porcentaje de seguridad (1- $\alpha$ ) para un error  $\alpha$  de 0.05, es decir un 95 % de confianza, es de 2.145. De esta manera, el t calculado es menor que el t crítico; lo que significa que no existen diferencias estadísticamente significativas.

#### 4.3.7 Repetibilidad

La precisión del método se estableció en términos de repetibilidad y el grado de precisión se calculó como la desviación estándar de los resultados que debe ser menor o igual a 2 de acuerdo a la USP [30]. Los resultados de repetibilidad se obtuvieron bajo las condiciones del mismo método, ítems de análisis idénticos comparado en material de referencia, en el mismo laboratorio, el mismo operador, el mismo equipo. Los resultados obtenidos se resumen en las tablas 4.11; 4.12 y 4.13, en las que se puede evidenciar que la desviación estándar es menor a 2.

Además, con la finalidad de saber si existen diferencias entre los valores obtenidos en cada grupo se realizó un análisis de varianza en Excel y se obtuvo el calor F calculado, que se comparó con el F tab y se evidencia así que al ser menor el F

calculado que el F crítico se concluye que no hay diferencias significativas en los resultados obtenidos en los 5 días de análisis en acetaminofén, ácido acetilsalicílico y bromhexina.

**TABLA 4.11 Resultados de repetibilidad para acetaminofén**

ACETAMINOFÉN							
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	F	Valor crítico para F
Concentración	%	%	%	%	%		
<b>0,5%</b>	0,502	0,503	0,506	0,502	0,506	2,375	3,478
	0,507	0,501	0,500	0,498	0,505		
	0,506	0,503	0,508	0,500	0,504		
Promedio	0,505	0,502	0,505	0,500	0,505		
Std. Dev	0,0026	0,0012	0,0042	0,0020	0,0010		
CV	0,0052	0,0023	0,0082	0,0040	0,0020		
%RSD	0,524	0,230	0,825	0,400	0,198		
<b>1,0%</b>	0,998	0,999	0,993	1,000	0,991	1,7405	
	0,999	0,992	0,990	0,987	0,996		
	1,000	0,993	0,993	0,988	0,991		
Promedio	0,999	0,995	0,992	0,992	0,993		
Std. Dev	0,0010	0,0038	0,0017	0,0072	0,0029		
CV	0,0010	0,0038	0,0017	0,0073	0,0029		
%RSD	0,100	0,381	0,175	0,729	0,291		
<b>1,5%</b>	1,503	1,496	1,510	1,490	1,493	0,3603	
	1,498	1,496	1,487	1,495	1,497		
	1,495	1,492	1,491	1,494	1,501		
Promedio	1,499	1,495	1,496	1,493	1,497		
Std. Dev	0,0040	0,0023	0,0123	0,0026	0,0040		
CV	0,0027	0,0015	0,0082	0,0018	0,0027		
%RSD	0,270	0,155	0,821	0,177	0,267		

**TABLA 4.12 Resultados de repetibilidad para ácido acetilsalicílico**

ÁCIDO ACETILSALICÍLICO							
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	F	Valor critico para F
	%	%	%	%	%		
<b>Concentración 0,5%</b>	0,499	0,505	0,501	0,504	0,499		
	0,500	0,508	0,498	0,504	0,502		
	0,499	0,499	0,500	0,500	0,500		
Promedio	0,499	0,504	0,500	0,503	0,500	1,984	
Std. Dev	0,0006	0,0046	0,0015	0,0023	0,0015		
CV	0,0012	0,0091	0,0031	0,0046	0,0031		
%RSD	0,116	0,909	0,306	0,459	0,305		
<b>Concentración 1,0%</b>	1,016	1,004	1,014	1,024	1,020		
	1,005	1,001	1,011	1,001	1,000		
	1,020	1,001	1,010	1,008	1,024	1,02	
Promedio	1,014	1,002	1,012	1,011	1,015		3,478
Std. Dev	0,0078	0,0017	0,0021	0,0118	0,0129		
CV	0,0077	0,0017	0,0021	0,0117	0,0127		
%RSD	0,766	0,173	0,206	1,166	1,267		
<b>Concentración 1,5%</b>	1,504	1,503	1,483	1,500	1,507		
	1,499	1,491	1,491	1,502	1,509		
	1,502	1,502	1,504	1,506	1,494	1,199	
Promedio	1,502	1,499	1,493	1,503	1,503		
Std. Dev	0,0025	0,0067	0,0106	0,0031	0,0081		
CV	0,0017	0,0044	0,0071	0,0020	0,0054		
%RSD	0,168	0,444	0,710	0,203	0,542		



**TABLA 4.13 Resultados de repetibilidad para bromhexina**

BROMHEXINA							
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	F	Valor critico para F
Concentración	%	%	%	%	%		
0,5%	0,500	0,499	0,500	0,503	0,502		
	0,502	0,501	0,498	0,498	0,499		
	0,502	0,501	0,497	0,502	0,501		
Promedio	0,501	0,500	0,498	0,501	0,501	1,453	
Std. Dev	0,0012	0,0012	0,0015	0,0026	0,0015		
CV	0,0023	0,0023	0,0031	0,0053	0,0031		
%RSD	0,230	0,231	0,307	0,528	0,305		
Concentración	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5		
1,0%	%	%	%	%	%		
	1,000	1,003	1,008	0,993	1,009		
	1,001	1,007	0,988	1,003	1,003		
	1,007	1,000	0,989	1,006	1,002	1,004	
Promedio	1,003	1,003	0,995	1,001	1,005		3,478
Std. Dev	0,0038	0,0035	0,0113	0,0068	0,0038		
CV	0,0038	0,0035	0,0113	0,0068	0,0038		
%RSD	0,378	0,350	1,133	0,680	0,377		
Concentración	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5		
1,5%	%	%	%	%	%		
	1,499	1,493	1,492	1,498	1,506		
	1,506	1,495	1,497	1,506	1,498		
	1,483	1,502	1,500	1,505	1,488	0,4574	
Promedio	1,496	1,497	1,496	1,503	1,497		
Std. Dev	0,0118	0,0047	0,0040	0,0044	0,0090		
CV	0,0079	0,0032	0,0027	0,0029	0,0060		
%RSD	0,788	0,316	0,270	0,290	0,602		

#### 4.3.8 Robustez

Con la finalidad de conocer si el método analítico se ve afectado por pequeñas variaciones en los parámetros del método, se establecieron condiciones analíticas que podrían afectar al método y estas fueron: cambio en el volumen de inyección, cambio de longitud de onda, variación en el pH de la fase móvil, cambio en el solvente orgánico de la fase móvil y cambio en el solvente orgánico del solvente en el que se preparan las muestras.

Para esta determinación se aplica el test Youden y Steiner, el mismo que nos permitirá evaluar el efecto de 5 variables con 8 análisis de las muestras, cuyo esquema se resume en la tabla 4.14

**TABLA 4.14 Esquema Youden y Steiner establecido para análisis de robustez**

Valor de la condición variable	ANÁLISIS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A: Volumen de inyección 15 µl	A	A	A	A	a	a	a	a
a: Volumen de inyección 5 µl								
B: Cuantificar a 240 nm	B	B	b	b	B	B	b	b
b: Cuantificar a 230 nm								
C: pH4 solución TEA	C	c	C	c	C	c	C	c
c: pH2 solución TEA								
D: 45% ACN en fase móvil	D	D	d	d	d	d	D	D
d: 35% ACN en fase móvil								
E: 45% ACN en solvente muestra	E	e	E	e	e	E	e	E
e: 35% ACN en solvente de la muestra								
<b>RESULTADOS</b>	<b>s</b>	<b>t</b>	<b>u</b>	<b>v</b>	<b>w</b>	<b>x</b>	<b>y</b>	<b>z</b>

Los resultados de los efectos de cada una de las variables se calcularon con la media de los cuatro análisis que contienen la variable mayúscula (ensayo original) y aquellas que corresponden al valor en la variable minúscula (ensayo modificado) y se comparó con la desviación estándar de los resultados s a z. La expresión matemática es la siguiente:

$$A - a = V_A = \frac{1}{4} (s + t + u + v) - \frac{1}{4} (w + x + y + z)$$

$$B - b = V_B = \frac{1}{4} (s + t + w + x) - \frac{1}{4} (u + v + y + z)$$

$$C - c = V_C = \frac{1}{4} (s + u + w + y) - \frac{1}{4} (t + v + x + z)$$

$$D - d = V_D = \frac{1}{4} (s + t + y + z) - \frac{1}{4} (u + v + w + x)$$

$$E - e = V_E = \frac{1}{4} (s + t + x + z) - \frac{1}{4} (t + v + w + y)$$

**TABLA 4.15 Resultados de ensayo de robustez**

Variable	Valor alto	Valor bajo	ANÁLISIS							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Volumen de inyección (µl)	15	5	15	15	15	15	5	5	5	5
Longitud de onda (nm)	240	220	240	240	220	220	240	240	220	220
pH solución TEA	4	2	4	2	4	2	4	2	4	2
Variación ACN en fase móvil	45	35	45	45	35	35	35	35	45	45
Variación ACN en solvente muestra	45	35	45	35	45	35	35	45	35	45

RESULTADOS %		s	t	u	v	w	x	y	z
	Acetaminofén	1.0588	1.0480	1.0634	1.0442	1.0434	1.0490	1.0448	1.0442
Ácido acetilsalicílico	0.9954	1.0036	0.7760	0.7852	0.7680	0.8010	0.9764	1.0106	
Bromhexina	1.0044	1.0092	0.8176	0.8182	0.7950	0.7934	1.0022	0.972	

En la tabla 4.15 se aprecian las diferencias de cada una de las variables que se obtuvo mediante calculo, y, con la media de los cuatro análisis que contienen la variable del método superior en mayúscula y aquellas que tienen el valor inferior en minúscula. Se calculó así las 5 comparaciones posibles, por la diferencia entre la variable en mayúscula versus la minúscula. De esta manera, cuanto mayor es la diferencia de los resultados entre el valor de las mayúsculas y el valor de las minúsculas, mayor influencia tendrá dicha variable en el método analítico. Se tomo como criterio de aceptación de la robustez lo siguiente:  $(X - x) < \sqrt{2}S$ , en donde la diferencia entre el valor mayúsculas y el valor minúsculas sea menor a menos a la desviación estándar del método. En las tablas se muestran los resultados para cada uno de los analitos de interés.

**TABLA 4.16 Resultados prueba de robustez de Youden y Steiner para acetaminofén**

ACETAMINOFÉN					
Variable		Resultados			Comparación
Valor Alto	Valor bajo	Promedio	Promedio	Diferencia	
X	x	X	x	X - x	
A	a	1,0536	1,0454	0,0083	No sensible al cambio
B	b	1,0498	1,0492	0,0006	No sensible al cambio
C	c	1,0526	1,0464	0,0063	No sensible al cambio
D	d	1,0490	1,0514	-0,0025	No sensible al cambio
E	e	1,0539	1,0465	0,0074	No sensible al cambio
<b>Media</b>				1,0495	
<b>S</b>				0,0075	
<b>FACTOR DE COMPARACIÓN:</b>				$Sx\sqrt{2}$	<b>0,0107</b>

En la tabla 4.16 se muestran los resultados de la comparación del método con las modificaciones analíticas para Acetaminofén, en la que se puede apreciar que ninguna de estas variaciones afecta al método ya que todos los resultados tienen valores inferiores a 0.017 que es el factor de comparación. Concluyendo que el método es robusto para acetaminofén.

**TABLA 4.17 Resultados prueba de robustez de Youden y Steiner para ácido acetilsalicílico**

<b>ÁCIDO ACETILSALICÍLICO</b>					
<b>Variable</b>		<b>Resultados</b>			<b>Comparación</b>
<b>Valor Alto</b>	<b>Valor bajo</b>	<b>Promedio</b>	<b>Promedio</b>	<b>Diferencia</b>	
<b>X</b>	<b>x</b>	<b>X</b>	<b>x</b>	<b>X - x</b>	
<b>A</b>	<b>a</b>	0,8901	0,8890	0,0011	No sensible al cambio
<b>B</b>	<b>b</b>	0,8920	0,8871	0,0050	No sensible al cambio
<b>C</b>	<b>c</b>	0,8790	0,9001	-0,0212	No sensible al cambio
<b>D</b>	<b>d</b>	0,9965	0,7826	0,2140	Sensible al cambio
<b>E</b>	<b>e</b>	0,8958	0,8833	0,0125	No sensible al cambio
<b>Media</b>				0,8895	
<b>S</b>				0,1151	
<b>FACTOR DE COMPARACIÓN: <math>Sx\sqrt{2}</math></b>				<b>0,1628</b>	

En la tabla 4.17 se observan los resultados de robustez para ácido acetilsalicílico frente a modificaciones en el método, y se puede concluir que el método es sensible a este cambio para este analito cuando se realiza un cambio en la proporción de la fase orgánica acetonitrilo en la fase móvil, ya que no se pudo realizar la cuantificación del mismo por superposición con otros picos presente en la matriz y se evidencia estadísticamente porque nos dio un resultado superior a 0.168 que es el factor de comparación. Para el resto de las modificaciones que se realizó en el método no existió variación alguna.

**TABLA 4.18 Tabla resultados prueba de robustez de Youden y Steiner para bromhexina**

<b>BROMHEXINA</b>					
<b>Variable</b>		<b>Resultados</b>			<b>Comparación</b>
<b>Valor Alto</b>	<b>Valor bajo</b>	<b>Promedio</b>	<b>Promedio</b>	<b>Diferencia</b>	
<b>X</b>	<b>x</b>	<b>X</b>	<b>x</b>	<b>X - x</b>	
<b>A</b>	<b>a</b>	0,9124	0,8970	0,0154	No sensible al cambio
<b>B</b>	<b>b</b>	0,9005	0,9088	-0,0083	No sensible al cambio
<b>C</b>	<b>c</b>	0,9048	0,9045	0,0003	No sensible al cambio
<b>D</b>	<b>d</b>	1,0033	0,8061	0,1972	Sensible al cambio
<b>E</b>	<b>e</b>	0,9032	0,9062	-0,0030	No sensible al cambio
		<b>Media</b>		0,9047	
		<b>S</b>		0,1058	
<b>FACTOR DE COMPARACIÓN:</b>		$Sx\sqrt{2}$		<b>0,1497</b>	

En la tabla 4.18 se observan los resultados de robustez para bromhexina en los cuales se aprecia que el método no es robusto cuando se realiza un incremento en la fase orgánica de la fase móvil, por superposición de picos de la matriz y se evidencia estadísticamente porque presenta un valor superior a 0.1497 que es el factor de comparación. Para el resto de modificaciones a las que se sometió al método no existió variación.

## CAPÍTULO 5

### 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 CONCLUSIONES

Se desarrolló un método que permite el análisis simultáneo de acetaminofén, ácido acetilsalicílico, bromhexina en solución oral.

Se demostró mediante validación que el método cumple con los requisitos establecidos en la guía ICH Q2 (R2) y que es específico, lineal, exacto y preciso.

El método permite la determinación cualitativa y cuantitativa simultánea de los tres principios activos de manera efectiva, rápida, con corto tiempo de análisis, de manera que el método puede ser utilizado en análisis de rutina y brindar resultados de una manera ágil.

Parámetros	Objetivos	Resultados
<b><u>ESPECIFICIDAD</u></b>		
No hay interferencia cromatográfica con los analitos de estudio entre ellos o con otras interferencias.	Específico	No hay respuesta cromatográfica que interfiera con los analitos de interés.
	Resolución $\geq 1,5$	Cumple
<b><u>LINEALIDAD</u></b>		
Coeficiente de correlación $\geq 0,99$	Mínimo: 0.99	r acetaminofén: 0.9998
		r ácido acetilsalicílico: 0.9997
		r bromhexina: 0.9997
Análisis residuales	Aleatoriedad	Aleatorio
F cal < F Crítico $\alpha=0,05$	F crítico < 2,866	Acetaminofén: $2,82E-05 < 2,866$ Ácido acetilsalicílico: $3,41E-05 < 2,866$ Bromhexina: $1,2E-04 < 2,866$
<b><u>EFEECTO MATRIZ</u></b>		
Pendientes similares entre placebo y matriz	t cal < t crítico $\alpha=0,05$	T crítico: 2,776 t cal acetaminofén: 0,55 t cal ácido acetilsalicílico: 0,14 t cal bromhexina: 0,23
F cal < F crítico	F crítico: 5.3176	F cal acetaminofén: 0.00009 F cal ácido acetilsalicílico: 0.00366 F cal bromhexina: 0.00298
<b><u>EXACTITUD</u></b>		
Porcentaje de recuperación	90-110%	Acetaminofén: 99.95% Ácido acetilsalicílico: 100.20% Bromhexina: 100.25%
<b><u>PRECISIÓN</u></b> (Repetibilidad, precisión intermedia).		
Desviación estándar relativa (RSD)	Menor 2%	Acetaminofén: 0.369% Ácido acetilsalicílico: 0.516% Bromhexina: 0.452%
<b><u>ROBUSTEZ</u></b>		
Verificación del desempeño del método en 8 muestras y mínimo 5 variaciones	Verificar el desempeño del método para los 3 analitos	Acetaminofén: Robusto en 5 variaciones Ácido acetilsalicílico: Robusto en 4 Bromhexina: Robusto en 4 parámetros

## **5.2 RECOMENDACIONES**

Evaluar si el método puede ser usado para identificación y cuantificación de degradantes.

El estudio del parámetro de robustez, permite recomendar que la proporción de fase móvil debe ser fija.

## 6. REFERENCIAS

- [1] USP United States Pharmacopeia @2023 USPC, “Acetaminofeno y aspirina tabletas”, 2023. doi: [En línea]. Disponible [https://doi.org/10.31003/USPNF\\_M230\\_01\\_02](https://doi.org/10.31003/USPNF_M230_01_02).
- [2] R.M. Kamble et al., “Validated RP-HPLC method for simultaneous estimation of paracetamol and tramadol hydrochloride in a commercial tablet”, *J Pharm Res*, vol. 4, núm. 11, pp. 4038–4040, jul. 2011, doi: [En línea]. Disponible: <https://www.researchgate.net/publication/282356554>.
- [3] S.R. Pattan et al, “RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Paracetamol and Etoricoxib from Bulk and Tablets”, *J Chem Pharm Res*, vol. 1, núm. 1, pp. 329–335, ene. 2009, doi: [En línea]. Disponible: <https://www.researchgate.net/publication/268359453>.
- [4] B. G. Tsvetkova et al., “Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous determination of paracetamol and ibuprofen in fixed dose combinations”, *Int. J Pharm Sci Rev Res*, vol. 16, núm. 1, pp. 13–16, oct. 2012, doi: [En línea]. Disponible: <https://www.researchgate.net/publication/232261699>.
- [5] *British Pharmacopoeia. Monographs: Medicinal and Pharmaceutical Substances*, Volume I & II. London, United Kingdom 2009, “Bromhexine Hydrochloride” pp. 770-773.
- [6] Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) “Bromhexina Clorhidrato”. México, 2020, pp.1288.
- [7] J. P. Rauha, H. Salomies, y M. Aalto, “Simultaneous determination of bromhexine hydrochloride and methyl and propyl p-hydroxybenzoate and determination of dextromethorphan hydrobromide in cough-cold syrup by high-performance liquid chromatography”, *Journal o Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 15, núm. 2, pp. 287–293, nov. 1996, doi: [En línea].



Disponible: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8933431/>.

- [8] S. Navarrete, "Validación de un método de análisis cuantitativo de Bromhexina tabletas por HPLC", Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León, Nicaragua, 2000.
- [9] V. Jain y M. C. Sharma, "Validated RP-HPLC method for determining the leves of bromhexine HCl, clorpheniramine maleate, dextromethorphan HBr and guaiphenesin in their pharmaceutical dosage forms", *Journal of Taibah Univesity Science.*, vol. 10, núm. 1, pp. 38–45, doi: [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2015.02.019>.
- [10] L. V. Sonawane y S. B. Bari., "Development and Validation of RP-HPLC Method for the simultaneous estimation of amoxicilina trihidrato y bromhexina hydrochloride from oily suspension.", *Pharm Anal Acta*, vol. 1, núm. 2, pp. 1–6, 2010, doi: [En línea]. Disponible: 10.4172/2153-2435.1000107.
- [11] J. L. Vila Jato, Ed., *Tecnología farmacéutica Volumen I, "Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas"*, vol. 1. Madrid, España: Editorial Síntesis S.A, 2001.
- [12] S. E. Bustamante, "*Vías de Administración de Fármacos*", 1a ed., vol. 1. Universidad de Chile: Editorial del Cardo, 2003.
- [13] J. De Pedro, "Formas Farmacéuticas en Veterinaria", *Revista de Farmacia Profesional*, vol. 19, núm. 2, pp. 74–77, feb. 2005, doi: [En línea]. Disponible: <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-formas-farmaceuticas-veterinaria-i--13072123>.
- [14] L. Villafuerte, "Los excipientes y su funcionalidad en productos farmacéuticos sólidos", *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional de México, México, pp. 1–19, marzo de 2011. doi: [En línea]. Disponible: <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v42n1/v42n1a3.pdf>.
- [15] E. Goldstein, J. Monzón, y N. Barcos, "Ingredientes farmacéuticos activos.

- Oportunidades para su desarrollo, producción y exportación”, jul. 2022. doi:  
[En línea].  
Disponible:[https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2021/03/29\\_-\\_ingredientes\\_farmaceuticos\\_activos\\_-\\_arg\\_productiva.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2021/03/29_-_ingredientes_farmaceuticos_activos_-_arg_productiva.pdf).
- [16] A. Y. Cárdenas, P. S. García, y F. U. Corona, “Administración de medicamentos”, en Manual de conocimientos básicos de farmacología, 1a ed., vol. 1, Guadalajara, México: Universidad de Guadalajara 2015, cap. 5, pp. 41–62.
- [17] D. A. Skoog, F. J. Holler, y S. R. Crouch, Principios de análisis instrumental, Sexta Edición. Santa Fé, México, 2008.
- [18] D. A. Skoog et al., “Fundamentos de Química Analítica”, Novena edición. Santa Fe, México, 2014.
- [19] A. García de Marina y D. J. Yusá, “HPLC instrumental”, 3ª edición. Valencia, España, 2016.
- [20] WHO/VSQ/97.02, “Guía de la OMS sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación (PAF)”, Ginebra, Suiza, 1998.
- [21] Erolab España P.P. Morillas y colaboradores, Guía Eurachem: “La adecuación al uso de los métodos analíticos - Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados”, (1ª ed. 2016). [En línea]. Disponible en [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org).
- [22] “Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos”, Instituto de Salud Pública Chile. Santiago, Chile 2010, pp. 1–70, diciembre de 2010.
- [23] “International Committee for Harmonization, ICH. "Validation of analytical procedures Q2(R2)". 22 March 2022. [En línea]. Disponible: [https://database.ich.org/sites/default/files/ICH\\_Q2-R2\\_Document\\_Step2\\_Guideline\\_2022\\_0324.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q2-R2_Document_Step2_Guideline_2022_0324.pdf)”, 2022.

- [24] Goodman y Gilman, “Las bases farmacológicas de la Terapéutica”, Undécima. Colombia: McGRAW-HILL Interamericana editores S.A., 2007.
- [25] “Fichas Internacionales de Seguridad Química (ICSCs)”.
- [26] R. E. Joya, “Un medicamento ancestral: ácido acetilsalicílico (Aspirina)”, *Revista Mexicana de Urología*, pp. 197–198, 2010.
- [27] “National Center for Biotechnology Information (2023) PubChem Compound Summary”.
- [28] A. J. M. A. Flórez J, “Farmacología humana”, 3ª edición. Barcelona, España: MASSON S.A.
- [29] L. C. Anzola, “Fundamentos básicos de Farmacología”, vol. 2a. edición. Bogotá, 2013.
- [30] United States Pharmacopeial Convention. “Farmacopea de los Estados Unidos de América: USP-NF 2021”. Rockville, Md.: United States Pharmacopeial Convention.

## 7. APÉNDICES Y ANEXOS

### Apéndice A Standard acetaminofén



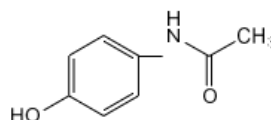
www.sigmaaldrich.com

## Certificate of Analysis – Certified Reference Material

### ACETAMINOPHEN


(Paracetamol)

**Product no.:** PHR1005-1G  
**Lot no.:** LRAC6466  
**Description of CRM:** White Powder  
**Expiry date:** 30 September 2024  
**Storage:** Room Temperature, Protect from Light  
**Certificate version:** LRAC6466.02 (Note: Certificates may be updated due to Pharmacopeial Lot Changes or the availability of new data. Check our website at: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) for the most current version.)  
**Chemical formula:** C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>  
**Molecular mass:** 151.16  
**CAS No.:** 103-90-2

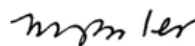


Analyte	Certified Purity ± associated uncertainty $U$ , $U = k \cdot u$ ( $k =$ ) (Mass Balance/ basis)
Acetaminophen	99.98 % $U_{CRM} = \pm 0.3$ %, $k = 2.0$ (as is basis)

**Metrological traceability:** Traceable to the SI and higher order standards from NIST through an unbroken chain of comparisons. Additional traceability to Primary Standards is established through comparative assay determinations. See "Details on metrological traceability" on page 2.  
**Measurement method:** Where applicable, the certified value is based on a purity determination by mass balance. See "Certification process details" on page 3.  
**Intended use:** Intended for R&D and Analytical Use only. Not for drug, household or other uses.  
**Minimum sample size:** 10 mg  
**Instructions for handling and correct use:** Do not dry, use on the as is basis. The internal pressure of the container may be slightly different from the atmospheric pressure at the user's location. Open slowly and carefully to avoid dispersion of the material. Attachment of a 20 mm aluminum crimp seal recommended for unused portions.  
**Health and safety information:** All chemical reference materials should be considered potentially hazardous and should be used only by qualified laboratory personnel. Please refer to the Safety Data Sheet for detailed information about the nature of any hazard and appropriate precautions to be taken.  
**Accreditation:** Sigma-Aldrich RTC is accredited by the US accreditation authority ANAB as a registered reference material producer AR-1470 in accordance with ISO 17034.  
**Certificate issue date:** 19 April 2021

[Andy Ommen; Quality Control]



[Mark Pooler; Quality Assurance]

Sigma-Aldrich RTC, 2931 Soldier Springs Rd. Laramie, WY 82070, USA;  
 Tel. 1 307-742-5452; Fax 1 307-855-831-9211; [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)  
 Sigma-Aldrich RTC is a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.



Certificate Page 1 of 7

Certificate version 02

## Apéndice B Standard ácido acetilsalicílico

Supelco®

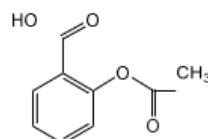
www.sigmaaldrich.com

### Certificate of Analysis – Certified Reference Material

#### ASPIRIN

(Acetylsalicylic Acid)

**Product no.:** PHR1003-1G  
**Lot no.:** LRAC6517  
**Description of CRM:** White Powder  
**Expiry date:** 31 October 2024  
**Storage:** Room Temperature  
**Certificate version:** LRAC6517.03 (Note: Certificates may be updated due to Pharmacopeial Lot Changes or the availability of new data. Check our website at: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) for the most current version.)  
**Chemical formula:** C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>  
**Molecular mass:** 180.16  
**CAS No.:** 50-78-2



Analyte	Certified Purity ± associated uncertainty $U$ , $U = k \cdot u$ ( $k=$ ) (Mass Balance/basis)
Aspirin	99.9 % U <sub>CRM</sub> = ± 0.1 %, k = 2.0 (as is basis)

**Metrological traceability:** Traceable to the SI and higher order standards from NIST through an unbroken chain of comparisons. Additional traceability to Primary Standards is established through comparative assay determinations. See "Details on metrological traceability" on page 2.

**Measurement method:** Where applicable, the certified value is based on a purity determination by mass balance. See "Certification process details" on page 3.

**Intended use:** Intended for R&D and Analytical Use only. Not for drug, household or other uses

**Minimum sample size:** 25 mg

**Instructions for handling and correct use:** Do not dry, use on the as is basis. The internal pressure of the container may be slightly different from the atmospheric pressure at the user's location. Open slowly and carefully to avoid dispersion of the material. Attachment of a 20 mm aluminum crimp seal recommended for unused portions.

**Health and safety information:** All chemical reference materials should be considered potentially hazardous and should be used only by qualified laboratory personnel. Please refer to the Safety Data Sheet for detailed information about the nature of any hazard and appropriate precautions to be taken.

**Accreditation:** Sigma-Aldrich RTC is accredited by the US accreditation authority ANAB as a registered reference material producer AR-1470 in accordance with ISO 17034.

**Certificate issue date:** 12 April 2022



*Andy Ommen*

[Andy Ommen; Quality Control]

*Mark Pooler*

[Mark Pooler; Quality Assurance]

Sigma-Aldrich RTC, 2931 Soldier Springs Rd. Laramie, WY 82070, USA;  
 Tel. 1 307-742-5452; Fax 1 307-855-831-9211; [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)  
 Sigma-Aldrich RTC is a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.



Certificate Page 1 of 6

Certificate version 03

## Apéndice C Standard ácido acetilsalicílico

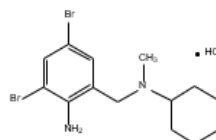
Supelco®

www.sigmaldrich.com

### Certificate of Analysis – Certified Reference Material

#### BROMHEXINE HYDROCHLORIDE

**Product no.:** PHR1831-200MG  
**Lot no.:** LRAD0575  
**Description of CRM:** White powder  
**Expiry date:** 30 November 2025  
**Storage:** Refrigerator  
**Certificate version:** LRAD0575.01 (Note: Certificates may be updated due to Pharmacopeial Lot Changes or the availability of new data. Check our website at: [www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com) for the most current version.)  
**Chemical formula:**  $C_{14}H_{21}Br_2ClN_2$   
**Molecular mass:** 412.6  
**CAS No.:** 611-75-6



Analyte	Certified Purity ± associated uncertainty $U$ , $U=k \cdot u$ ( $k=$ ) (Mass Balance/basis)
Bromhexine HCl	99.8 % $U_{CRM} = \pm 0.5 \%$ , $k = 2.0$ (as is basis)

**Metrological traceability:** Traceable to the SI and higher order standards from NIST through an unbroken chain of comparisons. Additional traceability to Primary Standards is established through comparative assay determinations. See "Details on metrological traceability" on page 2.

**Measurement method:** Where applicable, the certified value is based on a purity determination by mass balance. See "Certification process details" on page 3.

**Intended use:** Intended for R&D and Analytical Use only. Not for drug, household or other uses

**Minimum sample size:** 25 mg

**Instructions for handling and correct use:** Do not dry, use on the as is basis. The internal pressure of the container may be slightly different from the atmospheric pressure at the user's location. Open slowly and carefully to avoid dispersion of the material. Attachment of a 20 mm aluminum crimp seal recommended for unused portions.

**Health and safety information:** All chemical reference materials should be considered potentially hazardous and should be used only by qualified laboratory personnel. Please refer to the Safety Data Sheet for detailed information about the nature of any hazard and appropriate precautions to be taken.

**Accreditation:** Sigma-Aldrich RTC is accredited by the US accreditation authority ANAB as a registered reference material producer AR-1470 in accordance with ISO 17034.

**Certificate issue date:** 15 November 2021



*[Signature]*

[Andy Ommen; Quality Control]

*[Signature]*

Shawn Stetler- QA Manager

Sigma-Aldrich RTC, 2931 Soldier Springs Rd, Laramie, WY 82070, USA;  
 Tel: 1 307-742-5452; Fax 1 307-855-831-9211; [www.sigmaldrich.com](http://www.sigmaldrich.com)  
 Sigma-Aldrich RTC is a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

Certificate Page 1 of 5

Certificate version 01



## Apéndice D Certificado analítico de Acetonitrilo



### Certificate of Analysis

1.00030.4000 Acetonitrile gradient grade for liquid chromatography LiChrosolv®  
Reag. Ph Eur  
Batch 11223530

	Batch Values	
Purity (GC)	≥ 99.9	%
Identity (IR)	conforms	
Evaporation residue	≤ 2.0	mg/l
Water	≤ 0.02	%
Color	≤ 10	Hazen
Density (d 20 °C/20 °C)	0.78	
Refractive index (n 20/D)	1.344	
Boiling range (80-82°C)	≥ 95	% (v/v)
Acidity	≤ 0.0002	meq/g
Alkalinity	≤ 0.0002	meq/g
Gradient grade (at 210 nm)	0.1	mAU
Gradient grade (at 254 nm)	0.1	mAU
Fluorescence (as quinine at 254 nm)	0.1	ppb
Fluorescence (as quinine at 365 nm)	0.1	ppb
Transmission (at 193 nm)	75	%
Transmission (at 195 nm)	88	%
Transmission (from 230 nm)	≥ 98	%

Filtered by 0.2 µm filter.

Suitable for UPLC / UHPLC / Ultra HPLC - instruments.

Conforms to Acetonitrile for chromatography and Acetonitrile R1 according to Reag.Ph Eur;  
conforms to the requirements of ACS for liquid chromatography suitability.

Date of release (DD.MM.YYYY) 03.08.2022

Minimum shelf life (DD.MM.YYYY) 31.08.2025

# Apéndice E Certificado analítico de Ácido fosfórico



## Certificate of Analysis

1 Reagent Lane  
Fair Lawn, NJ 07410  
201.796.7100 tel  
201.796.1329 fax

Thermo Fisher Scientific's Quality System has been found to conform to Quality Management System  
Standard ISO9001:2015 by SAI Global Certificate Number CERT – 0120633

This is to certify that units of the lot number below were tested and found to comply with the specifications of the grade listed. Certain data have been supplied by third parties. Thermo Fisher Scientific expressly disclaims all warranties, expressed or implied, including the implied warranties of merchantability and fitness for a particular purpose. Products are for research use or further manufacturing. Not for direct administration to humans or animals. It is the responsibility of the final formulator and end user to determine suitability based upon the intended use of the end product. Products are tested to meet the analytical requirements of the noted grade. The following information is the actual analytical results obtained.


Catalog Number	A242	Quality Test / Release Date	10/28/2022
Lot Number	224168		
Description	O-PHOSPHORIC ACID, ACS		
Country of Origin	China	Suggested Retest Date	Oct/2027
Chemical Origin	Inorganic-non animal		
BSE/TSE Comment	No animal products are used as starting raw material ingredients, or used in processing, including lubricants, processing aids, or any other material that might migrate to the finished product.		

N/A			
Result Name	Units	Specifications	Test Value
APPEARANCE		REPORT	Clear, colorless liquid.
ANTIMONY (Sb)	%	<= 0.002	<0.002
ARSENIC (As)	ppm	<= 0.5	<0.5
ASSAY	w/w %	>= 85.0	85.45
CALCIUM	%	<= 0.002	<0.002
CHLORIDE	ppm	<= 3	<3
COLOR	APHA	<= 10	1
HEAVY METALS (as Pb)	%	<= 0.001	<0.001
IDENTIFICATION	PASS/FAIL	= PASS TEST	PASS TEST
INSOLUBLE MATTER	%	<= 0.001	<0.001
IRON (Fe)	%	<= 0.003	<0.003
MAGNESIUM	%	<= 0.002	<0.002
MANGANESE (Mn)	ppm	<= 0.5	<0.5
NITRATE (NO3)	ppm	<= 5	<5
PHOSPHOROUS & HYPOPHOSPHOROUS ACID	PASS/FAIL	= PASS TEST	PASS TEST
POTASSIUM (K)	%	<= 0.005	<0.005
REACTION WITH H2SO4	PASS/FAIL	= PASS TEST	PASS TEST
REDUCING SUBSTANCES	PASS/FAIL	= PASS TEST	PASS TEST
SODIUM (Na)	%	<= 0.025	<0.025
SULFATE (SO4)	%	<= 0.001	<0.001
VOLATILE ACIDS	%	<= 0.001	<0.001

Note: The data listed is valid for all package sizes of this lot of this product, expressed as an extension of this catalog number listed above.



## Apéndice F Certificado analítico de Trietilamina

 <p><b>SISCO RESEARCH LABORATORIES PVT. LTD.</b> www.srlchem.com</p>	<h3>Certificate of Analysis</h3>	
<b>Product</b>  <b>Batch No</b> <b>Analysis Date</b> <b>Date of Manufacture</b> <b>Expiry Date/Re-Test Date</b> <b>Molecular Formula</b> <b>Molecular Weight</b>	<b>95205 - Triethylamine extrapure AR, ExiPlus, Multi-Compendial, 99.5% - [121-44-8]</b>  <b>8013902</b> 28-Dec-2021 December 2021 December 2026 C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N 101.19	
<b>Test Parameters</b>	<b>Standards</b>	<b>Actual Results</b>
ExiPlus	meets compendial specs of USP, BP, Ph Eur	Complies
Appearance (Clarity)	Clear	Clear
Appearance (Colour)	Colourless	Colourless
Appearance (Form)	Liquid	Liquid
Miscibility in Ethanol (96%)	Clear, colourless	Clear, colourless
Assay (GC)	min. 99.5%	99.90%
Density (g/ml) @ 20°C	0.726-0.728	0.726
Refractive Index (20°C)	1.400-1.402	1.400
Boiling Range	88-90°C	88-90°C
Non Volatile Matter	max. 0.003%	0.0001%
Iron (Fe)	max. 0.0001%	Passes
Heavy Metals (Pb)	max. 0.0001%	Passes
Copper (Cu)	max. 0.00001%	Passes
Water (KF)	max. 0.1%	0.04%
Absorbance (A) of 6% in dilute H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		-
@250 nm	max. 0.04	0.0244
FRW82/11/295205 Rev No. 1 Date 01/11/2015	Prepared by: SudhanPatil	
In compliance with the standard specifications of SRL	Plant Site 1 : D-88/2, MIDC, Turbhe - 400 705, New Mumbai, India	

## Anexo A ANOVA para Efecto matriz Placebo y solvente acetaminofén

Análisis de varianza de un factor  
EFECTO MATRIZ ACETAMINOFEN 1  
RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	5	27712630,9	5542526,179	4,6973E+12
Columna 2	5	27608175,8	5521635,151	4,7829E+12

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1091087669	1	1091087669	0,00023018	0,98826666	5,317655072
Dentro de los grupos	3,79206E+13	8	4,74007E+12			
Total	3,79217E+13	9				

Análisis de varianza de un factor  
EFECTO MATRIZ ACETAMINOFEN 2  
RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	5	29701345,1	5940269,023	4,8241E+12
Columna 2	5	29679838,4	5935967,67	4,6886E+12

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	46254089,77	1	46254089,77	9,7247E-06	0,997588208	5,317655072
Dentro de los grupos	3,80509E+13	8	4,75636E+12			
Total	3,8051E+13	9				

Análisis de varianza de un factor  
EFECTO MATRIZ ACETAMINOFEN 3  
RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	5	29245743,2	5849148,638	5,6007E+12
Columna 2	5	29261650,4	5852330,077	5,6199E+12

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	25303882,1	1	25303882,1	4,5102E-06	0,99835751	5,317655072
Dentro de los grupos	4,4883E+13	8	5,61034E+12			
Total	4,4883E+13	9				

## Anexo B ANOVA para Efecto matriz placebo y solvente ácido acetilsalicílico

Análisis de varianza de un factor  
EFFECTO MATRIZ ACIDO ACETIL SALICILICO 1  
RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	5	22565344,2	4513068,84	3,2336E+12
Columna 2	5	22105964,1	4421192,83	3,1815E+12

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	21103002391	1	2,1103E+10	0,00657915	0,93734544	5,317655072
Dentro de los grupos	2,56604E+13	8	3,2076E+12			
Total	2,56816E+13	9				

Análisis de varianza de un factor  
EFFECTO MATRIZ ACIDO ACETILSALICILICO 2  
RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	5	23676395,8	4735279,161	2,9735E+12
Columna 2	5	23736689	4747337,807	2,9387E+12

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	363527395	1	363527394,6	0,00012297	0,99142368	5,317655072
Dentro de los grupos	2,3649E+13	8	2,95611E+12			
Total	2,3649E+13	9				

Análisis de varianza de un factor  
EFFECTO MATRIZ ACIDO ACETILSALICILICO 3  
RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	5	24587800,7	4917560,136	3,8866E+12
Columna 2	5	24177374,7	4835474,931	3,9383E+12

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1,6845E+10	1	16844952200	0,00430551	0,94929335	5,317655072
Dentro de los gru	3,1299E+13	8	3,91242E+12			
Total	3,1316E+13	9				

## Anexo C ANOVA para Efecto matriz placebo y solvente bromhexina

Análisis de varianza de un factor

EFFECTO MATRIZ BROMHEXINA 1

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	5	6123318,874	1224663,775	1,9913E+11
Columna 2	5	6237645,15	1247529,03	2,0015E+11

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1307049738	1	1307049738	0,00654699	0,93749841	5,317655072
Dentro de los grupos	1,59713E+12	8	1,99641E+11			
Total	1,59844E+12	9				

Análisis de varianza de un factor

EFFECTO MATRIZ BROMHEXINA 2

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	5	6880499,29	1376099,858	2,3262E+11
Columna 2	5	6870954,49	1374190,897	2,2825E+11

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	9110326,43	1	9110326,431	3,9535E-05	0,99513716	5,317655072
Dentro de los grupos	1,8435E+12	8	2,30438E+11			
Total	1,8435E+12	9				

Análisis de varianza de un factor

EFFECTO MATRIZ BROMHEXINA 3

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	5	7637628,97	1527525,794	3,9481E+11
Columna 2	5	7734979,93	1546995,986	3,9248E+11

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	947720883	1	947720882,9	0,00240755	0,96206897	5,317655072
Dentro de los grupos	3,1492E+12	8	3,93646E+11			
Total	3,1501E+12	9				

## Anexo D Pruebas t- Student para determinar diferencias significativas entre solvente y placebo acetaminofén

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

### ACETAMINOFÉN 1 CURVA

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	5521635,151	5542526,179
Varianza	4,78288E+12	4,69726E+12
Observaciones	5	5
Coefficiente de correlación de Pearson	0,999825367	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-1,033729174	
P(T<=t) una cola	0,179831632	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846786	
P(T<=t) dos colas	0,359663263	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105	

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

### ACETAMINOFÉN 2 CURVA

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	5940269,023	5935967,67
Varianza	4,8241E+12	4,68863E+12
Observaciones	5	5
Coefficiente de correlación de Pearson	0,99995512	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	0,257827658	
P(T<=t) una cola	0,404630666	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846786	
P(T<=t) dos colas	0,809261331	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105	

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

### ACETAMINOFÉN 3 CURVA

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	5849148,638	5852330,077
Varianza	5,60075E+12	5,61993E+12
Observaciones	5	5
Coefficiente de correlación de Pearson	0,999992447	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-0,707334965	
P(T<=t) una cola	0,259195522	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846786	
P(T<=t) dos colas	0,518391044	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105	

## Anexo E Pruebas t- Student para determinar diferencias significativas entre solvente y placebo ácido acetilsalicílico

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

ASPIRINA 1 CURVA

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	4513068,835	4421192,827
Varianza	3,23359E+12	3,18152E+12
Observaciones	5	5
Coefficiente de correlación de Pearson	0,999856569	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	6,107821989	
P(T<=t) una cola	0,001818417	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846786	
P(T<=t) dos colas	0,003636835	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105	

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

ASPIRINA 2 CURVA

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	4735279,161	4747337,807
Varianza	2,97353E+12	2,93869E+12
Observaciones	5	5
Coefficiente de correlación de Pearson	0,999842094	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-0,837650321	
P(T<=t) una cola	0,224679552	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846786	
P(T<=t) dos colas	0,449359104	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105	

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

ASPIRINA 3 CURVA

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	4917560,136	4835474,931
Varianza	3,88655E+12	3,93828E+12
Observaciones	5	5
Coefficiente de correlación de Pearson	0,999713421	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	3,736251587	
P(T<=t) una cola	0,010093377	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846786	
P(T<=t) dos colas	0,020186755	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105	

## Anexo F Pruebas t- Student para determinar diferencias significativas entre solvente y placebo bromhexina

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

BROMHEXINA CURVA 1

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	1247529,03	1224663,77
Varianza	2,00152E+11	1,9913E+11
Observaciones	5	5
Coefficiente de correlación de Pearson	0,999908798	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	8,324863614	
P(T<=t) una cola	0,000568786	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846786	
P(T<=t) dos colas	0,001137573	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105	

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

BROMHEXINA CURVA 2

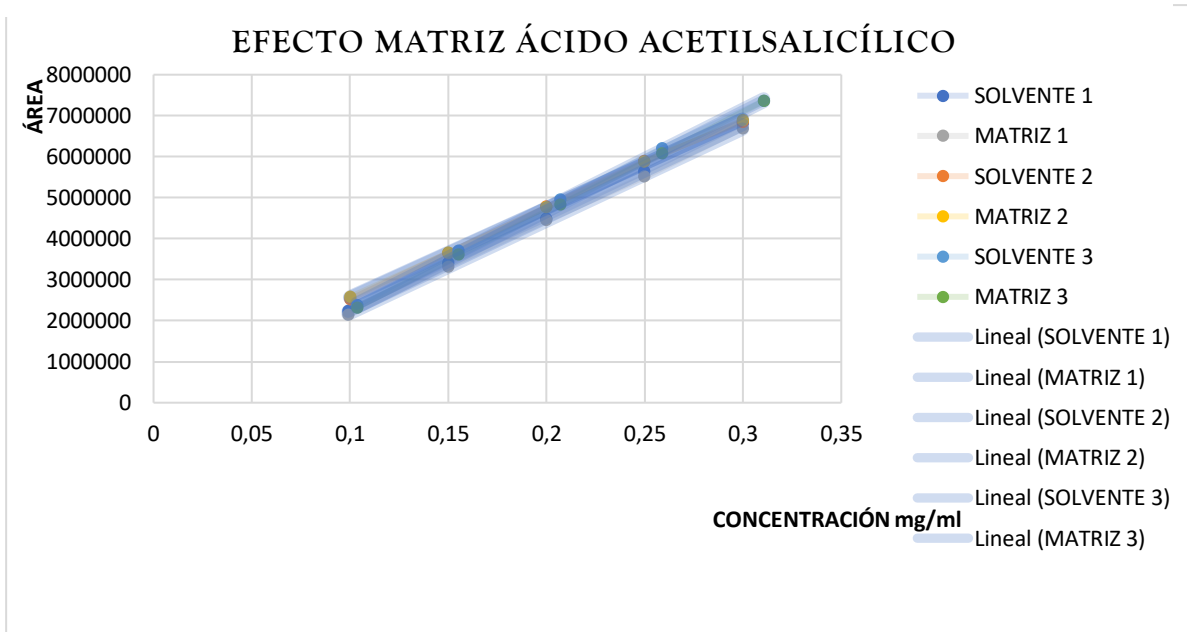
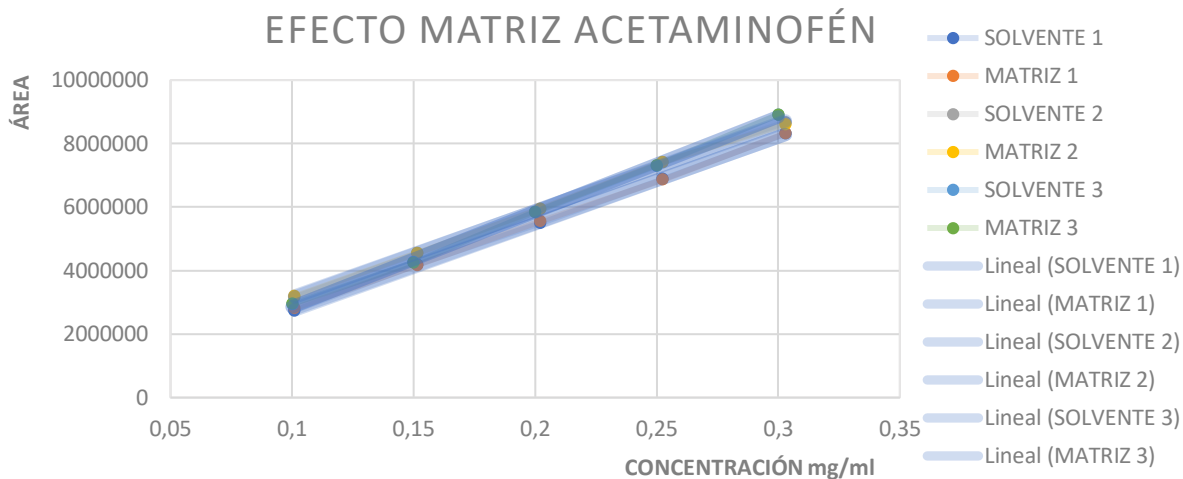
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	1376099,858	1374190,9
Varianza	2,32625E+11	2,2825E+11
Observaciones	5	5
Coefficiente de correlación de Pearson	0,999897009	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	0,516803683	
P(T<=t) una cola	0,316276732	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846786	
P(T<=t) dos colas	0,632553465	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105	

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

BROMHEXINA CURVA 3

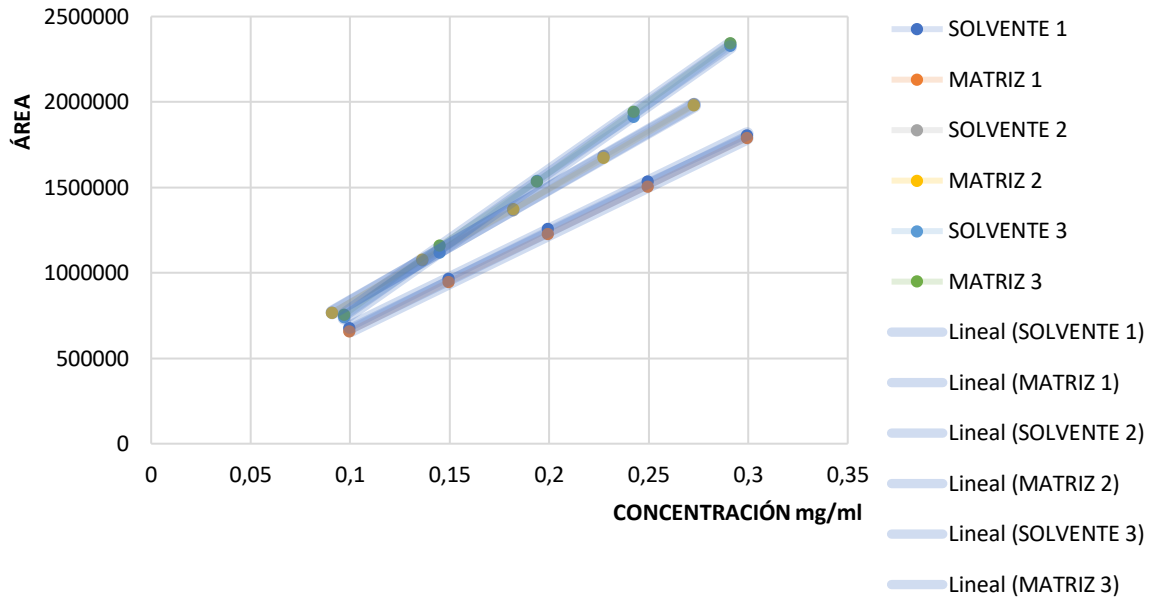
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	1527525,794	1546995,99
Varianza	3,94815E+11	3,9248E+11
Observaciones	5	5
Coefficiente de correlación de Pearson	0,999613829	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-2,482751335	
P(T<=t) una cola	0,03400515	
Valor crítico de t (una cola)	2,131846786	
P(T<=t) dos colas	0,0680103	
Valor crítico de t (dos colas)	2,776445105	

**Anexo G Imágenes de efecto matriz, acetaminofén, ácido acetil salicílico y aspirina.**





### EFEECTO MATRIZ BROMHEXINA



## Anexo H Linealidad acetaminofén

Resumen  
LINEALIDAD 1 ACETAMINOFEN

---

*Estadísticas de la regresión*

Coefficiente de correlación múltiple	0,99979813
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99959629
R <sup>2</sup> ajustado	0,99946172
Error típico	59195,8819
Observaciones	5

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	de cuadrado de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	2,6029E+13	2,6029E+13	7428,144262
Residuos	3	1,0512E+10	3504152433	
Total	4	2,604E+13		

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-361278,26	79419,26	-4,549000586	0,019901897	-614025,7908	-108530,73
Variable X 1	31954,0779	370,754238	86,18668262	3,44302E-06	30774,17241	33133,9833

Resumen  
LINEALIDAD 3 ACETAMINOFEN

---

*Estadísticas de la regresión*

Coefficiente de correlación múltiple	0,99983498
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99966999
R <sup>2</sup> ajustado	0,99955999
Error típico	53482,5923
Observaciones	5

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	de cuadrado de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	2,5994E+13	2,5994E+13	9087,60476
Residuos	3	8581163032	2860387677	
Total	4	2,6003E+13		

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-360419,274	71754,1114	-5,02297731	0,01520012	-588772,88	-132065,667
Variable X 1	31932,4171	334,970899	95,3289293	2,5446E-06	30866,3902	32998,444

Resumen  
LINEALIDAD 2 ACETAMINOFEN

---

*Estadísticas de la regresión*

Coefficiente de correlación múltiple	0,99990623
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99981247
R <sup>2</sup> ajustado	0,99974996
Error típico	40334,5972
Observaciones	5

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	de cuadrado de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	2,6021E+13	2,6021E+13	15994,5956
Residuos	3	4880639191	1626879730	
Total	4	2,6026E+13		

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-366378,309	54114,3426	-6,77044737	0,00658447	-538594,298	-194162,319
Variable X 1	31635,8629	250,145706	126,469742	1,09E-06	30839,7876	32431,9382

Resumen  
LINEALIDAD 4 ACETAMINOFEN

---

*Estadísticas de la regresión*

Coefficiente de correlación múltiple	0,99984955
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99969912
R <sup>2</sup> ajustado	0,99959882
Error típico	51389,7422
Observaciones	5

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	de cuadrado de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	2,6324E+13	2,6324E+13	9967,68905
Residuos	3	7922716812	2640905604	
Total	4	2,6332E+13		

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-408073,628	68946,2707	-5,91871937	0,00963529	-627491,432	-188655,823
Variable X 1	32134,2604	321,86301	99,8383146	2,2152E-06	31109,94869	33158,5722

Resumen  
LINEALIDAD 5 ACETAMINOFEN

---

*Estadísticas de la regresión*

Coefficiente de correlación múltiple	0,999792903
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,999585848
R <sup>2</sup> ajustado	0,999447798
Error típico	60014,24384
Observaciones	5

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	de cuadrado de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	2,6079E+13	2,6079E+13	7240,723599
Residuos	3	10805128393	3601709464	
Total	4	2,60898E+13		

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%
Intercepción	-383034,134	80517,20293	-4,757171388	0,017632666	-639275,809
Variable X 1	31984,52847	375,8797833	85,09244149	3,57752E-06	30788,31124

# Anexo I Linealidad ácido acetilsalicílico

Resumen

## LINEALIDAD 1 ACIDO ACETILSALICILICO

*Estadísticas de la regresión*

Coefficiente de correlación múltiple	0,99964036
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99928085
R <sup>2</sup> ajustado	0,99904114
Error típico	68178,3876
Observaciones	5

## ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	de cuadrado de los cua	F	valor crítico de F
Regresión	1	1,9377E+13	1,9377E+13	4168,61738
Residuos	3	1,3945E+10	4648292542	8,1867E-06
Total	4	1,9391E+13		

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-378613,211	91470,9056	-4,13916544	0,02560071	-669714,457
Variable X 1	27868,093	431,629614	64,5648309	8,1867E-06	26494,4549

Resumen

## LINEALIDAD ACIDO ACETILSALICILICO 2

*Estadísticas de la regresión*

Coefficiente de correlación múltiple	0,99967677
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99935365
R <sup>2</sup> ajustado	0,9991382
Error típico	63998,2035
Observaciones	5

Resumen

## LINEALIDAD ACIDO ACETILSALICILICO 3

*Estadísticas de la regresión*

Coefficiente de correlación múltiple	0,99965547
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99931105
R <sup>2</sup> ajustado	0,9990814
Error típico	66231,1594
Observaciones	5

## ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	de cuadrado de los cua	F	valor crítico de F
Regresión	1	1,8998E+13	1,8998E+13	4638,42697
Residuos	3	1,2287E+10	4095770046	6,9755E-06
Total	4	1,901E+13		

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-331618,129	85862,6	-3,86219529	0,03068761	-604871,243
Variable X 1	27594,1901	405,165344	68,105998	6,9755E-06	26304,7731

## ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	de cuadrado de los cua	F	valor crítico de F
Regresión	1	1,9088E+13	1,9088E+13	4351,47461
Residuos	3	1,316E+10	4386566475	7,6764E-06
Total	4	1,9101E+13		

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-335761,354	88858,4248	-3,77861025	0,03247423	-618548,52
Variable X 1	27659,5488	419,301933	65,9657079	7,6764E-06	26325,143

Resumen

## LINEALIDAD ACIDO ACETILSALICILICO 4

*Estadísticas de la regresión*

Coefficiente de correlación múltiple	0,99979254
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99958512
R <sup>2</sup> ajustado	0,99944682
Error típico	51636,398
Observaciones	5

Resumen

## LINEALIDAD ACIDO ACETILSALICILICO 5

*Estadísticas de la regresión*

Coefficiente de correlación múltiple	0,9995133
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99902683
R <sup>2</sup> ajustado	0,99870245
Error típico	78854,8046
Observaciones	5

## ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	de cuadrado de los cua	F	valor crítico de F
Regresión	1	1,9272E+13	1,9272E+13	7227,98005
Residuos	3	7998952794	2666317598	3,587E-06
Total	4	1,928E+13		

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-374912,008	69277,4976	-5,41174293	0,01237354	-595383,925
Variable X 1	27792,5835	326,90416	85,0175279	3,587E-06	26752,2286

## ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	de cuadrado de los cua	F	valor crítico de F
Regresión	1	1,915E+13	1,915E+13	3079,72451
Residuos	3	1,8654E+10	6218080207	1,2888E-05
Total	4	1,9169E+13		

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-345292,465	105794,822	-3,26379362	0,04699668	-681978,806
Variable X 1	27704,3906	499,220795	55,4952657	1,2888E-05	26115,6473

# Anexo J Linealidad bromhexina

## Resumen

LINEALIDAD BROMHEXINA 1	
Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99995136
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99990273
R <sup>2</sup> ajustado	0,99987031
Error típico	7296,83396
Observaciones	5

## ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	de cuadrado de los cua	F	valor crítico de F
Regresión	1	1,642E+12	1,642E+12	30839,5927
Residuos	3	159731358	53243785,9	4,0715E-07
Total	4	1,6422E+12		

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-80522,4448	9781,88613	-8,23179127	0,00375304	-111652,772
Variable X 1	8110,84381	46,1861457	175,612052	4,0715E-07	7963,85888

## Resumen

LINEALIDAD BROMHEXINA 2	
Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99982885
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99965773
R <sup>2</sup> ajustado	0,99954364
Error típico	13663,5984
Observaciones	5

## ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	de cuadrado de los cua	F	valor crítico de F
Regresión	1	1,6358E+12	1,6358E+12	8761,97552
Residuos	3	560081760	186693920	2,6878E-06
Total	4	1,6364E+12		

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-78429,569	18316,9528	-4,28180221	0,02340287	-136722,288
Variable X 1	8095,49413	86,4853096	93,6054246	2,6878E-06	7820,25927

## Resumen

LINEALIDAD BROMHEXINA 3	
Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9999306
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99986121
R <sup>2</sup> ajustado	0,99981494
Error típico	8763,71232
Observaciones	5

## ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	de cuadrado de los cua	F	valor crítico de F
Regresión	1	1,6598E+12	1,6598E+12	21611,7386
Residuos	3	230407961	76802653,7	6,9401E-07
Total	4	1,6601E+12		

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-87098,7065	11748,3331	-7,41370761	0,00507722	-124487,146
Variable X 1	8154,74196	55,4709202	147,009315	6,9401E-07	7978,20874

## Resumen

LINEALIDAD BROMHEXINA 4	
Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,999836023
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,999672074
R <sup>2</sup> ajustado	0,999562765
Error típico	13351,72346
Observaciones	5

## ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	de cuadrado de los cua	F	valor crítico de F
Regresión	1	1,6303E+12	1,6303E+12	9145,39186
Residuos	3	534805558	178268519	2,5206E-06
Total	4	1,6309E+12		

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-77485,77858	17898,864	-4,32908919	0,02272834	-134447,952
Variable X 1	8081,942294	84,5112618	95,6315422	2,5206E-06	7812,98974

## Resumen

LINEALIDAD BROMHEXINA 5	
Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99988901
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99977603
R <sup>2</sup> ajustado	0,99970137
Error típico	11126,6397
Observaciones	5

## ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	de cuadrado de los cua	F	valor crítico de F
Regresión	1	1,6579E+12	1,6579E+12	13391,5735
Residuos	3	371406336	123802112	1,4227E-06
Total	4	1,6583E+12		

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-82594,1475	14915,9928	-5,53728797	0,01160918	-130063,494
Variable X 1	8149,99024	70,4273397	115,721966	1,4227E-06	7925,85902