

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTADA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ESCUELA DE FORMACION PROFESIONAL DE FARMACIA
Y BIOQUÍMICA**



**Validación de la técnica analítica por cromatografía
líquida de alta performance (HPLC) para la
determinación de fenilefrina clorhidrato,
guaifenesina y dextrometorfano bromhidrato en
jarabe. Lima - 2013**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACEUTICA**

Presentado por la:

Bach. ENCISO RODRÍGUEZ, Maritza

AYACUCHO – PERÚ

2014

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Bach. Maritza Enciso Rodríguez

R.D.N° 197 – 2014 – FCB – D

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde con cinco minutos del día doce de diciembre del dos mil catorce, reunidos en el Auditorium de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, los profesores Ing. Juan Luis Quispe Cisneros, Mg. Maricela López Sierralta, Mg Enrique Javier Aguilar Felices, presidido por el Dr. Homero Ango Aguilar por encargo mediante memorando N° 013-2014-JDA-FCB-UNSCH y como secretario de docente Blgo. Elbert Hermoza Valdivia, con la finalidad de recepcionar la tesis Validación de la técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para la determinación de fenilefrina clorhidrato, guaifenesina y dextrometorfano bromhidrato en jarabe. Lima 2013, presentado por la bachiller en Farmacia y Bioquímica Maritza Enciso Rodríguez con la que pretende optar el Título profesional de Químico Farmacéutica.

Constatada la documentación respectiva y estando conforme, el presidente del jurado evaluador, da la autorización a la sustentante para que pueda dar inicios con su exposición, la misma que se inicia por parte de la sustentante con el agradecimiento a la Universidad, profesores, familiares y público asistente, teniendo para su exposición el tiempo no mayor a cuarenta y cinco minutos.

Concluida con su exposición, el Dr. Homero Ango Aguilar, en calidad de presidente, solicita a los miembros del jurado evaluador para que efectúen sus preguntas, o soliciten la aclaración que crean necesario a las mismas que la Srta. Sustentante da respuesta. Terminado esta sección, se invita a la sustentante y público asistente con la finalidad de que desocupen el Auditorium con la finalidad de realizar las discusiones respectivas y así mismo efectuar la calificación respectiva, obteniendo el siguiente resultado:

Miembro jurado	Exposición	Preguntas	Promedio
Dr. Blgo. Homero Ango Aguilar	19	19	19
Ing. Juan Luis Quispe Cisneros	17	18	18
Mg. Q.F. Maricela López Sierralta	18	18	18
Mg. Q.F. Enrique Javier Aguilar Felices	17	17	17
		Promedio:	18

Habiendo obtenido la nota de Dieciocho (18) siendo esta aprobatoria e invitándose a la sustentante y público asistente puedan ingresar al Auditorium, con la finalidad de dar a


conocer el resultado obtenido y de inmediato se procede en colocar la medalla respectiva y efectuar la juramentación de ley, de esta forma es reconocida como una nueva profesional Químico Farmacéutica.

Concluye el acto sustentatorio siendo las 6:00 de la tarde, firmando los miembros del jurado evaluador al pie del presente acta de conformidad.



Dr. HOMERO ANGO AGUILAR

Presidente – Miembro



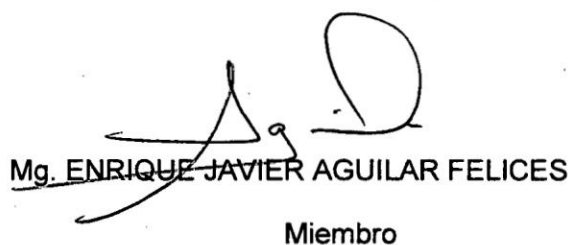
Ing. JUAN LUIS QUISPE CISNEROS

Miembro



Mg. MARICELA LOPEZ SIERRALTA

Miembro-Asesor



Mg. ENRIQUE JAVIER AGUILAR FELICES

Miembro



Blgo. ELBERT HERMOZA VALDIVIA

Secretario docente

A mi amado señor por sus tantas bendiciones y misericordias que me ha ofrecido, a mis padres Marcelino Q.E.P.D. y Antonia con eterna gratitud, a mis hermanos Celeste, Armando, Raúl y Norma por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad, apoyo y confianza en todo momento.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, *alma máter*, que en cuyas aulas cultivé conocimientos que marcarán mi vida futura y profesional.

A la Facultad de Ciencias Biológicas en especial a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica y a todos sus docentes por su invaluable contribución y dedicación en mi formación académica.

A mis asesoras Mg. QF. Maricela López Sierralta, y QF. Luz Yaranga Galindo por su generosa dirección, asesoramiento y apoyo, que hicieron posible el desarrollo y culminación del presente trabajo de investigación.

Al Laboratorio Gencopharmaceutical SAC, cuyos profesionales permitieron el desarrollo del trabajo en sus instalaciones.

A todas las personas que contribuyeron en la ejecución del presente trabajo de investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS	xv
RESUMEN	xix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Fenilefrina clorhidrato	4
2.3. Guaifenesina	5
2.4. Dextrometorfano bromhidrato	5
2.5. Cromatografía líquida de alta performance (HPLC)	6
2.5.1. Conceptos	6
2.5.2. Clases de cromatografía líquida	6
2.5.3. Partes	7
2.6. Validación	7
2.6.1. Categorías de validación	8
2.6.2. Validación de métodos analíticos	9
2.6.3. Aptitud del sistema	9
2.6.4. Parámetros de validación de métodos analíticos	10
III. MATERIALES Y METODOS	13
3.1. Ubicación	13
3.2. Población	13
3.3. Muestra	13
3.4. Diseño metodológico para la recolección de datos	14
3.5. Análisis estadístico de datos	27
IV. RESULTADOS	33
V. DISCUSION	51
VI. CONCLUSIONES	57
VII. RECOMENDACIONES	59
VIII. REFRENCIAS BIBLIOGRAFICAS	61
ANEXOS	63

INDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1.	Aptitud del sistema según parámetros y criterios de adecuación de la guaifenesina, fenilefrina clorhidrato y dextrometorfano bromhidrato, Gencopharmaceutical Lima - 2014.	34
Tabla 2.	Selectividad-especificidad, porcentaje de interferencia al determinar la guaifenesina, fenilefrina clorhidrato y dextrometorfano bromhidrato, medido por la adición de interferentes en el estándar y placebo, Gencopharmaceutical Lima -2014.	35
Tabla 3.	Precisión del sistema o repetibilidad instrumental según áreas de fenilefrina clorhidrato Gencopharmaceutical Lima - 2014	42
Tabla 4.	Precisión del sistema o repetibilidad instrumental según áreas de guaifenesina. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	43
Tabla 5.	Precisión del sistema o repetibilidad instrumental según áreas del dextrometorfano bromhidrato. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	44
Tabla 6.	Precisión intermedia para la fenilefrina clorhidrato según resultados obtenidos por analista uno y dos. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	45
Tabla 7.	Precisión intermedia para la guaifenesina según resultados obtenidos por analista uno y dos. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	46
Tabla 8.	Precisión intermedia para el dextrometorfano bromhidrato según resultados obtenidos por analista uno y dos. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	47
Tabla 9.	Exactitud del método para la fenilefrina clorhidrato. Gencopharmaceutical Lima -2014.	48
Tabla 10.	Resultados Exactitud del método para la guaifenesina. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	49
Tabla 11.	Exactitud del método para el dextrometorfano bromhidrato. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	50

Tabla 12.	Especificaciones de los parámetros de validación para la fenilefrina clorhidrato, guaifenesina y dextrometorfano bromhidrato. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	64
Tabla 13.	Linealidad del sistema concentración versus área respuesta de los estándares de fenilefrina clorhidrato. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	65
Tabla 14.	Linealidad del sistema concentración versus área respuesta de los estándares de guaifenesina. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	66
Tabla 15.	Linealidad del sistema concentración versus área respuesta de los estándares de dextrometorfano bromhidrato. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	67
Tabla 16.	Linealidad del sistema de la pendiente y proporcionalidad para la fenilefrina clorhidrato. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	68
Tabla 17.	Linealidad del sistema de la pendiente y proporcionalidad para la guaifenesina. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	69
Tabla 18.	Linealidad del sistema de la pendiente y proporcionalidad para el dextrometorfano bromhidrato. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	70
Tabla 19.	Linealidad del Método de la pendiente y proporcionalidad para la fenilefrina clorhidrato. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	71
Tabla 20.	Linealidad del Método de la pendiente y proporcionalidad para la guaifenesina. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	72
Tabla 21.	Linealidad del Método de la pendiente y proporcionalidad para el dextrometorfano bromhidrato. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	73
Tabla 22.	Precisión intermedia bajo las mismas condiciones operativas para la fenilefrina clorhidrato 5 mg/5 mL. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	74
Tabla 23.	Precisión intermedia bajo las mismas condiciones operativas para la guaifenesina 100 mg/5 mL. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	75

Tabla 24.	Precisión intermedia bajo las mismas condiciones operativas para el dextrometorfano bromhidrato 10 mg/5 mL. Gencopharmaceutical - 2014.	76
Tabla 25.	Exactitud, medido por el porcentaje hallado a diferentes concentraciones de la fenilefrina clorhidrato 5 mg/5 mL. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	77
Tabla 26.	Exactitud, medido por el porcentaje hallado a diferentes concentraciones de la guaifenesina 100 mg/5 mL. Gencopharmaceutical Lima -2014.	78
Tabla 27.	Exactitud, medido por el porcentaje hallado a diferentes concentraciones de dextrometorfano bromhidrato. 10 mg/5 mL. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	79

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Área versus concentración para determinar la linealidad del sistema para la fenilefrina clorhidrato gencopharmaceutical Lima - 2014.	36
Figura 2. Área versus concentración para determinar la linealidad del método para la fenilefrina clorhidrato, Gencopharmaceutical Lima - 2014.	37
Figura 3. Área versus concentración para determinar la linealidad del sistema para la guaifenesina. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	38
Figura 4. Área versus concentración para determinar la linealidad del método para la guaifenesina. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	39
Figura 5. Área versus concentración para determinar la linealidad del sistema para el dextrometorfano bromhidrato. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	40
Figura 6. Área versus concentración para determinar la linealidad del método para el dextrometorfano bromhidrato. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	41
Figura 7. Cromatografías, 1: estándar de fenilefrina clorhidrato y guaifenesina, 2: placebo de excipiente puro + fenilefrina clorhidrato y guaifenesina. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	80
Figura 8. Cromatografías, 1: placebo de excipiente puro, 2: fase móvil para fenilefrina clorhidrato y guaifenesina. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	81
Figura 9. Cromatografías, 1: control negativo (Alexmin®), 2: Placebo de excipiente puro + fenilefrina clorhidrato + guaifenesina + estres. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	82
Figura 10. Cromatografías, 1: estándar de dextrometorfano bromhidrato, 2: placebo de excipiente puro + dextrometorfano bromhidrato. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	83

- Figura 11. Cromatografías, 1: placebo de excipiente puro, 2: fase móvil para dextrometorfano bromhidrato. Gencopharmaceutical Lima - 2014. 84
- Figura 12. Cromatografías, 1: Control negativo (Alexmin®), 2: placebo de excipiente puro dextrometorfano bromhidrato+ estrés. Gencopharmaceutical Lima - 2014. 85
- Figura 13. HPLC Agilent 1200, Incubadora Indumelab-Control de Calidad. Gencopharmaceutical - 2014. 86
- Figura 14. Preparación de fase móvil, diluyente y muestras de fenilefrina clorhidrato, guaifenesina y dextrometorfano bromhidrato para ser evaluados en el HPLC. Gencopharmaceutical Lima - 2014. 87

INDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Especificaciones de los parámetros de validación para la fenilefrina clorhidrato, guaifenesina y dextrometorfano bromhidrato. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	64
Anexo 2. Linealidad del sistema: concentración versus área respuesta de los estándares de fenilefrina clorhidrato. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	65
Anexo 3. Linealidad del sistema concentración versus área respuesta de los estándares de guaifenesina. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	66
Anexo 4. Linealidad del sistema concentración versus área respuesta de los estándares de dextrometorfano bromhidrato. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	67
Anexo 5. Linealidad del sistema de la pendiente y proporcionalidad para la fenilefrina clorhidrato. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	68
Anexo 6. Linealidad del sistema de la pendiente y proporcionalidad para la guaifenesina. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	69
Anexo 7. Linealidad del sistema de la pendiente y proporcionalidad para el dextrometorfano bromhidrato. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	70
Anexo 8. Linealidad del Método de la pendiente y proporcionalidad para la fenilefrina clorhidrato. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	71
Anexo 9. Linealidad del Método de la pendiente y proporcionalidad para la guaifenesina. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	72
Anexo 10. Linealidad del Método de la pendiente y proporcionalidad para el dextrometorfano bromhidrato. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	73
Anexo 11. Precisión intermedia bajo las mismas condiciones operativas para la fenilefrina clorhidrato 5 mg/5 mL. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	74

Anexo 12.	Precisión intermedia bajo las mismas condiciones operativas para la guaifenesina 100 mg/5 mL. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	75
Anexo 13.	Precisión intermedia bajo las mismas condiciones operativas para el dextrometorfano bromhidrato 10 mg/5 mL. Gencopharmaceutical - 2014.	76
Anexo 14.	Exactitud, medido por el porcentaje hallado a diferentes concentraciones de la fenilefrina clorhidrato 5 mg/5 mL. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	77
Anexo 15.	Exactitud, medido por el porcentaje hallado a diferentes concentraciones de la guaifenesina 100 mg/5 mL. Gencopharmaceutical Lima -2014.	78
Anexo 16.	Exactitud, medido por el porcentaje hallado a diferentes concentraciones de dextrometorfano bromhidrato. 10 mg/5 mL. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	79
Anexo 17.	Cromatografías, 1: estándar de fenilefrina clorhidrato y guaifenesina, 2: placebo de excipiente puro + fenilefrina clorhidrato y guaifenesina. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	80
Anexo 18.	Cromatografías, 1: placebo de excipiente puro, 2: fase móvil para fenilefrina clorhidrato y guaifenesina. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	81
Anexo 19.	Cromatografías, 1: control negativo (Alexmin®), 2: Placebo de excipiente puro + fenilefrina clorhidrato + guaifenesina + estres. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	82
Anexo 20.	Cromatografías, 1: estándar de dextrometorfano bromhidrato, 2: placebo de excipiente puro + dextrometorfano bromhidrato. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	83
Anexo 21.	Cromatografías, 1: placebo de excipiente puro, 2: fase móvil para dextrometorfano bromhidrato. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	84
Anexo 22.	Cromatografías, 1: Control negativo (Alexmin®), 2: placebo de excipiente puro dextrometorfano bromhidrato+ estrés. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	85

Anexo 23.	HPLC Agilent 1200, Incubadora Indumelab-Control de Calidad. Gencopharmaceutical - 2014.	86
Anexo 24.	Preparación de fase móvil, diluyente y muestras de fenilefrina clorhidrato, guaifenesina y dextrometorfano bromhidrato para ser evaluados en el HPLC. Gencopharmaceutical Lima - 2014.	87
Anexo 25.	Matriz de consistencia	89

RESUMEN

El análisis por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) de productos farmacéuticos es una necesidad y es de uso rutinario. Esta técnica minimiza los errores que conlleva a situaciones de riesgo al usuario, garantizando que el contenido en el producto sea el correcto. La validación es un proceso establecido que obtiene pruebas documentadas y demostrativas para que un método de análisis sea lo suficientemente fiable y reproducible para producir un resultado previsto dentro de los intervalos definidos.

El presente trabajo de investigación tiene por objetivo validar una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance, (HPLC) para la determinación de contenido de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina en jarabe y documentar los resultados obtenidos. Se realizó en el laboratorio Gencopharmaceutical SAC Lima, durante el periodo enero a julio del 2014. El tipo de investigación fue descriptivo transversal con un muestreo aleatorio simple, para lo cual se evaluó los parámetros estipulados en la USP como: Exactitud, Precisión, Selectividad – Especificidad, Linealidad y Robustez, para el análisis de fenilefrina clorhidrato y guaifenesina se usó fase móvil, diluyente y una solución de muestra con una concentración final de 0.05 mg/mL y 1 mg/mL respectivamente, se usó una columna Eclipse XDB-Phenyl C18 de 4,6 x 250 mm 5 μ m y para el análisis del dextrometorfano bromhidrato se usó fase móvil y una solución de muestra con una concentración final de 0.1 mg/mL, se usó una columna de eclipse XDB-C18 de 4,5 x 150 mm 5 μ m.

Los resultados finales obtenidos según los parámetros descritos demostró que el método es selectivo y específico porque no existen interferencias con el excipiente, fase móvil, diluyente y productos de degradación. El método es lineal porque se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.99959 para la fenilefrina clorhidrato, 0,99997 para la guaifenesina y 0,99983 para el dextrometorfano bromhidrato. En la exactitud el porcentaje de recuperado promedio fue 99,80% de fenilefrina clorhidrato, 99.56% de guaifenesina y 99,78% de dextrometorfano bromhidrato en un rango de 80-120%. En la precisión el coeficiente de variación de la repetibilidad fue 0,65% para la fenilefrina clorhidrato, 0,34% para la guaifenesina y 1,23% para el dextrometorfano bromhidrato, la desviación estándar relativa porcentual de la precisión intermedia fue de 0.61% para la fenilefrina clorhidrato, 0,090% para la guaifenesina y 0,342% para el dextrometorfano bromhidrato respectivamente, encontrándose dentro de los límites especificados. En el ensayo de robustez los cambios en cuanto al pH de la fase móvil, marca de la columna y refrigeración de las muestras no interfieren en la recuperación. Concluyéndose así que el método analítico propuesto es lineal, exacto, preciso, reproducible, selectivo y presenta robustez, comprobándose así su validez.

Palabras claves: Validación de técnica analítica, HPLC fenilefrina clorhidrato, guaifenesina, dextrometorfano bromhidrato.

I. INTRODUCCIÓN

El análisis se considera hoy en día un proceso mediante el cual se obtiene información. Se realiza millones de análisis cada día en los ámbitos más variados: análisis de productos manufacturados, análisis medioambientales, análisis clínicos, forenses, químicos y físicos, en todos ellos se requiere una confianza en los resultados obtenidos. La validación de las metodologías analíticas, junto con otras actividades englobadas en el área de aseguramiento de la calidad, permiten conseguir calidad, otorgando la confianza necesaria a la vez que confieren un grado elevado de comparabilidad entre los resultados de los análisis químicos.¹

La industria farmacéutica, al elaborar sus productos destinados a curar la enfermedad, salvar vidas o mejorar la calidad de vida, no puede haber el mínimo margen para el error. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos de control y fabricación, se exige una mejora continua y máximas garantías de la calidad y es en el avance para conseguir un total dominio de la calidad, cuando surge el concepto de validación².

La técnica de cuantificación por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) por su naturaleza selectiva, permite la valoración del principio activo fenilefrina clorhidrato, guaifenesina y dextrometorfano bromhidrato en el producto en mención, y no contando con un método de cuantificación en ninguna monografía oficial vigente, se hace necesario tener disponible la evidencia que pruebe que la técnica analítica propuesta para la fórmula farmacéutica de jarabe es adecuado para su uso rutinario, de modo que su validación garantizara la confiabilidad de los resultados emitidos.³

Por todo lo manifestado anteriormente, en el presente trabajo de investigación se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Validar una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance, (HPLC) para la determinación de contenido de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina en jarabe y documentar los resultados obtenidos.

Objetivos específicos:

- Determinar la prueba de aptitud del sistema específico para la cuantificación de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina en jarabe.
- Determinar la especificidad y selectividad de la técnica analítica para el análisis de contenido por HPLC de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina en jarabe.
- Determinar la linealidad utilizando la técnica analítica por el método de HPLC para la cuantificación de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato. y guaifenesina en jarabe.
- Comprobar la precisión de la técnica analítica por el método de H.P.L.C para la cuantificación de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato. y guaifenesina en jarabe.
- Determinar la exactitud utilizando la técnica analítica por el método de HPLC para la cuantificación de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato. y guaifenesina en Jarabe.
- Evaluar la robustez empleando la técnica analítica por el método de HPLC para la cuantificación de dextrometorfano bromhidrato, enilefrina clorhidrato. y guaifenesina en jarabe.

II. MARCO TEORICO

2.1. ANTECEDENTES

Se realizó un estudio de validación de una técnica analítica para la cuantificación por HPLC de clorfeniramina maleato, fenilefrina clorhidrato, dextrometorfano bromhidrato y guayfenesina en jarabe. Esta muestra fue sometida a cromatografía de fase reversa, usando una columna Whatman Partisil SCX, en una fase móvil de fosfato diácido de potasio pH 4 y metanol HPLC (40:60), a un flujo de 1 mL/min, a una longitud de onda de 220 nm y con una inyección de 20ul. Se prepararon estándares y muestras a las siguientes concentraciones: clorfeniramina maleato 0,08 mg/mL, dextrometorfano bromhidrato 0,08 mg/mL, fenilefrina clorhidrato 0,04 mg/mL y guaifenesina 0,4 mg/mL, demostrando que la metodología analítica es efectiva y reproducible, cumple con los parámetros de aptitud del sistema, linealidad, exactitud, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), este método cumple con los requerimientos y normas ICH para la cuantificación de tres principios activos. El método de análisis cumple con el parámetro de repetibilidad para el análisis de clorfeniramina maleato, dextrometorfano bromhidrato y fenilefrina en jarabe porque se obtuvo un coeficiente de variación menor al 2% al evaluar varias muestras con la metodología a validar. El método utilizado demostró ser lineal cuando se trabaja a concentraciones de 60% al 140% para cada uno de los principios activos analizados, lo que significa que al trabajar en dicho rango la respuesta del equipo será directamente proporcional a las concentraciones del analito.⁴

Se realizó un estudio de validación por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) de dextrometorfano bromhidrato y guaifenesina en jarabe (Pectoflem®), desarrollado en el Laboratorio Induquímica SA. Lima - Perú, en la cual se evaluó una serie de parámetros como sigue: especificidad, linealidad, exactitud y

precisión, demostrando que la metodología analítica es efectiva y reproducibles, los resultados finales obtenidos según los parámetros descritos demuestran que el método es selectivo y específico, porque no se evidencia que los productos de degradación interfieran en el análisis del principio activo, la linealidad presentó una ecuación con una recta de regresión lineal $y = 2751560,3928x - 3376,910101$ con $r = 0,997738$ y un $r^2 = 0,995480$ para dextrometorfano bromhidrato y una recta de regresión lineal $y = 5605301,9424 x + 18524,558055$ con un $r = 0,999013$ y un $r^2 = 0,998028$ para guaifenesina, la exactitud según el test G de Cochran el $G_{exp.}(0,8500)$ es $< G_{tabla}(8709)$ el factor de concentración no influye en la variabilidad de los resultados y según el test de t de Student $t_{exp}(2,171) < t_{tab}(2,306)$ confirma que el método es exacto para el dextrometorfano bromhidrato y un $G_{exp.}(0,849) < G_{tabla}(0,8709)$ con un $t_{exp}(1,829) < t_{tabla}(2,306)$ para la guaifenesina, la precisión de los dos análisis expresa un CV = 1,51% para el dextrometorfano bromhidrato y un CV = 1,90% para la guaifenesina. Concluyéndose que el método analítico es selectivo, lineal, preciso, reproducible y exacto⁵.

2.2. Fenilefrina clorhidrato

2.2.1. Propiedades físico-químicas.

- Estado físico: polvo
- Apariencia: blanco
- Punto de congelación: 143,00 – 145,00 °C
- Fórmula molecular: $C_9H_{13}NO_2 \cdot HCl$
- Peso molecular: 203,67 g/mol

2.2.2. Usos: La fenilefrina es una amina simpaticomimética que se utiliza por vía intranasal para combatir la congestión nasal y por vía oral en combinación con otros fármacos en el tratamiento de la gripe, resfriados, etc. Aplicada tópicamente sobre los ojos, produce midriasis, siendo utilizada con fines de diagnóstico en el examen del fondo de ojo. También en combinación con bronco dilatadores administrados por inhalación.⁶

2.2.3. Indicaciones: La fenilefrina parenteral está indicada para el mantenimiento de una presión arterial adecuada durante la anestesia general o espinal y para el tratamiento de una hipotensión grave debido a un shock. También se emplea en casos de taquicardia supra ventricular paroxística y, en la anestesia regional como vasoconstrictor local.^{6,7}

2.3. Guaifenesina

2.3.1. Propiedades físico-químicas.

- Estado físico: polvo cristalino
- Apariencia: blanco a levemente gris
- Olor: leve, característico
- Sabor: amargo
- pH: 5 – 7 (solución de 1 en 100)
- Punto de fusión: con un intervalo de 3° entre 78 y 82°C
- Temperatura de descomposición: 126°C
- Solubilidad: 1 g en 60 a 70 mL de agua; soluble en alcohol, cloroformo, glicerina o propilenglicol; insoluble en éter de petróleo
- Formula molecular: $C_{10}H_{14}O_4$
- Peso molecular: 198,22 g/mol.⁸

2.3.2. Usos: Se usa para el alivio sintomático del trastorno respiratorio caracterizado por una tos seca no productiva, y por la presencia de moco en el tracto respiratorio.⁸

La acción de la guaifenesina mejora la tos seca no productiva al disminuir la viscosidad del esputo, la dificultad en la expectoración y aumentar el volumen del esputo. Es un componente en muchas formulaciones expectorantes registradas.⁸

2.3.3. Indicaciones: Es un expectorante. Se usa para aliviar la congestión y la mucosidad para ayudar a respirar más fácil. La guaifenesina diluye la mucosidad, aumenta la lubricación de las vías respiratorias (los pulmones, la nariz y la garganta), y aumenta la eliminación de mucosidad.⁸

2.4. Dextrometorfano bromhidrato

2.4.1. Propiedades físico-químicas.

- Estado físico: cristales o polvo
- Apariencia: casi blanco o cristalino
- Olor: débil
- pH: 5,2 – 6,5 (solución de 1 en 1000)
- Punto de fusión: 126°C
- Temperatura de descomposición: 126°C
- Solubilidad: 1 g en alrededor de 65 mL de agua; completamente soluble en alcohol o cloroformo; insoluble en éter.
- Peso molecular: 352,32 g/mL.⁹

2.4.2. Usos: El dextrometorfano bromhidrato es el *d*-isómero del análogo codeínico del levorfanol, se emplea como antitusígeno para el alivio temporal de la tos causada por irritación bronquial. Controla los espasmos de tos al deprimir el centro de la tos en el bulbo suprime el reflejo de la tos no productiva debido a irritación leve de la garganta y bronquios que se presenta asociado a los resfríos o a la inhalación de irritantes mediante un efecto directo sobre el centro de la tos en el bulbo raquídeo.⁹

Posee una potencia supresora de la tos de aproximadamente la mitad de la potencia antitusígena de la codeína. La administración oral de 30 mg a un adulto proporciona una actividad antitusiva efectiva en un período de 8 a 12 horas. A diferencia de la codeína, no posee propiedades analgésicas y produce poca o ninguna depresión del sistema nervioso central.⁹

El dextrometorfano se combina a menudo con expectorantes u otras drogas en medicaciones de venta libre para la tos y el resfrío.⁹

2.4.3. Indicaciones: Tratamiento para la supresión de la tos no productiva (crónica).⁹

2.5. Cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

2.5.1. Concepto. La cromatografía de líquida de alta performance (HPLC, por sus siglas en inglés), también llamada cromatografía de líquidos de alta resolución, es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida.¹⁰

Las separaciones se logran por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada.¹⁰

2.5.2. Clases de cromatografía líquida

- Fase normal o Líquida (NP, LSC).- Separación basada en adsorción/desorción del analito en una superficie polar (sílica).
- Fase reversa (RPC).- La separación de los analitos está basada en el coeficiente de partición de partículas entre la fase móvil y la fase estacionaria químicamente enlazada.
- Intercambio Iónico (IEC).- La separación está basada en el intercambio iónico con los contra iones y las interacciones con los iones enlazados en la fase estacionaria.
- Exclusión por tamaño (SEC OR GPC).- La separación está basada en el tamaño molecular de los analitos y la acción de filtro del empaque de la columna.¹¹⁻¹²

2.5.3. Partes

- **Fase Estacionaria y Fase móvil.-** Para la mayoría de los análisis farmacéuticos, la separación se logra por la partición de los compuestos presentes en la solución de prueba entre la fase móvil y la estacionaria. Los sistemas que constan de fases estacionarias polares y fases móviles no polares se describen como de fase normal, mientras que por el contrario cuando se emplean fases móviles polares y fases estacionarias no polares se denomina cromatografía en fase reversa.¹⁰
- **Bomba.-** Los sistemas de bombeo de HPLC administran cantidades exactas de fase móvil desde los recipientes hasta la columna mediante una tubería y uniones adecuadas para altas presiones. Existen 3 tipos de bombas, cada una con sus propias ventajas y desventajas: bombas recíprocas, bombas de jeringa o desplazamiento y bombas neumáticas o de presión constante.¹⁰
- **Inyectores.-** Después de ser disueltos en la fase móvil u otra solución apropiada, los compuestos que se van a cromatografiar se inyectan en la fase móvil, ya sean manualmente usando jeringas o inyectores de espiral o bien automáticamente mediante el uso de inyectores automáticos.¹³
- **Detectores.-** La mayoría de métodos de HPLC usados actualmente requieren del uso de detectores espectrofotométricos. Este tipo de detector consta de una celda de flujo colocada en el extremo de la columna. Un haz de radiación UV pasa a través de la celda de flujo y se introduce en el detector. A medida que los compuestos eluyen de la columna, pasan a través de la celda y absorben la radiación lo que da lugar a cambios cuantificables en el nivel de energía.¹³

La mayoría de métodos de HPLC usados actualmente requieren del uso de detectores espectrofotométricos. Este tipo de detector consta de una celda de flujo colocada en el extremo de la columna. Un haz de radiación UV pasa a través de la celda de flujo y se introduce en el detector. A medida que los compuestos eluyen de la columna, pasan a través de la celda y absorben la radiación lo que da lugar a cambios cuantificables en el nivel de energía.¹¹

2.6. Validación

La validación de un método analítico es el proceso que establece mediante estudios en el laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen los requisitos adecuados de exactitud y confiabilidad para las aplicaciones analíticas previstas. Las características de desempeño analítico

habituales que deben considerarse en la validación de los tipos de métodos descritos son exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad e intervalo.¹⁰

Los documentos de la Conferencia Internacional Tripartita sobre Armonización (ICH) aconsejan sobre la necesidad de realizar una nueva validación en las siguientes circunstancias: cambios en la síntesis de fármaco, cambios en la composición del producto farmacéutico y cambios en el procedimiento analítico.¹⁴

Se debe validar una técnica analítica porque nos interesa mantener un método que sea estable, capaz y robusto. Un método validado nos da la seguridad de ello, dado que estas características son esenciales para mantener altos niveles de calidad en los resultados del análisis.¹¹

Se realiza la validación con la finalidad de:

- Aseguramos que se cumpla con los requerimientos preestablecidos, confirmando su precisión y exactitud.
- Aseguramos que las modificaciones de las condiciones normales de ensayo y medio ambiente operacional no afecten negativamente el resultado final.
- Aseguramos un control de los puntos críticos del ensayo y poder así prevenir y evitar resultados erróneos que afecten la calidad de análisis.¹⁵

En un laboratorio de análisis debe considerarse para validar todo equipo o procedimiento que influya en la calidad final del resultado, así tenemos:

- Los equipos, incluido el control por computadora.
- Los métodos de análisis (se considera aquella que no están comprendidos en obras oficiales).
- El sistema analítico en su conjunto.
- Todo cambio o modificaciones importantes que se efectúen en el método, equipo o técnica de análisis del producto.¹⁵

2.6.1. Categorías de validación

La cantidad y el tipo de trabajo requerido para validar un método de HPLC varían en función del objetivo del método. Las actividades de validación deben organizarse de manera que los experimentos planeados complementen el método que se pretende apoyar.^{10,16}

- Categoría I: Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.

- Categoría II: Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos procedimientos Incluyen análisis cuantitativos y prueba de límite.
- Categoría III: Procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño (por ejemplo disolución, liberación del fármaco, etc.).
- Categoría IV: Pruebas de identificación para cada categoría, se requiere diferente información analítica.^{10, 17}

Los procedimientos farmacopéicos oficiales también están sujetos a reglamentos que requieren la demostración de aptitud en condiciones reales de uso; el grado y extensión del proceso de verificación va a depender de las características del desempeño y de evaluar las características que se consideren adecuadas, una prueba es la especificidad. Todo esto va acompañado de la documentación adecuada.¹⁸

2.6.2. Validación de métodos analíticos

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, por medio de estudio de laboratorio, que las características de desempeño del método reúnen los requisitos para las aplicaciones analíticas concebidas. Las características de desempeño se expresan en función de los parámetros analíticos que serán descritos más adelante.¹⁸⁻¹⁹

2.6.3. Aptitud del sistema

Las pruebas de aptitud del sistema son una parte integral de los métodos de cromatografía de líquidos y de gases. Estas pruebas se usan para verificar que el sistema cromatográfico sea adecuado para el análisis que se pretende efectuar. Las pruebas se basan en el concepto de que el equipo, los sistemas electrónicos, las operaciones analíticas y las muestras analizadas constituyen un sistema integral que se puede evaluar como tal.^{10, 20}

Los factores que se pueden afectar el comportamiento cromatográfico incluyen lo siguiente:

- Composición, fuerza iónica, temperatura y pH aparente de la fase móvil.
- Velocidad de flujo, dimensiones de la columna, temperatura de la columna y presión.
- Las características de la fase estacionaria, incluyendo el tipo de soporte cromatográfico, tamaño de partícula, tamaño de poro y área específica.²¹

Las inyecciones repetidas de una preparación estándar u otras soluciones estándar se comparan entre sí para determinar si se cumple con los requisitos de precisión, se usan los datos de cinco inyecciones repetidas del analito para calcular la desviación estándar relativa, %RSD, si el requisito es 2,0% o menos; se usan datos de seis inyecciones repetidas si la desviación estándar relativa es más de 2,0%. Factor de asimetría debe ser menor al 2%, tiempo de retención se calcular la desviación estándar relativa, %RSD debe ser menor al 2.0%, platos teóricos debe ser mayor a 1500.^{10,22}

2.6.4. Parámetros de validación de métodos analíticos

Las características de desempeño de un método analítico se expresan en función de los parámetros analíticos. Estos parámetros analíticos considerados en la validación son los siguientes:

- Selectividad - especificidad
- Precisión
- Exactitud
- Linealidad
- Robustez.¹⁰

a. Selectividad - especificidad. Los documentos de ICH definen especificidad como la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz.¹⁴

Mide la capacidad del método para identificar o cuantificar los analitos en presencia de otras sustancias, endógenas o exógenas, en una muestra de la matriz en las condiciones exigidas por el método.¹⁵

Aunque la especificidad y la selectividad se consideran términos equivalente, algunos autores los diferencian, considerando la selectividad como la capacidad de detectar simultánea o separadamente sustancias químicas diferentes presentes en una misma muestra y a la especificidad como la capacidad de detectar el analito sin interferencias de otro compuesto. La selectividad se determina comparando los resultados del análisis de muestras con los resultados del análisis de las muestras en presencia de productos relacionados.²³

b. Linealidad. La linealidad de un método analítico es su capacidad para demostrar que los resultados de la prueba son directamente proporcionales (o se convierten en directamente proporcionales mediante una transformación

matemática bien definida a la concentración del analito dentro de un rango dado.²⁴

La linealidad de un método analítico incluye la proporcionalidad entre la concentración del analito y su capacidad de respuesta, así como el intervalo de concentraciones del analito para los cuales el método es satisfactorio. La linealidad se relaciona además, con la sensibilidad de calibrado (representación gráfica del cociente entre la señal del analito y la señal del patrón frente a la concentración de analito de los patrones).²⁵

Las pautas de validación de los métodos analíticos descritos por la ICH recomiendan que para establecer la linealidad se utilice normalmente un mínimo de 5 concentraciones. También recomienda que para la valoración de un fármaco (o de un producto terminado) se realice dentro del intervalo de 80% a 120% de la concentración de prueba.¹⁵

c. Precisión. La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos analíticos efectuados sobre una muestra homogénea o expresado de otra forma, es la distribución de los valores analíticos alrededor de su media. La precisión de un método analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa de una serie de mediciones.¹⁸

La precisión engloba diferentes tipos de estudio:

- Repetibilidad o precisión del sistema.- Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos, etc.) en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.²⁶
- Precisión intermedia.- Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra pero en diferentes condiciones operativas (diferentes analistas, aparatos, días, etc.) y en un mismo laboratorio.²⁷
- Reproducibilidad.- Estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios. La precisión de un método analítico se expresa generalmente como el coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas. La reproducibilidad de dicho método de análisis se determina analizando una serie de alícuotas procedentes de lotes homogéneos en diferentes laboratorios, diferentes analistas y utilizando condiciones operativas y ambientales distintas pero siguiendo el procedimiento descrito en el método.²⁴

d. Exactitud. La exactitud de un método analítico, es la proximidad entre los resultados obtenidos por ese método y el valor real.²⁴

En la valoración de un fármaco, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del método analítico con respecto a un analito de pureza conocida (por ejemplo, un estándar de referencia), o comparando los resultados del método con los de un segundo método bien caracterizado, cuya exactitud se haya comprobado o definido.⁴

La exactitud puede a menudo expresarse como un porcentaje de recuperación, por medio de la valoración de cantidades conocidas agregadas de analitos. Representa el grado en que un método analítico es exacto para los fines propuestos.²⁷

e. Robustez. La robustez de un procedimiento analítico es una medida para no ser afectada por variaciones pequeñas, aunque deliberadas, en los parámetros del procedimiento indicados en la documentación, y provee una indicación de su aptitud durante condiciones normales de uso. La robustez puede determinarse durante la etapa de desarrollo del procedimiento analítico.¹⁰

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación

El presente trabajo de Investigación se realizó en el Departamento de Control de Calidad en el área de instrumentación; del Laboratorio Gencopharmaceutical SAC, ubicado en el distrito de Ate de la ciudad de Lima.

3.2. Población

Un lote determinado de 600 L de jarabe de fenilefrina clorhidrato (5 mg/5 mL), guaifenesina (100mg/5mL) y dextrometorfano bromhidrato. (10 mg/5 mL), del área de líquidos del Laboratorio Gencopharmaceutical SAC.

3.3. Muestra

Cuatro litros de placebo de jarabe de fenilefrina clorhidrato (5 mg/5 mL), guaifenesina (100 mg/5 mL) y dextrometorfano bromhidrato. (10 mg/5 mL).

3.3.1. Tipo de muestreo

Muestreo aleatorio simple.

3.3.2. Estándar de referencia:

El estándar a utilizar es un estándar secundario de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina.

Nombre : Dextrometorfano bromhidrato

Lote : 1031203902

Fecha de expira : 2015 - 08

Potencia : 94,95%

Fabricante : Drocorsa

Nombre : Fenilefrina clorhidrato

Lote : PPPHP200302

Fecha de expira : 2017 - 03

Potencia : 98,64%

Fabricante : Drocersa (Química skr laboratorios climittb)
Nombre : Guaifenesina
Lote : GGE04030213
Fecha de expira : 2016 - 10
Potencia : 99,01%
Fabricante : Drocersa (Gennex laboratorios climittb)

3.4. Diseño metodológico para la recolección de datos

3.4.1. Método analítico por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para la determinación de dextrometorfano bromhidrato (10 mg/5 mL), fenilefrina Clorhidrato (5 mg/5 mL) y guaifenesina (100mg/5 mL) jarabe.

3.4.1.1. Fenilefrina clorhidrato y guaifenesina

- **Preparación de la fase móvil.**

Preparar una solución de metanol y solución A (30: 70) y luego filtrar.

Solución A: Disolver 0,55 g. de ácido 1 – hexanosulfónico en agua y enrajar a 500 mL, filtrar a través de un filtro de membrana de 0,45 µm de nylon.

- **Preparación del diluyente**

Mezclar agua y metanol (30:10) y agregar 1 gota de ácido fosfórico luego verificar el pH en aproximadamente 3.0.

- **Preparación del estándar mixto:**

Transferir 50 mg de fenilefrina clorhidrato, exactamente pesados, a una fiola de 100 mL, adicionar 30 mL de diluyente, mezclar, dejar equilibrar a temperatura ambiente y completar a volumen con diluyente. Pesar 100 mg de guaifenesina a una fiola de 100 mL, transferir 10,0 mL de la solución estándar de fenilefrina clorhidrato a fiola de 100 mL y completar a volumen con diluyente, mezclar. (Conc. aprox. de 0,05 mg/mL de fenilefrina clorhidrato y 1 mg/mL de guaifenesina), filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de membrana de 0,20 µm de nylon descartando los primeros mL del filtrado.

- **Preparación de la muestra:**

Transferir 5mL de jarabe (± 5 mg de fenilefrina clorhidrato y 100 mg de guaifenesina), exactamente medidos, a una fiola de 100 mL, adicionar 40 mL de diluyente dejar equilibrar a temperatura ambiente y completar a volumen con diluyente, mezclar, (conc. aprox. de 0,05 mg/ mL de fenilefrina clorhidrato y 1 mg/ mL de guaifenesina), filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de membrana de 0,20 µm de nylon descartando los primeros mL del filtrado.

- **Condiciones cromatográficas:**

Longitud de onda	: 280 nm
Flujo	: 1,0 mL/minuto
Vol. De inyección	: 20 µL
Temperatura	: ambiente
Columna	: Eclipse XDB-Phenyl C18 de 4,6 x 250 mm 5-µm
Tiempos de retención	
Fenilefrina	: 10 min aproximadamente.
Guaifenesina	: 20 min aproximadamente.

- **Cálculos:**

Fenilefrina Clorhidrato

Factor de calibración del estándar de fenilefrina clorhidrato:

$$F_{st} = \frac{W_{St}}{100} \times \frac{10}{100} \times \frac{Pot_{St}}{100}$$

Dónde:

W St : Peso del estándar en miligramos

Pot St : Potencia tal cual del estándar de referencia

Factor de dilución de la muestra:

$$F_{mp} = \frac{100}{V_{mp}} \times Vol. declarado$$

Dónde:

Vm : Volumen de la muestra problema en mililitros

Vol. Declarado : Volumen declarado en la etiqueta 5mL

Fórmula para el cálculo de fenilefrina clorhidrato (5mg/5mL) jarabe

$$contenido\ en\ mg = \frac{Area\ mp}{Area\ St} \times F_{st} \times F_{mp}$$

Dónde:

Área mp : Área de muestra

Área St : Área del estándar

Fst : Factor del estándar

Fmp : Factor de la muestra

Fórmula directa:

$$contenido\ en\ mg = \frac{Área\ mp \times Peso\ St \times 10 \times 100 \times Pot.\ St \times Volumen\ declarado}{Área\ St \times 100 \times 100 \times Volumen\ de\ muestra \times mg/5mL}$$

Dónde:

- Área mp : Área de la muestra
Área St : Área del estándar
Peso St : Peso del estándar
Pot. St : Potencia tal cual del estándar

Guaifenesina:

Factor de calibración del estándar de guaifenesina:

$$Fst = \frac{W St}{100} \times \frac{Pot St}{100}$$

Dónde:

- W St : Peso del estándar en miligramos
Pot St : Potencia tal cual del estándar

Factor de dilución de la muestra:

$$Fmp = \frac{100}{Vmp} \times Vol. declarado$$

Dónde:

- Vmp : Volumen de la muestra en mililitros

Fórmula para el cálculo de guaifenesina (100mg/5mL) jarabe

$$contenido en mg = \frac{Area mp}{Area St} \times Fst \times Fmp$$

Dónde:

- Área mp : Área de muestra
Área St : Área del estándar
Fst : Factor del estándar
Fmp : Factor de la muestra

Formula directa

$$contenido en mg = \frac{Area mp \times Peso St \times 100 \times Pot. St \times Volumen declarado}{Area St \times 100 \times Volumen de muestra \times mg/5mL}$$

Dónde:

- Área mp : Área de la muestra
Área St : Área del estándar
Peso St : Peso del estándar
Pot. St : Potencia del estándar

3.4.1.2. Dextrometorfano bromhidrato.

- **Fase móvil:**

Pesar 1,44 g de lauril sulfato de sodio disolver en 300 mL de agua purificado. A esta solución agregar 5,5mL de trietanolamina, luego llevar a un pH 2,8 – 2,9 con ácido fosfórico, agregar 200mL de acetonitrilo dejar equilibrar a temperatura ambiente finalmente mezclar y filtrar a través de un filtro de membrana de 0,45 - µm de nylon.

- **Preparación del estándar:**

Transferir 25 mg de dextrometorfano bromhidrato, exactamente pesados, a una fióla de 25 mL, adicionar 10 mL de fase móvil, mezclar, dejar equilibrar a temperatura ambiente y completar a volumen con fase móvil. Transferir 1 mL de la dilución anterior a una fióla de 10 mL y llevar a volumen con fase móvil, mezclar (conc. aprox. de 0,1 mg/mL de dextrometorfano bromhidrato). Luego filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de membrana de 0,20 µm de Nylon descartando los primeros mL del filtrado.

- **Preparación de la muestra:**

Transferir 5 mL de jarabe (10 mg de dextrometorfano bromhidrato) a una fióla de 100 mL, adicionar 40 mL de fase móvil dejar equilibrar a temperatura ambiente y completar a volumen con fase movil, mezclar (conc. aprox. de 0,1 mg/mL de dextrometorfano bromhidrato). Luego filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de membrana de 0,20 µm de nylon descartando los primeros mL del filtrado.

- **Condiciones cromatografías:**

Longitud de onda	: 265 nm
Flujo	: 1,5 mL/minuto
Vol. De inyección	: 100 µL
Temperatura	: ambiente
Columna	: Eclipse XDB-C18 de 4,6 x 150 mm 5-µm
Tiempo de retención	: 20 min aproximadamente

- **Cálculos:**

Factor de calibración del estándar de dextrometorfano bromhidrato.

$$F_{st} = \frac{W_{St}}{25} \times \frac{1}{10} \times \frac{Pot_{St}}{100}$$

Dónde:

W St : Peso del estándar en miligramos

Pot St : Potencia tal cual del estándar

Factor de dilución de la muestra:

$$Fmp = \frac{100}{Vmp} \times Vol. declarado$$

Dónde:

Vmp : Volumen de la muestra en mililitros

Fórmula para el cálculo de dextrometorfano bromhidrato (10mg/5mL) jarabe

$$contenido en mg = \frac{Area mp}{Area St} \times Fst \times Fmp$$

Dónde:

Área mp : Área de muestra

Área St : Área del estándar

Fst : Factor del estándar

Fmp : Factor de la muestra

Formula directa:

$$contenido en mg = \frac{Area mp \times Peso St \times 1 \times 100 \times Pot. St \times Volumen declarado}{Area St \times 25 \times 10 \times Volumen de muestra \times mg/5mL}$$

Dónde:

Área mp : Área de la muestra

Área St : Área del estándar

Peso St : Peso del estándar

Pot. St : Potencia del estándar

3.4.2. Aptitud del sistema

Se evalúa a través de inyecciones repetidas de solución estándar, empleando los datos de cinco inyecciones repetidas del analito para calcular la desviación estándar relativa porcentual, cuando la especificación es menor de 2%, se usa este procedimiento para determinar si cumple con los requisitos de precisión del sistema cromatográfico

3.4.3. Desarrollo de los parámetros de validación.

3.4.3.1. Especificidad – Selectividad

a. Determinación de los picos cromatográficos provenientes de los reactivos utilizados durante el análisis

- **Fase móvil.**-Se preparar fase móvil por duplicado como indica en la técnica y filtrar en un vial por separado usando filtro de membrana de 0,20 µm de nylon e inyectar dos inyecciones de cada uno, se determina si hay respuesta.
- **Diluyente.**- Se prepara diluyente por duplicado como se indica en la técnica analítica y se filtra en un vial por separado usando filtro de membrana de 0,20 µm de nylon e inyectar dos inyecciones de cada uno, se determina si hay respuesta.

b. Determinación de picos cromatográficos de excipientes en el placebo, sin contenido de activo

- **Muestra placebo:** Transferir 5 mL de la preparación placebo exactamente medidos, a una fióla de 100 mL, adicionar 40 mL de diluyente dejar equilibrar a temperatura ambiente y completar a volumen con diluyente, mezclar, filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de membrana de 0,20 µm de nylon descartando los primeros mL del filtrado, preparar por duplicado y realizar dos inyecciones de cada uno.

c. Determinación de picos cromatográficos de excipientes en el placebo, al que se le añade el 100% de concentración del principio activo.

Para fenilefrina clorhidrato y guaifenesina:

- **Muestra placebo más principio activo:** Agregar 101,37 mg de principio activo de fenilefrina clorhidrato, agregar 2,02 mg de principio activo de guaifenesina a la muestra placebo en una fióla de 100 mL, de esta solución transferir 5 mL a una fióla de 100 mL y aforar con diluyente, (conc. aprox. de 0,05 mg/mL de fenilefrina clorhidrato), (conc. aprox de 1 mg/mL de guaifenesina), filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de membrana de 0,20 µm de nylon descartando los primeros mL del filtrado, preparar la muestra por duplicado y realizar dos inyecciones de cada uno.

Para dextrometorfano bromhidrato:

- **Muestra placebo más principio activo:** Agregar 210,64 mg de principio activo de dextrometorfano bromhidrato a la muestra placebo en una fióla de 100 mL, de esta solución transferir 5 mL a una fióla de 100 mL y aforar con diluyente, (conc. aprox. de 0,1 mg/mL de dextrometorfano bromhidrato). Luego filtrar una

porción de esta solución a través de un filtro de membrana de 0,20 µm de nylon descartando los primeros mL del filtrado, preparar la muestra por duplicado realizar dos inyecciones de cada uno.

b. Determinación de picos cromatográficos del control negativo (para poder evaluar la capacidad de distinguir otro analito).

Preparar una solución muestra usando otro producto que no contenga el principio activo, en este caso se utilizara como muestra a un producto que contiene cetirizina diclorhidrato como activo, Transferir 5 mL de la solución muestra (jarabe) a una fiólade 100 mL y aforar con diluyente, filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de membrana de 0,20 µm de nylon descartando los primeros mL del filtrado, preparar la muestra por duplicado y realizar dos inyecciones de cada uno.

d. Determinación de picos cromatográficos de impurezas relacionados a la fenilefrina clorhidrato, guaifenesina y dextrometorfano bromhidrato. Placebo más 100% de principio activo.

Para fenilefrina clorhidrato y guaifenesina:

- Muestra sometido a estrés (50° durante 1 hora).- Se transfirió 5 mL de muestra a una fióla de 100 mL, adicionar 40 mL de diluyente dejar equilibrar a temperatura ambiente y completar a volumen con diluyente, mezclar, (conc. aprox. de 0,05 mg/mL de fenilefrina clorhidrato), (conc. Aprox. de 1 mg/mL de guaifenesina), filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de membrana de 0,20 µm de nylon descartando los primeros mL del filtrado, preparar la muestra por duplicado y realizar dos inyecciones de cada uno.

Para dextrometorfano bromhidrato:

- Muestra sometido a estrés (50° durante 1 hora).- Se transfirió 5 mL de muestra a una fióla de 100 mL, adicionar 40 mL de diluyente dejar equilibrar a temperatura ambiente y completar a volumen con diluyente, (conc. aprox. de 0,1 mg/mL de dextrometorfano bromhidrato). Luego filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de membrana de 0,20 µm de nylon descartando los primeros mL del filtrado, preparar la muestra por duplicado.

3.4.3.2. Linealidad. Este ensayo se determina empleando estándares de referencia en las concentraciones de 80%, 90%, 100%, 110%, 120% para determinar la linealidad del sistema, y se realiza ensayos empleando placebo + activo (muestra) en las concentraciones de 80%, 90%, 100%, 110%, 120% para determinar la linealidad del método.

a. Linealidad del sistema. Se efectúa empleando estándares de referencia en las concentraciones de 80%, 90%, 100%, 110% y 120%, se prepara las muestras por triplicado pesados independientemente, realizar inyecciones por triplicado de cada preparación del estándar según el método analítico.

Para fenilefrina clorhidrato y guaifenesina:

- **Solución estándar al 80%.** Pesar 40,54 mg de fenilefrina clorhidrato., llevar a una fiola de 100 mL, aforar a volumen con diluyente, transferir 10 mL de esta solución a una fióla de 100 mL, agregar a esta fióla 80,80 mg de guaifenesina mezclar y aforar a volumen con diluyente corresponde a 0,04 mg/mL de fenilefrina clorhidrato, y 0,8 mg/mL de guaifenesina.
- **Solución estándar al 90%.** Pesar 45,61 mg de fenilefrina clorhidrato, llevar a una fiola de 100 mL, aforar a volumen con diluyente, transferir 10 mL de esta solución a una fióla de 100 mL, agregar a esta fióla 90,90 mg de guaifenesina mezclar y aforar a volumen con diluyente corresponde a 0,045 mg/mL de fenilefrina clorhidrato, y 0,9 mg/mL de guaifenesina.
- **Solución estándar al 100%.** Pesar 50,68 mg de fenilefrina clorhidrato., llevar a una fiola de 100 mL, aforar a volumen con diluyente, transferir 10 mL de esta solución a una fióla de 100 mL, agregar a esta fióla 101,00 mg de guaifenesina mezclar y aforar a volumen con diluyente corresponde a 0,05 mg/mL de fenilefrina clorhidrato, y 1 mg/mL de guaifenesina.
- **Solución estándar al 110%.** Pesar 55,70 mg de fenilefrina clorhidrato., llevar a una fióla de 100 mL, aforar a volumen con diluyente, transferir 10 mL de esta solución a una fióla de 100 mL, agregar a esta fióla 111,10 mg de guaifenesina, mezclar y aforar a volumen con diluyente corresponde a 0,055 mg/mL de fenilefrina clorhidrato, y 1,1 mg/mL de guaifenesina.
- **Solución estándar al 120%.** Pesar 60,82 mg de fenilefrina clorhidrato, llevar a una fiola de 100 mL, aforar a volumen con diluyente, transferir 10 mL de esta solución a una fióla de 100 mL, agregar a esta fióla 121,20 mg de guaifenesina mezclar y aforar a volumen con diluyente corresponde a 0,060 mg/mL de fenilefrina clorhidrato, y 1,2 mg/mL de guaifenesina.

Para dextrometorfano bromhidrato:

- **Solución estándar al 80%.** Pesar 21,06 mg de dextrometorfano bromhidrato, y llevar a una fióla de 25 mL, aforar a volumen con fase móvil, transferir 1 mL de esta solución a una fióla de 10 mL, mezclar y aforar a volumen con fase móvil, corresponde a 0,08 g/mL de dextrometorfano bromhidrato.

- **Solución estándar al 90%.** Pesar 23,70 mg de dextrometorfano bromhidrato, y llevar a una fióla de 25 mL, aforar a volumen con fase móvil, transferir 1 mL de esta solución a una fióla de 10 mL, mezclar y aforar a volumen con fase móvil, corresponde a 0,09 g/mL de dextrometorfano bromhidrato.
- **Solución estándar al 100%.** Pesar 25 mg de dextrometorfano bromhidrato., y llevar a una fióla de 25 mL, aforar a volumen con fase móvil, transferir 1 mL de esta solución a una fióla de 10 mL, mezclar y aforar a volumen con fase móvil, corresponde a 0,1 g/mL de dextrometorfano bromhidrato.
- **Solución estándar al 110%.** Pesar 28,96 mg de dextrometorfano bromhidrato, y llevar a una fióla de 25 mL, aforar a volumen con fase móvil, transferir 1 mL de esta solución a una fióla de 10 mL, mezclar y aforar a volumen con fase móvil; corresponde a 0,11 g/mL de dextrometorfano bromhidrato.
- **Solución estándar al 120%.** Pesar 31,60 mg de dextrometorfano bromhidrato, y llevar a una fióla de 25 mL, aforar a volumen con fase móvil, transferir 1 mL de esta solución a una fióla de 10 mL, mezclar y aforar a volumen con fase móvil, corresponde a 0,12 g/mL de dextrometorfano bromhidrato.

b. Linealidad del método: Se trabaja a diferentes concentraciones de placebo más principio activo.

Para fenilefrina clorhidrato y guaifenesina

- **Solución placebo más principio activo al 80%.** Pesar 40,54 mg de fenilefrina clorhidrato, llevar a una fióla de 50 mL, pesar 842,55 mg de guaifenesina y agregar a la misma fióla de 50 mL, aforar a volumen con placebo, tomar 5 mL de esta solución y llevar a una fióla de 100 mL, mezclar y aforar a volumen con diluyente, corresponde a 0,04 mg/mL de fenilefrina clorhidrato y 0,8 mg/mL de guaifenesina.
- **Solución placebo más principio activo al 90%.** Pesar 45,61 mg de fenilefrina clorhidrato., llevar a una fióla de 50 mL, pesar 947,87 mg de guaifenesina y agregar a la misma fióla de 50 mL, aforar a volumen con placebo, tomar 5 mL de esta solución y llevar a una fióla de 100 mL, mezclar y aforar a volumen con diluyente, corresponde a 0,045 mg/mL de fenilefrina clorhidrato, y 0,9 mg/mL de guaifenesina.
- **Solución placebo más principio activo al 100%.** Pesar 50,68 mg de fenilefrina clorhidrato, llevar a una fióla de 50 mL, pesar 1053,51 mg de

guaifenesina y agregar a la misma fióla de 50 mL, aforar a volumen con placebo, tomar 5 mL de esta solución y llevar a una fióla de 100 mL, mezclar y aforar a volumen con diluyente, corresponde a 0,05 mg/mL de fenilefrina clorhidrato, y 1 mg/mL de guaifenesina.

- **Solución placebo más principio activo al 110%.** Pesar 55,75 mg de fenilefrina clorhidrato, llevar a una fióla de 50 mL, pesar 1158,51 mg de guaifenesina y agregar a la misma fióla de 50 mL, aforar a volumen con placebo, tomar 5 mL de esta solución y llevar a una fióla de 100mL, mezclar y aforar a volumen con diluyente, corresponde a 0,055 mg/mL de fenilefrina clorhidrato, y 1,1 mg/mL de guaifenesina.
- **Solución placebo más principio activo 120%.** Pesar 60,82 mg de fenilefrina clorhidrato, llevar a una fióla de 50 mL, pesar 1263,83 mg de guaifenesina y agregar a la misma fióla de 50 mL, aforar a volumen con placebo, tomar 5mL de esta solución y llevar a una fióla de 100mL, mezclar y aforar a volumen con diluyente, corresponde a 0,06 mg/mL de fenilefrina clorhidrato y 1,2 mg/mL de guaifenesina.

Para dextrometorfano bromhidrato:

- **Solución placebo más principio activo 80%.** Pesar 84,26 mg de dextrometorfano bromhidrato, y llevar a una fióla de 50 mL, aforar a volumen con placebo, transferir 5 mL de esta solución a una fióla de 100 mL, mezclar y aforar a volumen con fase móvil, corresponde a 0,08 g/mL de dextrometorfano bromhidrato.
- **Solución placebo más principio activo al 90%.** Pesar 94,79 mg de dextrometorfano bromhidrato., y llevar a una fióla de 50 mL, aforar a volumen con placebo, transferir 5 mL de esta solución a una fióla de 100 mL, mezclar y aforar a volumen con fase móvil, corresponde a 0,09 g/mL de dextrometorfano bromhidrato.
- **Solución placebo más principio activo al 100%.** Pesar 105,32 mg de dextrometorfano bromhidrato, y llevar a una fióla de 50 mL, aforar a volumen con placebo, transferir 5 mL de esta solución a una fióla de 100 mL, mezclar y aforar a volumen con fase móvil, corresponde a 0,1 g/mL de dextrometorfano bromhidrato.
- **Solución placebo más principio activo al 110%.** Pesar 115,85 mg de dextrometorfano bromhidrato y llevar a una fióla de 50 mL, aforar a volumen con placebo, transferir 5 mL de esta solución a una fióla de 100 mL, mezclar y

aforar a volumen con fase móvil, Corresponde a 0,11 g/mL de dextrometorfano bromhidrato.

- **Solución placebo más principio activo al 120%.** Pesar 126,38 mg de dextrometorfano bromhidrato, y llevar a una fióla de 50 mL, aforar a volumen con placebo, transferir 5 mL de esta solución a una fióla de 100 mL, mezclar y aforar a volumen con fase móvil, corresponde a 0,12 g/mL de dextrometorfano bromhidrato.

3.4.3.3. Precisión:

Este ensayo se realiza para determinar la capacidad de un método analítico para dar resultados semejantes o alrededor del valor medio o central cuando se aplican análisis repetidos a una muestra homogénea.

a. Precisión del sistema o repetibilidad instrumental:

Se realiza bajo las mismas condiciones operativas, se prepara 10 soluciones de estándares exactamente pesados y a una concentración única del 100%, haciendo las mismas diluciones que se hacen para estándar en el método analítico.

Para fenilefrina clorhidrato y guaifenesina

- **Preparación del estándar.** Transferir 50 mg de fenilefrina clorhidrato, exactamente pesados, a una fióla de 100 mL, adicionar 30 mL de diluyente, mezclar, dejar equilibrar a temperatura ambiente y completar a volumen con diluyente. Pesar 100 mg de guayfenesina a una fióla de 100 mL, transferir 10 mL de la solución estándar de fenilefrina clorhidrato a fióla de 100 mL y completar a volumen con diluyente, mezclar. (conc. aprox. de 0,05 mg/mL de fenilefrina clorhidrato y 1 mg/mL de guaifenesina), filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de membrana de 0,20 μ m de nylon descartando los primeros mL del filtrado, inyectar por triplicado cada muestra.

Para dextrometorfano bromhidrato

- **Preparación del estándar.** Transferir 25 mg de dextrometorfano bromhidrato, exactamente pesados, a una fióla de 25 mL, adicionar 10 mL de fase móvil, mezclar, dejar equilibrar a temperatura ambiente y completar a volumen con fase móvil. Transferir 1 mL de la dilución anterior a una fióla de 10 mL y llevar a volumen con fase móvil, mezclar (conc. aprox. de 0,1 mg/mL de dextrometorfano bromhidrato).

Luego filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de membrana de 0,20 μ m de nylon descartando los primeros mL del filtrado.

b. Repetibilidad del método:

Este ensayo sirve para determinar la dispersión de varias muestras homogéneas del placebo más principio activo al 100% ó producto, se realiza bajo las mismas condiciones operativas, se prepara 10 muestras del producto a una concentración única de 100% haciendo las mismas diluciones que se hacen para la muestra problema a dicha concentración.

Para fenilefrina clorhidrato y guaifenesina

- **Preparación de la muestra.**-Transferir 5mL de jarabe (5 mg de fenilefrina clorhidrato y 100 mg de guaifenesina), exactamente medidos, a una fióla de 100 mL, adicionar 40 mL de diluyente dejar equilibrar a temperatura ambiente y completar a volumen con diluyente, mezclar, (conc. aprox. de 0,05 mg/mL de fenilefrina clorhidrato y 1 mg/mL de guaifenesina), filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de membrana de 0,20 μ m de nylon descartando los primeros mL del filtrado.

Para dextrometorfano bromhidrato

- **Preparación de la muestra.** Transferir 25 mg de dextrometorfano bromhidrato, exactamente pesados, a una fióla de 25 mL, adicionar 10 mL de fase móvil, mezclar, dejar equilibrar a temperatura ambiente y completar a volumen con fase móvil. Transferir 1 mL de la dilución anterior a una fióla de 10 mL y llevar a volumen con fase móvil, mezclar (conc. aprox. de 0,1 mg/mL de dextrometorfano bromhidrato). Luego filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de membrana de 0,20 μ m de nylon descartando los primeros mL del filtrado.

c. Precisión intermedia.

Este ensayo sirve para determinar la variación o dispersión de resultados de muestras del producto analizados por dos analistas en días diferentes y dentro del mismo laboratorio con columnas diferentes, se debe preparar 10 muestras homogéneas del placebo de excipientes más principio activo al 100% ó producto. Realizar las mismas diluciones que se hacen para la muestra problema según el método analítico.

3.4.3.4. Exactitud

Este ensayo se realiza para determinar el grado de concordancia o diferencia entre la media de los resultados del ensayo y el valor verdadero. Se emplean placebos más excipientes a los que se adicionan cantidades exactas de principio activo para obtener solución muestra a las concentraciones de 80%, 100% y

120% al cual se le adiciona una cantidad de principio activo, analizar cada muestra por triplicado, preparando cada muestra con las mismas diluciones que se hacen para la muestra problema a dicha concentración.

Para fenilefrina clorhidrato y guaifenesina:

- Solución placebo más principio activo al 80%: Pesar 40,54 mg de fenilefrina clorhidrato, llevar a una fióla de 50 mL, pesar 842,55 mg de guaifenesina y agregar a la misma fióla de 50 mL, aforar a volumen con placebo, tomar 5 mL de esta solución y llevar a una fióla de 100 mL, mezclar y aforar a volumen con diluyente, corresponde a 0,04 mg/mL de fenilefrina clorhidrato, y 0,8 mg/mL de guaifenesina.
- Solución placebo más principio activo al 100%: Pesar 50,68 mg de fenilefrina Clorhidrato, llevar a una fióla de 50 mL, pesar 1053,51 mg de guaifenesina y agregar a la misma fióla de 50 mL, aforar a volumen con placebo, tomar 5 mL de esta solución y llevar a una fióla de 100 mL, mezclar y aforar a volumen con diluyente, corresponde a 0,05 mg/mL de fenilefrina cloridratoh, y 1 mg/mL de guaifenesina.
- Solución placebo más principio activo 120%: Pesar 60,82 mg de fenilefrina clorhidrato, llevar a una fióla de 50 mL, pesar 1263,83 mg de guaifenesina y agregar a la misma fióla de 50 mL, aforar a volumen con placebo, tomar 5 mL de esta solución y llevar a una fióla de 100 mL, mezclar y aforar a volumen con diluyente, corresponde a 0,06mg/mL de fenilefrina clorhidrato, y 1,2 mg/mL de guaifenesina.

Para dextrometorfano bromhidrato:

- **Solución placebo más principio activo 80%.** Pesar 84,26 mg de dextrometorfano bromhidrato y llevar a una fióla de 50 mL, aforar a volumen con placebo, transferir 5 mL de esta solución a una fióla de 100 mL, mezclar y aforar a volumen con fase móvil, corresponde a 0,08 g/mL de dextrometorfano bromhidrato.
- **Solución placebo más principio activo al 100%.** Pesar 105,32 mg de dextrometorfano bromhidrato y llevar a una fióla de 50 mL, aforar a volumen con placebo, transferir 5 mL de esta solución a una fióla de 100 mL, mezclar y aforar a volumen con fase móvil, corresponde a 0,1 g/mL de dextrometorfano bromhidrato.
- **Solución placebo más principio activo al 120%.** Pesar 126,38 mg de dextrometorfano bromhidrato y llevar a una fióla de 50 mL, aforar a volumen

con placebo, transferir 5 mL de esta solución a una fióla de 100 mL, mezclar y aforar a volumen con fase móvil, corresponde a 0,12 g/mL de dextrometorfano bromhidrato.

3.5. Análisis de datos estadísticos

Los resultados obtenidos fueron introducidos en un ordenador Excel y se calculó el contenido, los promedios, desviación estándar, coeficiente de variación, regresión lineal, y el intervalo de confianza y se realizó la interpretación estadística mediante la prueba de t de Student y G de Cochram, para comparar se realizó el análisis de varianza con un 95% de confianza; para hallar el grado de eficacia significativa.

3.5.1. Aptitud del sistema: La solución preparada se inyecta 10 veces. Verificar los cálculos de platos teóricos, de factor de cola o tailing y calcular la desviación estándar relativa porcentual.

PARAMETROS DE LA USP	ESPECIFICACION
Desviación Estándar Relativa (RSD)	Igual o menor que 2,0%
Platos Teóricos	Igual o Mayor a 1500
Factor Tailing (T)	Igual o Menor que 2,0

3.5.2. Selectividad – Especificidad: las muestras inyectadas deben cumplir con las siguientes especificaciones:

DATOS CUALITATIVOS	
MUESTRA	DETALLE
Fase móvil	La corrida de fase móvil no debe mostrar picos en el tiempo de retención del principio activo analizados por este método
Diluyente	La corrida del diluyente no debe mostrar picos en el tiempo de retención del principio activo analizados por este método
Placebo de excipientes puros	La corrida de placebo puro no debe mostrar picos que interfieran con el tiempo de retención del principio activo analizados por este método
Placebo de excipiente + principio activo	La corrida de placebo de excipiente puro + principio activo debe mostrar el pico con el tiempo de retención semejante al de la técnica analítica en estudio

Estándar de fenilefrina clorhidrato, guaifenesina y dextrometorfano bromhidrato.

Para la confirmación de los tiempo de retención de los principios activos se inyecta los estándares de referencia, y se debe obtener picos con tiempos de retención característicos, el cual debe ser igual al del placebo + excipiente

Muestra sometido a estrés: baño maría a 50°C, a otro pH

La corrida de la muestra sometido a estrés no debe mostrar picos que interfieran con el tiempo de retención de los principios activos analizados por este método

3.5.3. Linealidad:

Calculo de la recta de regresión

- Ecuación de la recta:

$$y = bx + a$$

Dónde:

X: Concentración del analito

Y: Valor de la respuesta en área del pico cromatografía

b: Valor de la pendiente en la recta

a: Valor del intercepto de la recta con el eje "y"

- Fórmula para hallar la pendiente "b"

$$b = \frac{(x - \bar{x}) y - \bar{y}}{\sum(x - \bar{x})^2} = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

- Fórmula para hallar "a"

$$a = y - bx \frac{\sum y - b \sum x}{n}$$

Interpretación estadística de la regresión lineal

- Coeficiente de correlación "r":** El coeficiente de correlación "r", permite establecer si existe relación entre las variables x (Concentración) e y (Respuesta)

- **Test de Hipótesis para el Coeficiente de correlación "r"**

H₀: "r" es diferente de 1

Criterio de aceptación: "r" no debe ser significativamente diferente de 1

$$r = \frac{\sum xy - \frac{\sum y \sum x}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right)}$$

- **Coefficiente de determinación.-** Es el cuadrado del coeficiente de correlación "r", e indica la proporción de la varianza total de "y". este debe ser mayor o igual a 0,990 para ingredientes activos para una formula.
- **Test de hipótesis para demostrar regresión en función del coeficiente de correlación "r"**
 H_0 = no hay correlación entre x e y
 H_1 = Presenta correlación

Criterio de aceptación.- Si el valor de "t" obtenido es mayor que el de "t" de tabla, calculado para (n-2) grados de libertad y un nivel de significancia del 95% (probabilidad, p= 0,05), entonces si hay correlación entre "x" e "y"

Calculo de "t": t exp

$$t \text{ exp} = \frac{r \sqrt{(n-2)}}{(1-r^2)}$$

b. Test de Linealidad

- **Desviación estándar relativa de los factores de respuesta "f"**

Criterio de aceptación: RSD ≤ 5%

Calculo de "f"

$$f = \frac{y}{x}$$

- **Significancia estadística de la varianza de la pendiente "b"**

Test de Hipótesis para la pendiente "b": $H_0: b=0$

Criterio de aceptación "b": debe ser significativamente diferente de cero

Calculo de la varianza de la pendiente: S_b^2

$$S_b^2 = \frac{s^2_{xy}}{\sum(x-x)^2} = \frac{s^2_{xy}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

Calculo de la varianza del error experimental total: $S^2_{x,y}$

$$S^2_{xy} = \frac{\sum y^2 - a\sum y - b\sum xy}{n-2} = \frac{\sum(y-y)^2(1-r)^2}{n-2}$$

Calculo de la desviación estándar de la pendiente: S_b

$$S_b = \sqrt{S_b^2}$$

$$S_{b \text{ real}}(\%) = \frac{S_b \cdot 100}{b}$$

Calculo de los límites de confianza de la pendiente:

$$b = \pm t_{\text{tabla}} S_b$$

Dónde: "t_{tabla}" es el valor de la distribución de Student para (n-2) grados de libertad y un grado de significancia del 95% (probabilidad, $\alpha = 0.05$)

Cálculo del valor de "t" experimental: t_{exp}

$$t_{\text{exp}} = \frac{b}{S_b}$$

Criterio de aceptación: Si t_{exp} > t_{tabla} para $\alpha = 0.05$ y (n-2) grados de libertad, entonces "b" es significativamente diferente de cero y se rechaza la hipótesis nula (H₀)

c. Test de proporcionalidad

- **Significancia estadística de la varianza del intercepto "a":**

Test de hipótesis para el intercepto "a": H₀: a = 0

Criterio de aceptación: "a" no debe ser significativamente diferente de cero.

Calculo de la **varianza** del intercepto: S_a²

$$S_{a^2} = \frac{s^2_{xy} (\sum x^2)}{\sum x - x^2(n)} = \frac{s^2_{xy} (\sum x^2)}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2 n}{n}}$$

Calculo de la **varianza** del error experimental total: S²_{x,y}

$$S^2_{xy} = \frac{\sum y^2 - a\sum y - b\sum xy}{n - 2} = \frac{\sum (y - y)^2 (1 - r)^2}{n - 2}$$

Calculo de la **desviación estándar** del intercepto: S_a

$$S_a = \sqrt{S_{a^2}} \quad S_{a \text{ real}(\%)} = \frac{S_{a.100}}{n}$$

Calculo de los límites de confianza del intercepto:

$$a = \pm t_{\text{tabla}} S_a$$

Dónde:

"t" es el valor de la distribución de Student para (n-2) grados de libertad con una probabilidad de $\alpha = 0.05$

Cálculo del valor de "t" experimental: t_{exp}

$$t_{\text{exp}} = \frac{a}{S_a}$$

Criterio de aceptación: Si $t_{exp} < t_{tabla}$, para $\alpha = 0,05$, (n-2) grados de libertad entonces "a" no es significativamente diferente de cero y se rechaza la hipótesis nula (H_0).

3.4.4. Precisión: El RSD debe ser $\leq 2\%$ para los diferentes métodos de análisis

a. Precisión del sistema

Intervalo de confianza individual: $\mu = X \pm t.S$

Dónde: $t_{tabla: 0.05}=2,306$ para n-1 grados de libertad (9-1=8) y un nivel de confianza de 95%

$\mu = X \pm t_{tabla}. S$, de los datos que se va obtener:

$$\mu = \dots \pm 2,306 (S)$$

Entonces: $\dots \leq \mu \leq \dots$

Intervalo de confianza de la media: $\mu = X \pm t.S / \bar{n}$

Dónde: $t_{tabla: 0.05}=2,306$ para n-1 grados de libertad (9-1=8) y un nivel de confianza de 95%

$$\mu = x + \frac{t_{tabla}}{n} x S$$

Entonces: $\dots \leq \mu \leq \dots$

b. Precisión intermedia

Intervalo de confianza individual: $\mu = x \pm t_{tabla} x S$

Dónde: $t_{exp} = 2,110$ para n -1 grados de libertad (18-1=17) y un nivel de confianza de 95%

De los datos que se van a obtener: $\mu = x \pm 2.110 X S$

Entonces: $\dots < \mu < \dots$

Intervalo de confianza de la media: $\mu = x \pm t X S / \bar{n}$

Dónde: $t_{exp} = 2,110$ para n-1 grados de libertad (18-1=17) y un nivel de confianza de 95%.

$$\mu = x + \frac{t_{tabla}}{n} x S$$

Entonces: $\dots < \mu < \dots$

3.5.5. Exactitud:

a. Determinación de porcentaje de recuperación

$$\%R = \frac{Xh}{Xa} x 100$$

Además: $98\% \leq \%R \leq 102\%$

Dónde:

%R : Porcentaje de recuperación

Xh : Cantidad de analito hallado

Xa : Cantidad de analito añadido

b. Aplicación de test de "t" de Student

Criterio de aceptación.- Si el "t" experimental es menor al "t" de tablas ($t_{tablas; 0.05; 2,306}$), para $(n-1) = 8$ grados de libertad y un nivel de aceptación del 95% ($p= 0.05$), entonces no existe diferencias significativas entre la recuperación media y la cantidad añadida del analito.

Cálculo de t experimental

$$t_{exp} = \frac{100 - R - \bar{n}}{RSD}$$

Dónde:

R : Porcentaje de recuperación promedio de todos los datos

n : Número de mediciones

RSD : Desviación estándar relativa o coeficiente de variación del total de mediciones. Si $t_{exp} < t_{tablas}$

Intervalo de confianza de porcentaje de recuperación

Dónde: $t = 2,306$ para $n-1$ grados de libertad = $9-1=8$ y un nivel de confianza del 95%

$$\mu = \frac{t_{8;0.005}}{n} \times S$$

Entonces..... $\leq \mu \leq$

Rango:

En el siguiente cuadro, mostramos los rangos permitidos para las diferentes pruebas.

ENSAYOS	RANGO
LINEALIDAD	80,0% – 120,0%
PRECISION	80,0% – 120,0%
EXACTITUD	80,0% – 120,0%

IV. RESULTADOS

Tabla 1. Aptitud del sistema según parámetros y criterios de adecuación de la guaifenesina, fenilefrina clorhidrato y dextrometorfano bromhidrato, Gencopharmaceutical Lima -2014.

PARAMETROS DE ADUACION	CRITERIO DE ADECUACION	CRITERIO DE ACEPTACION	RESULTADOS		
			guaifenesina	fenilefrina	dextrometorfano
REPETIBILIDAD	Tiempo de retención	RSD < 2,0%	0,33%	0,20%	1,38%
	Áreas	RSD < 2,0%	0,13%	0,18%	0,16%
PARAMETROS CROMATOGRAFICOS	Platos Teóricos	No menor a 1500	11193	7618	9675
	Factor de cola o Tailing	Menor de 2	0,66	0,58	0,86

Tabla 2. Selectividad-especificidad, porcentaje de interferencia al determinar la guaifenesina, fenilefrina clorhidrato y dextrometorfano bromhidrato, medido por la adición de interferentes en el estándar y placebo, Gencopharmaceutical Lima - 2014.

P.A	MUESTRA	ESPECIFICACION (INTERFERENCIA)	PORCENTAJE DE INTERFERENCIA	RESULTADOS
GUAIENESINA	Fase móvil	No mayor de 2,0%	No se observa interferencia	Conforme
	Diluyente	No mayor de 2,0%	No se observa interferencia	Conforme
	Placebo	No mayor de 2,0%	No se observa interferencia	Conforme
	Placebo + PA	---	No se observa interferencia	Conforme
	PA	----	No se observa interferencia	Conforme
	Control Negativo	No mayor de 2,0%	No se observa interferencia	Conforme
	Muestra sometido a estrés	No mayor de 2,0%	No se observa interferencia	Conforme
	Muestra a otro pH	No mayor de 2,0%	No se observa interferencia	Conforme
	Fase móvil	No mayor de 2,0%	No se observa interferencia	Conforme
ENILEFRINA CLORH.	Diluyente	No mayor de 2,0%	No se observa interferencia	Conforme
	Placebo	No mayor de 2,0%	No se observa interferencia	Conforme
	Placebo + PA	----	No se observa interferencia	Conforme
	PA	----	No se observa interferencia	Conforme
	Control Negativo	No mayor de 2,0%	No se observa interferencia	Conforme
	Muestra sometido a estrés	No mayor de 2,0%	No se observa interferencia	Conforme
	Muestra a otro pH	No mayor de 2,0%	No se observa interferencia	Conforme
	Fase móvil	No mayor de 2,0%	No se observa interferencia	Conforme
	Diluyente	No mayor de 2,0%	No se observa interferencia	Conforme
DEXTROMETORFANO	Placebo	No mayor de 2,0%	No se observa interferencia	Conforme
	Placebo + PA	----	No se observa interferencia	Conforme
	PA	----	No se observa interferencia	Conforme
	Control Negativo	No mayor de 2,0%	No se observa interferencia	Conforme
	Muestra sometido a estrés	No mayor de 2,0%	No se observa interferencia	Conforme
	Muestra a otro pH	No mayor de 2,0%	No se observa interferencia	Conforme
	Fase móvil	No mayor de 2,0%	No se observa interferencia	Conforme
	Diluyente	No mayor de 2,0%	No se observa interferencia	Conforme
	Placebo	No mayor de 2,0%	No se observa interferencia	Conforme

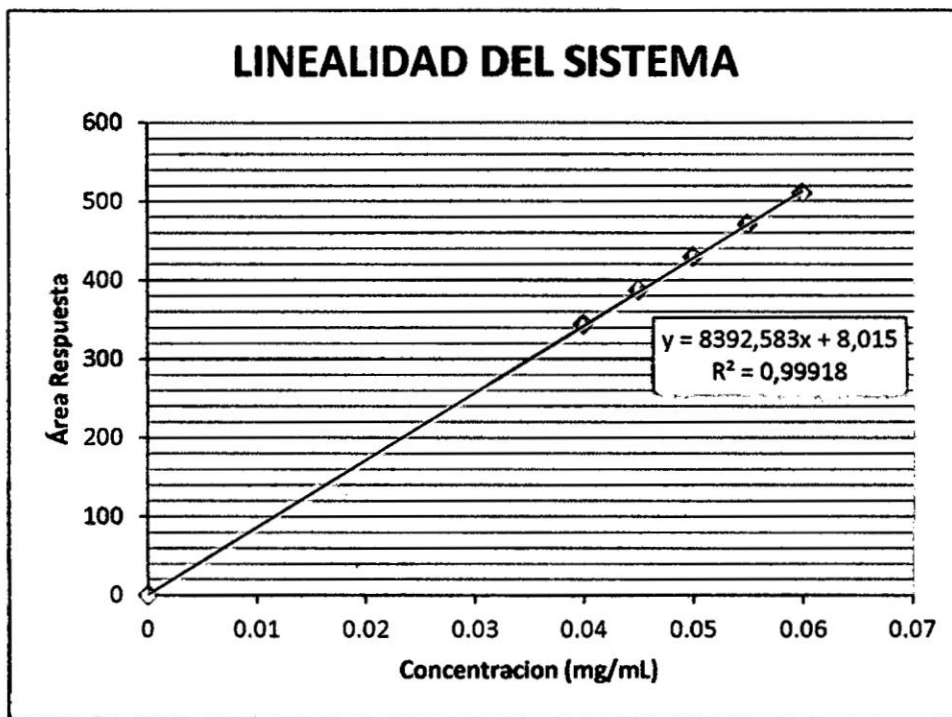


Figura 1. Área versus concentración para determinar la linealidad del sistema para la fenilefrina clorhidrato. Gencopharmaceutical Lima -2014.

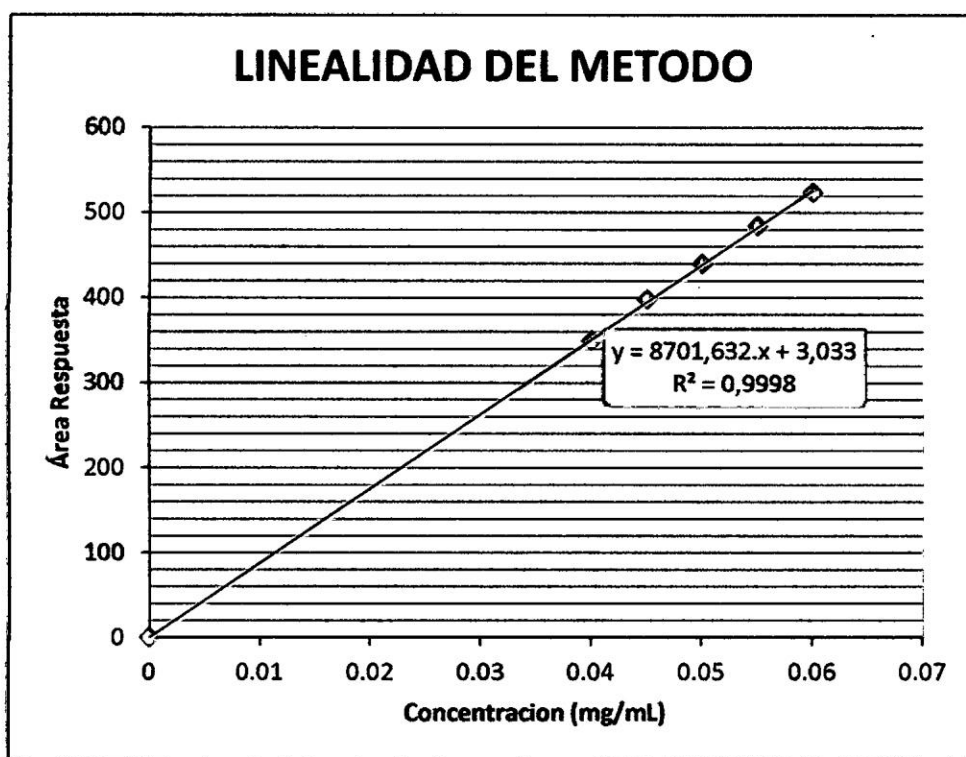


Figura 2. Área versus concentración para determinar la linealidad del método para la fenilefrina clorhidrato. Gencopharmaceutical Lima -2014.

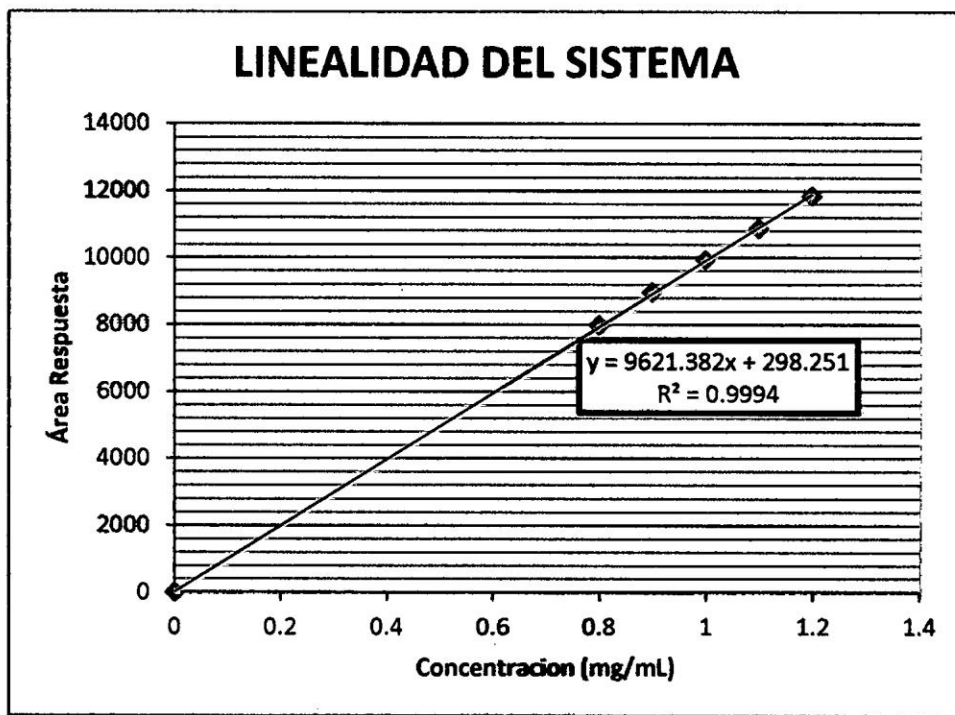


Figura 3. Área versus concentración para determinar la linealidad del sistema para la guaifenesina. Gencopharmaceutical Lima -2014.

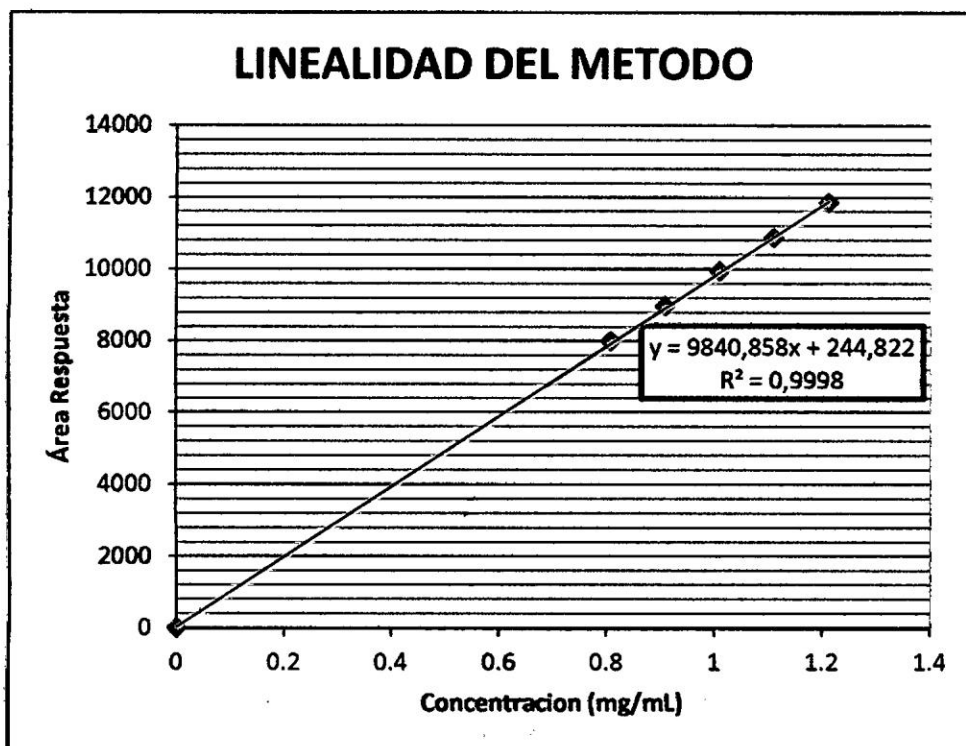


Figura 4. Área versus concentración para determinar la linealidad del método para la guaifenesina. Gencopharmaceutical Lima -2014.

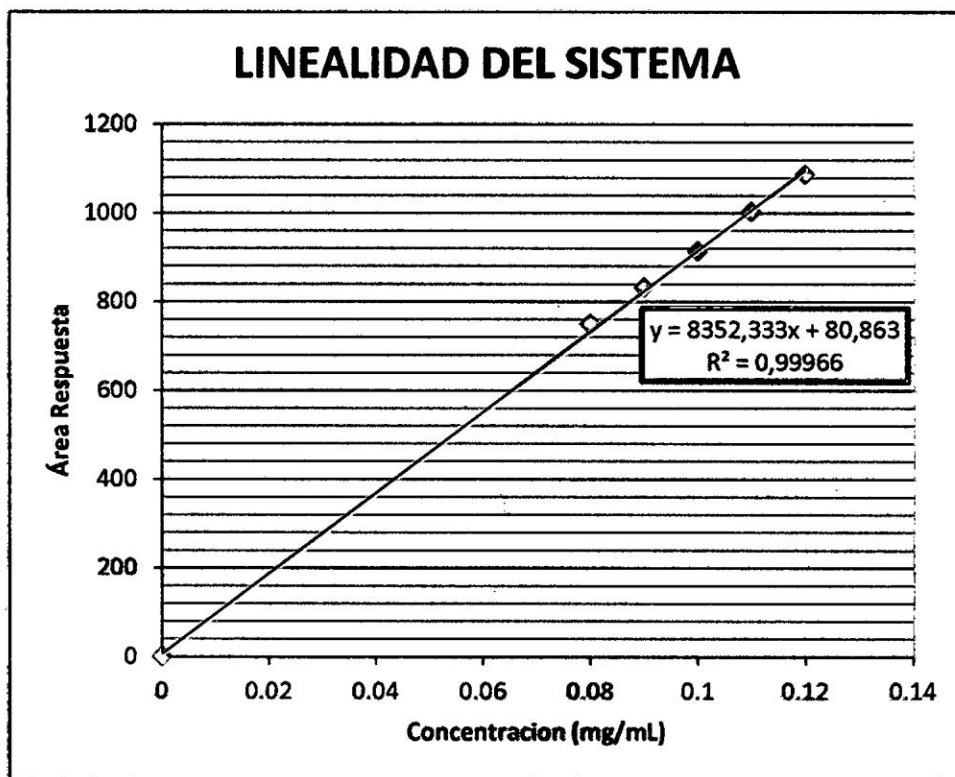


Figura 5. Área versus concentración para determinar la linealidad del sistema para el dextrometorfano bromhidrato. Gencopharmaceutical Lima -2014.

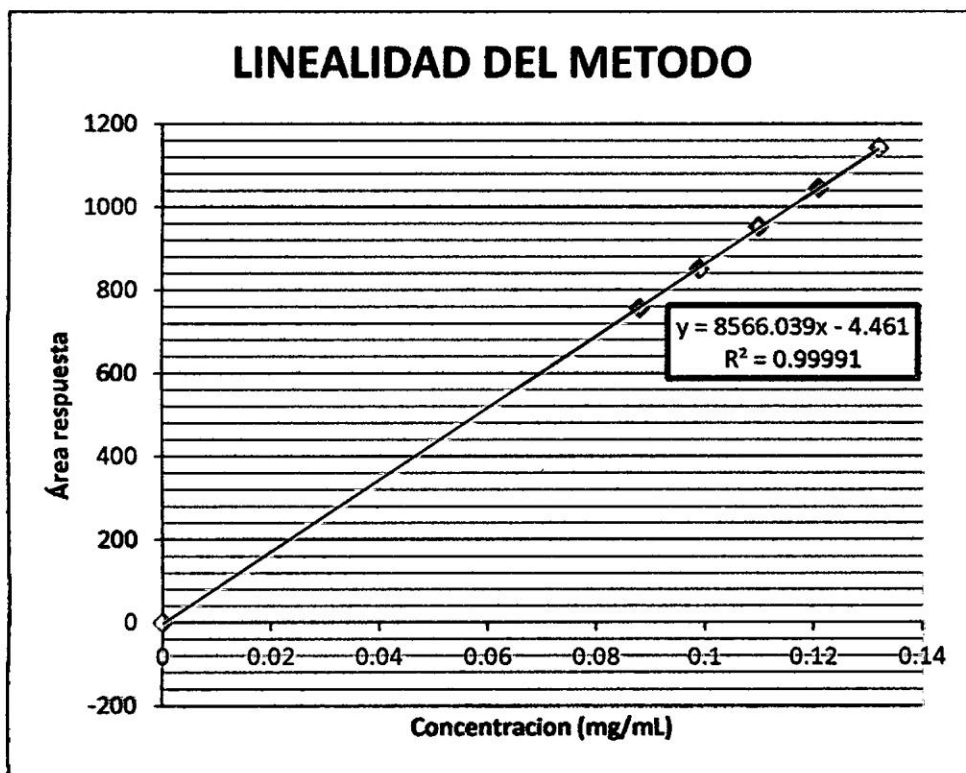


Figura 6. Área versus concentración para determinar la linealidad del método para el dextrometorfano bromhidrato. Gencopharmaceutical Lima -2014.

Tabla 3. Precisión del sistema o repetibilidad instrumental según áreas de fenilefrina clorhidrato Gencopharmaceutical Lima -2014.

MUESTRAS	PESO	AREAS	PROMEDIO DE AREAS
1	50,1 mg	435,00931	435,03163
		434,86050	
		435,22507	
2	50,1 mg	435,26907	435,25460
		435,16602	
		435,32870	
3	50,1 mg	433,91681	433,60437
		433,76996	
		433,12634	
4	50,1 mg	433,06827	432,54709
		432,47821	
		432,09479	
5	50,1 mg	432,06787	431,76336
		431,66727	
		431,55493	
6	50,0 mg	431,22012	430,84870
		430,84167	
		430,48431	
7	50,0 mg	429,57803	429,23281
		429,33063	
		428,78976	
8	50,0 mg	428,55646	427,96749
		427,97141	
		427,37460	
9	50,0 mg	426,58279	425,98732
		425,95337	
		425,42581	
10	50,1 mg	436,22284	436,11430
		436,11166	
		436,00839	
PROMEDIO			431,83517
DESVIACIÓN ESTANDAR			2,617
COEFICIENTE DE VARIACIÓN			0,61%

Tabla 4. Precisión del sistema o repetibilidad instrumental según áreas de guaifenesina. Gencopharmaceutical Lima -2014.

MUESTRAS	PESO	AREAS	PROMEDIO DE AREAS
1	100,0 mg	10219,5000	10217,36667
		10222,6000	
		10210,0000	
2	100,0 mg	10220,3000	10213,10000
		10206,3000	
		10212,7000	
3	100,0 mg	10203,6000	10199,16667
		10196,8000	
		10197,1000	
4	100,1 mg	10205,3000	10198,80000
		10196,5000	
		10194,6000	
5	100,0 mg	10196,3000	10197,23333
		10198,6000	
		10196,8000	
6	100,1 mg	10197,7000	10195,50000
		10195,3000	
		10193,5000	
7	100,1 mg	10193,7000	10194,00000
		10194,4000	
		10193,9000	
8	100,0 mg	10199,0000	10192,50000
		10189,6000	
		10188,9000	
9	100,0 mg	10199,0000	10195,86667
		10192,7000	
		10195,9000	
10	100,0 mg	10214,0000	10206,53333
		10199,8000	
		10205,8000	
PROMEDIO			10201,00667
DESVIACIÓN ESTANDAR			9,166
COEFICIENTE DE VARIACIÓN			0,090%

Tabla 5. Precisión del sistema o repetibilidad instrumental según áreas del dextrometorfano bromhidrato. Gencopharmaceutical Lima -2014.

MUESTRAS	PESO	AREAS	PROMEDIO DE AREAS
1	25,1 mg	953,27979	952,42831
		951,44330	
		952,56183	
2	25,0 mg	946,89905	945,32172
		945,17279	
		943,89331	
3	25,0 mg	951,06055	950,56338
		951,27460	
		949,35498	
4	25,1 mg	95,4660	950,58203
		950,18927	
		951,09082	
5	25,0 mg	946,59821	946,46291
		945,81531	
		946,97522	
6	25,0 mg	944,82001	944,14441
		945,15363	
		942,45959	
7	25,1 mg	949,60205	949,90680
		947,95404	
		952,16431	
8	25,0 mg	952,82092	952,59403
		953,24573	
		951,71545	
9	25,0 mg	944,97687	945,50922
		944,09363	
		947,45715	
10	25,1 mg	958,19183	957,24233
		956,54413	
		956,99103	
PROMEDIO			949,47551
DESVIACIÓN ESTANDAR			3,251
COEICIENTE DE VARIACIÓN			0,342%

Tabla 6. Precisión intermedia para la fenilefrina clorhidrato según resultados obtenidos por analista uno y dos. Gencopharmaceutical Lima -2014.

MUESTRA, VOLUMEN DE MUESTRA	ANALISTA 1			ANALISTA 2		
	AREAS	C mg/5mL	C %	AREAS	C mg/5mL	C %
Analista 1	434,59485	-----	-----	43571042	-----	-----
W. Est. 1 = 50.5 mg	432,49316			435,00876		
W. Est. 2 = 50.5 mg	432,96823			434,78033		
Analista 2	433,36349			434,02896		
W. Est. 1 = 50.5 mg	433,01489			433,56577		
W. Est. 2 = 50.5 mg	432,67142			434,25885		
Mt1	432,29849	4.978	99.561	430,37109	4,988	99,759
5 mL	431,40356			430,18320		
	433,02432			430,09128		
Mt2	430,85718	4.9573	99.146	429,94547	4,987	9,73
5 mL	431,16138			430,10165		
	429,30008			430,25369		
Mt3	428,11096	4.9213	98.426	430,77765	4,992	99,84
5 mL	427,48907			430,97464		
	426,35001			429,96970		
Mt4	425,57263	4.9245	98.491	43001556	4,986	99,71
5 mL	424,98663			430,09360		
	432,23117			429,90988		
Mt5	431,78833	4.9765	99.529	429,22424	4,974	99,49
5 mL	431,72653			428,97488		
	432,18951			428,93219		
Mt6	432,55276	4.9652	99.304	428,93076	4,97	99,4
5 mL	431,84219			428,63766		
	431,92191			428,43295		
Mt7	431,48492	4.9659	99.318	428,40417	4,966	99,33
5 mL	430,97205			428,71640		
	430,91785			427,95587		
Mt8	431,30859	4.9659	99.318	429,45572	4,977	99,539
5 mL	431,45483			429,34360		
	430,80295			429,00745		
Mt9	431,08331	4.9655	99.311	429,51645	4,978	99,555
5 mL	431,19951			429,37271		
	431,18802			429,11780		
Mt10	430,01535	4.9557	99.114	426,96420	4,95	99,001
5 mL	430,66849			427,17969		
	430,22540			426,70303		
PROMEDIO		4.9576	99.15		4,9768	99,54
D.S		0.0196	0.3913		0,0126	0,2494
CV		0.3948	0.3947		0,2538	0,2505

Tabla7. Precisión intermedia para la guaifenesina según resultados obtenidos por analista uno y dos. Gencopharmaceutical Lima -2014.

MUESTRA, VOLUMEN DE MUESTRA	ANALISTA 1			ANALISTA 2		
	AREAS	C mg/5mL	C %	AREAS	C mg/5mL	C %
Analista 1	10246,60	-----	-----	10334,60	-----	-----
W. Est. 1 = 101,0 mg	10244,00			10328,10		
W. Est. 2 = 101,1 mg	10244,20			10319,80		
Analista 2	10259,80			10317,80		
W. Est. 1 = 100,0 mg	10255,40			10312,40		
W. Est. 2 = 100,0 mg	10256,30			10310,70		
Mt1	10223,00	99,701	99,701	10271,70	99,119	99,119
5 mL	10220,70			10271,00		
	10217,40			10266,60		
Mt2	10217,40	99,633	99,633	10267,20	99,033	99,033
5 mL	10214,70			10261,20		
	10217,50			10254,10		
Mt3	10220,50	99,669	99,669	10258,00	99,103	99,103
5 mL	10215,90			10276,00		
	10214,80			10270,20		
Mt4	10220,50	99,684	99,684	10259,20	99,092	99,092
5 mL	10214,80			10266,00		
	10220,60			10275,50		
Mt5	10211,00	99,625	99,625	10268,40	99,109	99,109
5 mL	10212,90			10265,70		
	10214,00			10271,90		
Mt6	10222,20	99,746	99,746	10281,20	99,257	99,257
5 mL	10228,90			10286,30		
	10223,90			10284,70		
Mt7	10236,90	99,818	99,818	10281,20	99,257	99,257
5 mL	10226,80			10286,30		
	10233,60			10284,70		
Mt8	10235,70	99,82	9,82	10340,30	99,612	99,612
5 mL	10232,00			10330,10		
	10230,00			10292,10		
Mt9	10237,50	99,781	99,781	10263,70	98,811	98,811
5 mL	10223,30			10228,80		
	10225,10			10221,00		
Mt10	10224,80	99,754	99,754	10217,30	98,607	98,607
5 mL	10231,00			10218,30		
	10221,80			10214,40		
PROMEDIO		9,7231	99,72		99,1	99,10
D.S		0,0714	0,0714		0,2673	0,2673
CV		0,0716	0,0716		0,2697	0,2697

Tabla 8. Precisión intermedia para el dextrometorfano bromhidrato según resultados obtenidos por analista uno y dos. Gencopharmaceutical Lima -2014.

MUESTRA, VOLUMEN DE MUESTRA	ANALISTA 1			ANALISTA 2		
	AREAS	C mg/5mL	C %	AREAS	C mg/5mL	C %
Analista 1	916,05701	-----	-----	920,87299	-----	-----
W. Est. 1 = 25.0 mg	915,12402			919,34125		
W. Est. 2 = 25.0 mg	916,12830			921,43970		
Analista 2	917,16577			944,01715		
W. Est. 1 = 25.0 mg	916,03937			941,87018		
W. Est. 2 = 25.2 mg	914,83472			942,23090		
Mt1	990,1494	10,18	101,79	1001,1657	10,105	101,05
5 mL	992,8077			1001,4500		
	993,6799			1001,1989		
Mt2	1000,5482	10,17	101,67	1011,0617	10,099	100,99
5 mL	999,63464			1010,5532		
	999,92444			1009,8644		
Mt3	986,67297	10,14	101,41	994,80353	10,148	101,48
5 mL	987,67859			996,65247		
	989,33319			995,59991		
Mt4	992,15533	10,18	101,76	1000,2493	10,188	101,88
5 mL	990,82355			999,59552		
	990,58936			998,97913		
Mt5	983,81213	10,11	101,13	991,36035	10,106	101,06
5 mL	985,68549			991,13965		
	986,01581			992,32019		
Mt6	986,50226	10,13	101,36	994,37866	10,139	101,39
5 mL	986,14075			995,62891		
	986,69019			994,35608		
Mt7	974,53394	1,1	100,95	995,78723	10,161	101,61
5 mL	973,41339			997,28168		
	973,37964			997,86206		
Mt8	983,24377	10,19	101,92	993,95850	10,139	101,39
5 mL	982,61475			994,64441		
	983,41888			995,82953		
Mt9	987,21576	10,12	101,24	998,02643	10,177	101,77
5 mL	985,63550			997,52649		
	985,91266			100,0947		
Mt10	984,76697	10,11	101,14	993,43848	10,114	101,14
5 mL	985,93201			992,33807		
	985,04700			991,38385		
PROMEDIO		10,14	101,413		10,1676	101,68
D.S		0,3303	0,3303		0,0557	0,5568
CV		0,3256	0,3256		0,5476	0,5476

Tabla 9. Exactitud del método para la fenilefrina clorhidrato. Gencopharmaceutical Lima -2014.

	Áreas	Promedio de Áreas			
ESTANDARES	439,6639	438.7914			
	439,1011				
Peso Estándar 1 = 50,6 mg	438,4629		%		
Peso Estándar 2 = 50,6 mg	438,8945				
	438,4295				
	438,1968				
MUESTRA PLACEBO - 1	350,1912	350,8099	79,93	4,00	99,91
80%	349,4787				
Volumen de muestra = 5 mL	352,7598				
MUESTRA PLACEBO - 2	349,4751	349,2190	79,57	3,98	99,46
80%	348,8411				
Volumen de muestra = 5 mL	349,3407				
MUESTRA PLACEBO - 3	348,8399	349,9088	79,72	3,99	99,70
80%	349,5015				
Volumen de muestra = 5 mL	351,3850				
MUESTRA PLACEBO - 4	437,6979	438,3101	99,90	4,99	99,90
100%	438,6600				
Volumen de muestra = 5 mL	438,5724				
MUESTRA PLACEBO - 5	439,7203	440,2282	10,3	5,02	10,30
100%	440,4666				
Volumen de muestra = 5 mL	440,4978				
MUESTRA PLACEBO - 6	440,7194	441,0380	10,5	5,02	10,49
100%	441,2337				
Volumen de muestra = 5 mL	441,1608				
MUESTRA PLACEBO - 7	524,1741	523,1654	11,2	5,96	99,33
120%	522,2578				
Volumen de muestra = 5 mL	523,0643				
MUESTRA PLACEBO - 8	524,7058	524,4883	11,5	5,98	99,58
120%	524,1015				
Volumen de muestra = 5 mL	524,6576				
MUESTRA PLACEBO - 9	523,3846	523,5660	119,3	5,96	99,41
120%	523,2321				
Volumen de muestra = 5 mL	524,0813				

Tabla10. Exactitud del método para la guaifenesina. Gencopharmaceutical Lima -2014.

	Áreas	Promedio de Áreas		10 mg/5mL (mg obtenido)	% Recuperado
ESTANDARES	10121,400	10126,533			
	10129,300				
Peso Estandar 1 = 100,0 mg	10124,600		%		
Peso Estandar 2 = 100,0 mg	10131,100				
	10129,000				
	10123,800				
MUESTRA PLACEBO - 1	8220,204	8219,238	80,36	80,36	100,46
80%	8219,626				
Volumen de muestra = 5 mL	8217,882				
MUESTRA PLACEBO - 2	8214,663	8213,379	80,30	80,30	100,38
80%	8212,737				
Volumen de muestra = 5 mL	8212,737				
MUESTRA PLACEBO - 3	8212,737	8219,664	80,37	80,37	100,46
80%	8228,346				
Volumen de muestra = 5 mL	8217,908				
MUESTRA PLACEBO - 4	10162,500	10164,300	99,38	99,38	99,38
100%	10166,200				
Volumen de muestra = 5 mL	10164,200				
MUESTRA PLACEBO - 5	10164,200	10165,800	99,39	99,39	99,39
100%	10169,800				
Volumen de muestra = 5 mL	10163,400				
MUESTRA PLACEBO - 6	10157,900	10165,867	99,39	99,39	99,39
100%	10169,700				
Volumen de muestra = 5 mL	10170,000				
MUESTRA PLACEBO - 7	12212,500	12207,867	119,36	119,36	99,47
120%	12204,000				
Volumen de muestra = 5 mL	12207,100				
MUESTRA PLACEBO -8	12209,700	12203,100	119,31	119,31	99,43
120%	12203,600				
Volumen de muestra = 5 mL	12196,000				
MUESTRA PLACEBO -9	12212,200	12209,633	119,38	119,38	99,48
120%	12209,600				
Volumen de muestra = 5 mL	12207,100				

Tabla 11. Exactitud del método para el dextrometorfano bromhidrato. Gencopharmaceutical Lima-2014.

	Áreas	Promedio de Áreas			
ESTANDARES	925,774	914,195			
	925,774				
Peso Estandar 1 = 25,3 mg	925,998		%		
Peso Estandar 2 = 25,1 mg	901,372				
	903,230				
	903,023				
MUESTRA PLACEBO - 1	755,279	755,266	79,38	7,94	99,23
80%	754,137				
Volumen de muestra = 5 mL	756,380				
MUESTRA PLACEBO - 2	756,941	756,695	79,53	7,95	99,42
80%	755,997				
Volumen de muestra = 5 mL	757,148				
MUESTRA PLACEBO - 3	755,208	755,668	79,43	7,94	99,8
80%	756,850				
Volumen de muestra = 5 mL	754,945				
MUESTRA PLACEBO - 4	949,830	949,384	99,79	9,98	99,79
100%	948,548				
Volumen de muestra = 5 mL	949,773				
MUESTRA PLACEBO - 5	950,395	951,837	10,05	1,00	10,05
100%	952,400				
Volumen de muestra = 5 mL	952,714				
MUESTRA PLACEBO - 6	953,213	953,512	100,22	10,02	100,22
100%	953,171				
Volumen de muestra = 5 mL	954,151				
MUESTRA PLACEBO - 7	1140,725	114,483	119,98	12,00	99,98
120%	1141,954				
Volumen de muestra = 5 mL	1141,770				
MUESTRA PLACEBO - 8	1143,333	114,829	120,23	12,02	100,19
120%	1144,602				
Volumen de muestra = 5 mL	1143,550				
MUESTRA PLACEBO - 9	1140,926	114,423	120,08	12,01	100,06
120%	1142,934				
Volumen de muestra = 5 mL	1143,409				

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se desarrolló una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para la cuantificación de dextrometorfano bromhidrato, guaifenesina y fenilefrina clorhidrato en jarabe la cual no figura en ninguna farmacopea oficial, como se sabe éste tipo de análisis presenta mayores ventajas en relación a otros métodos como son los volumétricos y espectrofotométricos, por otro lado este tipo de método presenta mayores ventajas debido a su rapidez de análisis, aceptabilidad, exactitud, fiabilidad y de alta eficacia.

Se evaluó todos los parámetros tales como: especificidad, selectividad-precisión, exactitud, este producto farmacéutico es selectivo y específico para ser cuantificado por el método de HPLC ya que no puede ser cuantificado por métodos espectrofotométricos y volumétricos.

Así como señala la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria AEFI¹⁸, el método debe medir de forma inequívoca, exacta y específica al analito de interés, sin interferencia de excipientes, impurezas, productos de degradación, u otras sustancias presentes en la matriz de la muestra.

En la Tabla 1, se muestran los parámetros de adecuación y los resultados para la aptitud del sistema en la que se determinó la repetibilidad del tiempo de retención obteniendo como RSD 0,20% para la fenilefrina Clorhidrato, 0,33% para la guaifenesina y 1,32% para el dextrometorfano bromhidrato, lo cual indica un alto grado de certeza para la identificación del analito ya que la especificación indica que debe ser menor al 2%. El factor de asimetría (cola o Tailing) fue 0.58 para la fenilefrina clorhidrato, 0,66 para la guaifenesina y 0,86 para el dextrometorfano bromhidrato, estos resultados muestran que los picos obtenidos son simétricos, demostrando ausencia de colas hacia la derecha e izquierda. El

número de platos teóricos para la fenilefrina clorhidrato fue 7618,0; para la guaifenesina 11193,0 y para el dextrometorfano fue 9675,0, el cual indica la eficiencia de la columna cromatográfica, los valores obtenidos para cada parámetro de adecuación se encuentran dentro de las especificaciones establecidas según la USP¹⁰. Considerando estas condiciones de trabajo se procedió a la validación de la técnica analítica desarrollada por el método de HPLC.

La AEFI¹⁸, indica que la lectura del placebo debe tener una interferencia no mayor al 2,0%¹⁶. De acuerdo a lo descrito el análisis demuestra que ningún excipiente, fase móvil, diluyente interfieren con los picos de los principios activos, como tampoco se ha detectado la presencia de productos de degradación de la fenilefrina clorhidrato, guaifenesina y dextrometorfano bromhidrato, así como se demuestra en la Tabla 2, al realizar el análisis del principio activo sometido a estrés para que generen los compuestos potencialmente interferentes, por lo tanto mediante el estudio de la selectividad-especificidad, se demostró que la señal medida con el método analítico procede únicamente de los analitos en estudio; según la AEFI¹⁸, manifiesta que la selectividad-especificidad es una condición esencial para conseguir una adecuada capacidad para originar resultados que dependan de forma exclusiva del analito para su cuantificación.

Según Aguilar²⁸, explica que la linealidad sirve para determinar la proporcionalidad entre la concentración del principio activo y su respuesta, demostrando la capacidad del método para obtener resultados lineales.

Al aplicar el método de los mínimos cuadrados a los resultados obtenidos, se obtuvo la recta de la regresión lineal y la ecuación de la regresión lineal (área vs concentración), en las Figuras del 1 al 6 se expresa las siguientes ecuaciones respectivamente: Fenilefrina clorhidrato, $y = 8392,583x + 8,015$ ecuación de la recta para la linealidad del sistema, $y = 8701,632x + 3,033$ ecuación de la recta para la linealidad del método, guaifenesina $y = 9621,382x + 298,251$ ecuación de la recta para la linealidad del sistema $y = 9840,858x + 244,822$ ecuación de la recta para la linealidad del método y dextrometorfano bromhidrato $y = 8352,333x + 80,863$ ecuación de la recta para la linealidad del sistema $y = 8566,039x - 4,461$ ecuación de la recta para la linealidad del método.

Según el Anexo 6 y 7, el coeficiente de correlación lineal (r) fue: $r = 0,99959$ para la linealidad del sistema y un $r = 0,99936$ para la linealidad del método en la fenilefrina clorhidrato, en la guaifenesina $r = 0,99997$ para la linealidad del

sistema y un $r = 0,99981$ para la linealidad del método, en el dextrometorfano bromhidrato $r = 0,99983$ para la linealidad del sistema y un $r = 0,99991$ para la linealidad del método.

Según Castro¹⁶, señala que el coeficiente de correlación debe ser $r > 0,999$ de modo que supone una correlación positiva con una confianza de 99,5% por lo cual podemos decir que los datos obtenidos cumplen con la especificación señalada.

Según Diaz²⁹, menciona que primero se determina la linealidad del sistema en el cual solo se trabaja con estándares, y la linealidad del método se trabaja con estándares y con la matriz del producto y se determina como influye la matriz en el proceso de extracción de la muestra donde en la Figura 1 al 6 queda demostrado que cumple con las especificaciones para la linealidad del sistema y la linealidad del método tal como indica la USP¹⁰.

En los Anexos 3,4 y 5 se expresan los valores del factor respuesta (f) a diferentes concentraciones donde al aplicar el test de linealidad se determinó el coeficiente de variación de los factores de respuesta (f) donde se obtuvo el CV de 0,466% para la fenilefrina clorhidrato, 0,460% para la guaifenesina y 1,007% para el dextrometorfano bromhidrato., demostrando así que el (f) que son semejantes entre sí. La AEFI¹⁸, señala que el coeficiente de variación de los factores de respuesta deben ser menor al 5,0% lo cual indica que en una calibración lineal de los factores de respuesta deben ser semejantes entre si y cercanos al valor de la pendiente, cuando el coeficiente de variación es superior al 5,0% significa que no hay linealidad.

La AEFI¹⁸, señala que la pendiente debe ser significativa y estadísticamente distinta a cero para un grado de significancia $\alpha = 0,05$ siendo el $t_{exp} > t_{tabla}$ lo cual indica que hay una regresión lineal y que la recta no es paralela a la abscisa, así mismo los intervalos de confianza no deben incluir al cero. Por ello en los resultados para la fenilefrina clorhidrato en el Anexo6, se demuestra que la pendiente de la recta de regresión es estadísticamente distinta de cero, siendo el $t_{exp} = 130,174$, y el $t_{tabla} = 2,306$ (valor de t para n-2 grados de libertad y un intervalo de confianza de 95%), para la guaifenesina en el Anexo 7, se demuestra que la pendiente de la recta de regresión es estadísticamente distinta de cero, siendo el $t_{exp} = 42,358$, y el $t_{tabla} = 2,306$, para el dextrometorfano bromhidrato, en el Anexo 8, se demuestra que la pendiente de la recta de regresión es estadísticamente distinta de cero siendo el $t_{exp} = 11,404$, y el $t_{tabla} =$

2,306, al ser $t_{exp} > t_{tabla}$ significa que la probabilidad de ser $b \neq 0$ es muy elevado, si fuera $b=0$ significaría que la recta es paralela al eje de las abscisas y no hay regresión lineal. Así mismo, se demostró el intervalo de confianza, el cual se demuestra en el Anexo 6, siendo para la fenilefrina clorhidrato [8342,621 a 8442,544], en el Anexo 7, para la guaifenesina [9618,88 a 9623,883], y en el Anexo 8, para el dextrometorfano bromhidrato [8086,158 a 8618,508], donde también se concluye que el intervalo no incluye el cero. En los Anexos mencionados también se encuentran los datos de la prueba de proporcionalidad en donde el $t_{exp} < t_{tabla}$, siendo para la fenilefrina clorhidrato el $t_{exp} = 2,462$, para la guaifenesina $t_{exp} = 1,304$ y para el dextrometorfano bromhidrato $t_{exp} = 1,093$, siendo estos menor que el $t_{tabla} = 2,896$, por lo que podemos decir que el intercepto es semejante a cero. Por ello en las Figuras 1,2 y 3, se observa una gráfica de regresión lineal (concentración versus área) que evidencia de que la linealidad determina la región de la curva respuesta o de cuantificación en que hay relación directa entre la señal instrumental y la concentración del producto analizado, siendo un método lineal.

Según Aguilar²⁸, explica respecto al parámetro de precisión, cuyo objetivo principal es conocer una serie de alícuotas de una muestra homogénea por el mismo instrumento y el mismo analista, obteniéndose los siguientes resultados en la Tabla 3, donde el CV=0,61% para la fenilefrina clorhidrato, en la Tabla 4, donde el CV=0,090% para la guaifenesina y en la Tabla 5, donde el CV=0,342% para el dextrometorfano bromhidrato, encontrándose estos dentro de los parámetros establecidos.

De este modo podemos constatar que el método fue repetible y reproducible, es decir, fue suficientemente preciso, por lo que no repercutieron apreciablemente los errores aleatorios en la determinación.

Según Salazar³⁰, explican que la variabilidad del método puede deberse a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo no pueden ser siempre controlados como al analista, el equipo instrumental, los reactivos, el tiempo, etc., es por ello la importancia de la presente investigación

En el Anexo 12, se muestra los resultados en porcentaje de analito hallado en el análisis de contenido de las muestras realizado por un mismo analista para evaluar la precisión intermedia dando como resultado para la fenilefrina clorhidrato un coeficiente de variación de 0,645% entre el primer y segundo analista, en el Anexo 13, para la guaifenesina un coeficiente de variación igual a

0.341% entre el primer y segundo analista, en el Anexo 14, para el dextrometorfano bromhidrato un coeficiente de variación =1.228% entre el primer y segundo analista, donde indica que la repetibilidad de las inyecciones deben tener un coeficiente de variación menor al 2% referente a las áreas y tiempo de retención, como se puede observar los parámetros señalados para la precisión intermedia se encuentran dentro del criterio de aceptación como también el resultado de cuantificación del analito, efectuado sobre la misma muestra pero en condiciones diferentes; como por ejemplo: diferente analista, diferentes condiciones y diferentes días para el estudio de la precisión del método. Siendo 99,35% el porcentaje del promedio global para la cuantificación del analito para la fenilefrina clorhidrato, 99,41% para la guaifenesina y 101,68% para el dextrometorfano bromhidrato. Cumpliendo así con los criterios de aceptación que señala la AEFI¹⁸, realizado por otro analista en donde indica que la precisión intermedia de las inyecciones deben tener un coeficiente de variación menor al 2% referente a las áreas y tiempo de retención.

Según Aguilar, Zoraya^{28, 31}, la exactitud se expresa como porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito. La recuperación separada depende de la matriz de la muestra, del procedimiento de la preparación de la muestra y de la concentración del analito en la misma. En el Anexo 15, se expresa el porcentaje de recuperación a diferentes concentraciones donde el resultado que se obtuvo fue satisfactoriamente con un porcentaje de recuperación global = 99,80% para la fenilefrina clorhidrato, 99,56% para la guaifenesina y 99,78% para el dextrometorfano bromhidrato, los cuales se encuentran dentro de las especificaciones establecidas ya que para este parámetro se estableció un límite de aceptación entre 98-102%. La exactitud del método mide el grado de concordancia entre los valores obtenidos y el valor verdadero, también se determina la prueba estadística como demuestran en las Tablas 15, 16 y 17, la prueba del test de Student cuyos resultados fueron $t_{exp}=1,648$, siendo el $t_{tabla}=2,306$ para la fenilefrina clorhidrato, $t_{exp}=1,428$, siendo el $t_{tab}=2,306$ para la guaifenesina, $t_{exp}=1,507$, siendo el $t_{tab}=2,306$ para el dextrometorfano bromhidrato. Al ser $t_{exp} < t_{tabla}$ expresa que no existe diferencia significativa entre el promedio de la recuperación y el 100% confirmándose que el método es exacto, así como señala INECC³², por lo que la exactitud es correcta según sus respectivas especificaciones.

Asimismo en el anexo mencionado se encuentra la interpretación estadística de la exactitud donde se calculó el test de Cochran que es el test de igualdad de varianzas para determinar si el factor de concentración tiene alguna influencia en los resultados, se obtuvo un valor $G_{exp}=0,069$ siendo el $G_{tabla}=0,8709$ para la fenilefrina clorhidrato, $G_{exp}=0,426$ siendo el $G_{tabla}=0,8709$ para la guaifenesina, $G_{exp}=0,681$ siendo el $G_{tabla}=0,8709$ para el dextrometorfano bromhidrato. Al ser $G_{exp} < G_{tabla}$ significa que las varianzas de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes, es decir que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados otro dato a considerar es el coeficiente de variación del porcentaje de recuperación total donde el coeficiente de variación= 0,403% para la fenilefrina clorhidrato, coeficiente de variación =0,506% para la guaifenesina y coeficiente de variación =0,393% para el dextrometorfano bromhidrato, los cuales se encuentran dentro de las especificaciones ($CV < 2\%$)^{33, 34}.

VI. CONCLUSIONES

1. Se validó la técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance, (HPLC) para la determinación de contenido de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato. y guaifenesina en jarabe documentando los resultados obtenidos y demostrando que la técnica analítica es confiable por cumplir con los parámetros de Selectividad, Linealidad del sistema, Linealidad del método, Precisión, Exactitud y rango.
2. La prueba de aptitud del sistema para la técnica analítica propuesta fue reproducible en tiempo de retención y áreas.
3. La técnica analítica desarrollada demostró ser específica-selectiva, ya que no se detectó interferencias en el diluyente, fase móvil, excipientes y productos de degradación.
4. La técnica analítica demostró ser lineal, porque se determinó la relación entre la concentración versus áreas siendo estos proporcionales para determinar la regresión lineal con alto grado de correlación.
5. La técnica analítica es precisa, ya que el grado de concordancia nos permite obtener resultados repetitivos y reproducibles.
6. La técnica analítica propuesta demostró ser exacta debido a que no hay diferencia significativa entre la recuperación media y el 100%
7. La técnica analítica fue robusta porque no se halló diferencias significativas con los resultados obtenidos.

VII. RECOMENDACIONES

1. La validación del presente método analítico solo es aplicable a la forma farmacéutica de jarabe de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina.
2. Cualquier modificación en el método analítico o cualquier modificación en una de las etapas de fabricación significa una revalidación de dicho proceso.
3. Utilizar en todo el análisis del ensayo septas nuevas en los viales de los estándares y muestras para evitar la evaporación de los solventes y existan variaciones en los resultados.
4. Si este método pretenden utilizarlo otras empresas para cuantificación de jarabe del mismo producto, es necesario tomar en cuenta que los parámetros de exactitud, especificidad y linealidad del método se deben evaluar para el jarabe que se desea cuantificar debido a los posibles interferentes de los excipientes empleados.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Velasteguí J. Validación del método analítico de valoración de amoxicilina en polvo para suspensión oral producido por Betapharma S.A. mediante HPLC [tesis]. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2011.
2. Dalmau R, Suñé J, Cemeli J. Control de calidad en la industria Farmacéutica: Concepto de validación, Industria farmacéutica. 3ª ed. España; 1999.
3. Suneetha D, Laskshmana A. validated RP-HPLC Method for the estimation of quetiapine in Bulk and pharmaceutical formulations. E-Journal of chemistry [revista en internet]. 2010 abril [acceso 20 de diciembre de 2013]; (S1) S26-S266. Disponible en: <http://www.e-journals.net>
4. Vallejos F. Validación de la metodología analítica de cuantificación de clorfeniramina maleato, dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina en dos jarabes comerciales por cromatografía líquida de alta resolución [tesis]. Guatemala: Universidad de Guatemala; 2009.
5. Enciso R. Validación prospectiva de la técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para el Pectoflen® jarabe [tesis]. Ayacucho: Universidad Nacional San Cristobal de Huamanga; 2009.
6. Vademécum Fenilefrina. [base de datos en internet] [acceso 23 de octubre del 2013]. Disponible en: www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/f007.ht
7. Flórez J. Farmacología Humana: 3ª ed. España: Masson SA; 1998.
8. Fisterra.com; Guaifenesina [sede Web]. [actualizado el 10 de octubre de 2013; acceso fecha de acceso el 5 de noviembre del 2013]. Disponible en: <http://www.fisterra.com>.
9. Diccionario de medicina. Océano Mosby. 4ª ed. Barcelona: Grupo editorial Océano; 2006.
10. USP 37. The United States Pharmacopeial Convention 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852 Estados Unidos de América; 2014
11. Eurachem. The Fitness for Purpose of analytical Methods. A laboratory guide to method validation and related topics. 1ª ed. Hannover; 2001.
12. Skoog D, Leary L. Análisis instrumental. 4ª ed. Madrid: Mc Graw-Hill Interamericana; 2004.
13. The Merck Index. An Encyclopedia of Chemical, Drug and Biological. 3ª ed USA: Ataff; 2010.
14. Barcelli V. Curso de entrenamiento de Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) Lima: Lacrom Merck; 2002.
15. Internacional Conferencia on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: text and methodology [base de datos en internet] [Acceso el 10 de noviembre del 2013]. Disponible en: <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>.
16. Castro M, Gastón S, Pujol M. Validación de métodos analíticos A.E.F.I. Sección catalana: Madrid; 2001
17. Ahujas S, Dong M. Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC. Vol 6. Amsterdam: El servier. Academic Press; 2005.
18. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). Validación de Métodos Analíticos. Barcelona: Graficas Gispert S.A.; 2001.
19. Palomino E. validación de procesos de manufactura y métodos de análisis de productos farmacéuticos: Lima; 2008.
20. Azaña Y, Cornelio J. Desarrollo y validación de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para cuantificar

- clonixinato de lisina 125 mg y pargoverina clorhidrato 10mg en tabletas recubiertas[tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007
21. Rodríguez R. Validación de procesos. Taller de Validación OMS: Guatemala; 2004.
 22. Protocolo de Validación de Métodos analíticos para la Cuantificación de Fármacos [Sitio en internet] [Acceso 8 de noviembre del 2013]. Disponible en: <http://www.sld.cu>.
 23. Velastegui J. Validación del método analítico de valoración de amoxicilina en polvo para suspensión oral producido por Betapharma S.A. mediante HPLC [tesis]. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2011.
 24. Morales C. Desarrollo y validación prospectiva de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para el enalapril 10 mg tabletas cubiertas [tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2004.
 25. Mayorga G, Del Castillo C. validación de una técnica de análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para cuantificar norfloxacin y fenazopiridina clorhidrato en capsulas orales[tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2010.
 26. Leyva E, Peréz F. Desarrollo de validación de un método analítico para la cuantificación por HPLC de clenbuterol clorhidrato en solución oral-gotas, y análisis comparativo de productos comercializados en el Perú. Lima; 2009.
 27. Medina J, Berrocal J. Validación de métodos analíticos de valoración de naproxeno sódico 550mg tableta por cromatografía líquida de alta performance. Lima; 2008.
 28. Aguilar G, Alcántara A, Charvel, A, et al. Validación de métodos analíticos. CESA: México; 2002.
 29. Díaz M, Hernández I, MartínezM, Licea V, Fernández M, et al. Validación de técnicas utilizadas en el control de la calidad. (Rev. Cubana). 2008; 32(2):106-12.
 30. Salazar R. Introducción al estudio de la validación: concepto y generalidades. Validación Industrial. Barcelona: Romargraf. S.A.; 1999.
 31. Zoraya C, Quiroga F, Rojas J, Hernández H. Validación de una metodología analítica para la determinación de acetaminofén en procesos de limpieza. Rev. Col. Quím. Farm. 2003; 32 (2) 103-110.
 32. INECC-CCA. Guía para la implantación, Validación y verificación del desempeño continuo de un método analítico. México; 2009.
 33. Instituto de salud pública. Aspectos generales sobre la validación de métodos. Santiago; 2010.
 34. UNODEC. Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para los análisis de drogas ilícitas en materias incautados y especímenes biológicos. Nueva York; 2010.

ANEXOS

Anexo 1

Tabla 12. Especificaciones de los parámetros de validación para la fenilefrina clorhidrato, guaifenesina y dextrometorfano bromhidrato. Gencopharmaceutical Lima - 2014.

PARAMETROS	ESPECIFICACIONES
1.selectividad	No debe presentar interferencias de excipientes.
- Placebo de Excipientes	
2. Linealidad	
2.1. Linealidad del sistema :	
- Coeficiente de Correlación:	Mayor o igual que 0,999
- Coeficiente de Variación:	Máximo 5,0%
- Prueba de Linealidad de la Pendiente Para P=0,05 y n-2 Grados de Libertad.	t experimental > t tabla
- Prueba de Proporcionalidad del Intercepto Para P=0,02 y n-2 Grados de Libertad.	t experimental < t tabla
2.2. Linealidad del método :	
- Coeficiente de Correlación:	Mayor o igual que 0,999
- Coeficiente de Variación:	Máximo 5,0%
- Prueba de Linealidad de la Pendiente Para P=0,05 y n-2 Grados de Libertad.	t experimental > t tabla
- Prueba de Proporcionalidad del Intercepto Para P=0,02 y n-2 Grados de Libertad.	t experimental < t tabla
3. Precision	
- Precision del Sistema Coeficiente de Variación	Máximo 2,0%
- Repetibilidad del metodo : Coeficiente de Variación	Máximo 2,0%
- Precision intermedia : Coeficiente de Variación	Máximo 5,0%
4. Exactitud	
- Porcentaje de Recuperación	98,0 – 102,0%
Prueba de "t" Student Para P=0,05 y n-1 Grados de Libertad.	t exp < t tabla
5. Rango	80% – 120%

Anexo 2

Tabla 13. Linealidad del sistema: concentración versus área respuesta de los estándares de fenilefrina clorhidrato. Gencopharmaceutical Lima – 2014.

Concentración (%)	N° de Repeticiones	Peso (mg)	X Concentración (mg/mL)	Y				
				Áreas promedio	Xy	x ²	y ²	f (y/x)
80%	1	40,0	0,040	343,882	13,755	0,0016	118255,376	8597,069
	2	40,0	0,040	343,844	13,753	0,0016	118229,005	8596,111
	3	40,0	0,040	344,251	13,770	0,0016	118508,978	8606,283
90%	1	45,0	0,045	384,297	17,293	0,0020	147684,595	8539,945
	2	45,0	0,045	383,557	17,260	0,0020	147116,09	8523,492
	3	45,0	0,045	383,956	17,278	0,0020	147422,321	8532,358
100%	1	50,0	0,050	428,630	21,431	0,0025	183723,719	8572,601
	2	50,0	0,050	428,284	21,414	0,0025	183427,989	8565,698
	3	50,0	0,050	430,599	21,529	0,0025	185416,261	8611,997
110%	1	55,0	0,055	471,522	25,933	0,0030	222333,576	8573,138
	2	55,0	0,055	470,513	25,878	0,0030	221383,090	8554,793
	3	55,0	0,055	470,017	25,850	0,0033	220916,798	8545,779
120%	1	60,0	0,060	512,472	30,748	0,0036	262628,053	8541,208
	2	60,0	0,060	511,186	30,671	0,0036	261311,3004	8519,769
	3	60,0	0,060	507,637	30,458	0,0036	257696,2476	8460,631
	Σ		0,750	6414,655	327,02	0,0382	2796053,411	8556,058
7								
Desviación estándar f								39,84701
Coefficiente de Variación f								0,00466

Anexo 3

Tabla 14. Linealidad del sistema concentración versus área respuesta de los estándares de guaifenesina. Gencopharmaceutical Lima – 2014.

Concentración (%)	N° de Repeticiones	Peso (mg)	X Concentración (mg/mL)	Y Áreas promediado	xy	x ²	y ²	f (y/x)
80%	1	80,0	0,800	7981,057	6384,846	0,640	63697280,65	9976,322
	2	80,0	0,800	7988,927	6391,142	0,640	63822966,36	9986,160
	3	80,0	0,800	7991,915	6393,532	0,640	63870713,84	9989,894
90%	1	90,0	0,800	8968,994	8072,095	0,810	80442864,67	9965,550
	2	90,0	0,900	8966,304	8069,674	0,810	80394619,7	9962,561
	3	90,0	0,900	8965,151	8068,636	0,810	80373939,0	9961,279
100%	1	100,0	1,000	9933,161	9933,161	1,000	98667699,77	9933,161
	2	100,0	1,000	9935,844	9935,844	1,000	98721010,5	9935,845
	3	100,0	1,000	9933,743	9933,743	1,000	98679263,0	9933,743
110%	1	110,0	1,100	10871,65	11958,815	1,210	118192773,7	9883,318
	2	110,0	1,100	10868,60	11955,460	1,210	118126465,9	9880,545
	3	110,0	1,100	10870,15	11957,165	1,210	118160161,0	9881,955
120%	1	120,0	1,200	11844,25	14213,100	1,440	140286258,0	9870,208
	2	120,0	1,200	11850,45	14220,540	1,440	140433165,2	9875,375
	3	120,0	1,200	11844,30	14213,160	1,440	140287442,4	9870,250
	Σ		15,00	148814,5	151700,92	1,530	1504156623	9927,078
				Desviación estándar f				45,6553
				Coeficiente de variación f				0,0046

Anexo 4

Tabla 15. Linealidad del sistema concentración versus área respuesta de los estándares de dextrometorfano bromhidrato. Gencopharmaceutical Lima – 2014.

Concentración (%)	N° de Repeticiones	Peso (mg)	X Concentración (mg/mL)	Y Áreas promedio	xy	x ²	y ²	f (y/x)
80%	1	20,1	0,0804	751,51554	60,12124	0,0064	564775,599	9393,944
	2	20,0	0,0800	750,06072	60,00486	0,0064	562591,083	9375,759
	3	20,0	0,0800	749,65528	59,97242	0,0064	561983,031	9370,690
90%	1	22,5	0,0900	832,54297	74,92887	0,0081	693127,788	9250,477
	2	22,5	0,0900	832,97843	74,96806	0,0081	693853,056	9255,315
	3	22,4	0,0896	831,34659	74,82119	0,0081	691137,144	9237,184
100%	1	25,0	0,1000	913,58329	91,35833	0,0100	834634,418	9135,832
	2	25,0	0,1000	913,41065	91,34106	0,0100	834319,006	9134,106
	3	25,0	0,1000	914,71924	91,47192	0,0100	836711,278	9147,192
110%	1	27,5	0,1100	1003,00208	110,3302	0,0121	1006013,16	9118,200
	2	27,4	0,1096	1002,07858	110,2286	0,0121	1004161,48	9109,805
	3	27,5	0,1100	1003,40482	110,3745	0,0121	1006821,22	9121,861
120%	1	30,1	0,1204	1088,34601	130,6015	0,0144	1184497,02	9069,550
	2	30,0	0,1200	1087,40125	130,4881	0,0144	1182441,46	9061,677
	3	30,0	0,1200	1087,40418	130,4885	0,0144	1182447,84	9061,701
Σ			1,500	13761,4496	1401,502	0,1530	12839514,6	9189,553
								116,634
								Desviación estándar f
								0,01269
								Coefficiente de variación f

Anexo 5

Tabla 16 Linealidad del sistema de la pendiente y proporcionalidad para la fenilefrina clorhidrato. Gencopharmaceutical Lima -2014.

Ecuación de la recata	dónde:
$y = 8392.583x + 8.015$	
n = 15	n: Numero de muestras
a = 8392,58	a : Intercepto de la recta
b = 8,015	b: Pendiente de la recta
r = 0,99959	r: Coeficiente de correlación
r² = 0,99918	r ² : Coeficiente de determinación
t_{exp} = 130,174	t _{exp} : t de Student experimental
t_{tab} = 2,306	t _{tab} : t de Student tabla
S²xy = 3,1175	S ² xy: Varianza de la pendiente al cuadrado
S²b = 4156,44	S ² b: Desviación estándar de la pendiente al cuadrado
Sb = 64,473	Sb: Desviación estándar de la pendiente
Sxy = 1,766	Sxy: Varianza de la pendiente
S²a = 10,600	S ² a: Desviación estándar del intercepto al cuadrado
Sa = 3,256	Sa: Desviación estándar del intercepto
t_{exp} = 2,462	t _{exp} : t de Student experimental
t_{tab} = 2,896	t _{tab} : t de Student tabla
LCb = [8342,621 a 8442,544]	LCb: Límite de confianza de la pendiente
LCa = [-0.508 a 15.521]	LCa : Límite de confianza del intercepto

Coeficiente de correlación: r debe ser mayor que 0,999

$$r > 0,999 \quad r = 0,99959$$

Prueba de linealidad de la pendiente

Al aplicar la prueba estadística "t" de Student debe cumplirse que :

$$t_{\text{experimental}} > t_{\text{tablas}} \quad t_{\text{tab}} = 2,306 \quad t_{\text{exp}} = 130,174$$

El t experimental es mayor que el t de tablas por lo que existe la probabilidad de que b sea diferente de cero es elevada y la linealidad es correcta

Prueba de proporcionalidad:

Al aplicar la prueba estadística "t" de Student debe cumplirse que :

$$t_{\text{experimental}} < t_{\text{tabla}} \quad t_{\text{tabla}} = 2,896 \quad t_{\text{exp}} = 2,462$$

El t experimental es menor que el t de tablas por lo que decimos que cumple con la prueba de proporcionalidad

Límite de confianza para "b"

$$[8342,621 \text{ a } 8442,544]$$

LI LS

Estos límites no incluyen el cero, por lo que decimos que la pendiente es significativamente diferente de cero y no es paralela a la abcisa

Límite de confianza para "a"

$$[-0,508 \text{ a } 15,521]$$

LI LS

Estos límites incluye el cero, el método analítico no presenta sesgo es decir cumple con la prueba de proporcionalidad

Anexo 9

Tabla 20. Linealidad del Método de la pendiente y proporcionalidad para la guaifenesina. Gencopharmaceutical Lima -2014.

Ecuacion de la recata	dónd:
y = 9840.858x + 244.822	
n = 15	n: Numero de muestras
a = 244,822	a : Intercepto de la recta
b = 9840,858	b: Pendiente de la recta
r = 0,99981	r: Coeficiente de correlación
r² = 0,99962	r ² : Coeficiente de determinación
t_{exp} = 58,525	t _{exp} : t de Student experimental
t_{tab} = 2,365	t _{tab} : t de Student tabla
S²xy = 8652,228	S ² xy: Varianza de la pendiente al cuadrado
S²b = 28272,481	S ² b: Desviacion estandar de la pendiente al cuadrado
Sb = 168,144	Sb: Desviacion estandar de la pendiente
Sxy = 93,017	Sxy: Varianza de la pendiente
S²a = 29417,574	S ² a: Desviacion estandar del intercepto al cuadrado
Sa = 171,5	Sa: Desviacion estandar del intercepto
t_{exp} = 1,427	t _{exp} : t de Student experimental
t_{tab} = 2,998	t _{tab} : t de Student tabla
LCb = [793,84 a 835,476]	LCb: Limite de confianza de la pendiente
LCa = [-223,8 a 265,844]	LCa: Limite de confianza del intercepto
Coeficiente de correlación: r debe ser mayor que 0,999	
r > 0,999	r = 0,99981
Prueba de linealidad de la pendiente	
Al aplicar la prueba estadística "t" de Student debe cumplirse que :	
t experimental > t tablas t _{tab} = 2,306 t _{exp} = 58,525	
El t experimental es mayor que el t de tablas por lo que existe la probabilidad de que b sea diferente de cero es elevada y la linealidad es correcta	
Prueba de proporcionalidad	
Al aplicar la prueba estadística "t" de Student debe cumplirse que :	
t experimental < t tabla, t _{tab} = 2,896 t _{exp} = 1,427	
El t experimental es menor que el t de tablas por lo que decimos que cumple con la prueba de proporcionalidad	
Limite de confianza para "b" [793,842 a 835,476]	
LI	LS
Estos limites no incluyen el cero, por lo que decimos que la pendiente es significativamente	
Diferente de cero y no es paralela a la abicisa.	
Limite de confianza para "a" [-223,8 a 265,844]	
LI	LS
Estos limites incluye el cero, el método analítico no presenta sesgo es decir cumple con la prueba de proporcionalidad	

Anexo 10

Tabla 21. Linealidad del método de la pendiente y proporcionalidad para el dextrometorfano bromhidrato. Gencopharmaceutical Lima -2014.

Ecuación de la recata	dónde:
$y = 8566.039x + 4.461$	
n = 15	n: Numero de muestras
a = 4,461	a : Intercepto de la recta
b = 8566,039	b: Pendiente de la recta
r = 0,99991	r: Coeficiente de correlación
r² = 0,99982	r ² : Coeficiente de determinación
t_{exp} = 61,374	t _{exp} : t de Student experimental
t_{tab} = 2,365	t _{tab} : t de Student tabla
S²xy = 74,468	S ² xy: Varianza de la pendiente al cuadrado
S²b = 19480,069	S ² b: Desviacion estandar de la pendiente al cuadrado
Sb = 139,571	Sb: Desviacion estandar de la pendiente
Sxy = 8,6294	Sxy: Varianza de la pendiente
S²a = 241,858	S ² a: Desviacion estandar del intercepto al cuadrado
Sa = 15,55	Sa: Desviacion estandar del intercepto
t_{exp} = 0,287	t _{exp} : t de Student experimental
t_{tab} = 2,998	t _{tab} : t de Student tabla
LCb = [98335,3 a 104246,7]	LCb : Límite de confianza de la pendiente
Lca = [-32,32 a 41,242]	Lca : Límite de confianza del intercepto
Coeficiente de correlación: r debe ser mayor que 0,999	
r > 0,999 r = 0,99991	
Prueba de linealidad de la pendiente	
Al aplicar la prueba estadística de "t" de Student debe cumplirse que :	
t experimental > t tablas t _{tab} = 2,306 t _{exp} = 61,374	
El t experimental es mayor que el t de tablas por lo que existe la probabilidad de que b sea diferente de cero es elevada y la linealidad es correcta	
Prueba de proporcionalidad	
Al aplicar la prueba estadística "t" de Student debe cumplirse que :	
t experimental < t tabla, t _{tab} = 2,896 t _{exp} = 0,287	
El t experimental es menor que el t de tablas por lo que decimos que cumple con la prueba de proporcionalidad	
Límite de confianza para "b" [98335,287 a 104246,713]	
LI	LS
Estos límites no incluyen el cero, por lo que decimos que la pendiente es significativamente diferente de cero y no es paralela a la abcisa	
Límite de confianza para "a" [-32,32 a 41,242]	
LI	LS
Estos límites incluye el cero, el método analítico no presenta sesgo es decir cumple con la prueba de proporcionalidad	

Anexo 11

Tabla 22. Precisión intermedia bajo las mismas condiciones operativas para la fenilefrina clorhidrato 5mg/5mL. Gencopharmaceutical Lima -2014.

MUESTRA, VOLUMEN DE MUESTRA	ANALISTA 1			ANALISTA 2		
	AREAS	C mg/5mL	C %	AREAS	C mg/5mL	C %
Analista 1	434,59485	-----	-----	435,71042	-----	-----
W. Est. 1= 50.5 mg	432,49316			435,00876		
W. Est. 2= 50.5 mg	432,96823			434,78033		
Analista 2	433,36349			434,02896		
W. Est. 1 = 50.5 mg	433,01489			433,56577		
W. Est. 2 = 50.5 mg	432,67142			434,25885		
Mt1	432,29849	4,978	99,561	430,37109	4,988	99,75
5 mL	431,40356			430,18320		
	433,02432			430,09128		
Mt2	430,85718	4,9573	99,146	429,94547	4,987	99,73
5 mL	431,16138			430,10165		
	429,30008			430,25369		
Mt3	428,11096	4,9213	98,426	430,77765	4,992	99,84
5 mL	427,48907			430,97464		
	426,35001			429,96970		
Mt4	425,57263	4,9245	98,491	430,01556	4,986	99,71
5 mL	424,98663			430,09360		
	432,23117			429,90988		
Mt5	431,78833	4,9765	99,529	429,22424	4,974	99,49
5 mL	431,72653			428,97488		
	432,18951			428,93219		
Mt6	432,55276	4,9652	99,304	428,93076	4,970	99,4
5 mL	431,84219			428,63766		
	431,92191			428,43295		
Mt7	431,48492	4,9659	99,318	428,40417	4,966	99,33
5 mL	430,97205			428,71640		
	430,91785			427,95587		
Mt8	431,30859	4,9659	99,318	429,45572	4,977	99,53
5 mL	431,45483			429,34360		
	430,80295			429,00745		
Mt9	431,08331	4,9655	99,311	429,51645	4,978	99,55
5 mL	431,19951			429,37271		
	431,18802			429,11780		
Mt10	430,01535	4,9557	99,114	426,96420	4,95	99,00
5 mL	430,66849			427,17969		
	430,22540			426,70303		
PROMEDIO		4,95758	99,15		4,9768	99,5
D.S		0,01957	0,391349		0,01263	0,24
CV		0,39483	0,394696		0,25377	0,25
PROMEDIO ANALISTA 1 + ANALISTA 2		DS		0,640724808		
		CV		0,645236633		

Conclusión: El CV < 2%; el coeficiente de variación es 0,645%, es menor al 2% por lo tanto podemos decir que el método es preciso y cumple con la reproducibilidad

Anexo 12

Tabla 23. Precisión intermedia bajo las mismas condiciones operativas para la guaifenesina 100mg/5mL. Gencopharmaceutical Lima -2014.

MUESTRA, VOLUMEN DE MUESTRA	ANALISTA 1			ANALISTA 2		
	AREAS	C mg/5mL	C %	AREAS	C mg/5mL	C %
Analista 1	10246,6000	-----	-----	10334,600	-----	-----
W. Est. 1= 101,0 mg	10244,0000			10328,100		
W. Est. 2 = 101,1 mg	10244,2000			10319,800		
Analista 2	10259,8000			10317,800		
W. Est. 1 = 100,0 mg	10255,4000			10312,400		
W. Est. 2 = 100,0 mg	10256,3000			10310,700		
Mt1	10223,0000	99,701	99,701	10271,700	99,119	99,119
5 mL	10220,7000			10271,000		
	10217,4000			10266,600		
Mt2	10217,4000	99,633	99,633	10267,200	99,033	99,033
5 mL	10214,7000			10261,200		
	10217,5000			10254,100		
Mt3	10220,5000	99,669	99,669	10258,000	99,103	99,103
5 mL	10215,9000			10276,000		
	10214,8000			10270,200		
Mt4	10220,5000	99,684	99,684	10259,200	99,092	99,092
5 mL	10214,8000			10266,000		
	10220,6000			10275,500		
Mt5	10211,0000	99,625	99,625	10268,400	99,109	99,109
5 mL	10212,9000			10265,700		
	10214,0000			10271,900		
Mt6	10222,2000	99,746	99,746	10281,200	99,257	99,257
5 mL	10228,9000			10286,300		
	10223,9000			10284,700		
Mt7	10236,9000	99,818	99,818	10281,200	99,257	99,257
5 mL	10226,8000			10286,300		
	10233,6000			10284,700		
Mt8	10235,7000	99,82	99,82	10340,300	99,612	99,612
5 mL	10232,0000			10330,100		
	10230,0000			10292,100		
Mt9	10237,5000	99,781	99,781	10263,700	98,811	98,811
5 mL	10223,3000			10228,800		
	10225,1000			10221,000		
Mt10	10224,8000	99,754	99,754	10217,3000	98,607	98,607
5 mL	10231,0000			10218,3000		
	10221,8000			10214,4000		
PROMEDIO		99,7231	99,72		99,1	99,10
D.S		0,071424	0,071424		0,2673	0,2673
CV		0,071623	0,071623		0,2697	0,2697
PROMEDIO		DS			0,33871858	
ANALISTA 1 +		CV			0,341344399	
ANALISTA 2						

Conclusión: El CV < 2%; el coeficiente de variación es 0,341%, es menor al 2% por lo tanto podemos decir que el método es preciso y cumple con la reproducibilidad

Anexo 13

Tabla 24. Precisión intermedia bajo las mismas condiciones operativas para el dextrometorfano bromhidrato 10mg/5mL. Gencopharmaceutical-2014.

MUESTRA, VOLUMEN DE MUESTRA	ANALISTA 1			ANALISTA 2		
	AREAS	C mg/5mL	C %	AREAS	C mg/5mL	C %
Analista 1	916,05701	-----	-----	920,87299	-----	-----
W. Est. 1 = 25.0 mg	915,12402	-		919,34125	-	
W. Est. 2 = 25.0 mg	916,12830			921,43970		
Analista 2	917,16577			944,01715		
W. Est. 1 = 25.0 mg	916,03937			941,87018		
W. Est. 2 = 25.2 mg	914,83472			942,23090		
Mt1	990,14948	10,28	102,79	1001,1657	10,205	102,05
5 mL	992,80774			1001,4501		
	993,67990			1001,1990		
Mt2	1000,54828	10,37	103,67	1011,0617	10,299	102,99
5 mL	999,63464			1010,5533		
	999,92444			1009,8644		
Mt3	986,67297	10,24	102,41	994,80353	10,148	101,48
5 mL	987,67859			996,65247		
	989,33319			995,59991		
Mt4	992,15533	10,28	102,76	1000,2493	10,188	101,88
5 mL	990,82355			999,59552		
	990,58936			998,97913		
Mt5	983,81213	10,21	102,13	991,36035	10,106	101,06
5 mL	985,68549			991,13965		
	986,01581			992,32019		
Mt6	986,50226	10,23	102,26	994,37866	10,139	101,39
5 mL	986,14075			995,62891		
	986,69019			994,35608		
Mt7	974,53394	10,1	100,95	995,78723	10,161	101,61
5 mL	973,41339			997,28168		
	973,37964			997,86206		
Mt8	983,24377	10,19	101,92	993,95850	10,139	101,39
5 mL	982,61475			994,64441		
	983,41888			995,82953		
Mt9	987,21576	10,22	102,24	998,02643	10,177	101,77
5 mL	985,63550			997,52649		
	985,91266			1000,0947		
Mt10	984,66970	10,21	102,14	993,43848	10,114	101,14
5 mL	985,93201			992,33807		
	985,04700			991,38385		
PROMEDIO		10,233	102,33		10,167	101,68
D.S		0,0699	0,6960		0,0556	0,5567
CV		0,6833	0,6801		0,5476	0,5476
PROMEDIO ANALISTA 1 + ANALISTA 2		DS		1,25280166		
		CV		1,227795746		

Conclusión: El CV < 2%; el coeficiente de variación es 1.228%, es menor al 2% por lo tanto podemos decir que el método es preciso y cumple con la reproducibilidad

Anexo 14

Tabla 25. Exactitud, medido por el porcentaje hallado a diferentes concentraciones de la fenilefrina clorhidrato 5mg/5mL. Gencopharmaceutical Lima -2014.

PORCENTAJE DE ANALITO TEORICO	PESO		mg hallado	% hallado	S	S ²
	(mg)	% REAL				
Concentración 80%	4,50	80,0	4,00	79,38	0,076	0,006
	4,51	80,0	3,98	79,53		
	4,51	80,0	3,99	79,43		
Concentración 100%	5,02	100,0	4,99	99,79	0,217	0,047
	5,01	100,0	5,02	100,05		
	5,02	100,0	5,02	100,22		
Concentración 120%	5,50	120,0	5,96	119,98	0,126	0,016
	5,51	120,0	5,98	120,23		
	5,50	120,0	5,96	120,08		

Test de Igualdad de Varianzas (Test G de Cochran)

$$G_{exp} = \frac{S_{m\acute{a}x}^2}{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2} = \frac{0.047}{0.006 + 0.047 + 0.016} = 0.0690$$

$$G_{tabla}(p = 0.05; K = 3; n = 3) = 0,8709$$

Al ser $G_{exp} < G_{tabla}$ significa que las varianzas de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes

Es decir, el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

Anexo 15

Tabla 26. Exactitud, medido por el porcentaje hallado a diferentes concentraciones de la guaifenesina 100 mg/5 mL. Gencopharmaceutical Lima - 2014.

PORCENTAJE DE ANALITO TEORICO	PESO (mg)	% REAL	mg hallado	% hallado	S	S ²
Concentración 80%	80,01	80,0	80,36	80,06	0,163	0,026
	80,00	80,0	80,30	80,30		
	80,01	80,0	80,37	80,37		
Concentración 100%	100,00	100,0	99,38	99,38	0,113	0,013
	100,02	100,0	99,39	99,19		
	100,04	100,0	99,39	99,39		
Concentración 120%	120,02	120,0	119,36	119,36	0,149	0,022
	120,04	120,0	119,31	119,31		
	120,01	120,0	119,38	119,08		

Test de Igualdad de Varianzas (Test G de Cochran)

$$G_{exp} = \frac{S_{máx}^2}{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2} = \frac{0.026}{0.026 + 0.013 + 0.022} = 0.42623$$

$$G_{tabla}(p = 0.05; K = 3; n = 3) = 0,8709$$

Al ser $G_{exp} < G_{tabla}$ significa que las varianzas de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes

Es decir, el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

Anexo 16

Tabla 27. Exactitud, medido por el porcentaje hallado a diferentes concentraciones de dextrometorfano bromhidrato. 10 mg/5mL. Gencopharmaceutical Lima -2014.

PORCENTAJE DE ANALITO TEORICO	PESO (mg)	% REAL	mg hallado	% hallado	S	S ²
Concentración 80%	8,02	80,0	7,94	79,38	0,076	0,006
	8,01	80,0	7,95	79,53		
	8,00	80,0	7,94	79,43		
Concentración 100%	10,02	100,0	9,98	99,79	0,217	0,047
	10,02	100,0	10,00	100,05		
	10,01	100,0	10,02	100,22		
Concentración 120%	12,00	120,0	12,00	119,98	0,126	0,016
	12,02	120,0	12,02	120,23		
	12,03	120,0	12,01	120,08		

Test de Igualdad de Varianzas (Test G de Cochran) = 0.68116

$$G_{exp} = \frac{S_{m\acute{a}x}^2}{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2} = \frac{0.047}{0.006 + 0.047 + 0.016}$$

$$G_{tabla}(p = 0.05; K = 3; n = 3) = 0,8709$$

Al ser $G_{exp} < G_{tabla}$ Significa que las varianzas de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes.

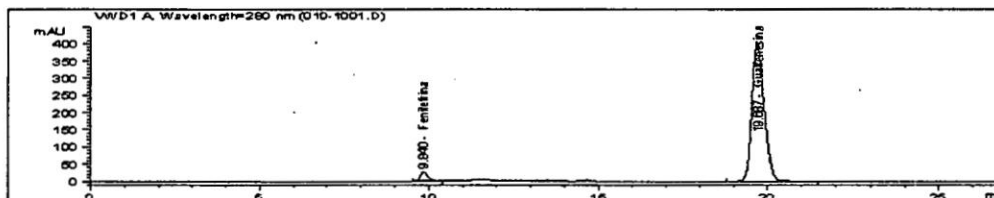
Es decir, el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

Anexo 17

1

```

Acq. Operator   : M. Enciso                      Seq. Line : 10
Acq. Instrument : Instrument 1                   Location  : Vial 10
Injection Date  : 8/15/2014 4:57:17 PM          Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 20.0 µl
Sequence File   : C:\CHEM32\1\DATA\VALIDACIONES\GUAIFENESINA\GUAIFENESINA 2014-08-15 08-
27-34\GUAIFENESINA.S
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\VALIDACIONES\GUAIFENESINA\GUAIFENESINA 2014-08-15 08-
27-34\GUAIFENESINA.M
Last changed    : 8/15/2014 8:38:59 AM by M. Enciso
(modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\DATA\VALIDACIONES\GUAIFENESINA\GUAIFENESINA 2014-08-15 08-
27-34\GUAIFENESINA.M (Sequence Method)
Last changed    : 8/15/2014 9:59:29 PM by M. Enciso
Sample Info     : PRINCIPIO ACTIVO 2
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Friday, July 11, 2014 11:20:31 AM
Multiplier:    : 1.0000
Dilution:      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

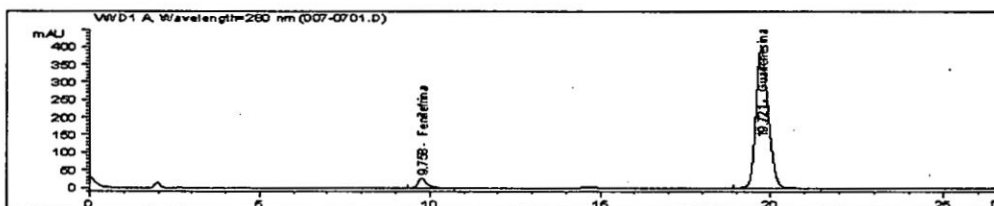
Signal 1: VWD1 A, Wavelength=280 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU * s	Amt/Area	Amount [µg]	Grp	Name
9.840	BB	420.49469	7.69640e-3	3.23630		Fenilefrina
19.687	BB	9857.04785	1.01433e-4	9.99834e-1		Guaifenesina

2

```

Acq. Operator   : M. Enciso                      Seq. Line : 7
Acq. Instrument : Instrument 1                   Location  : Vial 7
Injection Date  : 8/15/2014 2:07:37 PM          Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 20.0 µl
Sequence File   : C:\CHEM32\1\DATA\VALIDACIONES\GUAIFENESINA\GUAIFENESINA 2014-08-15 08-
27-34\GUAIFENESINA.S
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\VALIDACIONES\GUAIFENESINA\GUAIFENESINA 2014-08-15 08-
27-34\GUAIFENESINA.M
Last changed    : 8/15/2014 8:38:59 AM by M. Enciso
(modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\DATA\VALIDACIONES\GUAIFENESINA\GUAIFENESINA 2014-08-15 08-
27-34\GUAIFENESINA.M (Sequence Method)
Last changed    : 8/15/2014 9:59:29 PM by M. Enciso
Sample Info     : PLACEBO + PRINCIPIO ACTIVO 1
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Friday, July 11, 2014 11:20:31 AM
Multiplier:    : 1.0000
Dilution:      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=280 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU * s	Amt/Area	Amount [µg]	Grp	Name
9.758	BB	433.55307	7.69640e-3	3.33680		Fenilefrina
19.721	BB	9769.22363	1.01433e-4	9.90925e-1		Guaifenesina

Figura 7. Cromatografías, 1: estándar de fenilefrina clorhidrato y guaifenesina, 2: placebo de excipiente puro + fenilefrina clorhidrato y guaifenesina. Gencopharmaceutical Lima -2014

Anexo 123

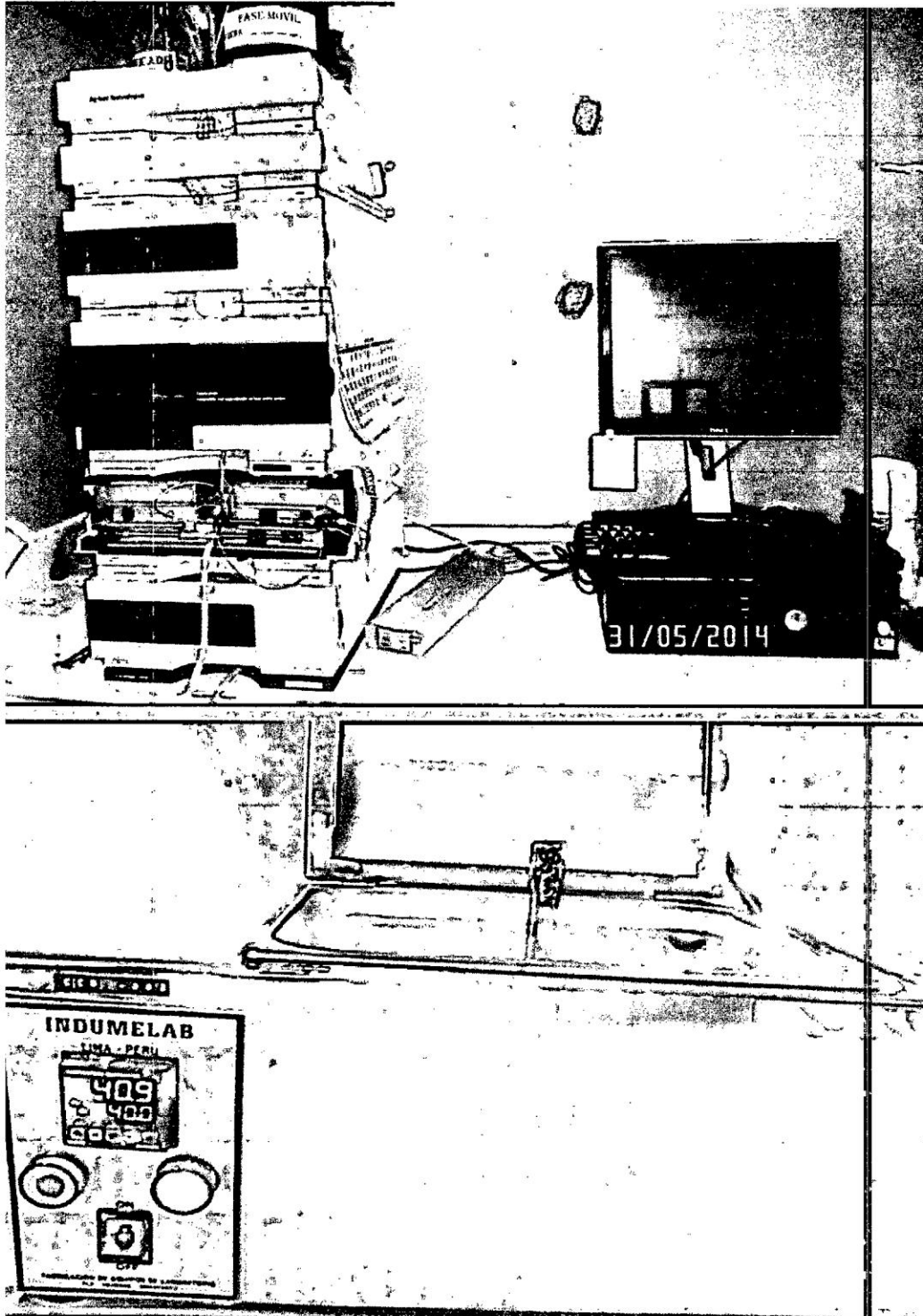


Figura 13. HPLC Agilent 1200, Incubadora Indumelab-Control de Calidad. Biocopharmaceutical - 2014

Figura 13. Control de Calidad de la Incubadora (Indumelab) en el laboratorio de Biocopharmaceutical - 2014

Anexo 24

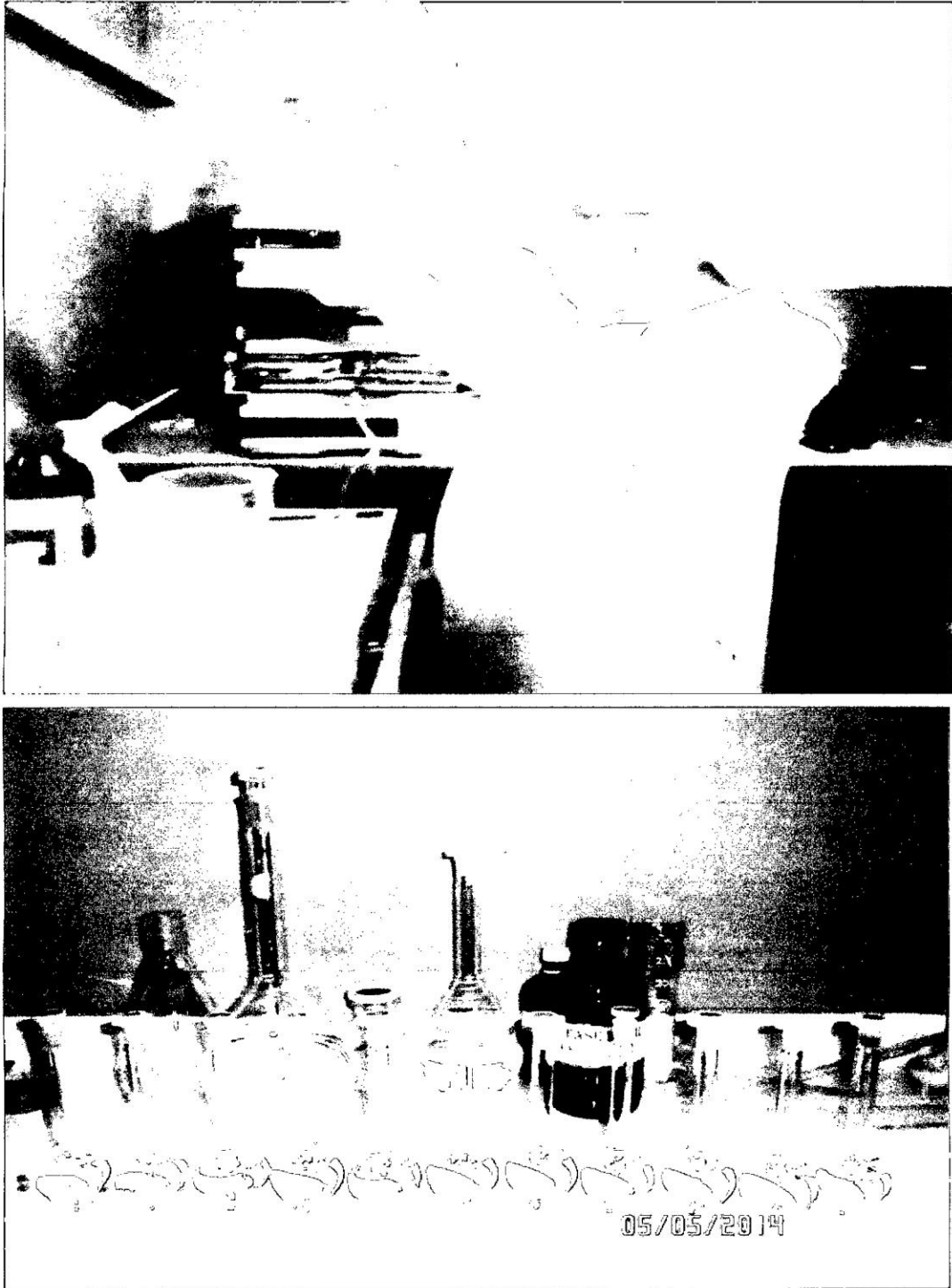


Figura 14. Preparación de fase móvil, diluyente y muestras de fenilefrina clorhidrato, guaifenesina y dextrometorfano bromhidrato para ser evaluados en el HPLC. Gencopharmaceutical Lima -2014.

Anexo 25. Matriz de consistencia

TITULO: Validación de la técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para la determinación de fenilefrina clorhidrato, guaifenesina y dextrometorfano bromhidrato en Jarabe. Lima – 2014
AUTORA: ENCISO RODRIGUEZ, Maritza

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	MARCO TEORICO	VARIABLES E INDICADORES	DISEÑO METODOLOGICO
Validación de la técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para la determinación de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina en Jarabe. Lima - 2014	¿Será confiable la técnica analítica para la cuantificación de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina en Jarabe desarrollado por el método de cromatografía líquida de alta performance para obtener resultados dentro de las especificaciones establecidas en el protocolo de validación?	<p>Objetivo general:</p> <p>Validar una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para la determinación de contenido de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina en Jarabe y documentar los resultados obtenidos.</p> <p>Objetivos específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Determinar la prueba de aptitud del sistema específico para la cuantificación de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina en Jarabe. • Determinar la especificidad y selectividad de la técnica analítica para el análisis de contenido por HPLC de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina en Jarabe. • Determinar la linealidad utilizando la técnica analítica por el método de HPLC para la cuantificación de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina en Jarabe. • Comprobar la precisión de la técnica analítica por el método de HPLC para la cuantificación de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina en Jarabe. • Determinar la exactitud utilizando la técnica analítica por el método de HPLC para la cuantificación de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina en Jarabe. • Evaluar la robustez empleando la técnica analítica por el método de HPLC para la cuantificación de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina en Jarabe. 	<p>La validación de la técnica analítica por cromatografía líquida de Alta performance (HPLC) para la determinación de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina en la forma farmacéutica de Jarabe es confiable para obtener los resultados dentro de las especificaciones establecidas en el protocolo de validación.</p>	<p>Validación de métodos analíticos</p> <p>La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, por medio de estudio de laboratorio, que las características de desempeño del método reúnen los requisitos para las aplicaciones analíticas concebidas. Las características de desempeño se expresan en función de los parámetros analíticos que serán descritos más adelante¹².</p> <p>Parámetros de validación:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Selectividad-Especificidad • Linealidad • Precisión • Exactitud • Robustez¹² <p>Dextrometorfano bromhidrat: Es el d-isomero del análogo codeínico del levorfanol, se emplea como antitusígeno. Controla los espasmos de la tos al deprimir el centro de la tos en el bulbo, posee una potencia supresora de la tos de aproximadamente la mitad de la potencia antitusígena de la codeína⁹.</p> <p>Fenilefrina clorhidrato: Es una amina simpaticomimética que se utiliza por vía intranasal para combatir la congestión nasal y por vía oral en combinación con otros fármacos en el tratamiento de la gripe, resfriado, etc.⁷</p> <p>Guaifenesina: es un expectorante utilizado para el alivio sintomático de los trastornos respiratorios caracterizados por una tos seca o productiva, y por la presencia de moco en el tracto respiratorio⁸.</p>	<p>Variable principal</p> <p>Validación de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC)</p> <p>Indicadores:</p> <p>Parámetros de validación: Selectividad, Linealidad, Precisión, Exactitud, Robustez</p>	<p>Tipo: Descriptivo transversal</p> <p>Nivel: Básico</p> <p>Población: Un lote determinado de 600L de Jarabe fenilefrina clorhidrato (5mg/mL), guaifenesina (100mg/5mL) y dextrometorfano bromhidrato (10mg/5mL), del área de líquidos del laboratorio Gencopharmaceutical SAC.</p> <p>Muestra: 4L de placebo de jarabe defenilefrina clorhidrato (5mg/5mL), guaifenesina (100mg/5mL) y dextrometorfano bromhidrato (10mg/5mL), se utilizó un muestreo aleatorio simple.</p> <p>METODOLOGIA:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fenilefrina y Guaifenesina: <p>Fase móvil: Preparar sol. de metanol: solución A (30:70) y luego filtrar.</p> <p>Solución A: Disolver 0.55 g de ácido 1-hexanosulfónico en agua y enrasar a 500mL. Filtrar a través de un filtro de membrana de 0.45 µm de nylon.</p> <p>Diluyente: Mezclar agua y metanol (30:10) y agregar 1 gota de ácido fosfórico luego verificar el pH en aproximadamente 3.0.</p> <p>Preparación del estándar mixto:</p> <p>Transferir 50mg de fenilefrina clorhidrato a una fiola de 100 mL, adicionar 30 mL de diluyente, mezclar, dejar equilibrar a T° ambiente y completar a volumen con diluyente. Pesar 100 mg de guaifenesina a una fiola de 100 mL, transferir 10,0 mL de la solución estándar de Fenilefrina clorhidrato, a una fiola de 100 mL y completar a volumen con diluyente, mezclar. (Conc. aprox. de 0.05 mg/mL de fenilefrina clorhidrato, 1 mg/mL de guaifenesina), filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de membrana de 0.20 µm de nylon descartando los primeros mL del filtrado.</p> <p>Preparación de la muestra:</p> <p>Transferir 5mL de jarabe (5mg defenilefrina clorhidrato y 100 mg de guaifenesina) exactamente medidos a una fiola de 100mL, adicionar 40mL de diluyente agitar hasta disolver, completar a volumen con diluyente, (conc. aprox 0.05 mg/mL de fenilefrina clorhidrato y 1mg/mL de guaifenesina), filtrar una porción de esta solución.</p> <p>Condiciones cromatográficas:</p> <p>Longitud de onda: 280nm, flujo: 1,0mL/minuto, Vol. de inyección: 20µL, temperatura: ambiente, columna: Eclipse XDB-Phenyl C18 de 4,6 x 250mm 5µm, tiempo de retención: fenilefrina: 10 min, guaifenesina: 20 min aprox.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Dextrometorfano bromhidrato (10mg/5mL): <p>Fase móvil: pesar 1.44g de lauril sulfato de sodio disolver en 300mL de agua purificada, agregar 5.5mL de Trietanolamina, luego llevar a pH 2.8-2.9 con ácido fosfórico, agregar 200mL de acetonitrilo dejar equilibrar a T° ambiente, finalmente mezclar y filtrar.</p> <p>Preparación del estándar: Transferir 25 mg de dextrometorfano bromhidrato, a una fiola de 25 mL, adicionar 30 mL de fase móvil, mezclar, dejar equilibrar a T° ambiente y completar a volumen con fase móvil, transferir 1 mL de la dilución anterior a una fiola de 10 mL y llevar a volumen con fase móvil, mezclar y filtrar (Conc. aprox. de 0.1 mg/mL de dextrometorfano bromhidrato).</p> <p>Preparación de la muestra: Transferir 5 mL de jarabe (± 10 mg de dextrometorfano bromhidrato) a una fiola de 100 mL, adicionar 40 mL de fase móvil dejar equilibrar a T° ambiente y completar a volumen con diluyente, mezclar y filtrar (Conc. aprox. de 0.1 mg/mL de dextrometorfano bromhidrato).</p> <p>Condiciones Cromatográficas: Longitud de onda: 265 nm, Flujo: 1.5 mL/min, Vol. de inyección: 100 µL, Temperatura: ambiente, Columna: Eclipse XDB C18 de 4,6 x 150 mm 5-µm, Tiempo de retención: 20 min aprox.</p>

Validación de la técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para la determinación de fenilefrina clorhidrato, guaifenesina y dextrometorfano bromhidrato en jarabe. Lima - 2013

Maritza Enciso Rodríguez¹ y Maricela López Sierralta¹.

¹Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

RESUMEN

El análisis por Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC) de productos farmacéuticos es una necesidad y es de uso rutinario. El presente trabajo de investigación tiene por objetivo Validar una técnica analítica por, (HPLC) para la determinación de contenido de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina en jarabe, desarrollado en el laboratorio Gencopharmaceutical SAC Lima, durante el periodo enero a julio del 2014. El tipo de investigación fue descriptivo transversal con un muestreo aleatorio simple, para lo cual se evaluó los parámetros estipulados en la USP como: Exactitud, Precisión, Selectividad – Especificidad, Linealidad y Robustez. Los resultados finales obtenidos según los parámetros descritos demostró que el método es selectivo y específico porque no existen interferencias con el excipiente, fase móvil, diluyente y productos de degradación. El método es lineal porque se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.99959 para la fenilefrina clorhidrato, 0.99997 para la guaifenesina y 0.99983 para el dextrometorfano bromhidrato. En la exactitud el porcentaje de recuperado promedio fue 99.80% de fenilefrina clorhidrato, 99.56% de guaifenesina y 99.78% de dextrometorfano bromhidrato en un rango de 80-120%. En la precisión el coeficiente de variación de la repetibilidad fue 0.65% para la fenilefrina clorhidrato, 0.34% para la guaifenesina y 1.23% para el dextrometorfano bromhidrato, la desviación estándar relativa porcentual de la precisión intermedia fue de 0.61% para la fenilefrina clorhidrato, 0,090% para la guaifenesina y 0.342% para el dextrometorfano bromhidrato respectivamente, encontrándose dentro de los límites especificados. En el ensayo de robustez los cambios en cuanto al pH de la fase móvil, marca de la columna y refrigeración de las muestras no interfieren en la recuperación. Concluyéndose así que el método analítico propuesto es lineal, exacto, preciso, reproducible, selectivo y presenta robustez, comprobándose así su validez.

Palabras claves: Validación de técnica analítica, HPLC fenilefrina clorhidrato, guaifenesina, dextrometorfano bromhidrato.

SUMMARY

The analysis by high precision liquid chromatography (HPLC) of pharmaceuticals is a necessity and is in routine use. The present research aims to validate an analytical technique for high performance Liquid Chromatography (HPLC) for the determination of dextromethorphan Bromh content. Phenylephrine Clorh. And Guaifenesin in Syrup, developed in the laboratory Gencopharmaceutical S.A.C., during the period January to the 2014 July.

The fellow of investigation went descriptive side road with an aleatory sampling simple, stop it as USP evaluated the stipulated parameters in her himself I have a meal: exactness, precisión, selectividad - specificity, linealidad and robustez. The final results obtenidos according to the described parameters he proved that method is selective and specific because atmospherics with the excipient, movable phase, thinner and degradation products do not exist. Method is linear because fenilefrina obtained a correlation coefficient of 0.99959 in order to her himself hydrochloride, 0.99997 in order to her guaifenesina and 0.99983 prop the dextrometorfano bromhidrato. The recovered- average percentage was 99.80 In the exactness. In the precision the variation coefficient of her repetibilidad was 0.65. The changes as to the movable phase's pH, the column's check mark and signs's refrigeration do not interfere in the recuperation In the robustness essay. Concluyéndose as soon as the analytical method once was proposed is linear, exact, precise, reproducible, selective and shows robustness, comprobándose thus his validity.

Key words: Validation of analytical technique, HPLC phenylephrine hydrochloride, guaifenesin, dextromethorphan hydrobromide.

INTRODUCCIÓN

El análisis se considera hoy en día un proceso mediante el cual se obtiene información. Se realiza millones de análisis cada día en los ámbitos más variados: análisis de productos manufacturados, análisis medioambientales, análisis clínicos, forenses, químicos y físicos, en todos ellos se requiere una confianza en los resultados obtenidos. La validación de las metodologías analíticas, junto con otras actividades englobadas en el área de aseguramiento de la calidad, permiten conseguir calidad, otorgando la confianza necesaria a la vez que confieren un grado elevado de comparabilidad entre los resultados de los análisis químicos.¹

La industria farmacéutica, al elaborar sus productos destinados a curar la enfermedad, salvar vidas o mejorar la calidad de vida, no puede haber el mínimo margen para el error. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos de control y fabricación, se exige una mejora continua y máximas garantías de la calidad y es en el avance para conseguir un total dominio de la calidad, cuando surge el concepto de validación².

Objetivo general:

Validar una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance, (HPLC) para la determinación de contenido de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina en jarabe y documentar los resultados obtenidos.

Objetivos específicos:

- Determinar la prueba de aptitud del sistema específico para la cuantificación de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina en jarabe.
- Determinar la especificidad y selectividad de la técnica analítica para el análisis de contenido por HPLC de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina en jarabe.
- Determinar la linealidad utilizando la técnica analítica por el método de HPLC para la cuantificación de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina en jarabe.
- Comprobar la precisión de la técnica analítica por el método de HPLC para la cuantificación de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina en jarabe.
- Determinar la exactitud utilizando la técnica analítica por el método de HPLC para la cuantificación de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina en Jarabe.
- Evaluar la robustez empleando la técnica analítica por el método de HPLC para la cuantificación de dextrometorfano

bromhidrato, enilefrina clorhidrato. y guaifenesina en jarabe.

MATERIALES Y MÉTODOS

DEFINICIÓN DE LA POBLACIÓN Y MUESTRA

Poblacion: Un lote determinado de 600L de Jarabe fenilefrina clorhidrato (5 mg/ mL), guaifenesina (100 mg/5 mL) y dextrometorfano bromhidrato (10 mg/5 mL), del área de líquidos del laboratorio Gencopharmaceutical SAC.

Muestra; 4L de placebo de jarabe de fenilefrina clorhidrato (5 mg/5 mL), guaifenesina (100 mg/5 mL) y dextrometorfano bromhidrato (10mg/5mL).

Tipo de muestreo

Muestreo aleatorio simple

DISEÑO METODOLÓGICO

Metodología para la recolección de datos

Recolección de la muestra

Las muestras de jarabe placebo de fenilefrina clorhidrato, guaifenesina y dextrometorfano bromhidrato fueron recolectados de un lote de 600 litros de la parte media con un muestreo aleatorio simple en el laboratorio Gencopharmaceutical del departamento de producción del área de líquidos en Lima.

1. Fenilefrina clorhidrato y guaifenesina

• Preparación de la fase móvil.

Preparar una solución de metanol: solución A (30: 70) y luego filtrar

Solución A: Disolver 0.55 g. de ácido 1 - hexanosulfónico en agua y enrasar a 500 mL, filtrar a través de un filtro de membrana de 0.45 µm de nylon.

• Preparación del diluyente

Mezclar agua: metanol (30:10) y agregar 1 gota de ácido fosfórico luego verificar el pH en aproximadamente 3.0.

• Preparación del estándar mixto:

Transferir 50 mg de fenilefrina clorhidrato, exactamente pesados, a una fióla de 100 mL, adicionar 30 mL de diluyente, mezclar, dejar equilibrar a temperatura ambiente y completar a volumen con diluyente. Pesar 100 mg de guaifenesina a una fióla de 100 mL, transferir 10,0 mL de la solución estándar de fenilefrina clorhidrato a fióla de 100 mL y completar a volumen con diluyente, mezclar. (conc. aprox. de 0.05 mg/mL de fenilefrina clorhidrato), (conc. aprox de 1 mg/mL de guaifenesina), filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de membrana de 0.20 µm de nylon descartando los primeros mL del filtrado. Colocar cada filtrado en viales limpios y septas nuevas.

- **Preparación de la muestra:**

Transferir 5 mL de jarabe (5 mg de fenilefrina clorhidrato y 100 mg de guaifenesina), exactamente medidos, a una fiola de 100 mL, adicionar 40 mL de diluyente dejar equilibrar a temperatura ambiente y completar a volumen con diluyente, mezclar, (conc. aprox. de 0.05 mg/mL de fenilefrina clorhidrato), (conc. aprox de 1 mg/mL de guaifenesina), filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de membrana de 0.20 µm de nylon descartando los primeros mL del filtrado.

Longitud de onda: 28 nm, Flujo: 1.0mL/min, Vol. De inyección: 20µL, temperatura ambiente, Columna: Eclipse XDB-phenyl C18.

2. Dextrometorfano bromhidrato

- **Fase móvil:**

Pesar 1.44 g de lauril sulfato de sodio disolver en 300mL de agua purificado. A esta solución agregar 5.5 mL de trietanolamina, luego llevar a un PH 2.8 - 2.9 con ácido fosfórico, agregar 200 mL de acetonitrilo dejar equilibrar a temperatura ambiente finalmente mezclar y filtrar a través de un filtro de membrana de 0.45 -µm de nylon.

- **Preparación del estándar:**

Transferir 25 mg de dextrometorfano bromhidrato, exactamente pesados, a una fiola de 25 mL, adicionar 30 mL de fase móvil, mezclar, dejar equilibrar a temperatura ambiente y completar a volumen con fase móvil. Transferir 1 mL de la dilución anterior a una fiola de 10 mL y llevar a volumen con fase móvil, mezclar (conc. aprox. de 0.1 mg/mL de dextrometorfano bromhidrato). Luego filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de membrana de 0.20 µm de nylon descartando los primeros mL del filtrado.

- **Preparación de la muestra:**

Transferir 5 mL de jarabe (10 mg de dextrometorfano bromhidrato) a una fiola de 100 mL, adicionar 40 mL de fase móvil dejar equilibrar a temperatura ambiente y completar a volumen con diluyente, mezclar (conc. aprox. de 0.1 mg/mL de dextrometorfano bromhidrato). Luego filtrar una porción de esta solución a través de un filtro de membrana de 0.20 µm de nylon descartando los primeros mL del filtrado. Longitud de onda: 265nm, flujo: 1.5 mL/minuto, Vol. de inyección: 100 µL, temperatura ambiente, columna: Eclipse XDB-C18 x 150mm.

Desarrollo de los parámetros de validación

1. Especificidad-Selectividad.- Los documentos de ICH definen especificidad como

la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz.^{3,4}

a. Determinación de picos provenientes de los reactivos utilizados durante el análisis: Se prepara fase móvil y diluyente por duplicado como indica la técnica y filtrar en un vial por separado e inyectar dos inyecciones de cada uno, se determina si hay respuesta.

b. Determinación de picos de excipientes en el placebo: Transferir 5 mL de la preparación placebo exactamente medidos a una fiola de 100mL completar a volumen con diluyente mezclar y filtrar, preparar por duplicado y realizar dos inyecciones de cada uno.

c. Determinación de picos de excipientes en el placebo al que se le añade 100% de principio activo:

Para fenilefrina clorhidrato + guaifenesina.- Agregar 101.37 mg de principio activo de Fenilefrina clorhidrato + 2.02 mg de principio activo de guaifenesina a la muestra placebo en una fiola de 100 mL y aforar con diluyente, de esta solución transferir 5 mL a una fiola de 100 mL y aforar con diluyente, filtrar una porción, preparar la muestra por duplicado y realizar dos inyecciones de cada uno.

Para dextrometorfano.- Agregar 210.64 mg de principio activo de dextrometorfano bromhidrato a la muestra placebo en una fiola de 100 mL, de esta solución transferir 5 mL a una fiola de 100 mL y aforar con diluyente, filtrar una porción de esta, preparar la muestra por duplicado y realizar dos inyecciones de cada uno.

d. Determinación picos del control negativo: preparar una solución muestra usando otro producto que no contenga el principio activo, preparar de la misma manera como indica la técnica, preparar por duplicado y realizar dos inyecciones de cada uno.

e. Determinación de picos de impurezas relacionado a la fenilefrina clorhidrato, guaifenesina y dextrometorfano bromhidrato placebo + principio activo al 100%:

Muestra sometido a estrés (50° durante 1hora).- transferir 5 mL de la muestra a una fiola de 100 mL, y aforar con diluyente a volumen, filtrar una porción de esta solución e inyectar por duplicado

2. Linealidad. La linealidad de un método analítico es su capacidad para demostrar que los resultados de la prueba son directamente proporcionales (o se convierten en directamente proporcionales mediante una transformación matemática bien definida a la concentración del analito dentro de un rango dado⁵. Se determina empleando soluciones de trabajo en un rango de

cinco concentraciones (80%, 90%, 100%, 110%, 120%), siendo el 100% la concentración nominal de la muestra en el ensayo, las muestras son preparadas de acuerdo como indica la técnica analítica.

3. Precisión. La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos analíticos efectuados sobre una muestra homogénea o expresado de otra forma, es la distribución de los valores analíticos alrededor de su media. La precisión de un método analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa de una serie de mediciones.⁶

Repetibilidad instrumental. se preparan 10 soluciones de estándares exactamente pesados y a una concentración única del 100% haciendo las mismas diluciones que se hace para el estándar en la técnica analítica, inyectar cada muestra por triplicado.

Repetibilidad del método. se preparan 10 soluciones de muestra exactamente pesados y a una concentración única del 100% haciendo las mismas diluciones que se hace para la muestra problema en la técnica analítica, inyectar cada muestra por triplicado.

Precisión intermedia. este ensayo se realiza para determinar la variación o dispersión de resultados de muestras del producto analizados por dos analistas en días diferentes y dentro del mismo laboratorio con columnas diferentes, se preparan 10 muestras al 100% y se inyectan cada muestra por triplicado.

4. Exactitud. La exactitud de un método analítico, es la proximidad entre los resultados obtenidos por ese método y el valor real²².

Se emplean placebos más excipientes a los que se adicionan cantidades exactas de principio activo para obtener muestras al 80%, 100% y 120%, analizar cada muestra por triplicado, preparando cada muestra con las mismas diluciones que se hacen para la muestra problema.

RESULTADOS:

Tabla 1. Parámetros y criterios de adecuación de la guaifenesina, fenilefrina clorhidrato y dextrometorfano bromhidrato, Gencopharmaceutical Lima-2014.

PARAMETROS DE ADECUACION	CRITERIO DE ADECUACION	RESULTADOS			
		CRITERIO DE ACEPTACION	guaifenesina	(fenilefrina Clorhidrato.)	(dextrometorfano bromhidrato)
REPETIBILIDAD	Tiempo de retención	RSD \leq 2.0%	0.33%	0.20%	1.38%
	Áreas	RSD \leq 2.0%	0.13%	0.18%	0.16%
PARAMETROS CROMATOGRÁFICOS	Platos Teóricos	No menor a 1500	11193	7618	9675
	Factor de cola o Tailing	Menor de 2	0.66	0.58	0.86

Tabla 2 Selectividad-especificidad, porcentaje de interferencia al determinar la guaifenesina, fenilefrina clorhidrato Y dextrometorfano bromhidrato medido por adición de interferentes en el estándar y. placebo, Gencopharmaceutical Lima -2014.

P.A	MUESTRA	ESPECIFICACION (INTERFERENCIA CIA)	PORCENTAJE DE INTERFERENCIA CIA	RESULTADOS
GUAIFENESINA	Fase móvil	>2.0%	No interferencia	Conforme
	Diluyente	>2.0%	No interferencia	Conforme
	Placebo	>2.0%	No interferencia	Conforme
	Placebo + PA	---	No interferencia	Conforme
	PA	---	No interferencia	Conforme
	Control Negativo	>2.0%	No interferencia	Conforme
	Muestra sometido a estrés	>2.0%	No interferencia	Conforme
FENILEFRINA CLORH.	Muestra a otro pH	>2.0%	No interferencia	Conforme
	Fase móvil	>2.0%	No interferencia	Conforme
	Diluyente	>2.0%	No interferencia	Conforme
	Placebo	>2.0%	No interferencia	Conforme
	Placebo + PA	---	No interferencia	Conforme
	PA	---	No interferencia	Conforme
	Control Negativo	>2.0%	No interferencia	Conforme
Muestra sometido a estrés	>2.0%	No interferencia	Conforme	
DEXTROMETORFANO	Muestra a otro pH	>2.0%	No interferencia	Conforme
	Fase móvil	>2.0%	No interferencia	Conforme
	Diluyente	>2.0%	No interferencia	Conforme
	Placebo	>2.0%	No interferencia	Conforme
	Placebo + PA	---	No interferencia	Conforme
	PA	---	No interferencia	Conforme
	Control Negativo	>2.0%	No interferencia	Conforme
Muestra sometido a estrés	>2.0%	No interferencia	Conforme	
Muestra a otro pH	>2.0%	No interferencia	Conforme	

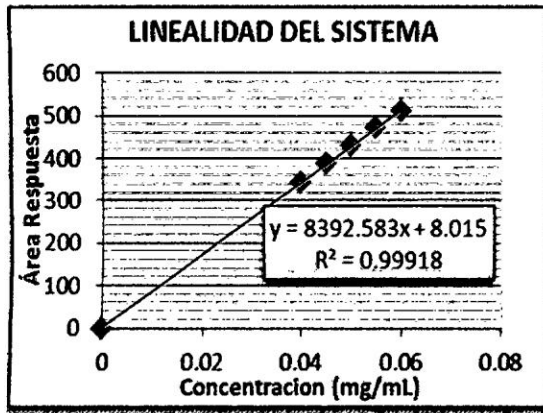


Figura 1: Área vs concentración, linealidad del sistema para fenilefrina, Gencopharmaceutical Lima -2014.

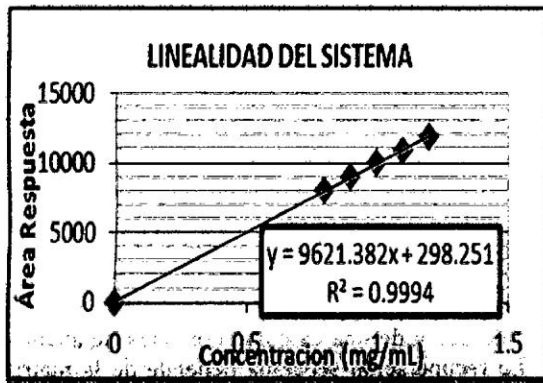


Figura 2. Área vs concentración para determinar la linealidad del sistema para la guaifenesina, Gencopharmaceutical Lima-2014

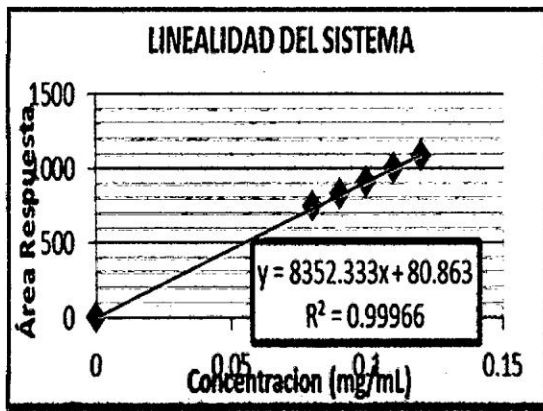


Figura 3. Área vs concentración para determinar la linealidad del sistema para el dextrometorfano bromhidrato. Gencopharmaceutical Lima-2014.

Tabla 6. Exactitud, para la fenilefrina clorhidrato. Gencopharmaceutical Lima-2014.

PORCENTJE DE ANALITO TEORICO	AREAS	PROMEDIO DE AREAS	%	10 mg/75 mL (mg obtenido)	% Recuperado)
80%	350.1				
Volumen de muestra = 5 mL	349.4 352.7	350.8	79.93	4.00	99.91
80%	349.4				
Volumen de muestra = 5 mL	348.8 349.3	349.2	79.57	3.98	99.46
80%	348.8				
Volumen de muestra = 5 mL	349.5 351.3	349.9	79.72	3.99	99.70
100%	437.6				
Volumen de muestra = 5 mL	438.6 438.5	438.3	99.90	4.99	99.90
100%	439.7				
Volumen de muestra = 5 mL	440.4 440.4	440.2	100.30	5.02	100.30
100%	440.7				
Volumen de muestra = 5 mL	441.2 441.1	441.0	100.50	5.02	100.49
120%	524.1				
Volumen de muestra = 5 mL	522.2 523.0	523.1	119.20	5.96	99.33
120%	524.7				
Volumen de muestra = 5 mL	524.1 524.6	524.4	119.50	5.98	99.58
120%	523.3				
Volumen de muestra = 5 mL	523.2 524.0	523.5	119.30	5.96	99.41

Tabla 7. Exactitud, para la guaifenesina. Gencopharmaceutical Lima-2014.

PORCENTJE DE ANALITO TEORICO	AREAS	PROMEDIO DE AREAS	%	10 mg/75 mL (mg obtenido)	% Recuperado)
80%	8220.2	821			
Volumen de muestra = 5 mL	8219.6 8217.8	821	80.36	80.36	100.46
80%	8214.6	821			
Volumen de muestra = 5 mL	8212.7 8212.7	821	80.30	80.30	100.38
80%	8212.7	821			
Volumen de muestra = 5 mL	8228.3 8217.9	821	80.37	80.37	100.46
100%	10162.5	101			
Volumen de muestra = 5 mL	10166.2 10164.2	101	99.38	99.38	99.38
100%	10164.2	101			
Volumen de muestra = 5 mL	10169.8 10163.4	101	99.39	99.39	99.39
100%	10157.9	101			
Volumen de muestra = 5 mL	10169.7 10170.0	101	99.39	99.39	99.39
120%	12212.5	122			
Volumen de muestra = 5 mL	12204.0 12207.1	122	119.36	119.36	99.47
120%	12209.7	122			
Volumen de muestra = 5 mL	12203.6 12196.0	122	119.31	119.31	99.43
120%	12212.2	122			
Volumen de muestra = 5 mL	12209.6 12207.1	122	119.38	119.38	99.48

Tabla 8. Exactitud, para dextrometorfano bromhidrato Gencopharmaceutical Lima-2014.

PORCENTJE DE ANALITO TEORICO	AREAS	PROMEDIO DE AREAS	%	10 mg75 mL (mg obtenido)	% Recuperato)
80%	755.2				
Volumen de muestra = 5 mL	754.1 756.3	755.26	79.38	7.94	99.23
80%	756.9				
Volumen de muestra = 5 mL	755.9 757.1 755.2	756.69	79.53	7.95	99.42
80%	756.8				
Volumen de muestra = 5 mL	754.9 754.9	755.66	79.43	7.94	99.28
100%	949.8				
Volumen de muestra = 5 mL	948.5 949.7	949.38	99.79	9.98	99.79
100%	950.3				
Volumen de muestra = 5 mL	952.4 952.7 953.2	951.83	100.05	10.00	100.05
100%	953.1				
Volumen de muestra = 5 mL	954.1 954.1	953.51	100.22	10.02	100.22
120%	1140.7				
Volumen de muestra = 5 mL	1141.9 1141.7 1143.3	1141.4	119.98	12.00	99.98
120%	1144.6				
Volumen de muestra = 5 mL	1143.5 1140.9 1142.9	1143.8	120.23	12.02	100.19
120%	1142.9				
Volumen de muestra = 5 mL	1143.4	1142.4	120.08	12.01	100.06

DISCUSIONES

En el presente trabajo se desarrolló una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para la cuantificación de dextrometorfano bromhidrato, guaifenesina y fenilefrina clorhidrato en jarabe la cual no figura en ninguna farmacopea oficial, como se sabe éste tipo de análisis presenta mayores ventajas en relación a otros métodos como son los volumétricos y espectrofotométricos, por otro lado este tipo de método presenta mayores ventajas debido a su rapidez de análisis, aceptabilidad, exactitud, fiabilidad y de alta eficacia.

La AEFI⁵, indica que la lectura del placebo debe tener una interferencia no mayor al 2.0%¹⁶. De acuerdo a lo descrito el análisis demuestra que ningún excipiente, fase móvil, diluyente interfieren con los picos de los principios activos, como tampoco se ha detectado la presencia de productos de degradación de la fenilefrina clorhidrato, guaifenesina y dextrometorfano bromhidrato, así como se demuestra en la Tabla 2, al realizar el análisis del principio activo sometido a estrés para que generen los compuestos potencialmente interferentes, por lo tanto mediante el estudio de la selectividad-especificidad, se demostró que la señal medida con el método analítico procede únicamente de los analitos en estudio; según la

AEFI⁵, manifiesta que la selectividad-especificidad es una condición esencial para conseguir una adecuada capacidad para originar resultados que dependan de forma exclusiva del analito para su cuantificación.

Según Aguilar⁷, explica que la linealidad sirve para determinar la proporcionalidad entre la concentración del principio activo y su respuesta, demostrando la capacidad del método para obtener resultados lineales.

Al aplicar el método de los mínimos cuadrados a los resultados obtenidos, se obtuvo la recta de la regresión lineal y la ecuación de la regresión lineal (área vs concentración), en las Figuras del 1 al 6 se expresa las siguientes ecuaciones respectivamente: Fenilefrina clorhidrato, $y = 8392.583x + 8.015$ ecuación de la recta para la linealidad del sistema, $y = 8701.632x + 3.033$ ecuación de la recta para la linealidad del método, guaifenesina $y = 9621.382x + 298.251$ ecuación de la recta para la linealidad del sistema $y = 9840.858x + 244.822$ ecuación de la recta para la linealidad del método y dextrometorfano bromhidrato $y = 8352.333x + 80.863$ ecuación de la recta para la linealidad del sistema $y = 8566.039x - 4.461$ ecuación de la recta para la linealidad del método.

Según Aguilar, Zoraya^{7, 8}, la exactitud se expresa como porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito. La recuperación separada depende de la matriz de la muestra, del procedimiento de la preparación de la muestra y de la concentración del analito en la misma. En el Anexo 15, se expresa el porcentaje de recuperación a diferentes concentraciones donde el resultado que se obtuvo fue satisfactoriamente con un porcentaje de recuperación global = 99.80% para la fenilefrina clorhidrato, 99.56% para la guaifenesina y 99.78% para el dextrometorfano bromhidrato, los cuales se encuentran dentro de las especificaciones establecidas ya que para este parámetro se estableció un límite de aceptación entre 98-102%.^{9, 10}

CONCLUSIONES

1. Se validó la técnica analítica por Cromatografía Líquida de Alta performance, (HPLC) para la determinación de contenido de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina en jarabe documentando los resultados obtenidos y demostrando que la técnica analítica es confiable por cumplir con los parámetros de Selectividad, Linealidad del sistema, Linealidad del método, Precisión, Exactitud y rango.

1. La prueba de aptitud del sistema para la técnica analítica propuesta fue reproducible en tiempo de retención y áreas.
2. La técnica analítica propuesta demostró ser exacto debido a que no hay diferencia significativa entre la recuperación media y el 100%
3. La técnica analítica es preciso, ya que el grado de concordancia nos permite obtener resultados repetitivos y reproducibles.
4. La técnica analítica demostró ser lineal, porque se determinó la relación entre la concentración vs áreas siendo estos proporcionales para determinar la regresión lineal en el cual indica un alto grado de correlación.
5. La técnica analítica fue robusta porque no se halló diferencias significativas con los resultados obtenidos encontrándose dentro del rango establecido trabajando a las condiciones cromatografías establecidas.

- procesos de limpieza. Rev. Col. Quím. Farm. 2003; 32 (2) 103-110.
9. USP 37. The United States Pharmacopeial Convention 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852 Estados Unidos de América; 2014
10. Palomino E. validación de procesos de manufactura y métodos de análisis de productos farmacéuticos: Lima; 2008.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Velasteguí J. Validación del método analítico de valoración de amoxicilina en polvo para suspensión oral producido por Betapharma S.A. mediante HPLC [tesis]. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2011.
2. Dalmau R, Suñé J, Cemeli J. Control de calidad en la industria Farmaceutica: Concepto de validación, Industria farmacéutica. 3a ed. España; 1999.
3. Skoog D, Leary L. Análisis instrumental. 4a ed. Madrid: Mc Graw-Hill Interamericana; 2004.
4. ICH Harmonized Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 4ta Edi. 2005.
5. Protocolo de Validación de Métodos analíticos para la Cuantificación de Fármacos [Sitio en internet] [Acceso 8 de noviembre del 2013]. Disponible en: <http://www.sld.cu>.
6. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). Validación de Métodos Analíticos. Barcelona: Graficas Gispert S.A.; 2001.
7. Aguilar G, Alcántara A, Charvel, A, et al. Validación de métodos analíticos. CESA: México; 2002.
8. Zoraya C, Quiroga F, Rojas J, Hernández H. Validación de una metodología analítica para la determinación de acetaminofén en