



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Desarrollo y validación de un método HPLC para la
determinación simultánea de paracetamol, ácido acetilsalicílico
y cafeína en productos farmacéuticos**

Autor: Adrián de la Fuente Ballesteros

Tutor: Marisol Vega Alegre

Julio 2019

AGRADECIMIENTOS

El trabajo que se expone a continuación ha sido realizado por el alumno del Grado en Química de la Universidad de Valladolid ADRIAN DE LA FUENTE BALLESTEROS, en el departamento de Química Analítica.

En primer lugar, quisiera expresar mi agradecimiento a MARISOL VEGA ALEGRE, tutora de este proyecto, por su apoyo incondicional en todo momento y por compartir conmigo sus conocimientos.

Del mismo modo, también me gustaría mencionar a los profesionales ROSARIO GÓMEZ y FRANCISCO DE LA ROSA por facilitarme el material de laboratorio y prestarme ayuda con los equipos.

RESUMEN

Desarrollo y validación de un método HPLC para la determinación simultánea de paracetamol, ácido acetilsalicílico y cafeína en productos farmacéuticos

A. de la Fuente Ballesteros¹, M. Vega Alegre^{1,2}

¹Departamento de Química Analítica, Universidad de Valladolid, Campus Miguel Delibes, Paseo de Belén 7, 47011 Valladolid. ²Instituto de Procesos Sostenibles, Universidad de Valladolid, Dr. Mergelina s/n, 47011 Valladolid. E-mail: adriandelafuenteballesteros@gmail.com

Palabras clave: analgésicos, validación, incertidumbre, RP-HPLC, optimización, diseño de experimentos, paracetamol, ácido acetilsalicílico, cafeína.

Los métodos usados en los análisis farmacéuticos deben ser validados para demostrar que son lo suficientemente exactos, específicos, sensibles y precisos para cumplir con los requisitos reglamentarios de la industria farmacéutica, garantizando así la seguridad y la calidad de los productos. La validación es una forma sistemática de evaluar que el procedimiento analítico es adecuado para el propósito previsto, que produce resultados confiables y precisos y cumple con los requisitos de los organismos reguladores.

El ácido acetilsalicílico (AAS) y el paracetamol (PCM) se utilizan como agentes analgésicos y antipiréticos y aparecen generalmente asociados con la cafeína (CFN). Estos compuestos pueden determinarse simultáneamente en medicamentos y en otras formulaciones utilizando la técnica RP-HPLC-UV-Vis. Las mediciones se realizaron con un cromatógrafo de líquidos Agilent Technologies serie 1200 equipado con una columna RP C₁₈ y un detector UV-Vis de longitud de onda variable.

Antes de la validación del método, las condiciones cromatográficas se optimizaron utilizando un diseño experimental de Taguchi para identificar los factores más significativos y sus niveles. Se seleccionaron seis factores a tres niveles (composición de metanol, acetonitrilo y tampón de fosfato 0,01 M en la fase móvil, pH, velocidad de flujo y longitud de onda) y un factor a dos niveles (temperatura de columna) para elaborar un diseño L₁₈(2¹×3⁷) de matriz ortogonal. La sacarosa se utilizó como factor de ruido para simular el efecto del excipiente con el fin de aumentar la robustez del método analítico. El análisis de varianza de las áreas de los picos para los tres compuestos indicó que el factor que más influyó fue la longitud de onda, sin embargo la composición y el pH de la

fase móvil fueron los factores que más influyeron en la resolución de los picos. La sacarosa no afectó ni a las áreas de los picos ni a los tiempos de retención. Las condiciones de RP-HPLC optimizadas y posteriormente utilizadas en la realización de experimentos fueron: temperatura, 25 °C; composición de la fase móvil MeOH: Acetonitrilo: Tampón fosfato, 30: 5: 25; pH, 2,7; velocidad de flujo, 1 mL·min⁻¹ y longitud de onda, 230, 246 y 273 nm para AAS, PCM y CFN, respectivamente.

Los parámetros de validación estimados han sido: exactitud, precisión, selectividad, robustez, límite de detección y límite de cuantificación, linealidad e intervalo lineal. La veracidad se evaluó para AAS y PCM mediante la participación en una prueba de aptitud para estudiantes de Química Analítica. Todos los parámetros de validación cumplieron los objetivos previamente especificados. La incertidumbre de medida se evaluó a partir de los resultados de la validación. La incertidumbre obtenida superó ligeramente el objetivo propuesto.

El método RP-HPLC optimizado es simple, rápido, sensible y preciso y, por lo tanto, adecuado para el análisis rutinario del ácido acetilsalicílico, paracetamol y cafeína en analgésicos. Este se aplicó a la determinación de estos analitos en formulaciones comerciales vendidas en España.

ABSTRACT

Development and validation of a HPLC method for the simultaneous determination of paracetamol, acetylsalicylic acid and caffeine in analgesics

A. de la Fuente Ballesteros¹, M. Vega Alegre^{1,2}

¹Department of Analytical Chemistry, University of Valladolid, Campus Miguel Delibes, Paseo de Belén 7, 47011 Valladolid. ²Institute of Sustainable Processes, University of Valladolid, Dr. Mergelina s/n, 47011 Valladolid. E-mail: adriandelafuenteballesteros@gmail.com

Key words: analgesics, validation, uncertainty, RP-HPLC, optimization, design of experiments, paracetamol, acetylsalicylic acid, caffeine.

Methods used in pharmaceutical analysis must be validated to demonstrate that they are sufficiently accurate, specific, sensitive and precise to conform to the regulatory requirements of the pharmaceutical industry, thus ensuring safety and quality of pharmaceutical products. Validation is a formal and systematic way to assess that the analytical procedure is suitable for its intended purpose, produces reliable and accurate results and also fulfils the requirements of regulatory bodies.

Acetylsalicylic acid (AAS) and paracetamol (PCM) are used as analgesic and antipyretic agents. They may appear associated with caffeine (CFN) in many pharmaceutical formulations. These compounds can be simultaneously determined in tablets and other formulations using RP-HPLC with UV/visible detection. Measurements were made with an Agilent Technologies series 1200 HPLC equipped with a RP C₁₈ column and a variable wavelength UV/visible detector.

Prior to method validation, the chromatographic conditions were optimized using a Taguchi experimental design to identify the most influencing factors and their optimal levels. Six factors at three levels (composition of methanol, acetonitrile and 0.01 M phosphate buffer in the mobile phase, pH, flow rate and detection wavelength) and one factor at two levels (column temperature) were assigned to the columns of a L₁₈(2¹×3⁷) orthogonal array. Saccharose was used as a noise factor to simulate the effect of the excipient in order to increase robustness of the analytical method. ANOVA of the peak areas for the three compounds indicated that the most influencing factor was wavelength, but the composition and pH of the mobile phase was the most influencing factors on peak resolution. Saccharose didn't affect either the peak areas or the retention times. The

optimized HPLC conditions used in further experiments were: temperature, 25 °C; composition of the mobile phase MeOH:AcN:Phosphate buffer, 30:5:25; pH, 2.7; flow rate, 1 mL·min⁻¹ and wavelength, 230, 246 and 273 nm for AAS, PCM y CFN respectively.

The validation parameters to be estimated include accuracy, precision, selectivity, limit of detection, limit of quantitation, linearity, linear range and robustness. Trueness was evaluated for AAS and PCM through participation in a proficiency test for students of Analytical Chemistry. Validation parameters satisfied the quality objectives previously established. The measurement uncertainty was evaluated from the validation results. Expanded uncertainty was slightly higher than the proposed value.

The optimized RP-HPLC method is simple, rapid, sensitive and accurate and therefore suitable for the routine analysis of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine in analgesic formulations. It was applied to the determination of these drugs in commercial formulations sold in Spain.

INDICE

1.- INTRODUCCION TEÓRICA	1
1.1.- Parámetros técnicos de validación.	2
1.2.- Incertidumbre.	4
1.3.- Determinación de analgésicos por RP-HPLC-UV-Vis.	6
2.- OBJETIVOS.....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1. Evaluación de la incertidumbre de medida.....	11
3.1.1.- Balanzas.....	11
3.1.2.- Material volumétrico.	11
3.2. Selección de las longitudes de onda de máxima absorción de los analitos.	12
3.3. Determinación por RP-HPLC-UV-Vis.....	12
3.4.-Optimización de la determinación cromatográfica.	13
3.4.1.-Análisis de datos, ANOVA.	15
3.4.2.- Participación en un ejercicio interlaboratorio.	16
3.5.- Aplicación del método a muestras reales.	16
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
4.1.-Validación de equipos de medida.....	19
4.1.1.- Balanzas.....	19
4.1.2.- Material volumétrico.	20
4.2.- Validación del método.....	27
4.3.- Evaluación de la incertidumbre de medida.	36
4.4.- Aplicación del método a muestras reales.	37
5.- CONCLUSIONES	41
6.- REFERENCIAS.	43
7.- MATERIAL COMPLEMENTARIO.....	45

ABREVIATURAS

PCM	Paracetamol
AAS	Ácido acetilsalicílico
CFN	Cafeína
Ac	Acetonitrilo
T	Temperatura
Me	Metanol
B	Tampón fosfato
F	Velocidad de flujo
L	Longitud de onda
R	Réplica
N1	Nivel de ruido 1 (sin sacarosa)
N2	Nivel de ruido 2 (con sacarosa)
RP-HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa
UA	Unidades de absorbancia
u	Incertidumbre
GUM	Guía para la expresión de la incertidumbre de medida
ANOVA	Análisis de varianza
MR	Material de referencia
DER	Desviación estándar relativa
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
K'	Factor de capacidad
R _s	Resolución
α	Selectividad
t _r	Tiempo de retención
H	Altura equivalente del plato teórico
N	Número de platos teóricos
W	Anchura de pico
L	Longitud de la columna

1.- INTRODUCCION TEÓRICA

La validación de métodos de ensayo ha sido siempre una necesidad de los laboratorios analíticos ya que es demandada en normas relacionadas con la gestión de la calidad, particularmente en la norma ISO/IEC 17025:2017. En dicha norma, se define validación como *la confirmación mediante examen y aportación de evidencias objetivas que demuestren el cumplimiento de ciertos requisitos para un uso o aplicación prevista*.

El proceso de validación es similar al ciclo de Deming, quien formula una estrategia de mejora de la calidad en cuatro pasos: planificar, hacer, verificar y actuar (Tague, 2005). Si este aspecto lo aplicamos al área de la Química Analítica, encontramos que la validación puede desglosarse en los siguientes pasos:

- 1) Identificar el método de análisis, se efectuará en función de las exigencias y material disponible, teniendo en cuenta que deberá adjuntarse una fase de certificación de los instrumentos de medida empleados.
- 2) Especificar las características del método, elaborando un protocolo de validación.
- 3) Determinar las características del método mediante la realización de experimentos y calcular la incertidumbre de medida.
- 4) Comparar los resultados con los requisitos establecidos mediante técnicas estadísticas.
- 5) Expresar el resultado del proceso. Si los resultados cumplen los requisitos se declara que el método está validado para su uso generándose un informe. (Lazos Martínez y Hernández Gutiérrez, 2004).

El fin de la industria farmacéutica ha sido desde siempre producir medicamentos seguros para el consumidor. El avance científico y tecnológico ha permitido introducir mejoras que hacen que este sector tenga que adaptarse a una gran diversidad de cambios. La mayor parte de los productos elaborados están relacionados con el ámbito vital de forma que el margen de error tiene que ser mínimo. Por ello, los medicamentos son sometidos a un exhaustivo control a lo largo de su vida que es lo que se conoce como Buenas Prácticas de Fabricación; es aquí donde surge el concepto validación. Por consiguiente, la validación de los métodos de control de calidad en la industria farmacéutica es esencial por la necesidad de obtener resultados fiables y reproducibles que doten al proceso de fabricación de un alto grado de seguridad (certeza).

Sostener una calidad constante en el producto generado reducirá costes en la industria y mejorará la satisfacción del cliente.

El proceso de validación de un método de ensayo implica estimar una serie de parámetros de funcionamiento del método que ayudan a una correcta evaluación de la calidad de los resultados de los laboratorios. Estos parámetros se obtienen del desarrollo del método, de la participación en ejercicios interlaboratorio o protocolos internos y se clasifican en dos grupos: parámetros de gestión y técnicos. (Díaz-Guerra et al., 2000; Eurachem/Citac, 2012).

Tabla 1. Parámetros de validación de los métodos de ensayo.

Parámetros de gestión	Parámetros económicos	Inversión inicial Costes de puesta a punto del método Costes en función del nº de muestras/día Costes en formación Sueldo del personal cualificado Costes generales de laboratorio...
	Parámetros operativos o productivos	Rapidez Grado de automatización Factores humanos: cualificación del personal, seguridad e higiene Necesidades energéticas y de espacio...
Parámetros técnicos	Parámetros técnicos de prevalidación	Robustez Representatividad
	Parámetros técnicos de validación	Selectividad/Especificidad Intervalo de trabajo, intervalo lineal y linealidad Sensibilidad Límite de detección y cuantificación Exactitud: veracidad (sesgo) y precisión (repetibilidad, reproducibilidad) Incertidumbre Recuperación Intervalo de medida / Límite superior

1.1.- Parámetros técnicos de validación.

En este apartado se comentan brevemente los parámetros técnicos de validación. (BIMP, 2012).

- Robustez. Propiedad de un método analítico que describe su capacidad para permanecer inalterado ante variaciones de las condiciones operativas y normalizadas e indica la fiabilidad de este durante su aplicación. (ICH, 2018)
- Representatividad. Coherencia o concordancia entre una medida o resultado respecto a las muestras recibidas en el laboratorio. (Cámara et al., 2002).
- Selectividad / especificidad. Capacidad de un método para detectar analitos diferentes en una misma matriz. Generalmente los términos selectividad y especificidad se usan de manera indistinta. Aunque rigurosamente la especificidad es la propiedad de un sistema de medida, por la que proporciona valores medidos independientes de otros mensurandos o magnitudes existentes.
- Intervalo de trabajo, intervalo lineal y linealidad. Es el tramo o intervalo de concentraciones donde la respuesta del método es proporcional a la concentración de analito. En dicho intervalo, la relación respuesta/concentración es constante. Depende de los coeficientes de determinación y coeficientes residuales.
- Sensibilidad. Capacidad de un método para discriminar entre concentraciones similares de analito. De forma matemática se puede definir como el cociente entre la variación de la señal por unidad de concentración. Suele coincidir con la pendiente de la línea de calibrado.
- Límite de detección y cuantificación.
El **límite de detección** (LOD) es la menor cantidad de analito que puede ser detectada con precisión y exactitud, pero no necesariamente cuantificada, de forma que el detector emita una señal perfectamente diferenciable del ruido de fondo. También se define como el valor medido con una probabilidad β de declarar erróneamente la ausencia de un constituyente en un material, y una probabilidad α de declarar erróneamente su presencia. La IUPAC recomienda α y β iguales a 0,05.
El **límite de cuantificación** (LOQ) es la menor concentración de un analito que puede ser cuantificada con un nivel aceptable de veracidad y precisión.
Un método es tanto más sensible cuanto menores son los límites de detección y de cuantificación. Estos límites se pueden calcular en base a las líneas de calibrado, en base a datos experimentales o en base a la relación señal/ruido.
- Exactitud. El objetivo de una medida es encontrar el valor verdadero (μ_0). Sin embargo, dicho valor es ideal ya que solo puede obtenerse cuando todas las fuentes de error son eliminadas y el número de observaciones es infinito. La exactitud se

define como el grado de concordancia entre el valor medido experimentalmente (x_i) y el valor verdadero, aceptado o de referencia, siendo la diferencia el error de la medida ($e_i = x_i - \mu_0$). Si se realizan n medidas de la magnitud en idénticas condiciones se obtendrá un valor promedio (\bar{x}). De este modo el error se puede descomponer en dos términos:

$$e_i = x_i - \mu_0 = (x_i - \bar{x}_i) + (\bar{x}_i - \mu) \text{ Ecuación. 1}$$

De este modo se verifica que las causas por las que el resultado analítico difiere del valor verdadero es la existencia de errores aleatorios (primer sumando) y sistemáticos (segundo sumando). Puesto que el error sistemático causa sesgo en el resultado y los errores aleatorios producen imprecisión, la exactitud hace referencia a una combinación de veracidad y precisión.

- **Veracidad.** Es la concordancia entre el valor medio de una serie de medidas y el valor aceptado como referencia. Se relaciona con la ausencia de sesgo (bias), esto es, con la ausencia de error sistemático.
- **Precisión.** Se define como la proximidad de los valores medidos en una colección de observaciones replicadas, e informa de la dispersión de los valores individuales alrededor del valor medio. La precisión se estima mediante la desviación típica o la varianza. Dependiendo de las condiciones experimentales hay varios tipos de precisión:

Repetibilidad. Proximidad o concordancia de los n resultados individuales obtenidos por el mismo método analítico sobre la misma muestra, en idénticas condiciones (material, reactivos, analista...) y en un corto intervalo de tiempo.

Reproducibilidad. Proximidad o concordancia de los n resultados obtenidos con el mismo método y muestra, bajo condiciones experimentales diferentes (diferente laboratorio, diferente instrumento, materiales, reactivos, analista...) y en diferentes momentos.

Dependiendo de las condiciones que se modifican se puede hablar también de precisión intermedia.

1.2.- Incertidumbre.

La evaluación de la incertidumbre de medida de los resultados de un método de ensayo es un requisito fundamental del proceso de validación. El Vocabulario Internacional de

Metrología, VIM, define la incertidumbre de medida como *la estimación que caracteriza el intervalo de valores en el que se sitúa, con una alta probabilidad, el valor verdadero de la magnitud de medida.*

Las incertidumbres derivadas de efectos aleatorios y sistemáticos se tratan de la misma manera, es decir, se expresan como desviaciones típicas de distribuciones de probabilidad asociadas y se combinan como varianzas. Las incertidumbres típicas de las fuentes de error se clasifican en dos tipos:

- **Incertidumbre tipo A:** es debida a la repetibilidad de los resultados de las mediciones del objeto de prueba, es una incertidumbre estadística y se calcula mediante la desviación estándar.
- **Incertidumbre de tipo B:** se evalúa a partir de información externa disponible sobre la variabilidad de la magnitud: conocimientos y experiencia sobre comportamiento y propiedades de materiales e instrumentos, datos obtenidos de mediciones anteriores, especificaciones de los fabricantes, datos obtenidos de calibraciones y otros certificados, catálogos, manuales...

Las distribuciones más habituales de incertidumbre de tipo B son la normal o gaussiana, rectangular y triangular. La Figura 1 muestra cómo se convierte la dispersión de estas distribuciones en incertidumbre típica de la magnitud x .

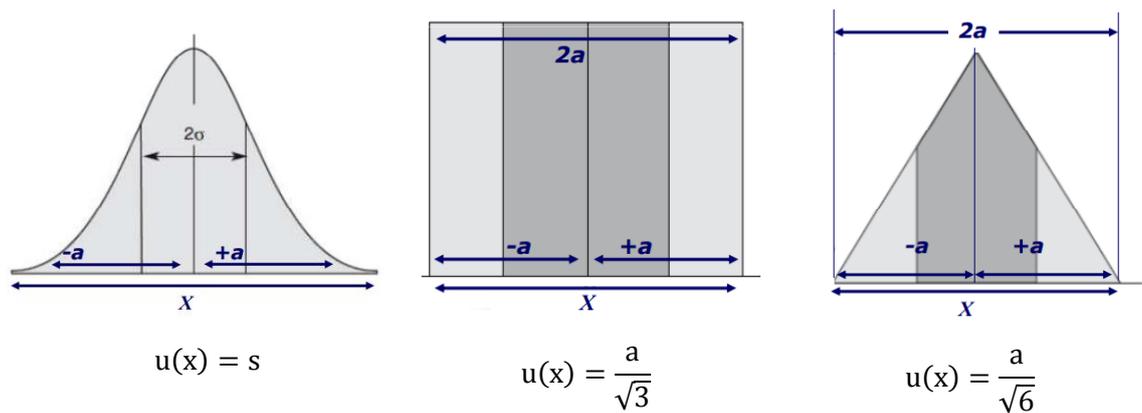


Figura 1. Incertidumbre típica de las distribuciones de probabilidad más frecuentes.

En aquellos casos en los que no se conozca la forma de la distribución, lo más recomendado es suponer una distribución de tipo rectangular para evitar que sea subestimada. Tras identificar cuáles son las fuentes de incertidumbre de un resultado, estas se cuantifican como incertidumbres típicas. A continuación, se combinan según la

ley de propagación de errores para obtener la incertidumbre combinada y finalmente se calcula la incertidumbre expandida multiplicando la combinada por un factor de cobertura $K=2$, que se corresponde con un nivel de confianza próximo al 95%.

Distintas organizaciones se han fundamentado en la *Guía para la expresión de la incertidumbre de medida*, GUM (JCGM, 2008), para proponer normas y procedimientos para la evaluación de la incertidumbre. De este modo, surgen distintos modelos como se muestran en la Figura 2. (Pérez., 2012; Hernández., 2013).

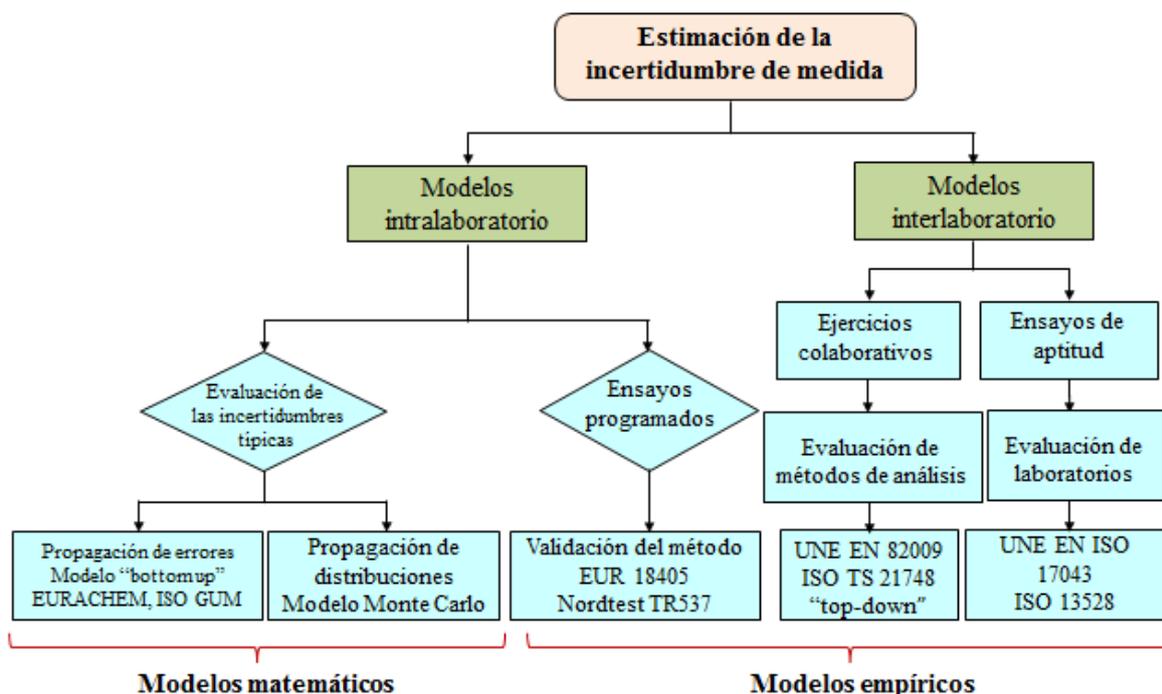


Figura 2. Modelos de estimación de la incertidumbre de medida.

1.3.- Determinación de analgésicos por RP-HPLC-UV-Vis.

La determinación simultánea de componentes presentes en los medicamentos suele ir precedida por una separación cromatográfica. La detección de componentes activos en productos farmacéuticos se lleva a cabo habitualmente mediante espectrofotometría UV-Vis. La falta de selectividad de la detección espectrofotométrica es compensada por la elevada capacidad de separación de la cromatografía de líquidos en fase inversa.

En este trabajo se pretende optimizar y validar un método cromatográfico para la determinación simultánea de paracetamol (PCM), cafeína (CFN) y ácido acetilsalicílico (AAS) en analgésicos comercializados en España.

La selección de los factores a optimizar para tener una separación adecuada y una sensibilidad máxima requiere un conocimiento previo de las características físico-químicas de los analitos, las cuales se resumen en las Tablas 2 (AAS), 3 (PCM) y 4 (CFN) (*PubChem*).

Tabla 2. Características del AAS

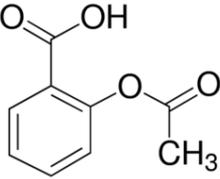
Nombre	Ácido acetilsalicílico, aspirina
Fórmula	
Peso molecular	180,16 g·mol ⁻¹
Propiedades físicoquímicas	<p>pK_a (25°C) = 3,5. Estabilidad para un pH =2-3. En solución acuosa se hidroliza en una semana a 25°C a pH=5-7. Solubilidad en agua (25°C) = 3 mg·mL⁻¹ Se presenta en forma de cristales blancos inodoros o polvo cristalino con un sabor amargo. En el aire se hidroliza gradualmente y adquiere olor a ácido acético.</p>
Efectos	<p>Tratamiento de dolor leve-moderado. Antiinflamatorio y antipirético. Prevención de trombosis.</p>

Tabla 3. Características del PCM

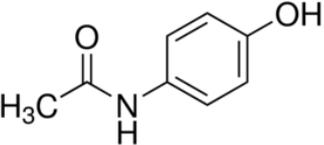
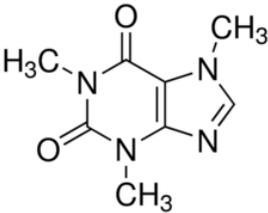
Nombre	Acetaminofenol, paracetamol
Fórmula	
Peso molecular	151,16 g·mol ⁻¹
Propiedades físicoquímicas	<p>pK_a = 9,38 Solubilidad en agua (20°C) = 1,4 g /100 mL. Soluble en agua hirviendo pero no en agua fría y en muchos disolventes orgánicos. Se presenta en forma de sólido cristalino blanco inodoro. Sabor amargo.</p>
Efectos	<p>Analgésico en el tratamiento del dolor leve-moderado. Se combina con otros agentes para el alivio a corto plazo de leves dolores y otros síntomas como estornudos o congestión.</p>

Tabla 4. Características de la CFN

Nombre	1,3,7-trimetilxantina, cafeína.
Fórmula	
Peso molecular	194,19 g·mol ⁻¹
Propiedades fisicoquímicas	<p>pK_a (25°C) = 14,0 pH =6,9 (1% solución) Solubilidad en agua = 15 mg·mL⁻¹ Se presenta en forma de polvo blanco inodoro o agujas blancas brillantes, generalmente fundidas entre sí.</p>
Efectos	<p>Estimulante del sistema nervioso. Afecta a los niveles celulares de calcio. Anula los efectos del ciclo celular de varios químicos Inhibe los mecanismos de reparación del ADN.</p>

2.- OBJETIVOS

Cualquier laboratorio que quiera demostrar su capacidad técnica para llevar a cabo métodos de ensayo debe validar dichos procedimientos aplicando la norma ISO/IEC 17025:2017. La norma es aplicable a laboratorios de ensayo y calibración sea cual sea su tamaño.

El objetivo de ese Trabajo Fin de Grado es la optimización y validación de un método analítico y la estimación de la incertidumbre de medida, para la determinación simultánea de ácido acetilsalicílico, cafeína y paracetamol en productos farmacéuticos mediante RP-HPLC-UV-Vis.

La selección del método se ha basado en criterios como la disponibilidad de material de laboratorio y la posibilidad de participación en un ensayo de aptitud (ejercicio de intercomparación de laboratorios), organizado por el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Barcelona, que permitirá evaluar la veracidad de los resultados obtenidos.

El plan de trabajo seguido ha sido:

1. Revisión bibliográfica tanto de las técnicas y condiciones de separación de los analitos como de las matrices donde se encuentran en forma de mezcla binaria o ternaria.
2. Calibración y estimación de la incertidumbre del material de laboratorio.
3. Ensayos previos espectrofotométricos y cromatográficos para la elección de factores y niveles a optimizar.
4. Optimización del procedimiento mediante un diseño de experimentos factorial fraccional.
5. Evaluación de los parámetros técnicos de validación.
6. Estimación de la incertidumbre de medida del método.

La Tabla 5 muestra los parámetros técnicos de validación a evaluar, la metodología a seguir en cada caso y los objetivos de validación perseguidos. Los objetivos de validación se han seleccionado atendiendo a la criticidad de los productos a analizar, pero teniendo en cuenta que las condiciones ambientales en las que se ha desarrollado el trabajo no son tan controladas como las que se tendrían en un laboratorio farmacéutico.

Tabla 5. Características técnicas de validación, metodología empleada en su estimación y objetivos de calidad perseguidos.

Parámetro	Requisito	Estimación
Robustez	Robusto	Revisión bibliográfica junto con diseño de experimentos
Sensibilidad	Maximizar	Pendiente de la línea de calibrado obtenida en condiciones optimizadas
Límite de detección	< 0,5 ppm	A partir de líneas de calibrado
Límite de cuantificación	< 1,5 ppm	
Precisión (reproducibilidad)	%DER ≤ 15 %	$\%DER = \frac{S_R}{\bar{x}} \cdot 100$
Veracidad (sesgo)	%Er ≤ 10 %	Mediante la participación en un ensayo de aptitud
Especificidad/selectividad	Selectivo	Revisión bibliográfica
Linealidad Intervalo lineal	$R^2 > 0,99$ 0,25 – 50 ppm	Se deben de cumplir las condiciones de precisión, veracidad e incertidumbre impuestas como objetivos
Incertidumbre	$I \leq 20\%$	Combinación de errores aleatorios y sistemáticos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Evaluación de la incertidumbre de medida.

3.1.1.- Balanzas.

La calibración se aplicó a una balanza analítica de precisión monoplato Tipo 1601 AMP8-1 (340450) Sartorius.

Las fuentes de error que contribuyen a la incertidumbre de la balanza son: histéresis, excentricidad, tara, repetibilidad y la propia de las masas empleadas.

- **Histéresis.** Debida al rozamiento o fricciones entre las piezas móviles de la balanza. Se calcula como la diferencia entre las lecturas inicial M_{inicial} y final M_{final} , después de una medida, M^* (Clark, 2000); Croakin, 2010).
- **Excentricidad.** Debida a la variación por pesar en distintos puntos del platillo de la balanza. Se estima como la diferencia entre el valor medio de dos mediciones en el punto central, \bar{M}_{1-1} , y el máximo valor obtenido de los puntos más alejados del centro del platillo, $M_{\text{más alejado}}$ a mitad de la máxima capacidad de la balanza (CEM ME-005; González et al., 2007; Reichmuth, 2001; Reichmuth et al., 2004).
- **Tara.** Consiste en comprobar que la balanza recupera el valor de la tara después de una medida. Para ello se tara la balanza al 50% de su capacidad máxima, M_{tara} y se realizan pesadas de masas crecientes. Se evalúa a partir de la diferencia entre el valor leído, $M_{\text{leída}}$ y el valor nominal tarado, $M_{\text{nominal tarado}}$, siendo este último la diferencia entre el valor real, M_{real} menos el valor de la tara M_{tara} . (Hernández Revilla, 2013).
- **Repetibilidad.** Se determina el comportamiento de la balanza al medir de forma repetitiva una masa. Se evalúa a partir de la desviación típica o estándar (s) de una serie de medidas (N).

3.1.2.- Material volumétrico.

Toda la experimentación se ha llevado a cabo con material volumétrico de clase A. Los matraces aforados, de 10, 25 y 50 mL, y las pipetas usadas, de 1, 2, 5 y 10 mL, se han calibrado y se ha estimado su incertidumbre.

El método de calibración empleado fue el gravimétrico basado en calcular el valor de masa de un líquido, cuya densidad es conocida, contenido en el material.

Se realizan medidas de repetibilidad por vertido. Homogeneizamos la pipeta con agua desionizada y tomamos un vaso de precipitados limpio y seco el cual taramos. Añadimos el volumen de la pipeta y anotamos la masa. Se repite la medida 10 veces para cada volumen seleccionado. En el caso de los matraces aforados, se pesan inicialmente secos, y luego se llenan hasta el enrase repetidas veces (N=10), anotando la masa en cada ocasión. La masa de agua se relaciona con el volumen a través de la densidad a la temperatura del laboratorio.

Conocidas las fuentes de error que contribuyen a la incertidumbre del material volumétrico (repetibilidad, temperatura y calibración), se estima la incertidumbre.

3.2. Selección de las longitudes de onda de máxima absorción de los analitos.

Las longitudes de onda a las que absorben cada uno de los analitos de estudio se determinaron registrando el espectro de absorción molecular de disoluciones de los analitos puros, de concentración 5 ppm en agua-metanol, con un espectrofotómetro de absorción molecular UV-Vis (Hewlett Packard modelo 8453) con detector de red de diodos (*diode array*).

3.3. Determinación por RP-HPLC-UV-Vis.

Se preparó una disolución stock multipatrón conteniendo 1000 ppm de cada uno de los analitos. Para ello se pesaron las cantidades necesarias de los compuestos puros (50 mg) y se disolvieron con 5 mL de metanol, enrasando finalmente a 50 mL con agua desionizada. La disolución se sumergió en el baño de ultrasonidos durante 20 min para asegurar la completa solubilización de los compuestos.

Por diluciones sucesivas de la disolución stock se prepararon por pesada patrones de calibración de concentraciones comprendidas entre 0,25 y 40 ppm que fueron medidas por duplicado, registrando en cada caso los tiempos de retención y las áreas de pico.

La determinación se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos Agilent Technologies serie 1200 equipado con bomba cuaternaria (G1311A), termostato de columna (G1316A), detector UV-Vis de longitud de onda variable (G1314B) y desgasificador, empleando una columna de fase inversa Scharlau KromaPhase C₁₈.

Previamente se realizaron ensayos con el objetivo de evaluar el efecto en la separación de los analitos y en la sensibilidad de parámetros como: longitud de onda y composición y

pH de la fase móvil. Los valores de pH a los que se trabajó fueron 2,7 y 7, y los componentes de la fase móvil ensayados fueron metanol, acetonitrilo y tampón fosfato; todos ellos de grado HPLC. El tampón fosfato para cada pH fue elaborado mezclando en la proporción adecuada cada uno de los componentes del sistema ácido-base del fosfórico, a partir de disoluciones patrón de concentración 0,5 M. El valor final del pH se verificó con el pH-metro. Todos los ensayos previos se realizaron con patrones puros o conjuntos conteniendo 8 ppm de los analitos.

En los cromatogramas obtenidos se analizaron la forma y tamaño de los picos, la separación y los tiempos de retención.

3.4.-Optimización de la determinación cromatográfica.

Con objeto de optimizar las condiciones experimentales se recurrió a un diseño de experimentos factorial. En primer lugar se identifican cuáles son los factores experimentales que pueden afectar al resultado y se seleccionan los niveles de dichos factores entre los que se sospecha que está el óptimo. Los factores a optimizar y los niveles seleccionados a partir de los ensayos previos se encuentran recogidos en la Tabla 6.

Tabla 6. Factores ensayados y sus niveles.

Factor	Unidades	Nivel -1	Nivel 0	Nivel +1
Temperatura	°C	25	-	35
MeOH	%	30	40	50
Acetonitrilo	%	0	5	10
Buffer	%	25	40	35
pH	uds. pH	2,7	5	7
Velocidad de flujo	mL·min ⁻¹	0,8	1	1,2
Longitud de onda	nm	230	246	273

La simbología de nivel, -1, 0, +1, hace referencia al valor más bajo, valor intermedio y valor más alto respectivamente para cada factor seleccionado.

Para ensayar todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores se requiere un número excesivo de experimentos. Con el fin de reducir la experimentación sin pérdida significativa de información se seleccionó un diseño factorial fraccional. El arreglo ortogonal de Taguchi L₁₈(2¹×3⁷) permite estudiar todos los factores y niveles seleccionados con solo 18 experimentos. La Tabla 7 muestra la combinación de niveles

de los factores a ensayar en cada uno de los experimentos definidos por este arreglo ortogonal.

Tabla 7. Matriz del diseño experimental.

Experimento	T	Me	Ac	B	pH	F	L
	°C	%	%	%	uds pH	mL·min ⁻¹	nm
1	25	30	0	25	2,7	0,8	230
2	25	30	5	40	5	1	246
3	25	30	10	35	7	1,2	273
4	25	40	0	25	5	1	273
5	25	40	5	40	7	1,2	230
6	25	40	10	35	2,7	0,8	246
7	25	50	0	40	2,7	1,2	246
8	25	50	5	35	5	0,8	273
9	25	50	10	25	7	1	230
10	35	30	0	35	7	1	246
11	35	30	5	25	2,7	1,2	273
12	35	30	10	40	5	0,8	230
13	35	40	0	40	7	0,8	273
14	35	40	5	35	2,7	1	230
15	35	40	10	25	5	1,2	246
16	35	50	0	35	5	1,2	230
17	35	50	5	25	7	0,8	246
18	35	50	10	40	2,7	1	273

Una ventaja adicional de los diseños de Taguchi es que permiten obtener una respuesta óptima robusta, insensible a la variación de factores no controlables (ruido). Para ello se introducen deliberadamente en la experimentación los factores de ruido. La composición variable del excipiente de los medicamentos puede ser considerada un factor de ruido no controlable que cause variabilidad en la respuesta cromatográfica. Como factor de ruido se ha elegido la sacarosa que, según la Guía Vademécum, es uno de los excipientes mayoritarios en analgésicos comerciales.

Se prepararon dos disoluciones conjuntas de 8 ppm de AAS, CFN y PCM; a una de ellas se le añadió 0,25 g de sacarosa. Tras enrasar con agua desionizada y homogeneizar, se inyectaron en el cromatógrafo variando los factores tal como establece el diseño elegido. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. La identificación de los picos cromatográficos se llevó a cabo por comparación de tiempos de retención inyectando disoluciones de los analitos puros.

3.4.1.-Análisis de datos, ANOVA.

Para analizar e interpretar los datos obtenidos se han empleado herramientas estadísticas que son fundamentales para la interpretación y visualización de datos en aquellos casos en los que existe una gran variedad y cantidad que deben ser relacionados.

Los cálculos y análisis estadísticos se han llevado a cabo con el software Microsoft Excel y Statgraphics.

El análisis de varianza es una técnica estadística que permite interpretar los resultados experimentales gracias al examen de diferentes tipos de efectos que operan simultáneamente. El objetivo es decidir qué tipo de efectos son significativos y estimar su contribución a la varianza total, asumiendo que las medias de dos o más poblaciones son iguales.

Para lograrlo, esta herramienta usa pruebas basadas en ratios de varianza para conocer si existen diferencias significativas entre varios grupos de observaciones, donde cada grupo sigue una distribución normal.

Se asume que la variación observada en la respuesta es debida al efecto de los factores estudiados, aunque también está presente cierto error aleatorio independiente que explica la variación residual. Dicho error aleatorio sigue una distribución normal con media cero y varianza constante.

Para aplicar este análisis de varianza se deben cumplir dos requisitos: la variable debe seguir una distribución normal (prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov) y las varianzas deben ser homogéneas dentro de los diferentes niveles de cada factor considerado.

El ANOVA permite identificar los factores estudiados que tienen un efecto significativo en la respuesta que se pretende optimizar.

A los factores significativos se les aplica finalmente la prueba de rangos múltiples de Duncan para conocer si las respuestas medias obtenidas a los diferentes niveles del factor difieren significativamente. La Ecuación 2 permite su cálculo a través del estadístico R.

$$R = r \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{n}} = r \cdot \sqrt{\frac{\sigma_{\text{residual}}^2}{n}} \quad \text{Ecuación. 2.}$$

donde r es el valor crítico tabulado para el nivel de significación empleado y los grados de libertad del residual, y n es el número de valores experimentales obtenidos a cada nivel del factor.

Las diferencias entre los niveles se comparan con el estadístico R . Si estas son mayores que el valor obtenido para R , entonces los dos niveles proporcionan una respuesta significativamente diferente, esto es, hay diferencias significativas entre los niveles.

Con toda esta información, las condiciones óptimas de separación fueron determinadas y a continuación se procedió a su confirmación inyectando disoluciones de patrones puros en las condiciones optimizadas.

3.4.2.- Participación en un ejercicio interlaboratorio.

El objetivo principal de este tipo de ejercicios es demostrar la calidad de los ensayos, permitiendo conocer la capacidad analítica del método a validar. Por otro lado, son de suma importancia y exigidos conforme a la norma ISO/IEC 17025:2017 en tanto que la evaluación de la muestra enviada por el organizador confirmará el grado del cumplimiento de una serie de requisitos establecidos por este mismo. En caso de no cumplirse, dicho ejercicio revelará la existencia de errores que tendrán que ser corregidos.

Para evaluar el sesgo del método se ha participado en un ejercicio interlaboratorio organizado por el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Barcelona, el cual envió cuatro materiales de referencia (MRs) de composición farmacéutica desconocida en paracetamol y ácido acetilsalicílico.

3.5.- Aplicación del método a muestras reales.

La selección de las muestras a las cuales se aplicó el método se basó en dos aspectos: la disponibilidad en farmacia de los medicamentos y que contuviesen al menos dos de los analitos estudiados. La Tabla 8 recoge los analgésicos más comunes que presentan los analitos de estudio en combinaciones binarias o ternarias.

De todos los medicamentos recogidos en la Tabla 8 se analizaron cinco: Desenfriol, Ilvico, Actron, Cafiaspirina y Frenadol Complex.

Tabla 8. Analitos contenidos en los medicamentos y sus usos.

Nombre	PCM	AAS	CFN	Usos
Actron	X	X	X	Dolores leves o moderados
Grippostad	X	-	X	Resfriado y gripe
Frenadol Complex	X	-	X	Gripes y catarros
Ilvico	X	-	X	Gripes y catarros
Desenfriol	-	X	X	Rinitis alérgica y resfriado
Cafiaspirina	-	X	X	Dolores leves o moderados
Dolviran	-	X	X	Dolores leves o moderados
Excedite	X	X	X	Dolor de cabeza agudo
Yendol	X	-	X	Gripes y catarros
Saridon	X	-	X	Dolores leves o moderados

El tratamiento de muestra al que fue sometido cada fármaco se realizó por triplicado y fue similar en todos los casos. Este se describe a continuación:

1. Pulverizar la muestra con la ayuda del mortero convenientemente.
2. Homogeneizar el polvo.
3. Pesar en balanza analítica una cantidad aproximada de 0,1 g.
4. Disolver en un matraz de 100 mL con 5 mL de MeOH y agua desionizada.
5. Sumergir en el ultrasonidos hasta disolución completa.
6. Filtrar la disolución resultante mediante un filtro de Nylon de 0,45µm.
7. Realizar la dilución correspondiente para que la concentración se sitúe en el intervalo de calibrado.

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.-Validación de equipos de medida.

La incertidumbre se estimó aplicando el método de propagación de errores. Una vez identificadas las fuentes se estimaron las incertidumbres individuales y finalmente se obtuvo la incertidumbre expandida multiplicando la incertidumbre combinada por un factor de cobertura ($K=2$). Para ello se aplicaron las ecuaciones que aparecen en las Tablas I y II del material complementario.

4.1.1.- Balanzas.

La Figura 3 muestra la variación de la incertidumbre expandida con la masa para masas nominales de 100, 50, 10, 1, 0,1 y 0,02 g. Se observa una relación potencial entre ambas magnitudes.

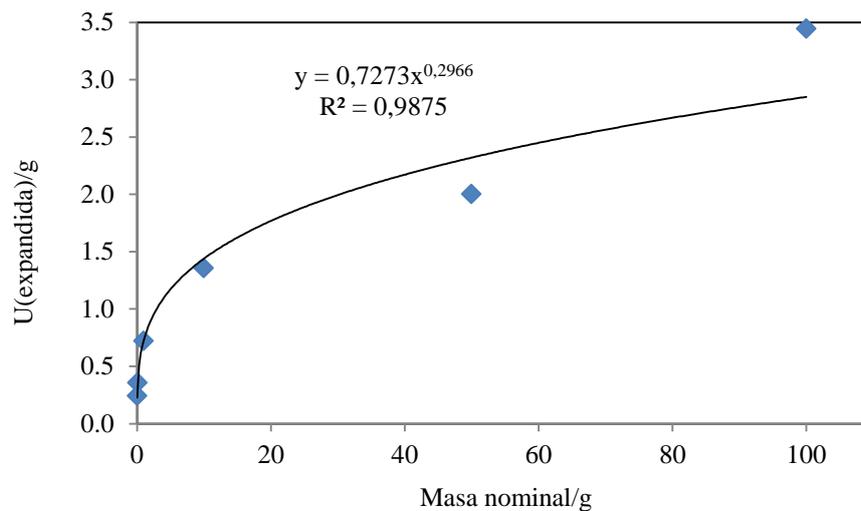


Figura 3. Representación de la incertidumbre expandida frente a la masa.

Para visualizar cuales son las contribuciones más significativas a la incertidumbre total, se construyó el gráfico que se muestra en la Figura 4.

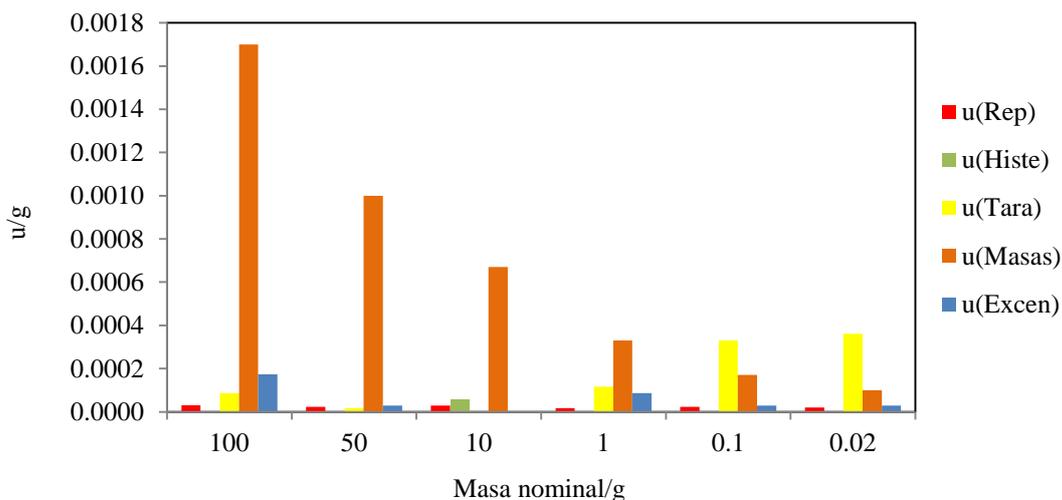


Figura 4. Contribuciones individuales a la incertidumbre total.

Las contribuciones de tara, repetibilidad o excentricidad tienen un reparto aleatorio, destacando entre ellas como más influyentes la debida a las masas patrón, la tara y la excentricidad. Sobre esta última se puede actuar realizando las medidas en el centro del plato. La incertidumbre debida a la histéresis es nula en todos los casos excepto para la masa de 10 g. En cuanto a la incertidumbre de las masas patrón es notorio como aumenta para masas altas y disminuye para masas pequeñas. Esto puede ser debido a que el juego de masas disponible no es de primera calidad.

4.1.2.- Material volumétrico.

La Figura 5 muestra los porcentajes de contribución de las fuentes de incertidumbre individuales. La contribución debida a la calibración del matraz es en general la más significativa.

La Figura 6 representa la variación de la incertidumbre expandida con el volumen nominal de pipetas (trazo azul) y matraces aforados (trazo rojo). En ambos casos se obtuvieron relaciones polinómicas. El aumento con el volumen de la pipeta es mucho más acusado que en el caso de los matraces aforados.

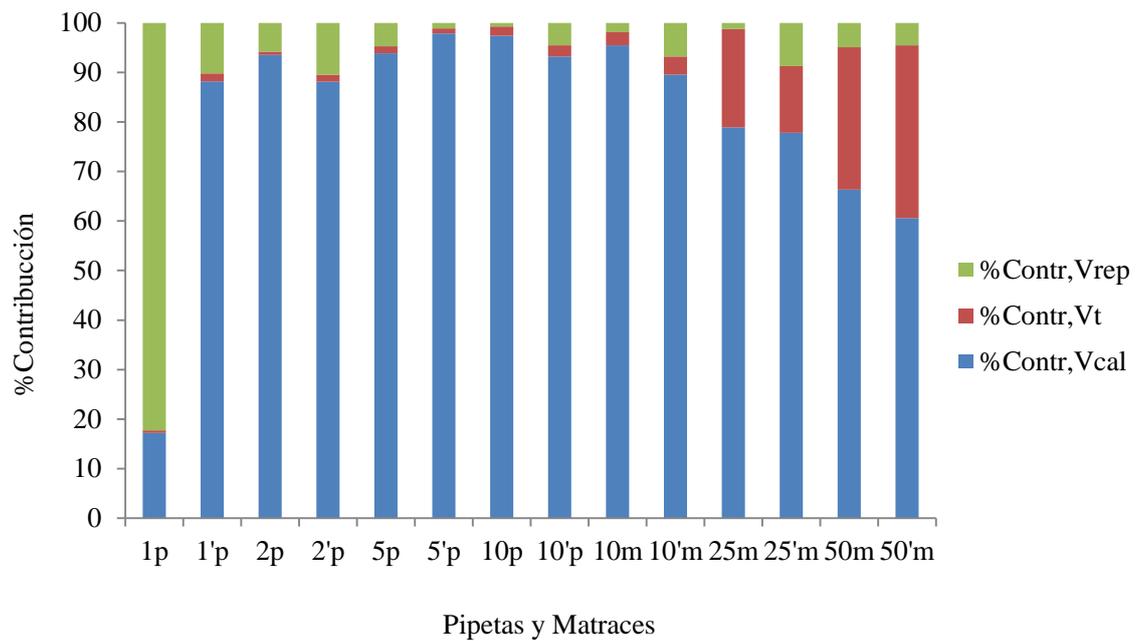


Figura 5. Contribuciones individuales a la incertidumbre del material volumétrico.

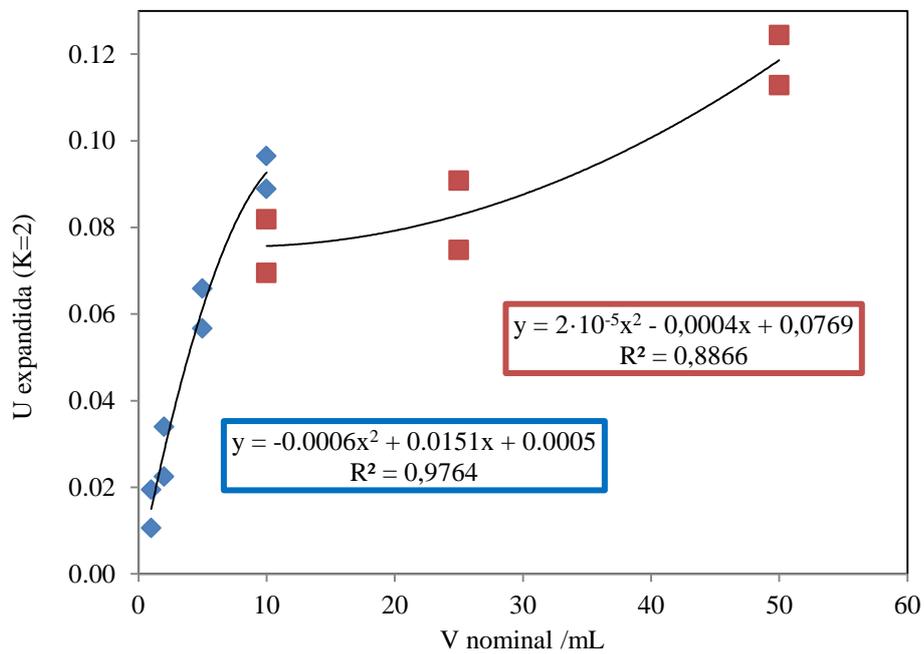


Figura 6. Variación de la incertidumbre expandida con el volumen nominal.

4.2. Optimización del método RP-HPLC-UV-Vis.

Las longitudes de onda óptimas para cada analito se muestran en la Figura 7. Las líneas azul, verde, rojo y amarillo hacen referencia a AAS, CFN, PCM y blanco MeOH/H₂O respectivamente.

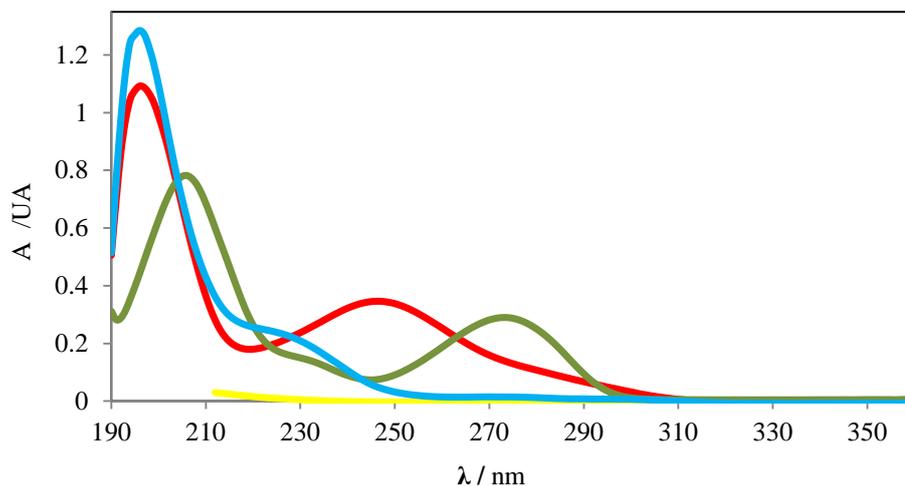


Figura 7. Espectro de absorción para la determinación de las longitudes de onda.

Al representar la absorbancia frente a la longitud de onda se obtienen tres máximos de absorbancia a: 273 nm para CFN, 246 nm para PCM y 230 nm para AAS.

La Figura 8 muestra 3 cromatogramas obtenidos en condiciones de repetibilidad a pH = 2,7, λ=230 nm, 40% MeOH, 0% Ac, 40% Tampón, 25°C.

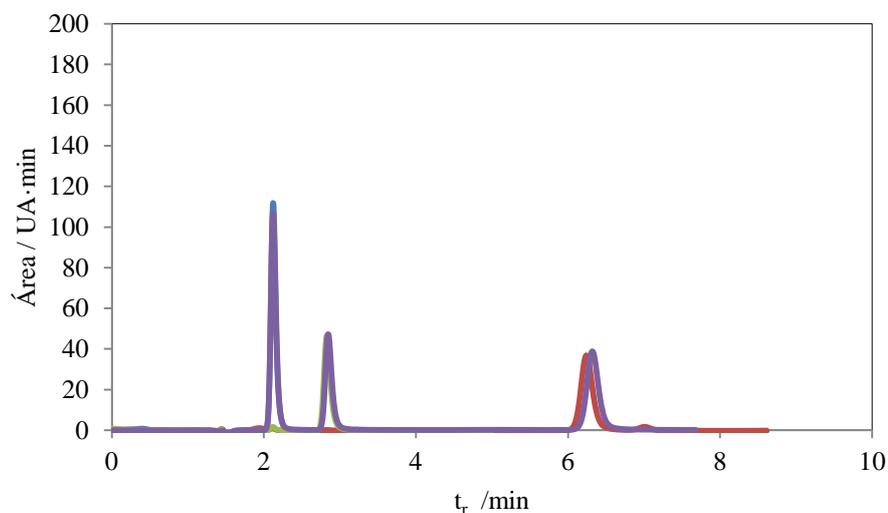


Figura 8. Repetibilidad de la separación: PCM (2,1 min); CFN (2,9 min), AAS (6,1 min).

Se observa la repetibilidad de los picos tanto en tiempo de retención como en área.

Las áreas de pico obtenidas para cada combinación experimental del diseño se recogen en la Tabla III del material complementario. Estos resultados se trataron mediante análisis de varianza para identificar los factores significativos que maximizan dicha respuesta.

La visualización de los gráficos de interacciones entre los factores y el ruido (Figura 9) proporcionó para los tres analitos el mismo resultado: no existen diferencias significativas entre el nivel de ruido 1 (muestras sin sacarosa) y el 2 (muestras dopadas con sacarosa) ya que el solapamiento de líneas es prácticamente completo. Consecuentemente la presencia del excipiente sacarosa no afecta a los resultados.

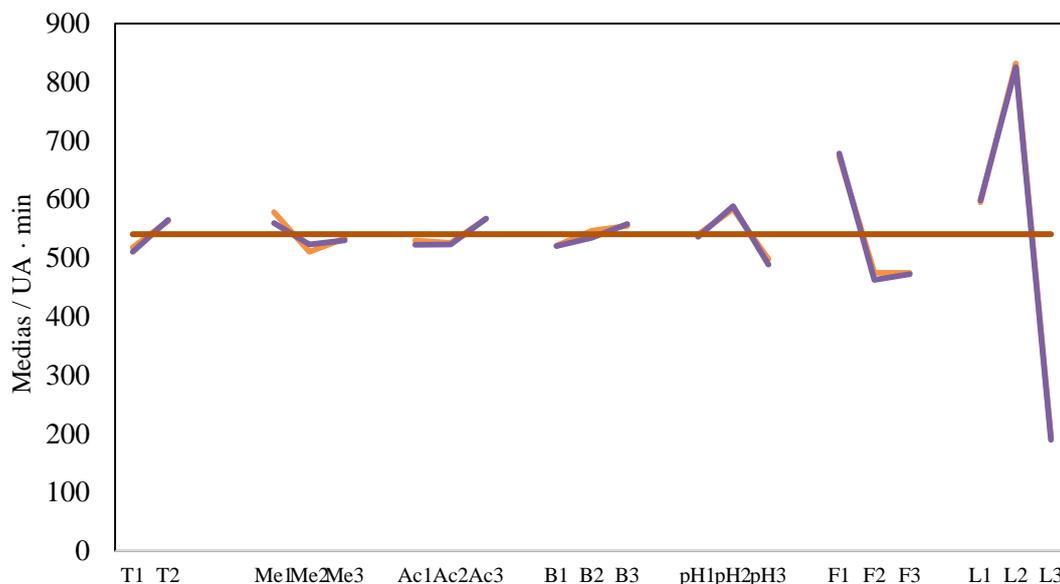


Figura 9. Representación de las áreas de pico medias a cada nivel de cada factor. Las líneas moradas y naranjas corresponden al estudio con y sin excipiente mientras que la línea horizontal refleja la gran media.

Se observa de forma cualitativa que los factores que afectan de forma más significativa al área de pico del PCM son la longitud de onda, la velocidad de la fase móvil y en menor medida el pH. Se obtuvieron conclusiones similares para los otros analitos.

El ANOVA de los resultados experimentales permitió identificar los factores con un efecto significativo en el área de pico de los tres analitos. La Tabla 9 resume las ecuaciones empleadas para hacer los cálculos de ANOVA.

La Tabla 10 resume los valores de probabilidad p-value obtenidos a partir del estadístico F de Fischer de cada factor. Si el valor de F es mayor que el F crítico, entonces $p < \alpha$ ($=0.05$) lo que implica que el factor es significativo. En la Tabla también se recogen los % de contribución a la varianza de cada factor.

Tabla 9. Fórmulas empleadas para el ANOVA.

Suma de cuadrados totales	$SS_T = \sum (x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}$ <p>Donde n es el número total de valores</p> $SS_T = \sum SS_F + SS_R$ <p>Donde SS_R es la suma de cuadrados del residual</p>
Suma de cuadrados de cada factor	$SS_F = \sum_{i=1}^m \frac{(\sum x_i^2)_F}{n_F} - \frac{(\sum x_i)^2}{2}$ <p>Donde m es el número de niveles de cada factor Donde n es el nº de resultados a un mismo nivel del factor</p>
Suma de cuadrados del ruido	$SS_N = \sum_{i=1}^m \frac{(\sum x_i^2)_N}{n_N} - \frac{(\sum x_i)^2}{2}$
Cuadrados medios	$MS = \frac{SS}{gdl}$
Estadístico F	$F = \frac{MS_F}{MS_R}$
% Contribución	$\% = \frac{SS_F}{SS_T} \cdot 100$
Grados de libertad	$gdl_T = n^{\circ} \text{ de experimentos} - 1$ $gdl_F = n^{\circ} \text{ de niveles} - 1$ $gdl_{F \times N} = gdl_F \cdot gdl_N$ $gdl_R = gdl_T - \sum gdl_F - \sum gdl_{F \times N}$

Tabla 10. Valores del p-value y % de contribución para cada fuente de variación. Los factores significativos se muestran en color verde.

Fuente	PCM		CFN		AAS	
	p-value	%Contrib.	p-value	%Contrib.	p-value	%Contrib.
T	0,037	0,735	0,574	0,005	0,082	1,666
Me	0,093	0,562	0,344	0,042	0,082	3,467
Ac	0,112	0,453	0,063	0,330	0,060	4,900
B	0,185	0,252	0,092	0,221	0,061	4,791
pH	0,033	1,691	0,070	0,296	0,011	26,766
F	0,005	10,984	0,003	8,818	0,054	5,431
L	0,001	81,797	0,000	88,641	0,009	35,408
TxMe	0,025	2,223	0,019	1,125	0,030	10,199
N	0,794	0,003	0,614	0,004	0,763	0,019
TxN	0,676	0,007	0,934	0,000	0,401	0,173
MexN	0,552	0,046	0,972	0,001	0,648	0,169
AcxN	0,954	0,003	0,927	0,002	0,852	0,054
BxN	0,818	0,013	0,588	0,016	0,739	0,109
pHxN	0,861	0,009	0,450	0,027	0,560	0,244
FxN	0,790	0,015	0,819	0,005	0,887	0,040
LxN	0,920	0,005	0,983	0,000	0,873	0,045
Residual		1,204		0,468		6,521
Total		100		100		100

Los factores significativos para cada uno de los analitos se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11. Factores significativos para cada analito.

Analito	Factores significativos
PCM	L, F, pH, T
AAS	L, F, pH
CFN	L, F

Una vez identificados los factores significativos, la aplicación de la prueba Duncan indicó para estos mismos, entre qué niveles las diferencias eran significativas. La Tabla 12 recoge las conclusiones extraídas.

Un factor a destacar fue el porcentaje de acetonitrilo ya que se vio que al aumentar este, los picos se desplazaban a tiempos de retención inferiores y aparecían antes en el cromatograma hasta llegar a solaparse. Para solucionarlo, se realizaron ensayos variando el porcentaje de este disolvente en un intervalo 5 - 10 % hasta conseguir una separación óptima.

Tabla 12 Resultados de la prueba Duncan.

Analito	Factor	Resultado
PCM	L	Diferencias significativas entre los tres niveles
	F	Diferencias significativas entre F1 y F2-F3
	pH	Diferencias significativas entre los tres niveles
	T	Diferencias significativas entre T1 y T2
AAS	L	Diferencias significativas entre L1 y L2-L3
	F	Diferencias significativas entre F3 y F1-F2
	pH	Diferencias significativas entre los tres niveles
CFN	L	Diferencias significativas entre los tres niveles
	F	Diferencias significativas entre los tres niveles

Durante la realización de estos ensayos, se observó en los cromatogramas obtenidos a pH=7 la aparición de un cuarto pico que se atribuyó a la hidrólisis del AAS en condiciones alcalinas transformándose en ácido salicílico y ácido acético (Poma M., Amanda M., 2016).

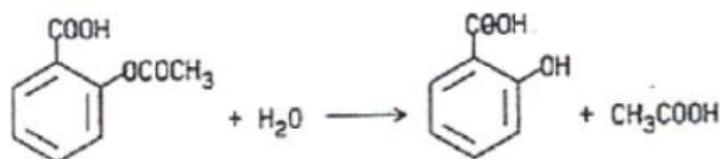


Figura 10. Reacción de degradación del ácido acetilsalicílico.

Con objeto de verificar este hecho y para establecer la frecuencia de preparación de los patrones de dicho analito, sucesivos espectros de una disolución de AAS fueron tomados con el espectrofotómetro a distintos intervalos de tiempo. De este modo se comprobó la interferencia del salicílico en la determinación y la inestabilidad del AAS en medios básicos. Por consiguiente, se eligió un pH ácido de trabajo y los patrones se renovaron con la mayor frecuencia posible.

Finalmente, se seleccionaron las condiciones óptimas para la determinación cromatográfica que se muestran en la Tabla 13. Con estas condiciones se observó que se obtenían los picos cromatográficos con una resolución adecuada y con un tiempo de retención y área reproducibles. Además, gracias a que el equipo tiene un detector de longitud de onda variable y que este es el factor más influyente, se optó por medir cada analito a su longitud de onda óptima. Para ello entre los minutos 0 – 2 min el detector se mantuvo a 246 nm para detectar PCM ; entre 2 – 3 min a 273 nm (CFN) y entre 3 – 4 min a 230 nm (AAS).

Tabla 13. Condiciones óptimas de separación.

Parámetro	Valor
Temperatura (°C)	25
Metanol (%)	30
Acetonitrilo (%)	5
Tampón fosfato (%)	25
pH (uds. pH)	2,7
Velocidad de flujo (mL·min ⁻¹)	1
Longitud de onda (nm)	230, 246, 273

La Figura 11 muestra un cromatograma obtenido en las condiciones optimizadas.

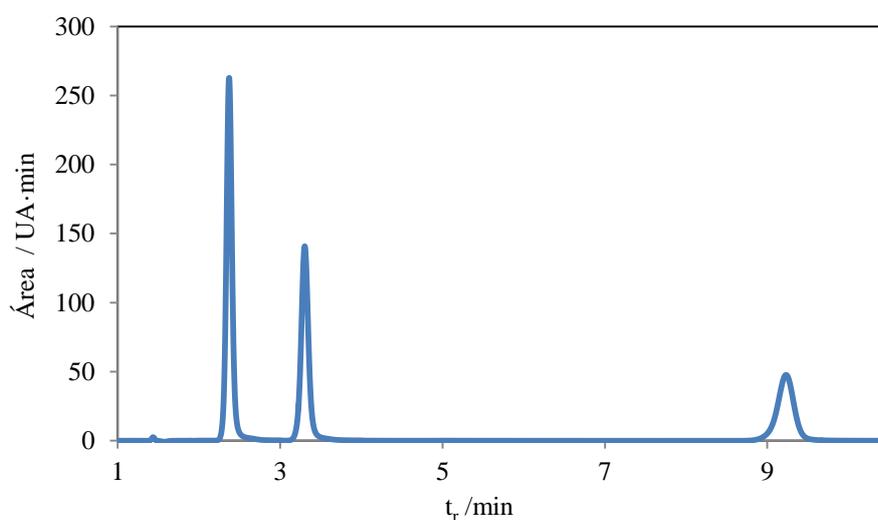


Figura 11. Cromatograma con las condiciones optimizadas para una concentración de 15ppm donde se observan tres picos PCM (2,3 min); CFN (3,3 min); AAS (9,2 min).

4.2.- Validación del método.

Se han estimado los siguientes parámetros de validación: robustez, especificidad, linealidad, sensibilidad, límites de detección y cuantificación, veracidad y precisión.

Robustez

Esta propiedad del método analítico se ha evaluado introduciendo una variación incontrolada durante los experimentos de optimización en forma de factor de ruido. Como ya se ha explicado, el efecto de la sacarosa en las áreas de pico y en los tiempos de retención no fue significativo. Los gráficos de interacciones de los factores de control con el factor de ruido evidenciaron para todos los analitos que no existen diferencias significativas entre los resultados de las muestras dopadas con excipiente y sin dopar. El

método analítico puede considerarse por tanto robusto y permanece inalterado ante variaciones de la matriz analítica, que suele ser una de las principales fuentes de error de los métodos de análisis.

Especificidad/selectividad

Cuantificar la selectividad de un método analítico no es una tarea sencilla dado que existen muy pocos métodos que den respuesta a un solo analito. De este modo, se hace notable la dificultad por conocer todas las posibles interferencias presentes en varias matrices y para distintos intervalos de concentración. Por ello, para evaluar la selectividad se han variado las condiciones cromatográficas con el objeto de seleccionar aquellas que proporcionaran picos cromatográficos estrechos y con solapamiento nulo.

Los picos de cada analito obtenidos en las condiciones óptimas estaban separados en el tiempo lo suficiente como para poder ser cuantificados y su área era perfectamente diferenciable del ruido de fondo. Por tanto, el método es selectivo.

Linealidad / Intervalo lineal

El proceso para evaluar el intervalo lineal del método a validar consiste en medir patrones de concentraciones conocidas de analito, representando gráficamente los datos señal/concentración, y determinar cuáles son los límites de concentración entre los cuales la respuesta del método varía linealmente con la concentración. Se observó linealidad en la relación área de pico - concentración en el intervalo 0,25 - 80 ppm para los tres analitos. No obstante, el rango de calibración se redujo al intervalo 0,25 – 40 ppm para disminuir el error típico del ajuste y mejorar la linealidad y los límites de detección, calculados a partir del error típico del ajuste y de la pendiente.

La linealidad se evaluó a partir del coeficiente de determinación R^2 de las líneas de calibrado, obtenidas diariamente con 8 patrones de calibración con concentraciones dentro del intervalo 0,25 – 40 ppm, preparados por pesada para mejorar su precisión y medidos por duplicado para estimar la falta de ajuste de la regresión. Como se muestra en la Figura 12, al representar la señal frente a la concentración de analito se vio que la respuesta del método es proporcional a la concentración en la muestra, de modo que la relación respuesta/concentración permanecía constante. Los patrones fueron analizados

en sentido creciente de concentración con el fin de hacer mínimo el efecto memoria del equipo.

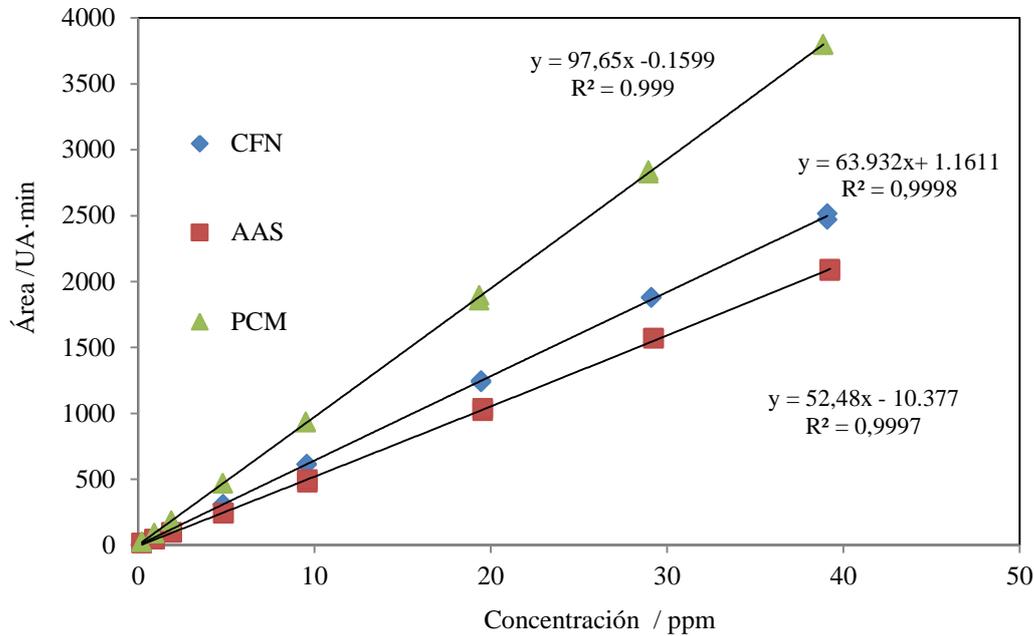


Figura 12. Líneas de calibrado para los distintos analitos.

Se realizó un análisis de regresión con objeto de conocer la relación entre la respuesta y la concentración. Esta relación se expresa con una función matemática, la cual es empleada para predecir el valor de una de las variables siendo desconocida la otra. La técnica que se empleó fue el ajuste de los puntos experimentales a la mejor relación lineal entre señal y concentración por el método de mínimos cuadrados. Simultáneamente se analizaron los residuales y el coeficiente de determinación como se refleja en la Tabla 14 y en la Figura 13.

Tabla 14. Parámetros estimados para evaluar la linealidad. Los valores que se muestran son promedios de todas las líneas de calibrado obtenidas.

Parámetro	PCM	CFN	AAS
b_0	-1,09	-11,16	64,41
b_1	98,09	64,41	53,34
s_e	16,68	11,24	13,22
R^2	0,9998	0,9998	0,9997

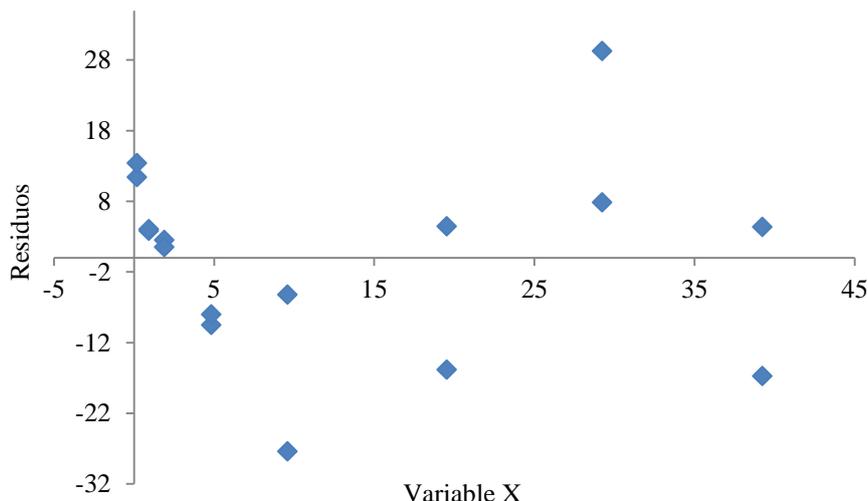


Figura 13. Gráfico de residuales para el AAS.

En todos los casos, los residuales se encontraban aleatoriamente distribuidos en torno a cero, de pequeña magnitud y homocedásticos. Además, los coeficientes de determinación obtenidos fueron muy próximos a 1 y muy superiores al objetivo de calidad impuesto, garantizando la linealidad dentro del intervalo de concentraciones. El intervalo de confianza de la ordenada incluía a cero, de modo que descartamos la presencia de sesgo constante debido a un blanco no corregido.

Otro criterio estadístico para validar la línea de calibrado es realizar la prueba de falta de ajuste mediante ANOVA para verificar si el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos observados o si se debería usar un modelo más complicado. Mediante este análisis de varianza comparamos la variabilidad de los residuos del modelo actual con la variabilidad entre observaciones hechas en valores repetidos de la variable independiente, x. Dicha prueba se ejecuta con el programa estadístico Statgraphics obteniéndose los valores del p-Value recogidos en la Tabla 15.

Tabla 15. Valores del p-value para la prueba de falta de ajuste.

Parámetro	PCM	CFN	AAS
p-Value	0,7870	0.5392	0,0952

Para los tres analitos el p-value promedio para la prueba de falta de ajuste es mucho mayor de 0,05, por lo que el modelo lineal parece ser adecuado para los datos observados con un nivel de confianza del 95%; y de este modo confirmamos la ausencia de falta de ajuste.

Sensibilidad

Puesto que el método de ensayo requiere de calibrado lineal, la sensibilidad coincide con la pendiente de la línea de calibrado. Esta se ha estimado calculando el promedio de las pendientes de un conjunto de líneas de calibrado realizadas en condiciones de reproducibilidad. Experimentalmente se analizaron 8 patrones de concentraciones crecientes de analito en el intervalo lineal seleccionado.

La sensibilidad estimada como promedio se refleja en la Tabla 14.

Límite de detección y límite de cuantificación.

El límite de detección y cuantificación se pueden calcular de dos formas distintas: a partir de la línea de calibrado o mediante medidas replicadas del patrón más diluido. De la primera forma hemos obtenido un valor más alto puesto que pequeñas variaciones en la preparación de patrones o en las áreas de los picos incrementan la varianza de los residuales y ello aumenta los límites de detección y cuantificación. La segunda manera es una forma más correcta de estimar dichos límites y para ello se inyectó en condiciones de repetibilidad (N=4) el multipatrón más diluido de concentración 0,25 ppm.

Las ecuaciones a aplicar en ambos casos, siendo s_B la desviación estándar de una serie de medidas replicadas del blanco, s_e el error típico y b_1 la pendiente de la línea de calibrado, se muestran en la Tabla 16. Sin embargo, para los cálculos se aplicó únicamente la expresión a partir del patrón más diluido pues proporciona un valor más realista.

Tabla 16. Ecuaciones empleadas para el cálculo del límite de detección y cuantificación.

Parámetro	A partir de la línea de calibrado	A partir del patrón más diluido
LOD	$C_{LOD} = \frac{3,29 \cdot s_e}{b_1}$	$C_{LOD} = \frac{3,29 \cdot s_B}{b_1}$
LOQ	$C_{LOQ} = \frac{10 \cdot s_e}{b_1}$	$C_{LOQ} = \frac{10 \cdot s_B}{b_1}$

Aplicando dichas expresiones se obtienen los valores promedio recogidos en la Tabla 17.

Tabla 17. Valores promedio de los límites de detección y cuantificación.

Parámetro	PCM	CFN	AAS
LOD (ppm)	0,20	0,32	0,46
LOQ (ppm)	0,97	1,4	0,60

Veracidad

Una forma de estimar el sesgo de los resultados de un método de análisis es participar en ensayos de aptitud en los que se analizan materiales, cuyo valor de referencia es asignado por los organizadores o bien consensuado por los participantes.

Dichos materiales deben cumplir ciertos requisitos: (i) la concentración del analito debe estar en el intervalo de concentración indicado en el método, (ii) el MR debe ser homogéneo y tener propiedades estables en el tiempo, (iii) la subdivisión del MR debe realizarse con cuidado para evitar la introducción de errores, (iv) la cantidad del MR debe ser suficiente para satisfacer la evaluación de la veracidad.

El sesgo o error sistemático se cuantifica como error absoluto aplicando la Ecuación 3.

$$\delta = \bar{x} - x_{MRC} \quad \text{Ecuación.3}$$

Durante el proceso de validación de un método, la veracidad debe evaluarse en todo el rango especificado para ese método analítico. Para ello se estima el sesgo o bias, al menos por triplicado, para 3-5 niveles de concentración, eligiendo las dos concentraciones en los extremos del rango (límite de cuantificación y límite superior del rango de medida) y varias concentraciones intermedias.

Para evaluar la veracidad se analizaron las muestras procedentes del ejercicio interlaboratorio ya descrito. Estas se trataron de forma similar a los patrones de calibrado. Se homogenizó previamente el vial y se varió el volumen de enrase a 100 mL. La concentración real de las muestras se calculó por interpolación en la línea de calibrado y cada muestra se analizó por triplicado.

Para la CFN no se pudo estimar este parámetro de validación debido a que no estaba contenido en los materiales del ejercicio interlaboratorio.

Una vez obtenido el sesgo, para evaluar si este es significativo se aplicó una prueba paramétrica de comparación de una media experimental con un valor conocido afectado por incertidumbre (Massart, 1998) obteniéndose los resultados reflejados en la Tabla 18.

Tabla 18. Evaluación del sesgo mediante una prueba de significación

Muestra control	AAS	PCM
31	1,242	0,549
32	2,658	1,680
33	1,219	0,380
34	0,234	1,263

Los valores del estadístico d reflejados en la Tabla 18 se calcularon mediante la siguiente expresión:

$$d = \frac{|c_{\text{ref}} - c_m|}{\sqrt{u_{\text{ref}}^2 + u_m^2}} \text{ Ecuación.4}$$

donde C_{ref} y u_{ref} son el valor de referencia y la incertidumbre típica consensuados por los participantes del ejercicio de intercomparación, y C_m y u_m son los valores obtenidos por un participante individual. Los valores d se calcularon con el valor crítico para un 95% de confianza ($d=2$). Si $d_{\text{crítico}} < d_{\text{calculado}}$ entonces acepto la hipótesis alternativa de que el sesgo es significativo. Puede apreciarse que solo en el caso de AAS en la muestra 32 el sesgo es significativo, pudiendo despreciarse para el resto de analitos y muestras.

Precisión

De la variación de todas las fuentes que pueden afectar a nuestro método durante la evaluación de la precisión nacen dos conceptos que la matizan: repetibilidad y reproducibilidad.

En concreto, si solo se quiere conocer la repetibilidad (s_r) y reproducibilidad (s_R), la norma UNE 82009-2 adaptada para un ejercicio interlaboratorio permite estimar ambas magnitudes, siendo esta última una combinación de la reproducibilidad intralaboratorio (s_L) y la repetibilidad.

En la práctica, para cada muestra del ejercicio interlaboratorio se realizaron experimentos en un periodo de cinco días inyectando las muestras diariamente por triplicado. Se aplicó un ANOVA de una vía donde el factor es el día y se calculó la varianza debida al factor y

debida a la repetibilidad combinándose mediante la Ecuación 4. Finalmente, el resultado se expresó como desviación estándar relativa como muestra la Tabla 19.

El modelo es un ANOVA de efectos aleatorios implica que:

- La varianza dentro de las columnas estima la repetibilidad: s_r^2
- El efecto del factor día estima la varianza entre laboratorios: s_L^2
- La suma de ambas contribuciones estima la reproducibilidad: $s_R^2 = s_L^2 + s_r^2$

$$s_R^2 = s_L^2 + s_r^2 = \frac{MS_L - MS_r}{n} + MS_r \text{ Ecuación. 5}$$

Tabla 19. Resultados promedio para la estimación de la precisión.

	PCM	CFN	AAS
s_r	0,1	0,007	0,050
s_R	0,4	0,010	0,6
$s_{\text{día}}$	0,4	0,01	0,6
DER_r %	1,74	1,92	1,24
DER_R %	11,7	2,7	14,4

Aunque la desviación estándar relativa de reproducibilidad es elevada en el caso de PCM y AAS, se cumplen los objetivos de calidad propuestos para este parámetro de validación ($DER_R < 15\%$).

Una vez estimados los parámetros de validación, se evaluaron los siguientes parámetros cromatográficos.

Factor de capacidad.

Relación entre el número de moles de soluto en la fase estacionaria con respecto al número de moles de soluto en la fase móvil.

$$K' = \frac{t_r - t_{r0}}{t_{r0}} \text{ Ecuación .6}$$

Resolución.

Medida cuantitativa de la separación alcanzada fijada por la pareja de picos peor resuelta del cromatograma.

$$R_s = \frac{2(t_{r2}-t_{r1})}{W_1+W_2} \text{ Ecuación. 7}$$

Coefficiente de selectividad.

Parámetro que se utiliza para caracterizar la distancia entre dos picos consecutivos.

$$\alpha = \frac{t_{r2}-t_{r0}}{t_{r1}-t_{r0}} \text{ Ecuación. 8}$$

Tiempo de retención.

Es el tiempo que transcurre desde la inyección hasta la elución del máximo del pico correspondiente a un compuesto retenido.

Eficacia de una columna cromatográfica.

Es la capacidad de la columna para proporcionar picos estrechos. Se evalúa a través de N y/o H y se determina experimentalmente a partir del cromatograma. Cuanto mayor sea el número de platos teóricos, mayor es el número de equilibrios, de modo que mayor es el número de transferencias, y por tanto se consiguen separaciones más eficaces.

$$H = \frac{L}{N} ; N = 16 \cdot \left(\frac{R_t}{W}\right)^2 \text{ Ecuación. 9}$$

Los resultados del cálculo de los parámetros cromatográficos se recogen en la Tabla 20.

Tabla 20. Parámetros cromatográficos para un multipatrón de concentración 5 ppm.

Parámetro	PCM	CFN	AAS	Criterio de aceptación
K'	0,7	1,3	5,3	$0,5 < K' < 10$
R _s	10,1			$R_s \geq 2$
α	1,9	4,2	-	$\alpha > 1$
t _r	2,4	3,3	9,2	-
H	10 ⁻⁵	8·10 ⁻⁶	5·10 ⁻⁶	Cuanto más pequeño, más eficacia tiene la columna
N	14012	18442	28082	$N > 2000$

A la vista de los resultados, en todos los casos los valores encontrados cumplen los criterios de aceptación.

4.3.- Evaluación de la incertidumbre de medida.

La incertidumbre se ha estimado a partir de los resultados de la validación como una combinación de la incertidumbre debida a la componente de precisión más la incertidumbre correspondiente al sesgo. Esta última es a su vez una combinación de la incertidumbre de las medidas realizadas junto con la incertidumbre del material de referencia, como se muestra en la Ecuación 10.

$$u_c^2 = u_R^2 + u_\delta^2 = s_R^2 + (u_x^2 + u_{ref}^2) = s_R^2 + \left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)^2 + \left(\frac{IC}{k}\right)^2 \quad \text{Ecuación. 10}$$

No obstante, el cálculo también puede realizarse a partir de la concentración consensuada en el ejercicio interlaboratorio aplicando la Ecuación 11 y usando los valores de consenso de la Tabla 21.

$$u_\delta^2 = \frac{\sum \delta_i^2}{n} + \frac{\sum u_{C_{ref_i}}^2}{n} = \frac{\sum \delta_i^2}{n} + \frac{\sum \left(\frac{s_i}{\sqrt{p}}\right)^2}{n} \quad \text{Ecuación. 11}$$

p hace referencia al número de laboratorios participantes

Tabla 21. Valores de consenso para la muestra de analgésico.

Parámetro	Valores
Ácido acetilsalicílico (%)	4,12 ±0.68
Paracetamol (%)	3,27 ±0.56

Una vez estimada la incertidumbre combinada, se calcula la incertidumbre expandida como:

$$U = K \cdot u_c \quad \text{Ecuación.12}$$

Donde K es el factor de cobertura. Se ha usado un valor de 2 correspondiente a un nivel de confianza del 95% aproximadamente.

Los resultados de incertidumbre para AAS y PCM contenidos en las muestras del ejercicio de intercomparación se muestran en la Tablas 22 y 23. Para CFN no se pudo completar la evaluación de la incertidumbre por no disponer de datos de veracidad.

Tabla 22. Incertidumbre para AAS del ejercicio de intercomparación.

Muestra	Media	u_R	u_δ	u_c	U
31	4.3	0.282	0.326	0.431	0.9
32	3.6	0.579	0.326	0.664	1.3
33	3.9	0.728	0.326	0.797	1.6
34	4.1	0.659	0.326	0.735	1.5

Tabla 23. Incertidumbre para PCM del ejercicio de intercomparación.

Muestra	Media	u_R	u_δ	u_c	U
31	3.4	0.497	0.223	0.545	1.1
32	2.9	0.255	0.223	0.339	0.7
33	3.2	0.208	0.223	0.305	0.6
34	3.1	0.506	0.223	0.553	1.1

La incertidumbre estimada ha resultado superior al valor objetivo. La razón es doble, por un lado la incertidumbre consensuada para los materiales del ejercicio interlaboratorio era alta debido a que los participantes eran alumnos en formación de diferentes universidades españolas. Por otro lado, la reproducibilidad de las medidas realizadas en este trabajo fue elevada. Ambas contribuciones dan lugar a una incertidumbre ligeramente superior al 25%.

4.4.- Aplicación del método a muestras reales.

La concentración de cada analito en el analgésico estudiado se obtuvo por interpolación en la línea de calibrado y se comparó con la concentración real dada por el fabricante observándose una buena concordancia entre ambos valores como se puede ver en la Tabla 24.

Tabla 24. Comparativa entre la concentración obtenida y la declarada.

Medicamento	C_{media} (mg / comprimido)			$C_{declarada}$ (mg / comprimido)		
	CFN	AAS	PCM	CFN	AAS	PCM
Desenfriol	34	336	0	32	389	0
Ilvico	28	0	297	30	0	325
Actron	40	245	125	40	267	133
Cafiaspirina	50	478	0	50	500	0
Frenadol Complex	23	0	633	30	0	650

Como es evidente, estos fármacos contenían además de los analitos de estudio, otros que ayudan a establecer las propiedades idóneas, de modo que en las Figuras 14, 15, 16, 17 y 18 aparecen otros picos que no han sido identificados.

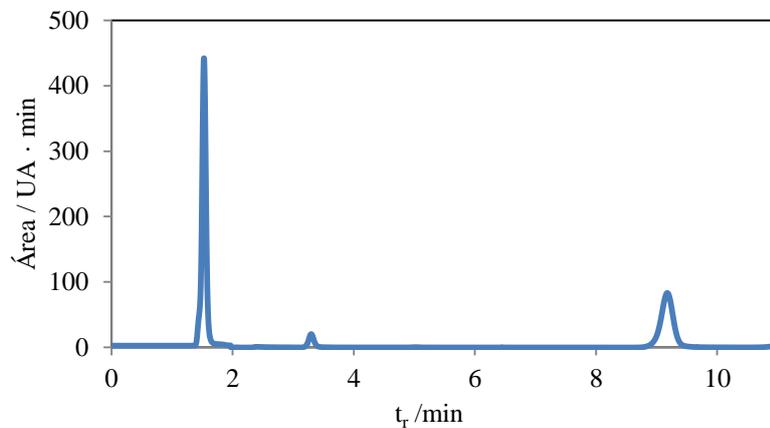


Figura 14. Cromatograma para Desenfriol: CFN (3,3 min), AAS (9,1 min)

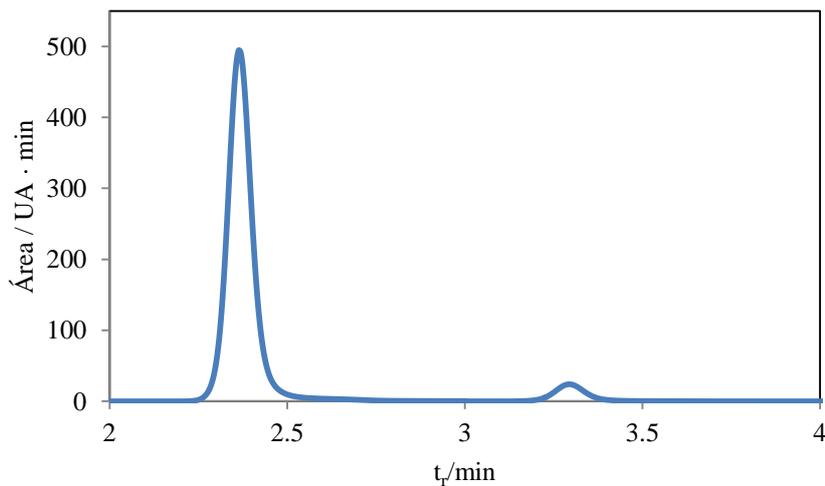


Figura 15. Cromatograma para Ilvico: PCM (2,3 min); CFN (3,3 min)

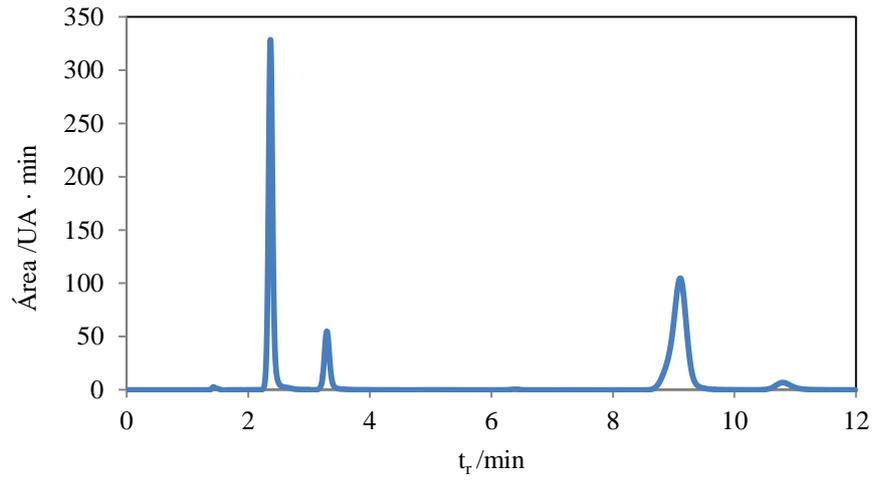


Figura 16. Cromatograma para Actron: PCM (2,3 min); CFN (3,2 min); AAS (9,1 min)

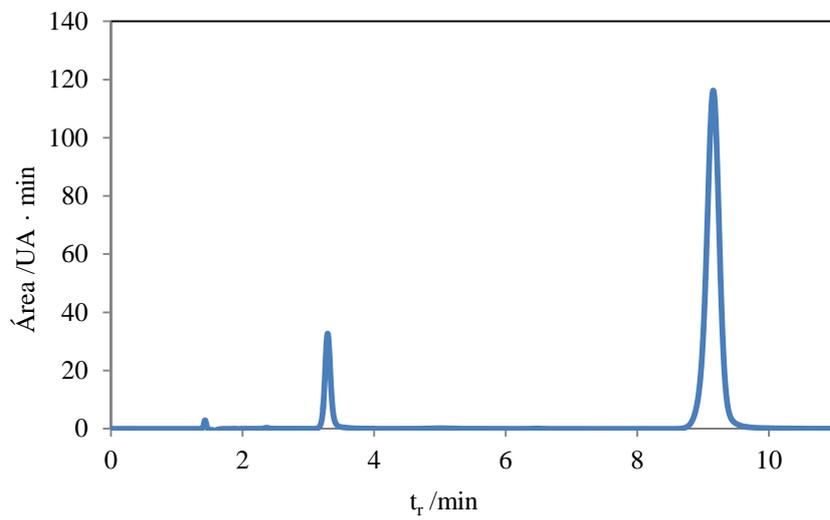


Figura 17. Cromatograma para Cafiaspirina: CFN (3,2 min); AAS (9,1 min)

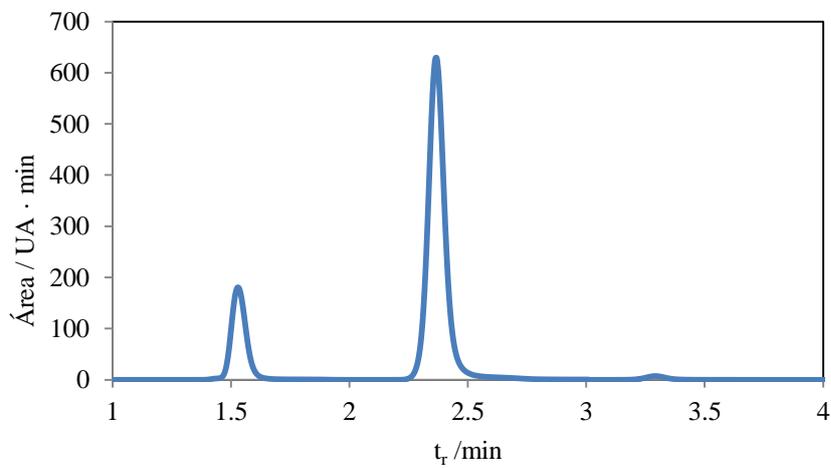


Figura 18. Cromatograma para Frenadol Complex PCM (2,4 min); CFN (3,3 min)

5.- CONCLUSIONES

Las conclusiones a las que se ha llegado mediante la realización de este trabajo han sido:

1. Las contribuciones que más afectan a la incertidumbre de medida en la calibración de equipos son las masas para el caso de la balanza y el factor de calibración para el material volumétrico.
2. Es preferible el empleo de un pH ácido cuando se trabaja con AAS para evitar su hidrólisis y por consiguiente efectos de ruido e interferencias. Además, los patrones de dicho analito son muy inestables en agua y es recomendable su preparación con frecuencia.
3. El excipiente sacarosa presente en la mayoría de los fármacos no tiene efecto significativo en la optimización cromatográfica. La longitud de onda es el factor más influyente en el área mientras que la composición y el pH de la fase móvil fueron los factores que más influyeron en la resolución de los picos.
4. Las condiciones óptimas de separación de los analitos son: temperatura, 25°C, composición de la fase móvil: Metanol: Acetonitrilo: Tampón fosfato, 30: 5: 25, pH 2,7, flujo $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y longitud de onda 230, 246 y 273 nm para aspirina, paracetamol y cafeína respectivamente.
5. Se han estimado los parámetros técnicos de validación del método RP-HPLC-UV-Vis desarrollado. Los objetivos de validación propuestos se han cumplido excepto en el caso de la incertidumbre expandida.

6.- REFERENCIAS.

- BIMP (2012). International vocabulary of metrology-Basic and general concepts and associated terms. 3rd ed. JCGM 200:2012. *Bureau International des Poids et mesures, BIMP*.
- Cámara C., Fernández P., Martín-Esteban A., Pérez-Conde C., Vidal C. (2002). Toma y tratamiento de muestras. Síntesis, Madrid, España.
- CEM ME-005 (s.f). Procedimiento de calibración para la calibración de balanzas monoplateo. *Centro Español de Metrología, CEM*.
- Chandra P., Rathore A., Lohidasan S., Mahadik K. (2012). Application of HPLC for the Simultaneous Determination of Aceclofenac, Paracetamol and Tramadol Hydrochloride in Pharmaceutical Dosage Form. *Sci Pharm*, 80: 337–351.
- Clark, J. (2000). Evaluation of methods for estimating the uncertainty of electronic balance measurements, W.S. Company, Ed.
- Consulta de densidades. (Ultimo acceso: 08/04/2019 18:03 h). <http://antoine.frostburg.edu/chem/senese/javascript/water-density.html>
- Croakin C. (2010). Engineering statistics handbook. Quantifying uncertainties from a gauge study. *National Institute of Standards and Technology, NIST*.
- Darwish K., Salama I., Mostafa S., El-Sadek M. (2012). Validated Stability-Indicating Reversed-Phase-HPLC Method for Simultaneous Determination of Orphenadrine Citrate, Caffeine and Aspirin. *Chem. Pharm. Bull.* 60(11) 1426–1436.
- Díaz-Guerra González J.P., Quejido Cabezas A.J., Simón Arauzo M.A., Rucandi Saez M.I. Pérez Pastor R., Sánchez Ledesma D.M., Santamaría Martín J. (2000). Calidad Total y acreditación en química analítica. CIEMAT, Madrid, España.
- Duffau B., Rojas F., Guerrero I., Roa L., Rodríguez L., Soto M., Aguilera M., Sandoval S. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de medición: aspectos generales sobre la validación de métodos. *Instituto de salud pública*.
- Eglal A., Ibrahim A., Eman S., Nouruddin W. (2015). HPTLC and RP-HPLC methods for simultaneous determination of Paracetamol and Pamabrom in presence of their potential impurities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 114, 22-27.
- Eurachem/Citac (2012). Cuantificación de la incertidumbre en medidas analíticas. Tercera edición. QUAM: 2012. P1
- Franeta J.T, Agbaba D., Eric S., et al. (2002). HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets. *Il Farmaco. Elsevier*. 57, 709-713.
- González A.G., Herrador M.A. (2007). The assessment of electronic balances for accuracy of mass measurement in analytical laboratories. *Accred. Qual. Assur.*12, 21-29.

- Hernández Revilla M., (2013). Validación de métodos de ensayo y estimación de la incertidumbre de medida conforma a la norma ISO/IEC 17025. *Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid.*
- ICH (1996). ICH Topic Q2 (R1). Validation of analytical procedures: Text and Methodology. The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
- ISO/IEC 17025:2017. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. CTN/66 ISO-UNE.
- JCGM 100 (2008). Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement. Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM/WG 1). www.bipm.org.
- Lazos Martínez R., Hernández Gutiérrez I. (2004). La validación de métodos: un enfoque práctico. *Centro Nacional de Metrología.*
- Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., De Jong, S., Lewi, P.J., Smeyers-Verbeke, J. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B, Elsevier, Amsterdam, 1998.
- Pérez Hernández M. (2012). Estimación de incertidumbres. Guía GUM. *E. medida. Revista española de metrología.*
- Poma M., Amanda M. (2016). Estudio de degradación de la aspirina en tabletas de diferentes marcas comercializadas en la ciudad de La Paz en la gestión 2015. *Rev. Cs. Farm. y Bioq. v.4 n.1 La Paz.*
- Propiedades de los analitos. (Ultimo acceso: 03/05/2019 11:32 h). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Reichmuth A. (2001). Weighing accuracy. Estimating measurement bias and uncertainty of a weighing. Mettler Toledo.
- Reichmuth A., Wunderli, S., Weber, M., Meyer V.R. (2004). The uncertainty of weighing data obtained with electronic analytical balances. *Microchim. Acta* 148, 133.141.
- Sharma R., Khanna S., Mishra G. (2010). Development and Validation of RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Ramipril, Aspirin and Atorvastatin in Pharmaceutical Preparations. *E-Journal of Chemistry*, 9(4), 2177-2184.
- Tague, N.R. (2005). Plan-Do-Study-Act cycle. The quality toolbox (2nd ed.). ASQ Quality Press, Milwaukee.
- Vaidya V., Singh G., Choukebar M., Kebare M. (2010). Simultaneous RP HPLC Determination of Aceclofenac, Paracetamol and Tizanidine in Pharmaceutical Preparations. *E-Journal of Chemistry*. 7(1), 260-264.

7.- MATERIAL COMPLEMENTARIO

Tabla I. Cuantificación de las fuentes de error que contribuyen a la incertidumbre de la balanza

Histéresis	$u(\text{Histe}) = \frac{ M_{\text{inicial}} - M_{\text{final}} }{\sqrt{3}}$
Excentricidad	$u(\text{Excen}) = \frac{ \bar{M}_{1-1'} - M_{\text{más alejado}} }{\sqrt{3}}$
Tara	$u(\text{Tara}) = \frac{ M_{\text{leída}} - M_{\text{nominal tarado}} }{\sqrt{3}}$ $M_{\text{nominal tarado}} = M_{\text{real}} - M_{\text{tara}}$
Repetibilidad	$u(\text{Rep}) = \frac{s_{\text{masa}}}{\sqrt{N}}$
Incertidumbre combinada	$u_c = \sqrt{u_{\text{excen}}^2 + u_{\text{rep}}^2 + u_{\text{histe}}^2 + u_{\text{tara proemdio}}^2 + u_{\text{masas}}^2}$
Incertidumbre expandida	$U = K \cdot u_c$

Tabla II. Cuantificación de las fuentes de error que contribuyen a la incertidumbre de pipetas.

Repetibilidad	$u(V, \text{rep}) = \sqrt{\frac{s^2}{n}}$
Temperatura	$u(V, \text{temp}) = \frac{V_{\text{nominal}} \cdot \Delta T \cdot \rho}{\sqrt{3}}$ ρ representa el coeficiente de expansión cúbico del agua
Calibración	$u(V, \text{cal}) = \frac{V_{\text{medio}} - V_{\text{nominal}}}{\sqrt{3}}$ $u(V, \text{cal}) = \sqrt{\frac{\sum \delta_i^2}{n}}$ $u(V, \text{cal}) = \frac{\text{Tolerancia}}{\sqrt{3}}$
Incertidumbre combinada	$u(\text{Volumen}) = \sqrt{u(V, \text{rep})^2 + u(V, \text{temp})^2 + u(V, \text{cal})^2}$
Incertidumbre expandida	$U = K \cdot u(\text{Volumen})$
% de Contribución	$\% V_i = \frac{u^2 V_i}{u^2 V_c} \cdot 100$

Tabla III. Áreas de pico (UA min) agrupadas por experimentos, factores y analitos de estudio.

Experimento	PCM				CFN				AAS			
	N1		N2		N1		N2		N1		N2	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
1	658,8	653,4	647,5	659,8	344,7	342	335,1	335,3	486,5	477	452,7	468,7
2	766,3	814	761,3	758,8	153,8	123	122,4	127,8	69	0	0	0
3	164,2	161	129,1	146,5	423,9	421,7	423,6	431,8	0	0	3,8	19,7
4	188,1	185,1	186,2	185,5	487,2	489,7	489,7	493,1	0	0	0	0
5	440,2	451,9	463,5	446,8	202,6	212,5	213,7	209,7	146,3	140,9	146,4	143,2
6	1032,9	971,4	1025,8	1036,9	178,5	159,9	159,7	161,7	74,9	70,2	0	0
7	778,6	687,1	690,4	692,6	135,4	110,8	100,9	111,6	46,3	45,5	49,4	36,4
8	265,2	264,5	273,6	273,2	640,8	617,3	649,2	638,6	0	0	0	0
9	440,8	395,9	399,5	403,9	257,5	249,2	253,9	249	174	137,2	141	149,9
10	797	740,8	726,8	753,4	132,6	132,2	151,7	155,1	66,2	57,1	64,2	72,4
11	173,1	158,4	155,3	149,4	459,9	449,6	431,9	440,7	29	30	41,7	34,1
12	914,8	928,7	922,2	902,6	333,2	335,4	337,5	346,9	0	0	0	0
13	213,3	203,7	209,9	212,7	624,4	616,2	610,9	602,7	25,5	27,8	27,1	25,6
14	510	499	512,2	509,6	275,5	266,2	266,9	267	370	379,7	341,6	361,7
15	705,2	723,7	746,4	739,6	108,6	104,5	106,9	106,5	0	0	0	0
16	622,3	623,4	642,3	663	221,4	229,3	218	221,1	0	0	0	0
17	994,5	968	983,5	986,1	150	157	155,2	152,1	3,8	0	71,4	71,1
18	177,4	178	173,8	175,6	491,7	499,3	495,5	488,6	45,3	40,7	46,7	47,7

