



---

**Universidad de Valladolid**

Facultad de Ciencias

## **TRABAJO FIN DE MÁSTER**

Máster en Técnicas Avanzadas en Química. Análisis y  
Control de Calidad Químicos

**Determinación simultánea de ácido ascórbico, ácido  
acetilsalicílico y paracetamol mediante la combinación de  
técnicas espectroscópicas y calibración multivariante**

*Autora: Silvia Pintado Martín*

*Tutor/es: María del Sol Vega Alegre*

*Curso 2021/22*



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer, en primer lugar, a mi tutora Marisol Vega Alegre su dirección, consejos y ayuda científica.

Doy las gracias también a los técnicos de laboratorio Francisco de la Rosa y Rosario Gómez por proporcionarme los materiales que he necesitado, así como por su ayuda en el manejo de los equipos.

Por último, extiendo mi agradecimiento a Blanca Calvo y M<sup>a</sup> Purificación Niño del Departamento de Física por su colaboración en el uso del ATR-FTIR.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	1
RESUMEN .....	2
ABSTRACT .....	3
1. INTRODUCCIÓN TEÓRICA .....	4
1.1. Control de calidad en la industria farmacéutica.....	4
1.2. Técnicas espectroscópicas.....	5
1.3. Herramientas para el análisis de datos. Quimiometría .....	6
1.4. Aplicaciones de las técnicas de calibración multivariable .....	8
1.5. Productos de interés farmacéutico objeto de estudio.....	9
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO .....	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1. Muestras reales y muestras sintéticas de calibración.....	13
3.2. Determinación por ATR-FTIR.....	16
3.3. Determinación por UV-Vis.....	17
3.4. Tratamiento matemático .....	19
• Relación entre absorbancia y concentración.....	19
• Calibración multivariable con ajuste por mínimos cuadrados clásicos (CLS) .....	20
• Calibración multivariable con ajuste por mínimos cuadrados parciales (PLS) .....	24
• Método de adiciones patrón generalizado (GSAM) .....	27
3.5. Determinación por RP-HPLC-UV .....	30
3.6. Cálculo de la incertidumbre de los resultados .....	32
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
4.1. Determinación por espectroscopía UV-Vis.....	34
• Calibración multivariada con ajuste por CLS .....	35
• Calibración multivariada con ajuste por PLS .....	38
• Método de adiciones patrón generalizado (GSAM) .....	46
4.2. Determinación por espectroscopía ATR-FTIR .....	51
4.3. Determinación por RP-HPLC-UV .....	54
4.4. Comparación de resultados.....	56
5. CONCLUSIONES.....	58
6. REFERENCIAS .....	60
7. ANEXOS.....	63

## ABREVIATURAS

PCM	Paracetamol
AAS	Ácido acetilsalicílico
Vit C	Vitamina C
COD	Codeína
AcN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
PLS	Mínimos cuadrados parciales (“Partial least squares”)
CLS	Mínimos cuadrados clásicos (“Classical least squares”)
PCR	Regresión de componentes principales (“Principal component regression”)
GSAM	Método de adiciones patrón generalizado (“Generalited Standard Adittion method”)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (“High Performance Liquid Chromatography”)
CG	Cromatografía de gases
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
FT-IR	Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier
NIR	Infrarrojo cercano
ATR	Reflectancia total atenuada (“Attenuated Total Reflectance”)
As	Aspirina C
Al	Algidol
De	Desenfriol
Do	Dolmen
Ef	Efferaldol
FDA	Food and Drug Administration

## RESUMEN

Las exigencias de calidad que requiere la industria farmacéutica implican un amplio y riguroso control de múltiples parámetros, tanto a lo largo del proceso productivo como del producto final, ya que deben cumplir con una serie de especificaciones estrictamente reguladas para poder llegar al mercado. Por ello, la industria farmacéutica demanda métodos de análisis que sean rápidos, sencillos, económicos y que garanticen resultados confiables. Las técnicas espectroscópicas cumplen estos requisitos, pero al no ser selectivas, no se puede realizar la determinación directa de diferentes componentes en una mezcla, lo que hace necesario la utilización de técnicas de calibración multivariantes.

En este trabajo se llevó a cabo la determinación por espectrometría Ultravioleta-Visible e Infrarroja de paracetamol, ácido acetilsalicílico y ácido ascórbico en formulaciones farmacéuticas para el tratamiento del dolor y la fiebre, combinadas con técnicas de calibración multivariable y con el método de adiciones patrón generalizado con ajuste por mínimos cuadrados clásicos (CLS) y mínimos cuadrados parciales (PLS).

Para la calibración multivariable con CLS y PLS se preparó un conjunto de muestras de calibración según un modelo ortogonal, a partir de las cuales, según el fundamento de cada técnica, se obtuvieron los coeficientes que relacionan la absorbancia con la concentración. Una vez determinados se predice la concentración de nuevas muestras.

Para corregir el efecto matriz, se aplicó el método de adiciones patrón generalizado a la determinación por espectrofotometría UV-Vis. Se prepararon para la calibración una serie de disoluciones que contenían la muestra y cantidades conocidas de cada uno de los analitos de interés, a partir de las cuales se calcularon los coeficientes que permiten predecir posteriormente la concentración de las muestras reales.

También se realizó la determinación cromatográfica con detección UV como método de comprobación, ya que al ser una técnica de separación, proporciona resultados fiables, aunque con un tiempo de análisis y un coste más elevados.

Se demuestra principalmente el potencial de la calibración multivariable con PLS para predecir la concentración de muestras complejas, siempre que se introduzca toda la variabilidad de la muestra en el conjunto de calibración.

## **ABSTRACT**

The quality requirements of the pharmaceutical industry involve a wide and rigorous control of multiple parameters, both throughout the production process and the final product, as they must comply with a series of strictly regulated specifications in order to reach the market. For this reason, the pharmaceutical industry demands fast, simple and economical methods of analysis that guarantee reliable results. Spectroscopic techniques meet these requirements, but since they are not selective, direct determination of different components in a mixture can not be carried out, which makes it necessary to use multivariate calibration techniques.

In this work, the determination by Ultraviolet-Visible and infrared spectrometry of paracetamol, acetylsalicylic acid and ascorbic acid in pharmaceutical formulations for the treatment of pain and fever was carried out combined with multivariate calibration techniques and the generalized standard additions method with classical least squares (CLS) and partial least squares (PLS) adjustment.

For multivariate calibration with CLS and PLS, a set of calibration samples was prepared according to an orthogonal model, from which, according to the basis of each technique, the coefficients relating absorbance to concentration were obtained. Once determined, the concentration of new samples is predicted.

To correct the matrix effect, the method of generalized standard additions was applied with the determination by UV-Vis spectrometry. A series of solutions containing the sample and known amounts of each of the analytes of interest were prepared for calibration, from which the coefficients were calculated to subsequently predict the concentration of the real samples.

Chromatographic determination with UV detection was also carried out as a verification method, since it is a separation technique that provides reliable results, although with a higher analysis time and cost.

The potential of multivariate calibration with PLS to predict the concentration of complex samples is mainly demonstrated, provided that all sample variability is entered into the calibration set.

# 1. INTRODUCCIÓN TEÓRICA

## 1.1. Control de calidad en la industria farmacéutica

El control de la calidad está adquiriendo cada vez más importancia en la industria, siendo la industria farmacéutica uno de los sectores más regulados debido a la importancia de sus productos sobre la salud de los consumidores. Las normas ISO definen la calidad como “la totalidad de rasgos y características de un producto, proceso o servicio que inciden en su capacidad de satisfacer necesidades reguladas o implícitas” y la edición de 1977 de las Buenas Prácticas de Fabricación y Control la definen como “parte de la esencia de un objeto que comprende la totalidad de sus atributos y propiedades que hacen a su aptitud para el uso pretendido” (*Mariano Maggio, 2008*).

El objetivo principal del control de calidad de medicamentos es asegurar que cumpla con todas las especificaciones de identidad, pureza, dosis, potencia, eficacia terapéutica e inocuidad, así como con sus propiedades organolépticas y características farmacotécnicas. Para ello, los controles de calidad en la industria farmacéutica obligan a realizar un alto número de determinaciones de características tanto físicas como químicas de las materias primas, de los productos intermedios y de los productos finales, que están regulados por organismos como el Instituto de Salud Pública (ISP), la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, Food and Drug Administration) o la Conferencia Internacional de Armonización (ICH). Además, los fabricantes europeos deben cumplir con las Normas para la Correcta Fabricación de Medicamentos (NCF) (*Pino, 2020; Romero, 2001*).

Las especificaciones y ensayos que más se realizan son los de identidad de los componentes, pureza del principio activo, de contenido, propiedades fisicoquímicas, de disolución, uniformidad y acción. Todo ello requiere el uso de un elevado número de metodologías analíticas, principalmente HPLC y, en menor medida, cromatografía de gases. Estas técnicas, aunque establecidas como métodos de rutina en los laboratorios de la industria farmacéutica, requieren a menudo una laboriosa preparación de muestra, un tiempo largo de análisis y consumen un elevado volumen de disolvente. Además, la mayoría de estos análisis se realizan en el producto final, siendo el ensayo de contenido del principio activo uno de los más importantes (*Bautista, 2009*).



Para solventar estos inconvenientes, la FDA planteó una nueva filosofía de trabajo denominada Tecnología Analítica de Procesos (PAT, Process Analytical Technology), que se define como un mecanismo para diseñar, analizar y controlar los procesos de fabricación farmacéutica a través de la medición de parámetros críticos del proceso que afectan a los atributos críticos de calidad. De esta forma, se busca mejorar la calidad de los productos finales aumentando simultáneamente la eficiencia de los procesos de producción.

Tanto las pruebas realizadas en el seguimiento continuo del proceso como los ensayos del producto final requieren la utilización de técnicas analíticas rápidas y sencillas, y preferiblemente que permitan hacer un seguimiento a tiempo real (on-line o in-line), lo que supone una mejora respecto a los procesos off- y at-line. Las técnicas espectroscópicas son especialmente apropiadas para ser utilizadas en esta metodología.

### **1.2. Técnicas espectroscópicas**

Las técnicas espectroscópicas como espectrometría Ultravioleta-Visible, de Fluorescencia molecular, Infrarrojo o Raman han adquirido una gran importancia debido a que son rápidas, el equipamiento es menos costoso que los equipos de cromatografía, sencillas en el manejo y requieren la utilización de una pequeña o nula cantidad de disolventes, por lo que son compatibles con el medio ambiente.

Las espectroscopías Ultravioleta-Visible y Fluorescencia, requieren la puesta del analito en disolución, por lo que son técnicas destructivas, mientras que las espectroscopías IR y Raman permiten analizar las muestras directamente en estado sólido, sin necesidad de ningún pretratamiento, más allá de la molienda y homogeneización del material.

El uso de la espectroscopía UV-Vis disminuye considerablemente el tiempo de análisis y el uso de disolventes con respecto a las técnicas cromatográficas, debido a la sencillez y rapidez en la medida, mientras que el uso de las espectroscopías IR y Raman presenta un gran número de ventajas adicionales:

- No es necesario el tratamiento de la muestra: no destructiva ni invasiva
- Ausencia de consumo de reactivos: compatible con el medio ambiente
- El proceso de medida se puede automatizar, pudiendo ser utilizados por personal en planta sin un alto grado de formación científica

- Se pueden realizar ensayos on-line o in-line en cualquier punto de la cadena de producción
- Bajo coste de mantenimiento

La principal desventaja que presentan las técnicas espectroscópicas es que no son selectivas y, en caso de mezclas complejas, las señales de los diferentes componentes aparecen solapadas en los espectros, impidiendo su determinación directa. Así, el espectro de una muestra será la suma de la contribución a la absorbancia de cada uno de los componentes que la forman a cada longitud de onda.

Esto constituye un problema en la determinación de la composición de fármacos, ya que generalmente hay más de una especie absorbente, ya sean varios principios activos y/o varios excipientes.

Por ello, es necesario el uso de herramientas matemáticas para obtener los resultados de los parámetros de interés.

### **1.3. Herramientas para el análisis de datos. Quimiometría**

La Quimiometría surge como una herramienta analítica para la interpretación de datos complejos en donde la información de interés es difícil de observar a simple vista. Se define como “la disciplina que utiliza métodos matemáticos, estadísticos y otros métodos basados en la lógica formal para: a) diseñar o seleccionar procedimientos de medida y experimentos óptimos; y b) proporcionar el máximo de información química relevante mediante el análisis de datos químicos”.

Existen diferentes técnicas quimiométricas para tratar las señales analíticas como los métodos de reconocimiento de pautas para el análisis cualitativo o caracterización de una muestra o los métodos de reducción de la dimensionalidad como el análisis de componentes principales (PCA), que permite condensar un gran volumen de información como la que proporcionan los datos espectroscópicos. Este trabajo se va a centrar en la calibración multivariable, para el análisis cuantitativo de muestras complejas.

Los métodos de calibración multivariable (o multivariante) permiten la determinación simultánea de varios analitos en una mezcla mediante métodos espectroscópicos no

selectivos, ya que resuelve el problema de solapamiento de las bandas espectrales, sin la necesidad de una etapa previa de separación.

Los métodos multivariable de calibración más conocidos son: calibración multivariable por mínimos cuadrados clásicos (*classic least squares*, CLS), mínimos cuadrados parciales (*partial least squares*, PLS) o el método de adiciones patrón generalizado (*generalized standard additions method*, GSAM).

En la mayoría de los casos, especialmente en espectrometría IR y Raman, antes de aplicar estos métodos a los datos espectroscópicos es necesario realizar un pretratamiento espectral con la finalidad de aumentar la calidad de la señal instrumental, reduciendo al máximo la información no asociada a la propiedad estudiada. Algunos ejemplos son el suavizado espectral, variable normal estándar (SNV) y la derivación de la señal analítica.

- Calibración multivariable con CLS y PLS

Para la determinación por calibración multivariable con CLS y PLS es necesario utilizar un conjunto de calibración que permita establecer la relación entre la respuesta instrumental (absorbancia) y la propiedad a determinar.

El conjunto de calibración debe contener las fuentes de variabilidad esperadas para las muestras para las que se prepara el método, además de contener al analito o analitos en un amplio rango de concentración, lo que no se puede obtener a partir de muestras de producción, ya que presentan un contenido de principio activo y excipientes muy próximo al valor nominal. Por tanto, las muestras de calibración se pueden preparar de la siguiente manera:

- Muestras dopadas, que se consiguen infra- y sobre- dosificando las muestras de producción con pequeñas cantidades de excipientes o de principio activo.
- Muestras sintéticas, que se preparan por pesada de cantidades conocidas de los distintos componentes puros del fármaco.

En CLS es necesario que el modelo de calibración sea ortogonal, esto es, que los niveles de concentración de los analitos en las muestras de calibración no estén correlacionados, mientras que en PLS este requisito no es necesario, resultando más flexible para seleccionar los niveles de concentración de los componentes.

Otra diferencia entre CLS y PLS es que en CLS se utilizan sólo las absorbancias a unas determinadas longitudes de onda, que deben ser seleccionadas cuidadosamente, mientras que en PLS se utiliza todo el espectro, aprovechando mucho mejor la información espectral de la muestra.

PLS es el método más generalmente utilizado a pesar de la mayor complejidad de cálculo (fundamento explicado en el apartado Materiales y Métodos), debido a que conduce, en general, a una mejor predicción en las muestras reales.

- GSAM

Se trata de un método de calibración multivariable que proporciona un análisis multicomponente en presencia de efectos matriz.

En un gran número de muestras analíticas, el efecto de la matriz causa interferencias que pueden influir en la señal analítica, dando lugar a una determinación errónea. Cuando existe un solo analito esto se soluciona utilizando el método de adiciones patrón (SAM, *Standard Adittions Method*), pero cuando hay varios analitos es necesario utilizar el método de adiciones patrón generalizado (GSAM), que combina el análisis multicomponente (para solucionar el problema de las interferencias espectrales) con el método de adiciones patrón (efecto matriz). Para la resolución matemática se puede utilizar tanto mínimos cuadrados clásicos como mínimos cuadrados parciales, pero cambia el modo en el que se obtiene el conjunto de calibración, ya que está formado por diferentes muestras que contienen la muestra real y cantidades conocidas de patrones puros de los componentes (como se explica con más detalle en el apartado de Materiales y Métodos).

#### **1.4. Aplicaciones de las técnicas de calibración multivariable**

Algunos ejemplos de la aplicación de las técnicas espectroscópicas junto a las técnicas de calibración multivariable en la industria farmacéutica, así como en la industria alimentaria o medioambiental se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1: Aplicaciones de las técnicas de calibración multivariable

Multivariate technique	Analytical technique	Analites	References
PHARMACEUTICALS			
PLS	FT-Raman	paracetamol, acetylsalicylic acid	<i>Szostak and Mazurek (2001)</i>
PLS	NIR	Acetylsalicylic acid	<i>Merckle and Kovar (1998)</i>
MLRC y PLS	FT-IR	Ascorbic acid, biotin	<i>Bunaciu et al. (2009)</i>
PLS	Raman	Acetylsalicylic acid, ibuprofen, paracetamol	<i>Omar et al. (2020)</i>
PLS	ATR-FTIR	Clavulanic acid and amoxicillin	<i>Müller et al. (2011)</i>
PLS	UV-Vis	Paracetamol, acetylsalicylic acid, caffeine	<i>Bouhsain et al. (1997)</i>
PLS	UV-Vis	Imatinib, gemifloxacin, nalbuphine, naproxen	<i>Belal et al. (2018)</i>
PLS, PCR	UV-Vis	Bromazepan, diazepam, clonazepam	<i>Belal et al. (2018)</i>
PLS	Fluorescencia	Caffeine, acetylsalicylic acid	<i>Moreira et al. (2005)</i>
MLRC, TLRC, CLS	UV-Vis	Caffeine, paracetamol, metamizol	<i>Dinc. (2003)</i>
PLS	NIR	Paracetamol, caffeine, diacetylmorphine	<i>Melucci et al. (2012)</i>
GSAM	UV-Vis	Rifampicin, isoniazid, pyrazinamide	<i>Asadpour-zeynali and Saeb (2016)</i>
OTHER MATRICES			
PLS	ATR-FTIR	Histamine in tuna fish	<i>Asghari et al. (2022)</i>
PLS	FT-IR	Moisture in Oil	<i>Fong and Jeffrey (2019)</i>
GSAM-PLS	UV-Vis	Paracetamol, dextromethorphan, phenylephrine in urine	<i>Shariati-Rad et al. (2013)</i>

### 1.5. Productos de interés farmacéutico objeto de estudio

Un grupo importante de fármacos por su volumen de ventas y consumo a nivel mundial son los analgésicos y antigripales, que se utilizan para el tratamiento del dolor y la fiebre. Los principios activos que principalmente contienen son el paracetamol (en adelante, PCM), que es un agente analgésico y antipirético, y el ácido acetilsalicílico (AAS), que

además de tener funciones analgésicas y antipiréticas, es un agente antiinflamatorio y anticoagulante. Estos principios activos generalmente aparecen combinados con la cafeína (acción estimulante) o con el ácido ascórbico o Vitamina C (VitC). Este último no tiene actividad analgésica, pero en combinación con el PCM o AAS mejora sus efectos favorables.

Generalmente presentan pocos efectos secundarios, pero una sobredosis o su consumo a elevadas concentraciones causa efectos como enfermedades en el hígado en el caso del paracetamol, un aumento del riesgo de problemas gastrointestinales en el caso del ácido acetilsalicílico y diarrea y problemas gastrointestinales en el caso de la Vitamina C. Por todo ello es importante su control de calidad.

La estructura (Figura 1) y propiedades físico-químicas (Tabla 2) del PCM, AAS y VitC se muestran a continuación (*Pubchem*):

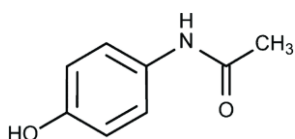


Figura 1.1: Paracetamol

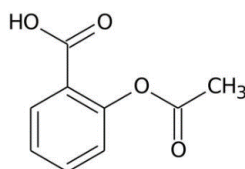


Figura 1.2: Ácido acetilsalicílico

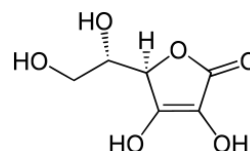


Figura 1.3: Ácido ascórbico

Tabla 2: Propiedades del PCM, AAS, VitC

Nombre	Paracetamol, Acetaminofenol	Ácido acetilsalicílico, Ácido 2-acetoxibenzoico, Aspirina	Vitamina C, Ácido ascórbico
<b>Propiedades químicas</b>			
<b>Fórmula química</b>	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>
<b>Peso molecular</b>	151.16 g/mol	180.16 g/mol	176.12 g/mol
<b>pk<sub>a</sub></b>	9.38	3.5	4.17
<b>Propiedades físicas</b>			
<b>Aspecto</b>	Sólido cristalino blanco inodoro. Sabor amargo	Cristales blancos inodoros o polvo cristalino con ligero sabor amargo	Polvo cristalino de blanco a ligeramente amarillo inodoro. Sabor ácido
<b>Densidad (g/cm<sup>3</sup>)</b>	1.293	1.4	1.65
<b>Punto de fusión</b>	169-170°C	135°C	191°C
<b>Solubilidad</b>	14 mg/mL (25°C)	3.3 g/L (25°C)	330 g/L (25°C)
	Soluble en dvtes. orgánicos	Muy soluble en alcohol	

## 2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

La industria farmacéutica debe garantizar que el contenido de los diferentes componentes del fármaco esté dentro de unas especificaciones establecidas que garanticen su calidad y eficacia, para lo que necesita métodos de análisis rápidos, sencillos, económicos y fiables.

El objetivo de este trabajo de Fin de Máster es estudiar el potencial de la combinación de las técnicas quimiométricas multivariantes con técnicas analíticas no selectivas para determinar la composición de muestras complejas. Para ello se aplicarán métodos rápidos, pero no selectivos, como la espectroscopía Ultravioleta-Visible e Infrarroja para la determinación simultánea de paracetamol (PCM), ácido acetilsalicílico (AAS) y ácido ascórbico (VitC) en preparaciones farmacéuticas comercializadas en farmacias locales. Las respuestas espectrales, no selectivas y aditivas, se tratarán con técnicas de calibración multivariable como mínimos cuadrados parciales (PLS), mínimos cuadrados clásicos (CLS) o el método de adiciones patrón generalizado (GSAM) para determinar el contenido de los componentes activos en las muestras.

Además, para comprobar la veracidad de los resultados se llevará a cabo la determinación de los analitos en las muestras mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección UV.

El plan de trabajo ha sido:

1. Revisión bibliográfica de diferentes métodos de análisis de los analitos estudiados y de las aplicaciones analíticas de las técnicas de calibración multivariable.
2. Preparación de las muestras sintéticas de calibración para calibración multivariable con ajuste por mínimos cuadrados clásicos (CLS) y mínimos cuadrados parciales (PLS).
3. Medida de los patrones de calibración y muestras por ATR-FT-IR.
4. Medida de los patrones de calibración y muestras por UV-Visible, con su correspondiente pretratamiento.
5. Preparación de muestras y disoluciones estándar para GSAM.

6. Obtención de la composición de las muestras aplicando las diferentes técnicas quimiométricas estudiadas.
7. Puesta a punto de un método cromatográfico para la determinación simultánea de PCM, AAS y VitC en las muestras, para usar estos resultados como valores de referencia para evaluar los resultados de las técnicas multivariantes.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Muestras reales y muestras sintéticas de calibración

Las muestras de medicamentos a analizar se adquirieron en una farmacia local y se eligieron de forma que contuvieran mezclas de al menos dos de los analitos estudiados. En la Tabla 3 se muestran las cantidades de principio activo declaradas y los excipientes que contienen cada uno de ellos.

Tabla 3: Principios activos y excipientes de cada medicamento

	<b>Aspirina C</b>	<b>Algídol</b>	<b>Desenfriol C</b>	<b>Dolmen</b>	<b>Efferaldol</b>
<b>API</b>	400mg AAS 240mg VitC	650mg PCM 500mg VitC 10mg COD	500mg VitC 388,8mg AAS 32,4mg CFN	500mg AAS 250mg VitC 10mg COD	330mg PCM 200mg VitC
<b>Excip.</b>	NaHCO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> Sacarina Citrato de sodio Ácido cítrico Aroma	Sacarosa Sacarina de sodio Sílice coloidal Povidona Maltosa Celulosa microcristalina Aroma de naranja Colorante amarillo anaranjado S	Sacarosa Sacarina sódica Ácido cítrico anhidro NaHCO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> Manitol Aroma de naranja Colorante amarillo anaranjado S	Sacarina sódica NaHCO <sub>3</sub> Ácido cítrico Citrato monosódico anhidro Benzoato de sodio Aroma de naranja Povidona	NaHCO <sub>3</sub> KHCO <sub>3</sub> Ácido cítrico anhidro Docusato de sodio Polividona Benzoato de sodio Sorbitol

El rango de concentración de los componentes activos en las muestras sintéticas o patrones de calibración se definió en función del porcentaje que había de cada uno de ellos en las muestras reales. Para ello, se pesaron los diferentes comprimidos y se obtuvieron los siguientes porcentajes:

Tabla 4: Porcentaje de API's en cada medicamento

	<b>m<sub>comprimido</sub> (g)</b>	<b>PCM (%)</b>	<b>AAS (%)</b>	<b>VitC (%)</b>
<b>Aspirina C</b>	3,2550	0	12.29	7.37
<b>Algídol</b>	2,1435	30.32	0	23.33
<b>Desenfriol C</b>	7,3049	0	5,32	6,84
<b>Dolmen</b>	3,3468	0	14.94	7.47
<b>Efferaldol</b>	2,9176	11.31	0	6.85

Así, se prepararon 25 muestras de calibración, en las que cada analito podía estar en 5 niveles de concentración que cubrían entre 0 y +5-10 % de la cantidad máxima en los medicamentos comerciales seleccionados. Se utilizaron patrones puros de paracetamol (*Sigma-Aldrich*), ácido acetilsalicílico (*Merck*) y ácido ascórbico (*Fluka*). Los niveles de concentración seleccionados se muestran en la Tabla 5.

El número de muestras de calibración y el nivel de cada analito en cada una de ellas se eligió según un modelo ortogonal denominado “I” niveles factorial parcial. En este diseño, que se muestra en la Tabla 6, las concentraciones de los diferentes componentes no tienen correlación entre sí (*Pintado, 2021*).

Tabla 6: Modelo de calibración

Bloque	Nº Experimento	Nivel		
		PCM	AAS	Vit C
	1	0	0	0
1	2	0	-2	-2
	3	-2	-2	2
	4	-2	2	-1
	5	2	-1	2
	6	-1	2	0
	7	2	0	-1
2	8	0	-1	-1
	9	-1	-1	1
	10	-1	1	2
	11	1	2	1
	12	2	1	0
	13	1	0	2
3	14	0	2	2
	15	2	2	-2
	16	2	-2	1
	17	-2	1	-2
	18	1	-2	0
	19	-2	0	1
4	20	0	1	1
	21	1	1	-1
	22	1	-1	-2
	23	-1	-2	-1
	24	-2	-1	0
	25	-1	0	-2

Tabla 5: Niveles de concentración (%) de cada analito

Nivel	PCM	AAS	VitC
-2	0	0	0
-1	10	5	5
0	20	10	10
1	30	15	20
2	40	20	30

Como en las muestras reales un gran porcentaje del contenido corresponde a los excipientes, y estos pueden afectar de forma notable a las señales espectrales de la muestra, es necesario introducirlos en las muestras sintéticas para que sean lo más representativas posible.

Se eligieron como excipientes la sacarosa (*Scharlau*), la sacarina sódica (*Hermes Sweeteners Ltd.*), el bicarbonato sódico (*Panreac*) y el ácido cítrico (*Panreac*), ya que son los que más se repiten en las muestras de medicamentos disponibles. Los porcentajes de cada uno de ellos fueron un 15% de sacarosa, 15% de sacarina, 30% de  $\text{NaHCO}_3$  y 40% de ácido cítrico del porcentaje total de excipientes que quedaba una vez añadidos los componentes activos.

Finalmente, la composición real de las muestras sintéticas se muestra en la Tabla 7. Se pesaron las cantidades necesarias de cada componente para una cantidad total de 5g. Todos los componentes se trituraron previamente en un molino de discos vibratorios de carburo de wolframio (RETSCH) para obtener un menor tamaño de partícula. Una vez pesados los componentes de cada muestra, se mezclaron con un agitador oscilante de brazos y posteriormente con una varilla de vidrio para asegurar la obtención de muestras homogéneas.

Tabla 7: Composición (%) de 25 muestras sintéticas

C real (%)							
Experimento (mezcla)	PCM	AAS	VitC	Sacarosa	Sacarina	NaHCO <sub>3</sub>	Ac. Cítrico
1	20,02	10,09	10,02	8,87	9,12	18,09	23,78
2	19,98	0,00	0,00	12,84	11,10	24,62	31,46
3	0,00	0,00	30,02	10,68	10,31	21,25	27,73
4	0,00	19,97	5,03	11,18	11,33	22,51	29,99
5	40,20	4,79	29,99	3,98	3,73	7,37	9,95
6	10,06	20,94	9,01	9,05	8,92	18,20	23,82
7	39,14	9,96	5,87	6,99	6,73	13,43	17,87
8	20,09	4,99	4,90	10,63	10,37	21,01	28,01
9	10,66	4,91	19,45	9,85	9,49	19,63	26,01
10	10,13	14,97	29,84	6,86	6,74	13,57	17,89
11	30,31	19,67	20,06	4,77	4,20	8,97	12,03
12	40,79	14,25	9,90	5,14	5,49	10,53	13,90
13	30,07	9,99	30,05	4,49	4,34	9,20	11,87
14	20,08	20,16	29,92	4,59	4,25	9,10	11,89
15	40,05	20,38	0,00	5,55	5,94	12,03	16,05
16	40,34	0,00	20,33	5,42	5,86	12,04	16,01
17	0,00	15,09	0,00	14,05	11,93	25,55	33,39
18	29,62	0,00	10,48	11,43	6,31	17,99	24,17
19	0,00	10,09	20,07	10,76	10,20	21,05	27,84
20	20,32	15,17	20,14	7,70	5,32	13,48	17,87
21	30,11	14,86	5,16	7,57	7,22	15,18	19,91
22	30,78	4,55	0,00	10,98	8,18	19,57	25,93
23	9,99	0,00	5,08	12,71	12,87	26,78	32,58
24	0,00	5,03	10,27	12,68	12,62	25,39	34,01
25	10,01	10,20	0,00	11,78	11,99	24,05	31,97

### 3.2. Determinación por ATR-FTIR

La determinación de patrones y muestras se llevó a cabo en un espectrómetro FT-IR Bruker Tensor 27 equipado con dispositivo ATR (*Attenuated Total Reflection*) Golden gate. El software utilizado fue OPUS, Optics User Software. Cada espectro se obtuvo como promedio de 32 barridos en el rango comprendido entre 600 y 4000  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Se registraron las absorbancias en función del número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Se realizó un fondo (background) del aire antes de comenzar las medidas y posteriormente después de cada 5 medidas.

Los patrones de calibración no necesitaron ningún tratamiento de muestra; los medicamentos comercializados como comprimidos fueron pulverizados antes del análisis.

Los 25 patrones y las muestras se midieron por quintuplicado y posteriormente se realizaron los cálculos con el promedio de los cinco espectros.

### **3.3. Determinación por UV-Vis**

La determinación se llevó a cabo en un espectrofotómetro Agilent 8453 Ultravioleta-Visible con lámpara de deuterio y detector de red de diodos en un intervalo de longitudes de onda comprendido entre 210 y 400 nm (región del Ultravioleta), ya que las disoluciones medidas son incoloras y no absorben en la región visible del espectro electromagnético. Se utilizaron cubetas de cuarzo (Quartz Suprasil, Hellma) de 10 mm de camino óptico. Todas las medidas se realizaron frente a un blanco que contenía un 5% de metanol en agua desionizada.

El análisis por UV-Vis requiere la disolución previa tanto de los patrones de calibración como de las muestras.

#### **- Patrones de calibración**

Para la elección del rango de concentración en disolución de cada uno de los analitos en las 25 muestras sintéticas se estudió previamente el rango de respuesta lineal del instrumento, representando los datos de absorbancia frente a la concentración de patrones puros a la longitud de onda de máxima absorción. Además, también se tuvo en cuenta el porcentaje de cada analito en los multipatrones sólidos.

Se observó que el rango lineal era hasta 30 mg/L para PCM y hasta 40 mg/L para AAS y VitC, ya que a concentraciones más elevadas se produce la saturación del detector.

Por ello se eligió un factor de dilución de las muestras que garantizara que la concentración total, suma de los tres analitos, no superara los 30 ppm para evitar la saturación causada por la aditividad de las absorbancias.

Las disoluciones se prepararon pesando aproximadamente 0,1 g de la muestra sintética en una balanza analítica y disolviéndolo en un 10% de metanol y agua desionizada hasta enrasar. Se introdujeron en el baño de ultrasonidos durante aproximadamente 10

minutos para asegurar la disolución completa. El metanol se utilizó debido a la baja solubilidad del paracetamol en agua. A continuación, se realizó una dilución 1:50 para obtener las concentraciones deseadas. Con este factor de dilución, el rango de concentraciones en las muestras patrón de los tres analitos fue el que se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8: Niveles de concentración (mg/L) de cada analito en las muestras de calibración

Nivel	C (mg/L)		
	PCM	AAS	VitC
-2	0	0	0
-1	4	2	2
0	8	4	4
1	12	6	8
2	16	8	12

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

- Muestras reales

El tratamiento de las muestras previo a las medidas se muestra a continuación:

1. Pesar el comprimido.
2. Pulverizar el comprimido en un mortero hasta conseguir el menor tamaño de partícula posible.
3. Pesar en una balanza analítica la cantidad necesaria de cada muestra (entre 0,02 y 0,05 g).
4. Transferir la cantidad pesada a un matraz aforado, añadir metanol hasta una concentración del 10%, agitar para disolver y enrasar con agua desionizada. Sumergir en el baño ultrasonidos hasta disolución completa.
5. Realizar una dilución 1:10 para que la concentración esté dentro del intervalo de calibración.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

- Preparación muestras para G-SAM

El método de adiciones patrón generalizado, cuyo fundamento se explica en el apartado de Tratamiento matemático, requiere de un proceso experimental diferente.

Para ello se prepararon disoluciones madre patrón individuales de 1000 ppm disolviendo aproximadamente 0.05 g, pesados con precisión de  $\pm 0.1$  mg, en 10 mL de metanol y enrasando con agua a 50 mL, con posterior introducción en el baño de ultrasonidos para asegurar la disolución completa. La preparación de las muestras reales fue la misma que en los casos anteriores.

Para cada muestra, en diez matraces aforados de 50 mL se pipetearon volúmenes constantes de la muestra problema y volúmenes crecientes de la correspondiente disolución patrón de 1000 ppm, para tener las concentraciones de patrón añadido que se muestran en la Tabla 9.

Los niveles de concentración de cada analito en cada matraz (Tabla 9) se eligieron de forma que no superaran los 30 mg/L en la suma de los tres, para evitar la saturación de la absorbancia y de forma que la condición de la matriz experimental fuera lo menor posible.

Tabla 9: Concentración de cada adición estándar de cada analito

Experimento	Nivel C			Cañadida teórica (mg/L)		
	AAS	ASC	PCM	AAS	ASC	PCM
1	0	0	0	0	0	0
2	1	0	0	5	0	0
3	2	0	0	10	0	0
4	3	0	0	15	0	0
5	0	1	0	0	5	0
6	0	2	0	0	10	0
7	0	3	0	0	15	0
8	0	0	1	0	0	5
9	0	0	2	0	0	10
10	0	0	3	0	0	15

### 3.4. Tratamiento matemático

Para poder relacionar la señal medida con la concentración es necesario realizar un tratamiento matemático de los datos utilizando las técnicas de calibración multivariable.

- **Relación entre absorbancia y concentración**

En espectroscopía Ultravioleta-Visible e infrarroja existe una relación lineal entre la absorbancia medida y la concentración, determinada por la ley de Lambert-Beer,

aunque la espectroscopía infrarroja es susceptible a que se produzcan desviaciones del comportamiento de la ley.

La ecuación que rige esta ley es:

$$R_{x,\lambda} = k_{x,\lambda}C_x + e_{x,\lambda}$$

donde  $R_{x,\lambda}$  es la respuesta de absorbancia del analito a una longitud de onda,  $k_{x,\lambda}$  es la pendiente de la línea de regresión, que incluye el camino óptico y la absorptividad del analito a esa longitud de onda (generalmente el camino óptico tiene un valor de 1cm),  $C_x$  es la concentración del analito y  $e_{x,\lambda}$  es el error residual.

Esto permite calcular la concentración de una única especie absorbente a partir de la medida de la absorbancia, pero no en presencia de otros componentes que absorben en la misma región del espectro, ya que las absorbancias son aditivas, quedando una ecuación de este tipo:

$$R_\lambda = R_{a,\lambda} + R_{b,\lambda} + \dots + R_{z,\lambda} = k_{a,\lambda}C_a + k_{b,\lambda}C_b + \dots + k_{z,\lambda}C_z + e_{a,b,\dots,z}$$

Para resolver este problema se utiliza la calibración multivariable con ajuste por mínimos cuadrados clásicos, mínimos cuadrados parciales y el método de adiciones patrón generalizado, cuyos fundamentos se explican a continuación.

- **Calibración multivariable con ajuste por mínimos cuadrados clásicos (CLS)**

Esta técnica multivariante permite obtener las concentraciones de los diferentes componentes de una muestra a partir de los coeficientes obtenidos en una etapa de calibración previa y las absorbancias medidas. Por tanto, el procedimiento a seguir consta de una etapa de calibración y otra de predicción.

#### Etapa de calibración

En la etapa de calibración se obtienen los coeficientes que relacionan la absorbancia a cada longitud de onda con la concentración de cada analito. Para ello se diseña un modelo de calibración con muestras que contienen concentraciones conocidas de cada uno de los analitos y se registran los espectros.

De los espectros se escogen como mínimo las absorbancias a tantas longitudes de onda (denominadas de forma genérica sensores) como analitos se estén estudiando (NA=NS),



y un número mayor si se quiere estimar el error (NA<NS). Se eligen de forma que las proporciones de absorbancia de los componentes difieran lo máximo posible.

La respuesta R (absorbancia) de cada sensor en cada una de las disoluciones o experimentos es la suma de las contribuciones de todos los analitos que hay en la mezcla:

$$R_{i1} = k_{11}C_{i2} + k_{21}C_{i2} + \dots + k_{NA1}C_{iNA} + e_{i1}$$

En esta expresión,  $R_{i1}$  es la respuesta de la disolución i al sensor 1,  $C_{ij}$  es la concentración del analito j en la disolución i,  $k_{j1}$  es el coeficiente de selectividad del sensor 1 a la especie j y  $e_{i1}$  es el error residual del modelo del sensor 1 en la disolución i.

Esto se puede escribir de forma matricial considerando todos los sensores, analitos y disoluciones:

$$\begin{bmatrix} R_{11} & R_{12} & \dots & R_{1NS} \\ R_{21} & R_{22} & \dots & R_{2NS} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ R_{n1} & R_{n2} & \dots & R_{nNS} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} C_{11} & C_{12} & \dots & C_{1NA} \\ C_{21} & C_{22} & \dots & C_{2NA} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ C_{n1} & C_{n2} & \dots & C_{nNA} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} k_{11} & k_{12} & \dots & k_{1NS} \\ k_{21} & k_{22} & \dots & k_{2NS} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ k_{NA1} & k_{NA2} & \dots & k_{NANS} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e_{11} & e_{12} & \dots & e_{1NS} \\ e_{21} & e_{22} & \dots & e_{2NS} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ e_{n1} & e_{n2} & \dots & e_{nNS} \end{bmatrix}$$

Y, de forma simplificada:

$$R_{(n \times NS)} = C_{(n \times NA)} \cdot K_{(NA \times NS)} + E_{(n \times NS)}$$

Conociendo R y C, la obtención de la matriz K de los coeficientes de sensibilidad de cada sensor a cada analito se consigue resolviendo la ecuación matricial anterior, como se indica a continuación:

1. Se multiplica a ambos lados por la matriz traspuesta de C,  ${}^tC$ :

$${}^tC \cdot R = {}^tC \cdot C \cdot K$$

2. Se multiplica a ambos lados por la matriz inversa del producto de C y  ${}^tC$ :

$$({}^tC \cdot C)^{-1} \cdot {}^tC \cdot R = ({}^tC \cdot C)^{-1} \cdot ({}^tC \cdot C) \cdot K$$

3. Como el producto de una matriz por su inversa da la identidad, se obtiene directamente la matriz K:

$$K = ({}^t C C)^{-1} \cdot {}^t C \cdot R$$

Las varianzas de los coeficientes de selectividad para cada analito en cada sensor se obtienen a partir de los valores de la diagonal de las matrices de varianza-covarianza obtenidas para cada sensor a partir de la siguiente expresión:

$$s_k^2 = s_e^2 \cdot ({}^t C \cdot C)^{-1}$$

donde  $s_e^2$  es la varianza de los residuos obtenidos para cada sensor (j):

$$s_{e,j}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (R_{i,j} - R_{i,j,predicho})^2}{N - m}$$

N es el número de disoluciones o muestras patrón, m el número de componentes estudiados,  $R_{i,j}$  las respuestas obtenidas en el sensor j y  $R_{i,j,predicho}$  las respuestas predichas en el sensor j, calculadas previamente ( $R_{i,j,predicho} = C \cdot K$ ).

### Etapa de predicción

En la etapa de predicción se obtienen las concentraciones de los analitos de muestras reales a partir de los coeficientes de selectividad obtenidos en la etapa de calibrado (matriz K) y las respuestas o absorbancias medidas a las longitudes de onda elegidas previamente.

Para ello se registran los espectros y se toman las respuestas a las mismas longitudes de onda utilizadas en el calibrado, que se relacionan con la concentración según la ecuación matricial:

$$r_m = c_m \cdot K$$

donde  $r_m$  es el vector de las respuestas de absorbancia de las muestras a cada longitud de onda,  $K$  es la matriz de coeficientes de selectividad calculada previamente y  $c_m$  es el vector de concentraciones de cada analito en la muestra, que es lo que se desea conocer.

Las operaciones matriciales necesarias para la resolución de la ecuación son similares a las ya descritas en la etapa de calibración:

$$r_m \cdot {}^t K = c_m \cdot K^t \cdot K$$

$$r_m \cdot {}^t K \cdot (K^t K)^{-1} = c_m \cdot (K^t K) \cdot (K^t K)^{-1}$$

$$c_m = a_m \cdot {}^t K \cdot (K^t K)^{-1}$$

Las varianzas de las concentraciones obtenidas de cada analito en cada muestra se obtienen a partir de la diagonal principal de la matriz de varianzas-covarianza ( $s_c^2$ ) según la expresión:

$$s_c^2 = s_e^2 \cdot ({}^t K \cdot K)^{-1}$$

$s_e^2$  se calcula para cada muestra según la ecuación:

$$s_e^2 = \frac{\sum_{i=1}^S (r_{m,i} - r_{m,i,predicho})^2}{S - m}$$

donde  $S$  es el número de sensores,  $m$  el número de componentes estudiados,  $r_{m,i}$  las respuestas de la muestra a cada sensor y  $r_{m,i,predicho}$  los valores de respuestas predichos, que se calculan previamente a partir de las concentraciones predichas por el modelo y la matriz  $K$  ( $r_{m,i,predicho} = c_m \cdot K$ ).

La elección de los niveles de concentración de cada analito en cada experimento del modelo de calibración y la elección de los sensores (longitudes de onda) es esencial para minimizar el error cometido en el cálculo de las concentraciones de los componentes en las muestras reales.

En la etapa de calibrado, el error relativo cometido al estimar la matriz  $K$  está relacionado con el error relativo cometido al medir las respuestas  $R$  (errores experimentales) a través de un coeficiente de proporcionalidad, que es la condición de la matriz de concentraciones,  $C$ .

$$\frac{|\Delta K|}{|K|} \leq \text{cond}(C) \cdot \frac{|\Delta R|}{|R|}$$

En la etapa de predicción, el error relativo cometido al calcular las concentraciones de los analitos en las muestras está relacionado con el error relativo cometido en la determinación experimental de las respuestas a través de la condición de  $K$ .

$$\frac{|\Delta c_m|}{|c_m|} \leq \text{cond}(K) \cdot \frac{|\Delta r_m|}{|r_m|}$$

Por tanto, la condición de C y de K amplifica los errores experimentales cometidos en las dos etapas y debe ser lo más pequeña posible.

Para una matriz que no es cuadrada ( $NS > NA$ ) la condición se calcula como la raíz cuadrada del cociente entre el valor propio más grande y más pequeño de la matriz ( ${}^t C \cdot C$ ) para la etapa de calibrado y de la matriz ( $K \cdot {}^t K$ ) para la etapa de predicción.

$$Cond(C) = \sqrt{Cond({}^t C \cdot C)} = \sqrt{\frac{\lambda_{m\acute{a}x}}{\lambda_{m\acute{i}n}}}$$

$$Cond(K) = \sqrt{Cond(K \cdot {}^t K)} = \sqrt{\frac{\lambda_{m\acute{a}x}}{\lambda_{m\acute{i}n}}}$$

También se puede calcular la sensibilidad global del método a partir de la matriz K. Para una matriz no cuadrada ( $NS > NA$ ) se obtiene a partir de la raíz cuadrada del determinante de la matriz ( $K \cdot {}^t K$ ).

$$Sensibilidad = \sqrt{|deter((K \cdot {}^t K))|}$$

- **Calibración multivariable con ajuste por mínimos cuadrados parciales (PLS)**

En PLS, considerado el mejor método en calibración multivariable, no se requiere la selección de un número pequeño de longitudes de onda, sino que utiliza toda la información del espectro o intervalos del espectro seleccionados.

Así, construye un modelo estadístico que relaciona múltiples variables independientes o respuestas X (absorbancias) con múltiples variables dependientes Y (concentraciones).

$$Y_{(n \cdot m)} = X_{(n \cdot p)} \cdot B_{(p \cdot m)} + E_{(n \cdot m)}$$

donde n es el número de muestras empleadas para construir el modelo predictivo, m es el número de analitos, p es el número de sensores, B es la matriz con los parámetros del modelo de regresión, Y es la matriz que contiene los n valores estandarizados de los m analitos, X es la matriz que contiene los n valores estandarizados de los p sensores y E es la matriz de errores.

PLS, en lugar de estimar B directamente, reduce la dimensión de los datos obtenidos concentrando la información en unas nuevas variables c, denominadas componentes o

factores, que son combinaciones lineales de las variables originales, y utiliza únicamente esos componentes para construir el modelo de regresión. Así, en las  $c$  nuevas variables se concentra la información relevante y se descarta la información no relevante y el ruido experimental, que está contenido en el resto de factores no empleados en la regresión. La pérdida de información en este proceso es mínima.

La reducción de dimensiones se realiza proyectando los elementos originales de las matrices  $X$  e  $Y$  en las coordenadas de nuevos espacios con un número menor  $c$  de dimensiones.

PLS descompone tanto la matriz de variables respuesta o independientes  $X$  (en este caso, las absorbancias de los espectros) como la matriz de variables dependientes  $Y$  (concentraciones de los analitos en los patrones) en productos de las siguientes matrices:

$$X = T^t P + F$$

$$Y = U^t Q + E$$

Donde  $T$  y  $U$  son las matrices de *scores* (puntuaciones),  ${}^tP$  y  ${}^tQ$  son las matrices de *loadings* traspuestas (cargas) y  $E$  y  $F$  son las matrices de residuos.

Los *scores* constituyen la proyección de los objetos ( $n$ ) de  $X$  e  $Y$  en los nuevos factores ( $c$ ), y sus valores para cada factor,  $t$  o  $u$ , son recogidos en las matrices  $T$  o  $U$  de *scores*, respectivamente, de dimensiones  $(n \times c)$ . Las primeras columnas de la matriz de *scores* explican la variación no aleatoria de las matrices  $X$  e  $Y$ , y contienen la mayor cantidad de varianza total de los datos experimentales en  $X$  e  $Y$ . PLS obtiene las componentes de  $T$  y  $U$  maximizando la covarianza (correlación) entre  $Y$  y  $X$ .

Los *loadings* indican la relación existente entre las variables originales y los factores definidos por el modelo, es decir, son los coeficientes que muestran la participación de las variables antiguas en las nuevas. Se recogen en las matrices  $P$  y  $Q$  que tienen dimensiones  $(c \times p)$  y  $(c \times m)$  respectivamente.

$E$  y  $F$  son las matrices que contienen el error residual del modelo, y que PLS trata de minimizar para obtener el modelo que mejor se ajuste a los datos experimentales. Estos se calculan como la diferencia entre los valores  $X$  e  $Y$  experimental y  $X$  e  $Y$  predichos ( $T^t P$ ,

U<sup>t</sup>Q). De esta forma T<sup>t</sup>P contiene la información relevante de las respuestas (exenta de ruido) y U<sup>t</sup>Q contiene las verdaderas concentraciones (exentas de ruido).

Los coeficientes del modelo de regresión (matriz B) se obtienen resolviendo la ecuación matricial  $U = T \cdot B$ , y permitirán posteriormente predecir las respuestas  $Y_m$  de nuevas muestras a partir de los registros de sus señales  $X_m$  mediante la ecuación matricial:

$$Y_m = X_m \cdot B$$

Este modelo permite que las variables, tanto en X como en Y, puedan estar correlacionadas (en CLS era necesaria la condición de ortogonalidad), así como que tanto X como Y tengan error (los métodos de regresión clásicos asumen que las concentraciones de los patrones no tienen error). Además, permite construir modelos de regresión predictivos simples (pocos componentes) aunque el número de respuestas y/o analitos sea muy grande, así como que la matriz X tenga más variables (p) que observaciones (n).

- Validación del modelo

Antes de realizar la etapa de predicción es necesario validar o evaluar la capacidad del modelo para predecir el/los analitos en nuevas muestras. Esta evaluación puede realizarse por medio de un conjunto externo de monitoreo (*monitoring set*) o por medio de una validación interna, que emplea el mismo conjunto de calibración (*training set*). Esta última forma se denomina validación cruzada (*cross-validation*). Hay diferentes alternativas para realizar la validación cruzada, como seleccionar un pequeño número de muestras del conjunto de calibración para realizar la validación, aunque el procedimiento más utilizado es el denominado “dejar uno fuera” (*leave-one-out*).

Para un conjunto n muestras consiste en dejar fuera una de las muestras, construir un modelo de calibración con las n-1 muestras restantes y predecir la concentración de la muestra apartada empleando este nuevo modelo. Este procedimiento se repite hasta que todas las muestras han sido dejadas fuera una vez. De esta manera se calcula el valor de PRESS o Suma de Cuadrados del Error de Predicción (*Prediction Error Sum of Squares*), además de la predicción de R<sup>2</sup>.

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (c_{i(pred)} - c_{i(real)})^2$$

Lo primero, como PLS es un método basado en la reducción de variables, es clave seleccionar el número óptimo de factores para que el modelo incorpore la información relevante, pero excluya el ruido (maximice la varianza explicada y minimice los residuales). Para disminuir el error hay que aumentar el número de factores, pero este no puede ser ilimitado, ya que a partir de un valor el modelo incorpora factores de ruido que dan lugar a un sobreajuste en donde se considera al ruido como un componente a ajustar. Esto se puede evaluar utilizando el criterio del mínimo PRESS (mínimo error de predicción) o el más alto  $R^2$  de predicción.

También existen otros parámetros para evaluar la calidad de la calibración y elegir el número óptimo de factores, como el error estándar promedio de validación cruzada (*MSECV, Mean Square Error of Cross Validation*):

$$MSECV = \frac{\sum_{i=1}^n (c_{i(pred)} - c_{i(real)})^2}{n}$$

Así, se puede seleccionar el número de factores representando el MSECV frente al número de factores y seleccionando el mínimo o el primer mínimo local.

También se debe estudiar el porcentaje de varianza explicada en X y en Y en cada componente, que determina cuanta información de las variables originales es recogida por los nuevos factores. Se debe elegir el número de componentes que explique una cantidad significativa de varianza.

Una vez obtenido el número óptimo de factores se realiza de nuevo la validación cruzada para estudiar el resto de parámetros que evalúan la calidad del modelo de regresión (Análisis de Varianza, gráfico de valores reales vs. Predichos, residuos, etc.).

- **Método de adiciones patrón generalizado (GSAM)**

Esta técnica multivariable permite calcular las concentraciones de los diferentes componentes de una muestra a partir de la medida de la absorbancia a diferentes longitudes de onda y los coeficientes calculados previamente con disoluciones que contenían la muestra y cantidades conocidas de cada componente.

El método consiste en la obtención de los coeficientes que relacionan la absorbancia con la concentración preparando una serie de disoluciones que contengan una cantidad (volumen, masa o concentración) conocida de muestra y diferentes adiciones estándar de patrones puros de cada uno de los analitos. Tras registrar los espectros se toma la absorbancia de un número de longitudes de onda igual o mayor al número de analitos (sensores). El número de adiciones estándar realizadas (número de experimentos o matraces) debe ser igual o mayor al número de analitos.

De esta forma se obtiene un modelo de regresión que, expresando en forma matricial, es el siguiente:

$$R = C \cdot K + e$$

donde R son las respuestas de los NS sensores de la muestra sin adiciones y después de las n adiciones estándar ( $n + 1 \times NS$ ), C es la matriz de concentraciones (o bien masa o volumen, según la forma de realizar las adiciones) de los m analitos en la muestra y tras las n adiciones estándar ( $n + 1 \times r$ ), K es la matriz de coeficientes ( $m \times NS$ ) y e es el error residual.

Como la concentración de la muestra no se conoce, las matrices R y C se pueden escribir como:

$$r_0 + \Delta R = (\Delta C + c_0) \cdot K$$

donde  $r_0$  y  $c_0$  son las respuestas de los NS sensores ( $1 \times NS$ ) y las concentraciones de los analitos ( $1 \times m$ ) de la muestra y  $\Delta R$  y  $\Delta C$  son los incrementos en la respuesta de los NS sensores ( $n \times NS$ ) y los incrementos en la concentración de cada analito ( $n \times m$ ) entre cada adición estándar y la muestra.

Por tanto, K se obtiene resolviendo la siguiente ecuación matricial:

$$\Delta R = \Delta C \cdot K$$

Los cálculos matriciales a realizar son los mismos que los utilizados en calibración multivariable con mínimos cuadrados clásicos, pero con las matrices de incrementos:

$${}^t \Delta C \cdot \Delta R = {}^t \Delta C \cdot \Delta C \cdot K$$

$$({}^t \Delta C \cdot \Delta C)^{-1} \cdot {}^t \Delta C \cdot \Delta R = ({}^t \Delta C \cdot \Delta C)^{-1} ({}^t \Delta C \cdot \Delta C) \cdot K$$



$$K = ({}^t\Delta C \cdot \Delta C)^{-1} {}^t\Delta C \cdot \Delta R$$

Las varianzas en los coeficientes obtenidos para cada analito en cada sensor también se obtienen de la misma forma que en calibración multivariable CLS, pero con las matrices de incrementos de la concentración y la respuesta y siendo n el número de adiciones estándar realizadas.

$$s_k^2 = s_e^2 \cdot ({}^t\Delta C \cdot \Delta C)^{-1}$$

$$s_{e,p}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\Delta R_{i,j} - \Delta R_{i,j,predicho})^2}{n - m}$$

Una vez obtenido K se predicen las concentraciones de la muestra también mediante operaciones matriciales:

$$r_0 = c_0 \cdot K$$

$$r_0 \cdot {}^t K = c_0 \cdot K \cdot {}^t K$$

$$r_0 \cdot {}^t K \cdot (K \cdot {}^t K)^{-1} = c_0 \cdot (K \cdot {}^t K) \cdot (K \cdot {}^t K)^{-1}$$

$$c_0 = r_0 \cdot {}^t K \cdot (K \cdot {}^t K)^{-1}$$

Las varianzas en las concentraciones obtenidas de cada analito en cada muestra se calculan según las mismas expresiones que en CLS.

$$s_c^2 = s_e^2 \cdot ({}^t K \cdot K)^{-1}$$

$$s_e^2 = \frac{\sum_{i=1}^S (r_{0,i} - r_{0,i,predicho})^2}{S - m}$$

En GSAM-CLS también es esencial la elección de los niveles de concentración en los que se adiciona cada analito en cada uno de los matraces, así como la elección de las longitudes de onda (sensores) elegidas para el cálculo de la concentración real de la muestra.

Se cumple que el error relativo cometido al estimar la matriz K está relacionado con el error relativo cometido al medir las respuestas R (errores experimentales) a través del valor de la condición de la matriz de incrementos de concentración.

$$\frac{|\Delta K|}{|K|} \leq \text{cond}(\Delta C) \cdot \frac{|\Delta R|}{|R|}$$

Y que el error relativo en las concentraciones reales está relacionado con el error experimental en la medida de las respuestas a través de la condición de K, igual que en el caso de CLS.

$$\frac{|\Delta c_0|}{|c_0|} \leq \text{cond}(K) \cdot \frac{|\Delta r_0|}{|r_0|}$$

Por ello, es importante el orden en los que se realicen las adiciones, ya que una mala condición de  $\Delta C$  amplifica los errores experimentales.

Anteriormente se ha descrito el tratamiento matemático del método GSAM con mínimos cuadrados clásicos (CLS), pero la resolución matemática también se puede llevar a cabo por mínimos cuadrados parciales (PLS).

En este caso, la matriz X de variables independientes corresponde con la matriz de incrementos de absorbancias a cada longitud de onda y la matriz Y de variables dependientes con la matriz de incrementos de concentración de cada analito, entre cada adición estándar y la muestra en ambos casos. Con estos datos se construye un modelo de regresión utilizando el mismo procedimiento descrito en el apartado PLS, con el que posteriormente se predice la concentración de la muestra.

### **3.5. Determinación por RP-HPLC-UV**

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 Ultravioleta-Visible de longitud de onda variable y desgasificador. Se empleó una columna en fase inversa Kromaphase C18 de dimensiones 150 x 4,6mm y diámetro de partícula 5  $\mu\text{m}$  (marca Scharlau).

Las condiciones óptimas para la separación se obtuvieron tras la consulta de bibliografía (*Franeta et al., Akay et al., Elkady Y., Rizwan Khan et al.*) y la realización de diferentes ensayos. La composición de la fase móvil se mantuvo en régimen isocrático con un 30% de metanol, 10% acetonitrilo y 10% tampón fosfato 0.01M. El flujo de la fase móvil fue de 1 ml/min y la temperatura de la columna se mantuvo a 25°C.

El tampón fosfato se preparó mezclando las cantidades necesarias de ácido fosfórico (85%, *Scharlau*) y dihidrógeno fosfato de potasio (99%, *Panreac*) ( $\text{pK}_a=2,15$ ) para

conseguir un pH de 2,7. Todos los disolventes fueron de grado HPLC (AcN, *Labkem*; MeOH, *Sigma-Aldrich*).

El pH de la fase móvil constituye un factor crítico, ya que el ácido acetilsalicílico en condiciones básicas se hidroliza a ácido salicílico.

Las longitudes de onda elegidas para el detector corresponden con las de máxima absorción para cada analito, para obtener la mayor sensibilidad, y se eligieron previamente a partir de los espectros de absorción UV-Vis de cada uno de ellos. Tras determinar a qué tiempo de retención eluía de la columna cada analito a partir de la determinación cromatográfica de cada patrón puro, se eligieron las siguientes condiciones del detector:

*Tabla 10: Condiciones del detector UV-Vis*

Tiempo (min)	$\lambda$ , nm
0 - 1.7	264
1.7 - 4.5	243
4.5 - 6	231

El equipo se calibró con multipatrones de concentración comprendida entre 0.5-16 ppm de cada analito, de los que se registró los tiempos de retención y áreas de pico. Algunos patrones se midieron por duplicado para evaluar la falta de ajuste del modelo de regresión obtenido. Los multipatrones se prepararon a partir de disoluciones madre patrón de 1000 ppm individuales preparadas pesando aproximadamente 50 mg de cada compuesto, con precisión  $\pm 0.1$  mg, y disolviéndolo con 5 mL de metanol y agua desionizada hasta enrasar a 50 mL. Éstas se introdujeron en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos para asegurar la completa solubilización.

Una vez calibrado el equipo, se analizaron las muestras de medicamentos en las mismas condiciones, cuya preparación de muestra es la misma que la descrita en el apartado **3.3**. Todas ellas se analizaron por triplicado.

### 3.6. Cálculo de la incertidumbre de los resultados

Los resultados obtenidos por las diferentes técnicas se expresan junto al valor del error en la concentración introducido por el método y la incertidumbre combinada, que tiene en cuenta las contribuciones de las variables experimentales.

$$C(mg/comprimido) = C_{dil} \left( \frac{mg}{L} \right) \cdot V(L) \cdot \frac{Vf(mL)}{Vi(mL)} \cdot \frac{masa_{comprimido}(g)}{masa_{pesada}(g)}$$

Las contribuciones de cada variable independiente a la incertidumbre total,  $u(c, x_i)$ , se estimaron a partir de las incertidumbres típicas de cada variable  $u(x_i)$  mediante el algoritmo de Kragten; la incertidumbre combinada se calculó según la ecuación de propagación del error:

$$u_c^2 = \sum u^2(c, x_i)$$

Para HPLC la incertidumbre de la concentración diluida se debe al calibrado y se calcula según la siguiente expresión:

$$u_{cdil} = \frac{s_e}{b_1} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(C_{dil} - \bar{c})^2}{\sum (c_i - \bar{c})^2}}$$

Para el resto de técnicas se obtiene a partir de la varianza residual ( $s_c$ ), según se explica en los correspondientes apartados.

La incertidumbre de la masa y el volumen se estiman de la misma forma para todos los métodos utilizados según las siguientes expresiones:

$$u_{volumen} = \sqrt{u_{rep}^2 + u_{cal}^2 + u_{T^a}^2}$$

$$u_{T^a} = \frac{V \cdot \Delta T \cdot \gamma}{\sqrt{3}} \quad u_{rep} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad u_{cal} = \frac{Tolerancia}{\sqrt{6}}$$

$$u_{masa} = \frac{U_{balanza}}{2}$$

A continuación, se calculó el porcentaje de contribución de cada término a la incertidumbre combinada según la siguiente expresión:

$$\%Contrib(c) = \frac{u^2(c, x_i)}{u_c^2} \cdot 100$$

Según los resultados obtenidos (ver Anexo I) se observa que la mayor contribución se debe al error en la concentración diluida obtenido por los diferentes métodos y, además en algunos casos, también hay una elevada contribución de la masa pesada para el análisis, al ser ésta muy pequeña. Por ello, para el cálculo final de la incertidumbre combinada sólo se consideraron estos dos términos.

Todos los cálculos descritos han sido realizados con Excel (calibración uni y multivariante), Statgraphics Centurion 19 (PLS) y Matlab (condición de la matriz).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Determinación por espectroscopía UV-Vis

Los espectros UV-Visible de cada uno de los analitos puros se muestran en la Figura 2. Su registro es esencial para seleccionar las longitudes de onda necesarias para HPLC y las técnicas de calibración multivariable con ajuste por mínimos cuadrados clásicos.

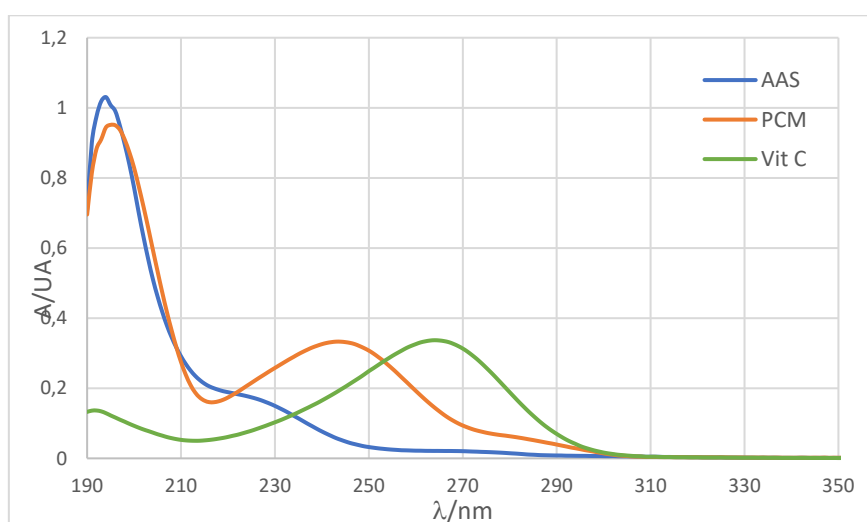


Figura 2: Espectros de absorción UV de PCM, AAS y VitC

Las líneas de calibrado obtenidas para cada uno de los analitos a las respectivas longitudes de onda de máxima absorción (225 nm para AAS, 243 nm para PCM, 264 nm para VitC) se muestran en la Figura 3, en las que se observa su rango lineal hasta 30 o 40 ppm, así como la mayor sensibilidad para el PCM.

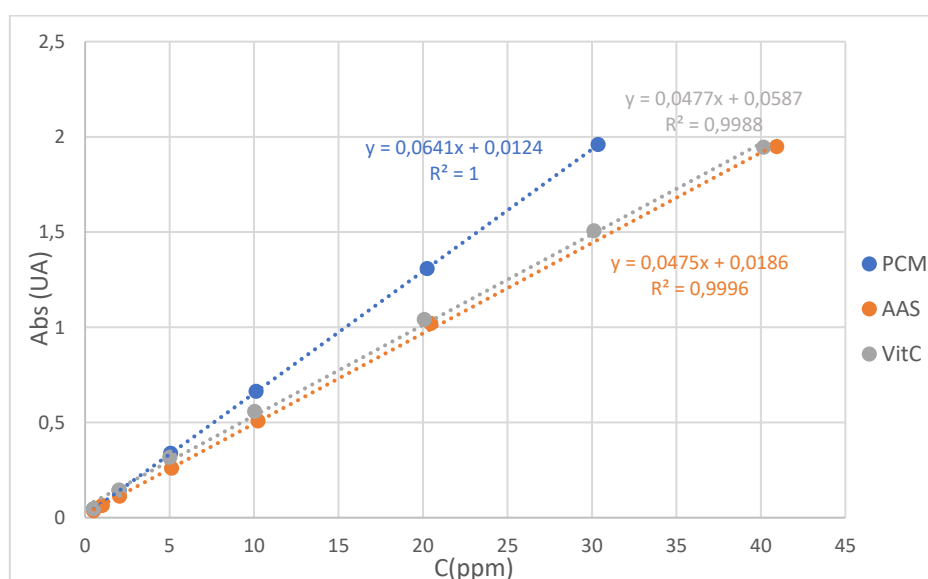


Figura 3: Líneas de calibrado UV-Vis PCM, AAS, VitC

Los espectros de registrados con las disoluciones preparadas a partir de cada una de los 25 patrones de calibración se muestran en la Figura 4. Los espectros de las muestras se muestran en el Anexo III.

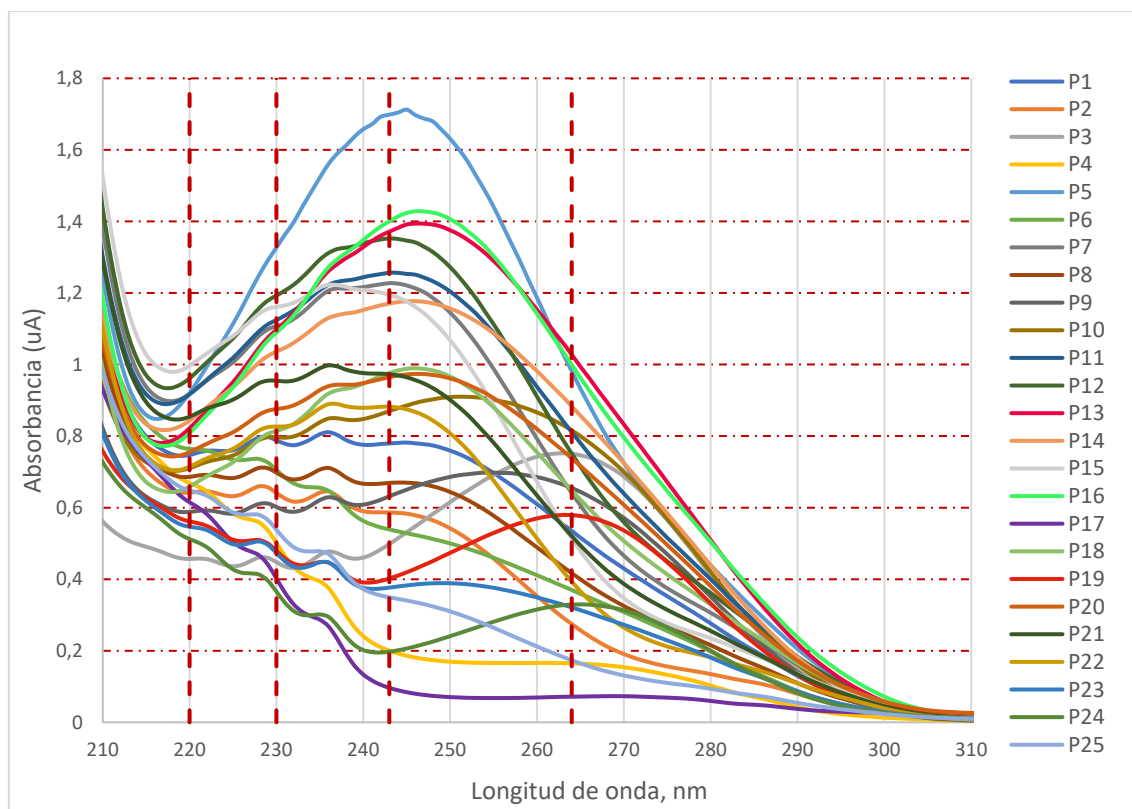


Figura 4: Espectros de los 25 patrones de calibración

Las líneas discontinuas muestran las longitudes de onda elegidas para realizar los cálculos por CM-CLS.

Se observa que los espectros no tienen la misma forma que los de los componentes puros, especialmente entre 220 y 240nm. Esto se debe a que uno de los excipientes, la sacarina, presenta una elevada absorción en esta zona (Anexo IV).

- **Calibración multivariada con ajuste por CLS**

En calibración multivariable con CLS es esencial que la matriz de calibración sea ortogonal. Por ello se comprobó que no hubiera correlación en los 25 experimentos entre los niveles de concentración de cada par de componentes calculando su coeficiente de correlación (Tabla 11) y realizando una representación gráfica (Figura 5).

Tabla 11: Coeficientes de correlación de los tres analitos

r	
PCM-AAS	0,000
PCM-VitC	0,000
AAS-VitC	0,000

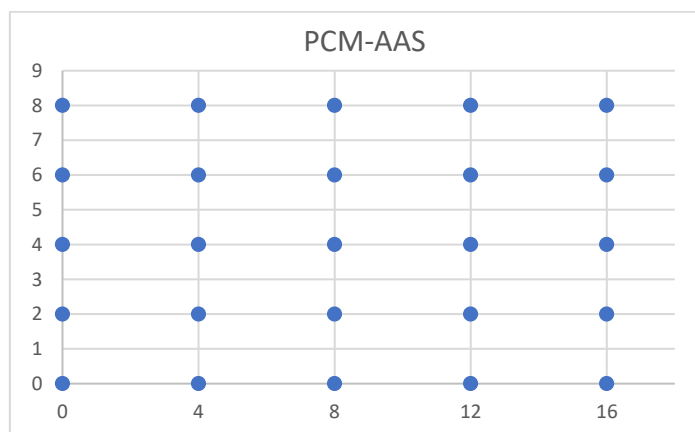


Figura 5: Comprobación ortogonalidad del PCM y AAS

Para la matriz C con las concentraciones reales utilizadas se obtuvo un valor de la condición de 3.54, lo que corrobora que el método es muy sensible a cambios en las concentraciones y a la pérdida de ortogonalidad.

Las longitudes de onda elegidas para realizar la calibración fueron 220, 230, 243 y 264 nm, ya que entre 220 y 230 nm se encuentra la mayor absorción del AAS y 243 nm y 264 nm son las longitudes de máxima absorción del PCM y VitC, respectivamente.

K se calculó a partir de la resolución de la ecuación matricial:

$$R_{25 \times 4} = C_{25 \times 3} \cdot K_{3 \times 4}$$

obteniéndose los siguientes coeficientes:

$$K = \begin{bmatrix} 0,03781 & 0,05383 & 0,06818 & 0,03006 \\ 0,05849 & 0,04165 & 0,01149 & 0,00478 \\ 0,02167 & 0,02890 & 0,04127 & 0,05458 \end{bmatrix}$$

En esta matriz, las filas se corresponden con PCM, AAS y VitC, respectivamente, mientras que las columnas se corresponden con las longitudes de onda empleadas, en orden creciente. Su condición tiene un valor de 5,48.



A continuación, se predicen las concentraciones de las muestras resolviendo la siguiente ecuación:

$$r_{m(n \times 4)} = C_{m(n \times 3)} \cdot K_{3 \times 4}$$

donde n es el número de muestras, 4 el número de sensores y 3 el número de analitos.

Por último, se calculan los errores en la concentración,  $s_c$  y la incertidumbre combinada, como se describió en la sección experimental. Los resultados obtenidos para cada réplica de las muestras se muestran en la Tabla 12.

Tabla12: Resultados obtenidos por calibración multivariable con CLS

	PCM (mg/comprimido)				AAS (mg/comprimido)				VitC (mg/comprimido)			
	C <sub>ref</sub>	C <sub>obt</sub>	s <sub>c</sub>	u	C <sub>ref</sub>	C <sub>obt</sub>	s <sub>c</sub>	u	C <sub>ref</sub>	C <sub>obt</sub>	s <sub>c</sub>	u
As1					400	223,7	0,075	3,9	240	454,9	0,103	5,6
As2						216,4	0,064	4,7		456,0	0,088	4,7
As3						223,3	0,068	5,2		453,3	0,093	5,2
Al1	650	569,0	0,049	4,5					500	490,0	0,051	4,1
Al2		562,3	0,004	4,0						508,8	0,004	3,6
Al3		535,3	0,034	4,0						541,1	0,035	4,1
De1					388,8	196,8	0,093	6,7	500	868,1	0,127	9,6
De2						194,2	0,050	3,5		778,6	0,069	5,3
De3						189,5	0,055	3,8		730,7	0,076	5,6
Do1					500	365,2	0,157	9,8	250	344,4	0,215	13,2
Do2						378,1	0,192	12,1		398,8	0,263	16,5
Do3						380,7	0,134	8,5		388,5	0,184	11,5
Ef1	330	195,7	0,187						200	393,4	0,196	8,3
Ef2		193,2	0,177							409,9	0,185	7,8
Ef3		192,5	0,209							404,7	0,219	9,0

Se observa que el método no realiza buenas predicciones de las muestras reales, ya que se obtienen valores totalmente diferentes a excepción del Algidol, en el que se acercan un poco más.

Esta desviación puede ser causada por el un elevado solapamiento de los espectros de los tres analitos, especialmente en el caso del ácido acetilsalicílico, en el que la absorbancia es muy pequeña y se encuentra completamente solapado con el paracetamol. Debido a esto, la condición de K obtenida es muy elevada (5,48), siendo los sensores poco selectivos a cada analito.

Además, la matriz analítica de las muestras reales es diferente a las de calibración por la presencia de excipientes no simulados en las muestras sintéticas, lo que puede afectar en la predicción.

- **Calibración multivariada con ajuste por PLS**

- Obtención y validación del modelo de regresión PLS

Para la resolución con PLS se utiliza el mismo conjunto de calibración que para calibración multivariada por CLS, pero en lugar de elegir cuatro longitudes de onda, se obtiene la información de un intervalo relevante del espectro. La región del espectro elegida para cada muestra se observa en la Tabla 13.

*Tabla13: Intervalos de longitudes de onda elegidos*

Muestra	Intervalo de $\lambda$
Aspirina C	220-280 nm
Algídol	215-290 nm
Desenfriol	220-280 nm
Dolmen	215-300 nm
Efferaldol	220-300 nm

El intervalo de longitudes de onda comprendido entre 220-280nm es común para dos muestras (Aspirina C y Desenfriol), por lo que a continuación se explicará la obtención y validación del modelo de regresión utilizando este intervalo (61 longitudes de onda o sensores).

En primer lugar, se debe elegir el número óptimo de componentes del modelo de regresión a partir de los valores de la suma de cuadrados del error de predicción (PRESS) y los valores de  $R^2$ , ya que el modelo debe explicar una cantidad significativa de varianza.

Para el paracetamol (Figura 6), se observa que el máximo valor de la predicción de  $R^2$  y el mínimo valor de PRESS calculados durante la validación cruzada (CV) se obtiene para 7 componentes. Para el ácido acetilsalicílico (Figura 7) los dos primeros componentes explican una cantidad muy poco significativa de varianza, alcanzándose el máximo  $R^2$  (mínimo PRESS) para seis componentes. Por último, para la Vitamina C (Figura 8) se obtiene que el número óptimo de componentes es cinco.

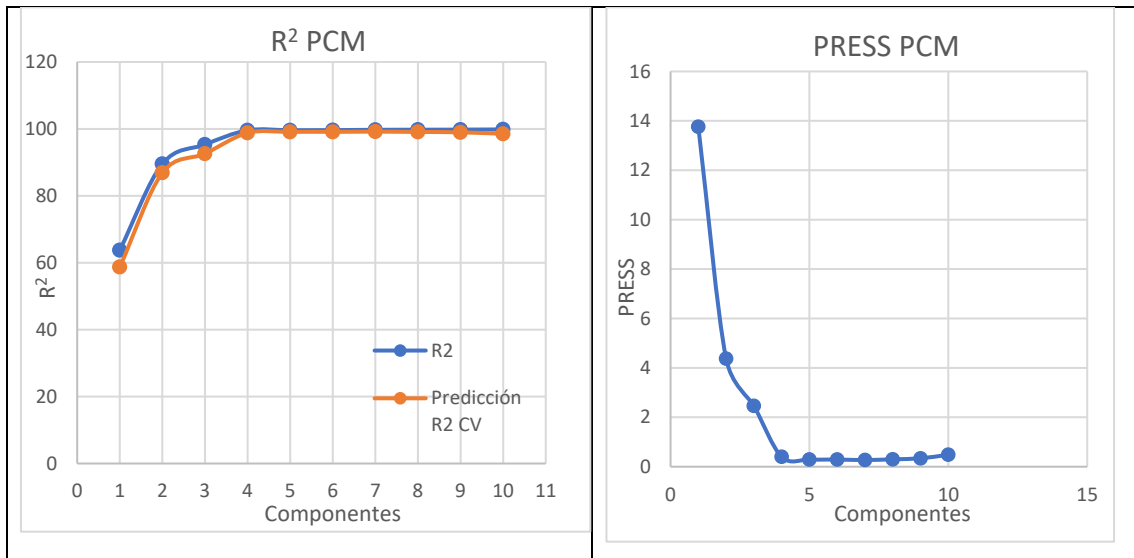


Figura 6: Coeficiente de determinación y valor PRESS para modelo de PCM

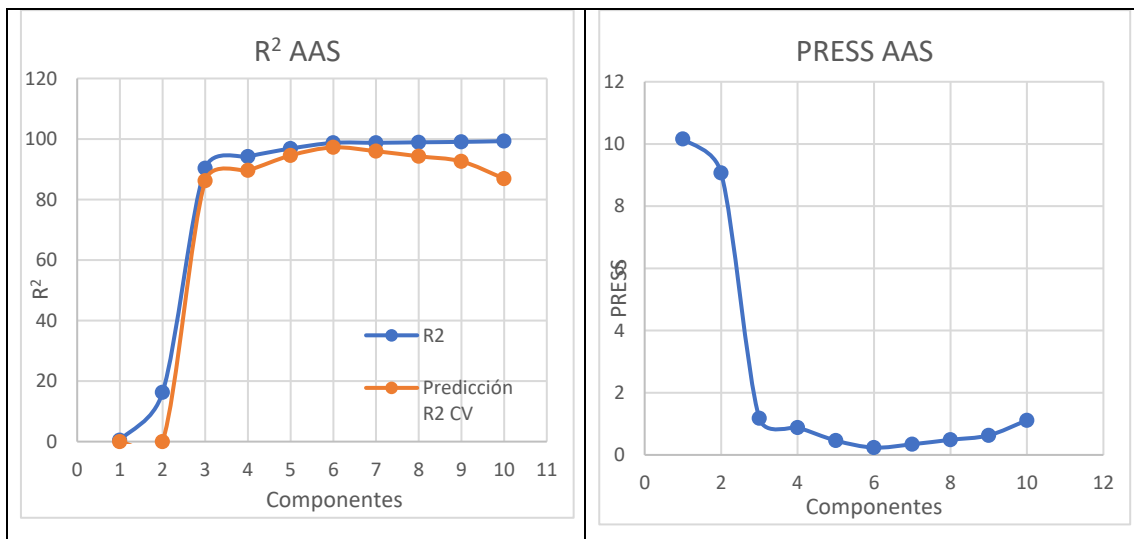


Figura 7: Coeficiente de determinación y valor PRESS para modelo de AAS

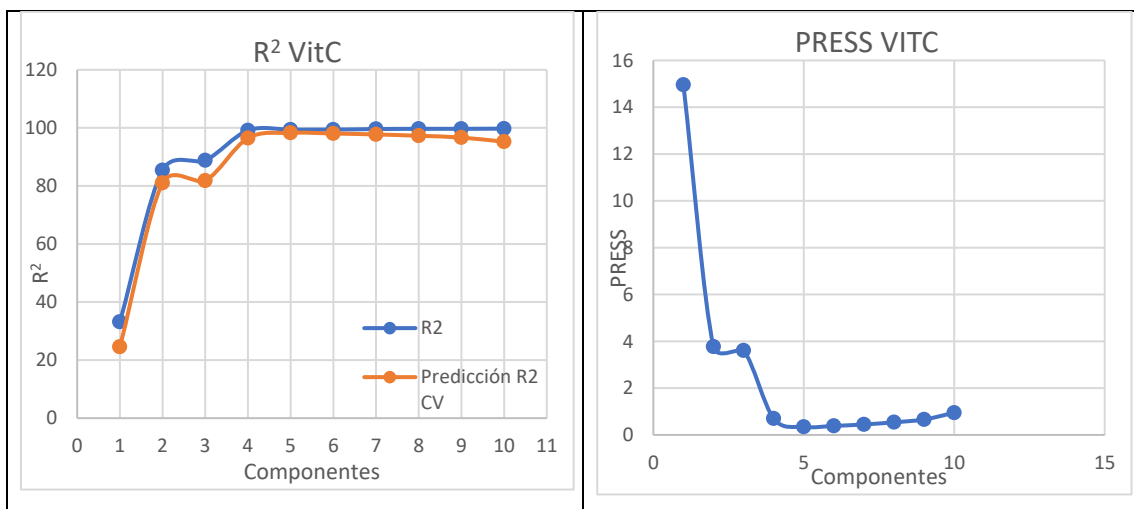


Figura 8: Coeficiente de determinación y valor PRESS para modelo VitC

Para elegir finalmente el número de componentes para el modelo se representa el porcentaje de variación promedio para los tres analitos en X, en Y y en la predicción de  $R^2$  (Figura 9).

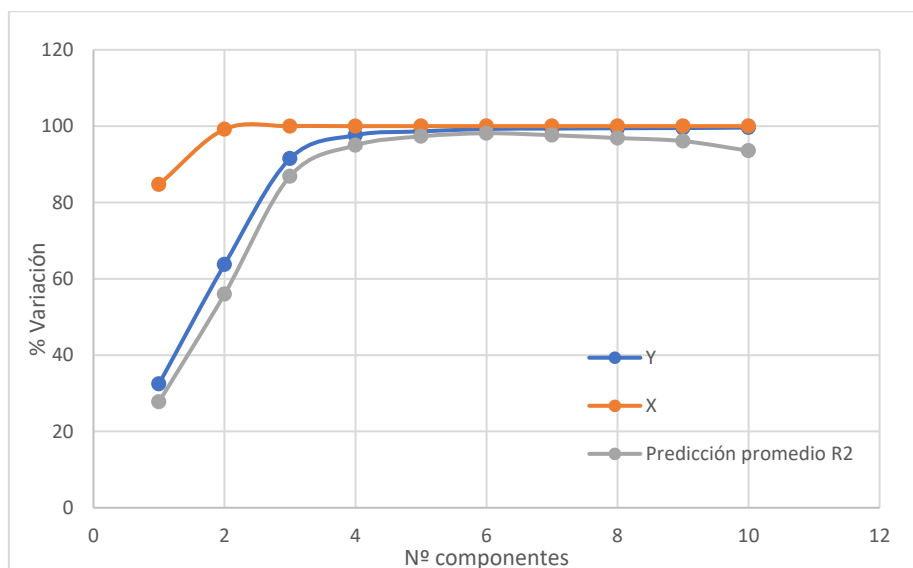


Figura 9: Elección final Nº óptimo de componentes

Se observa que el valor óptimo es seis. Así, toda la información que relaciona los tres analitos con las absorbancias registradas a 61 longitudes de onda queda contenida en estos seis componentes que son combinaciones lineales de las variables (longitudes de onda) originales.

A continuación, se debe validar el modelo de regresión generado. Para ello se realiza de nuevo la validación cruzada, esta vez con el número de componentes elegido, y se estudian diferentes parámetros.

- ANOVA

Mediante el ANOVA se estima la validez de la regresión para cada analito. En todos los casos se obtiene que el valor de p es 0.000, por lo que el modelo de regresión generado explica una cantidad significativa de varianza a un nivel de significación del 5%.

- Gráfico valores reales vs. predichos y residuos

Mediante la representación gráfica de los valores de concentración reales frente a los valores predichos obtenidos durante la validación cruzada se evalúa la capacidad de predicción del modelo. Así, cuanto menor sea la diferencia entre estos dos valores, mejor es el modelo generado y mejores predicciones se obtendrán para las muestras.

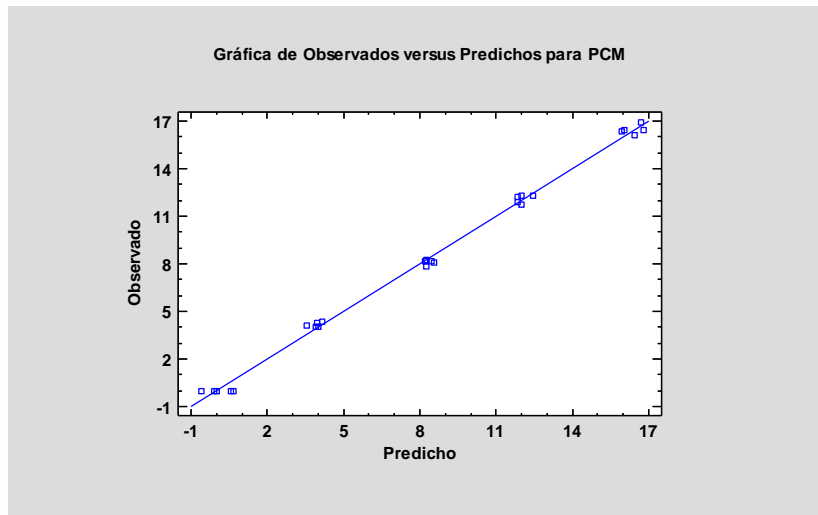


Figura 10: Gráfico valores reales vs. predichos PCM

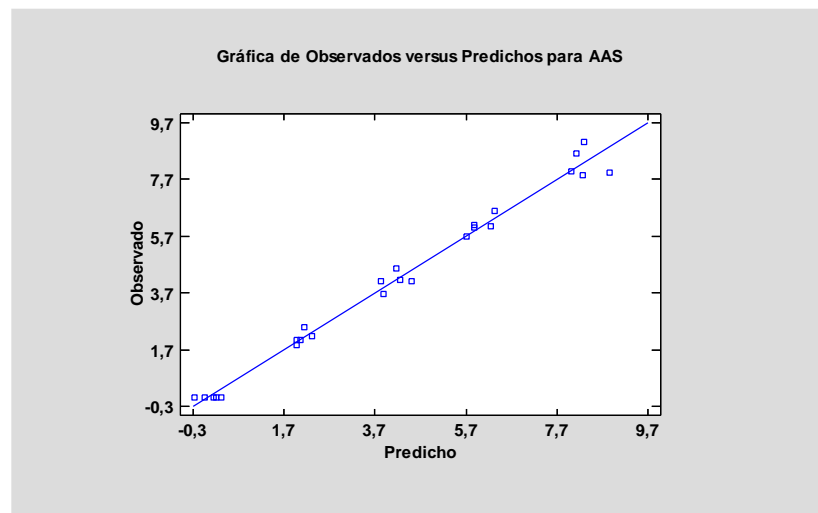


Figura 11: Gráfico valores reales vs. predichos AAS

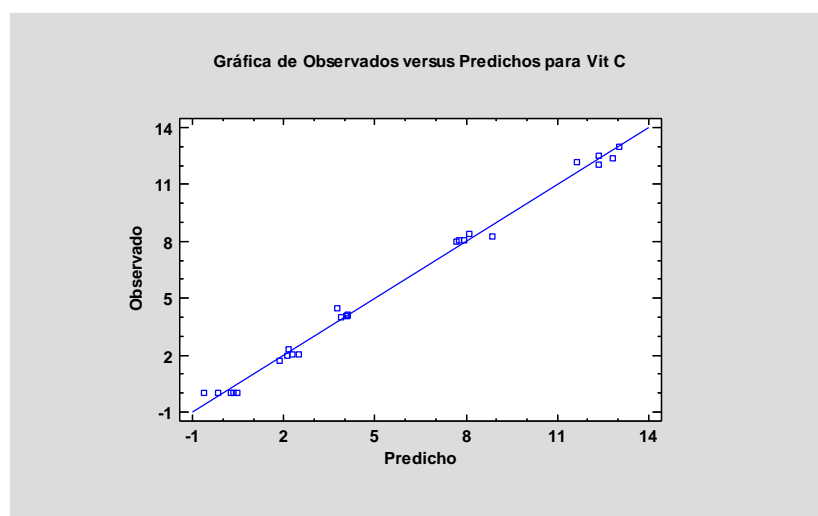


Figura 12: Gráfico valores reales vs. predichos VitC

Para el PCM (Figura 10) se observa una buena concordancia entre los valores predichos y reales para todos los niveles de concentración. Para el AAS (Figura 11) hay una peor concordancia, especialmente en el último nivel de concentración. Para la VitC (Figura 12) también hay buena concordancia entre valores reales y predichos.

Los residuos son la diferencia entre los valores de concentración reales y los predichos por el modelo. Los requisitos que deben satisfacer en regresión por mínimos cuadrados es que sean lo más pequeños posibles, se distribuyan aleatoriamente y sigan una distribución normal. Las figuras 13 a 15 muestran los gráficos de probabilidad normal de los residuos y éstos frente al nivel de concentración para cada analito.

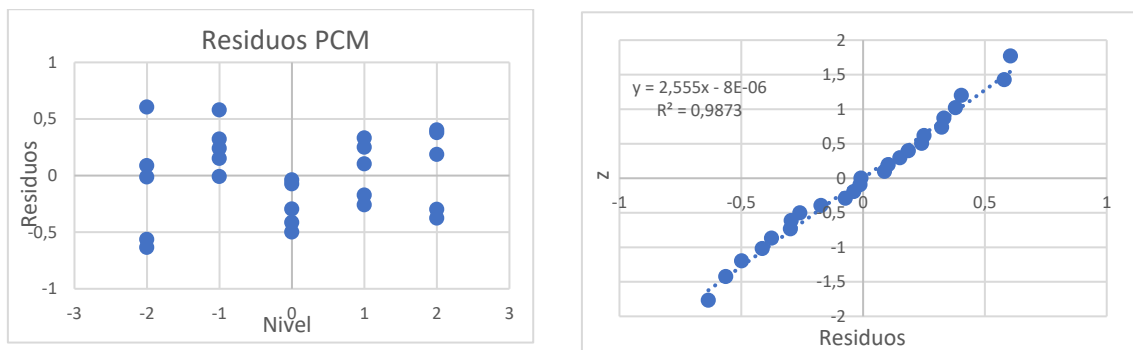


Figura 13: Gráficos de residuos PCM

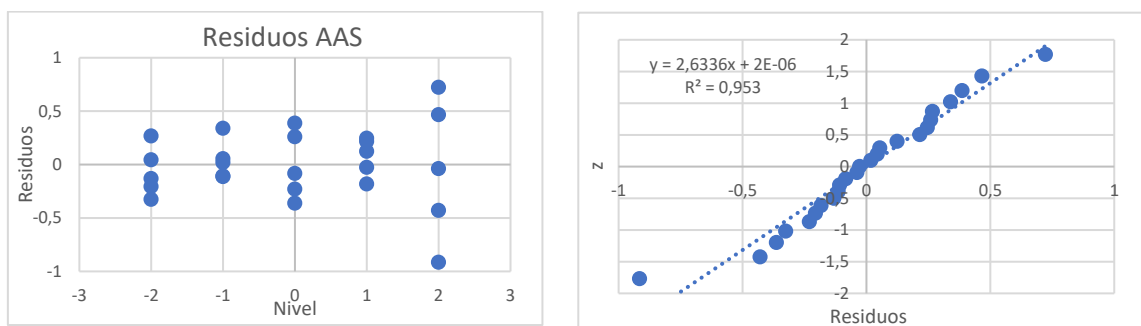


Figura 14: Gráficos residuos AAS

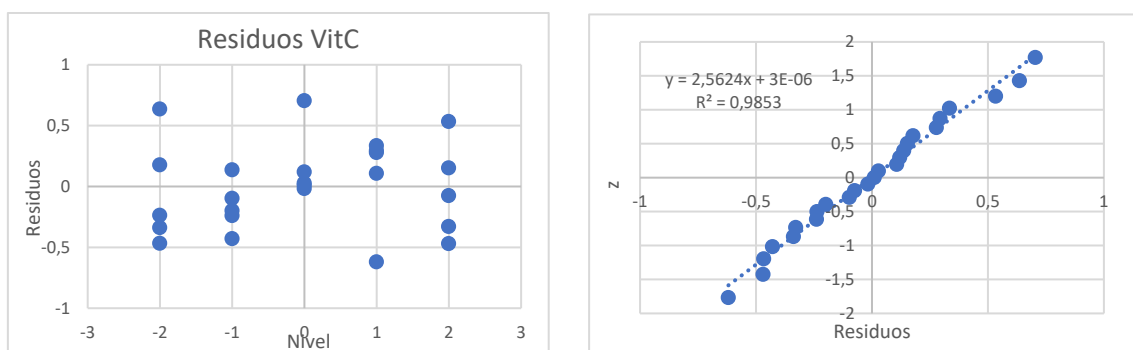


Figura 15: Gráficos residuos VitC

Se observa que para los tres analitos los residuos siguen una distribución normal, ya que se ajustan a una línea recta (valores de  $R^2$  entre 0.95 y 0.98). En el ácido acetilsalicílico hay un residuo demasiado elevado que se aleja de la linealidad.

Además, los residuos están distribuidos aleatoriamente en torno a 0. Los valores más elevados, como se había observado anteriormente en el gráfico reales vs. Predichos, corresponden al nivel más alto del AAS.

Una vez validado el modelo, es posible predecir las concentraciones de nuevas muestras.

Con respecto al modelo obtenido, PLS descompone las matrices X e Y en matrices de scores (T, U) y loadings (P, Q), que tienen la información contenida en los seis componentes elegidos.

En la representación de los scores de Y (T) se pueden ver diferencias y similitudes entre las 25 muestras de calibración. Así, por ejemplo, en la representación de los scores del componente 3 frente al componente 1 (Figura 16), se observa que las muestras se separan en función del nivel de AAS.

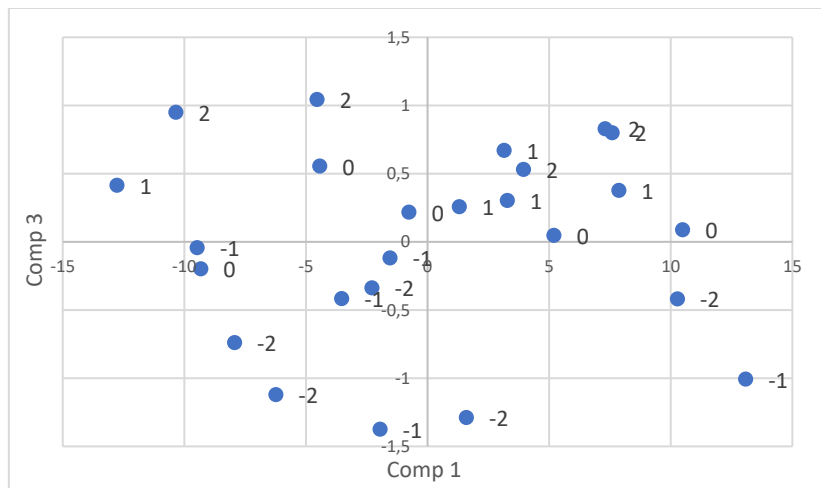


Figura 16: Gráfico de scores

Los niveles altos (1, 2) están en los scores positivos del componente 3 y los niveles bajos (-1, -2) en los negativos.

Además, al obtener el modelo de regresión, PLS calcula la matriz B de coeficientes de regresión.

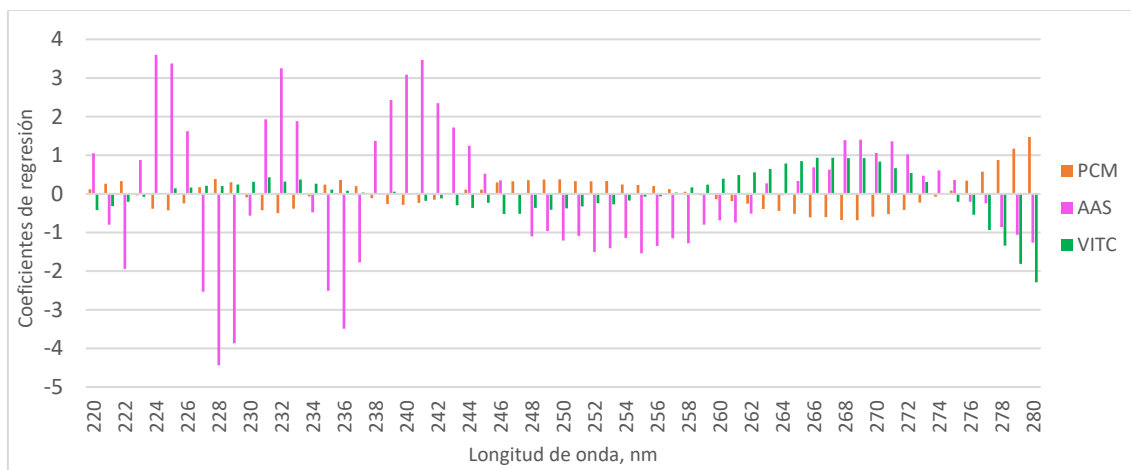


Figura 17: Coeficientes de regresión del modelo PLS

En el gráfico se observa qué zonas del espectro tienen más contribución de un analito que de otro. No hay una buena separación entre los coeficientes de los tres analitos, como sería deseable, aunque se observa una mayor contribución del ácido acetilsalicílico a bajas longitudes de onda, una ligera contribución del PCM a longitudes de onda intermedias y de la VitC a las longitudes más elevadas.

Con todos estos datos analizados anteriormente ya es posible predecir las concentraciones de nuevas muestras.

Para el resto de muestras, se realizó el mismo procedimiento empleando las absorbancias registradas en los correspondientes intervalos de longitudes de onda que se indicaron en la Tabla 13.

- Predicción de la concentración de nuevas muestras

A partir de las absorbancias medidas en el intervalo de longitudes de onda elegido y el modelo de regresión generado por PLS se predicen los valores de la concentración.

Los resultados obtenidos, junto al error introducido por el método y la incertidumbre combinada se muestran en la Tabla 14.



Tabla 14: Resultados muestras de medicamentos obtenidos por PLS

	PCM (mg/comprimido)				AAS (mg/comprimido)				VitC (mg/comprimido)			
	C <sub>ref</sub>	C <sub>obt</sub>	S <sub>c</sub>	u	C <sub>ref</sub>	C <sub>obt</sub>	S <sub>c</sub>	u	C <sub>ref</sub>	C <sub>obt</sub>	S <sub>c</sub>	u
As1					400	394,2	1,244	61,4	240	277,0	1,300	64,1
As2						389,3	1,235	59,2		276,5	1,290	61,8
As3						392,6	1,253	62,3		271,6	1,310	65,0
Al1	650	583,4	0,469	21,0					500	440,6	0,511	22,7
Al2		576,3	0,460	21,2					500	444,5	0,502	22,9
Al3		556,8	0,442	19,8					500	504,8	0,481	21,5
De1					388,8	419,6	1,331	95,7	500	563,1	1,391	99,9
De2						416,1	1,310	91,2		514,5	1,368	95,2
De3						395,4	1,310	88,6		490,6	1,368	92,6
Do1					500	669,3	1,049	63,7	250	222,8	0,882	53,5
Do2						702,4	1,022	63,5		266,6	0,859	53,3
Do3						701,2	1,023	62,6		232,9	0,860	52,5
Ef1	330	295,3	0,870	36,1					200	201,4	0,883	36,6
Ef2		302,9	0,844	34,8					206,9	0,857	35,3	
Ef3		300,9	0,878	35,5					203,1	0,891	36,0	

Los resultados obtenidos por PLS son mejores que los obtenidos por CLS. Excepto el ácido acetilsalicílico en Dolmen, que se obtiene excesivamente alto, los resultados muestran una buena concordancia con los valores de referencia declarados por los fabricantes, aunque aun así hay diferencias significativas.

En PLS, no es tanto el problema del solapamiento de los espectros (aunque también influye debido a la poca selectividad de B), pero sí el de la matriz analítica. Las muestras reales contienen otros excipientes, como aromas y colorantes no introducidos en el conjunto de calibración, que pueden causar discrepancias.

Para corroborar esta teoría se sacaron 5 muestras del conjunto de calibración, que se consideraron muestras desconocidas, y se predijo el valor de su concentración.

Para ello se utilizó como conjunto de calibración las 20 primeras muestras sintéticas, a partir de las cuales se generó y validó el modelo de regresión de la misma forma que se explicó anteriormente. La región del espectro elegida fue entre 220-290nm y el número óptimo de componentes fue siete.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15: Resultados muestras sintéticas obtenidos por PLS

	PCM (%)				AAS (%)				VitC (%)			
	C <sub>real</sub>	C <sub>obt</sub>	S <sub>c</sub>	u	C <sub>ref</sub>	C <sub>obt</sub>	S <sub>c</sub>	u	C <sub>ref</sub>	C <sub>obt</sub>	S <sub>c</sub>	u
P21	30,1	30,0	0,138	0,35	14,9	15,46	0,195	0,48	5,2	5,18	0,158	0,39
P22	30,8	30,5	0,352	0,88	4,6	5,09	0,498	1,2				
P23	9,9	9,7	0,179	0,43					5,1	5,17	0,206	0,49
P24					5,0	5,81	0,218	0,54	10,3	10,24	0,177	0,44
P25	10,0	9,4	0,221	0,54	10,2	10,79	0,313	0,77				

Se observa una buena concordancia entre los valores reales y predichos, algo peor en el caso del AAS, ya que igual que en la validación del modelo de regresión explicado anteriormente, se obtuvieron unos residuos más elevados en los niveles altos del ácido acetilsalicílico, lo que empeora las predicciones.

Esto demuestra que, cuando las muestras que se predicen tienen la misma matriz analítica que las muestras del conjunto de calibración, se obtienen buenos resultados, haciendo necesario introducir toda la variabilidad posible en el conjunto de calibración.

- **Método de adiciones patrón generalizado (GSAM)**

- GSAM-CLS

Para la resolución por este método, primero se calculó la condición de la matriz de incrementos de concentración  $\Delta C$ , para comprobar que el diseño de adiciones empleado era adecuado. Se obtuvo un valor de 1.006, que es muy próximo al valor mínimo de este parámetro (1).

Tras medir las absorbancias de la muestra y las 9 disoluciones con adiciones patrón se eligieron cinco longitudes de onda, que fueron 220, 225, 236, 245 y 264 nm, para calcular los coeficientes de K.

Los espectros obtenidos para la muestra de Aspirina C se muestran en la Figura 18. Para el resto de muestras se encuentran en el Anexo II.

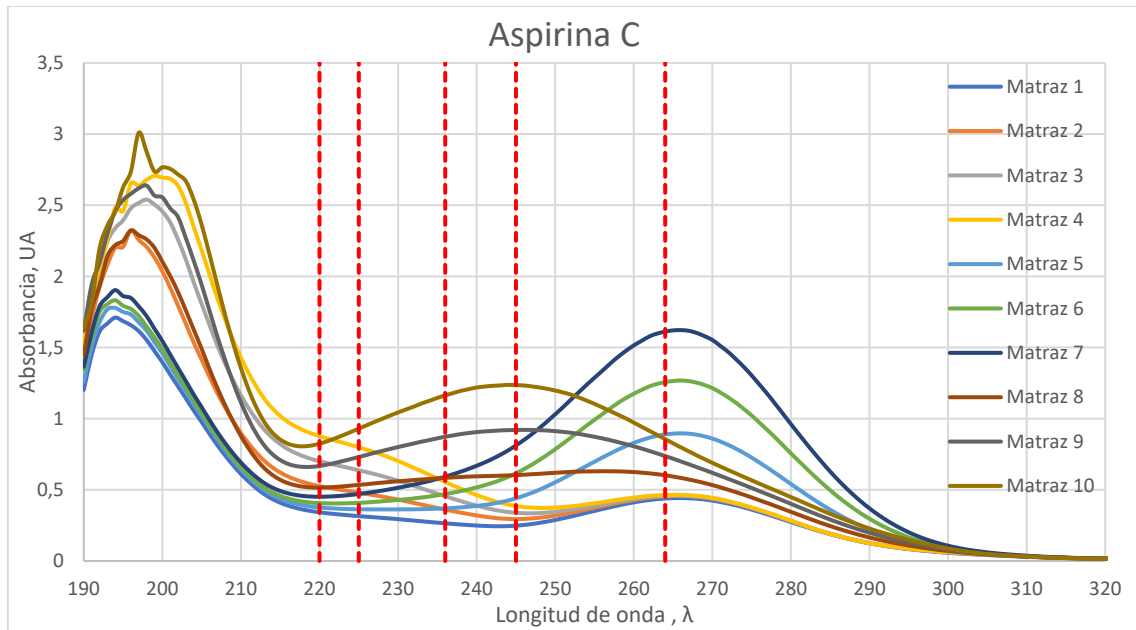


Figura 18: Espectro adiciones patrón Aspirina C

Se resolvió la siguiente ecuación matricial para cada una de las muestras para obtener K:

Los valores de la condición de K obtenidos para cada muestra se muestran en la Tabla 16. La elevada magnitud de los valores obtenidos hace sospechar que las predicciones van a tener un alto grado de incertidumbre.

Tabla 16: Valores condición K

Muestra	Condición K
Aspirina C	4,92
Algidol	10,24
Desenfriol	5,73
Dolmen	6,58
Efferaldol	4,90

A continuación, se predice la concentración de la muestra a partir de las absorbancias a las mismas longitudes de onda y los coeficientes de K, resolviendo la siguiente ecuación matricial:

$$r_{0(1 \times 5)} = c_{0(1 \times 3)} \cdot K_{(3 \times 5)}$$

Por último, se calculan los errores en la concentración,  $s_c$  y la incertidumbre combinada.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17: Resultados obtenidos por GSAM-PLS

	PCM (mg/compr)				AAS (mg/compr.)				VitC (mg/comprimido)			
	C <sub>ref</sub>	C <sub>obt</sub>	S <sub>c</sub>	u	C <sub>ref</sub>	C <sub>obt</sub>	S <sub>c</sub>	u	C <sub>ref</sub>	C <sub>obt</sub>	S <sub>c</sub>	u
<b>As</b>					400	451,7	0,235	12,0	240	281,0	0,121	6,3
<b>Al</b>	650	313,2	0,212	19,4					500	797,8	0,215	20
<b>De</b>					389	550,6	0,238	17,3	500	759,9	0,149	11
<b>Do</b>					500	707,8	0,473	29,5	250	365,9	0,352	22
<b>Ef</b>	330	326,0	0,039	1,7					200	214,6	0,031	1,3

Se observa que se obtienen buenas predicciones para la Aspirina C y Efferaldol, pero no para el resto de muestras. Esto puede ser debido al elevado solapamiento que hay entre los espectros de los analitos, lo que da lugar a coeficientes K poco selectivos. Con los valores de la condición de K se puede observar que cuando es menor de 5 se obtienen mejores predicciones que cuando se supera este valor. Por ejemplo, en el caso del Algidol, en el que los espectros están totalmente solapados y la condición de K es mayor de 10, se obtienen resultados totalmente incoherentes.

#### - GSAM-PLS

Para la resolución matemática con PLS se utilizó la misma matriz de incrementos de concentración utilizada para CLS (matriz Y) pero se tomaron las diferencias en la absorbancia de un intervalo completo del espectro. Los intervalos de longitudes de onda elegidos para cada muestra se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18: Intervalos de longitudes de onda elegidos

Muestra	Intervalo de $\lambda$
Aspirina C	215-280 nm
Algidol	220-290 nm
Desenfriol	215-280 nm
Dolmen	220-290 nm
Efferaldol	220-280 nm

A continuación, se explica la obtención y validación del modelo para el intervalo comprendido entre 220-290nm, cuyos pasos son los mismos que en calibración multivariable con PLS.

Primero se calcula el número óptimo de componentes a partir del promedio de la predicción de  $R^2$  de los tres analitos, obteniéndose que es seis componentes.

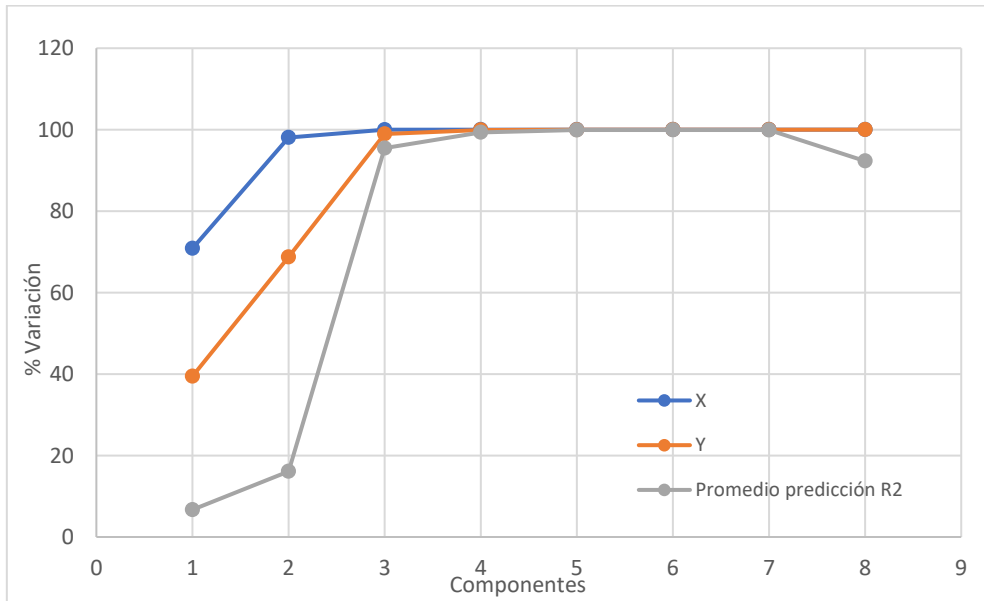


Figura 19: Elección N<sup>o</sup> óptimo de componentes

A continuación, se valida el modelo mediante un análisis de varianza y el estudio de los residuos. En el ANOVA se obtiene un valor de p menor a 0.05, por lo que el modelo de regresión generado explica una cantidad significativa de varianza. Para los tres analitos se obtuvo una buena concordancia entre los valores reales y los predichos por el modelo mediante la validación cruzada y, por tanto, unos residuos pequeños. Además, los residuos están distribuidos aleatoriamente en torno a cero y siguen una distribución normal. Se muestran como ejemplo los gráficos obtenidos para la Vitamina C.

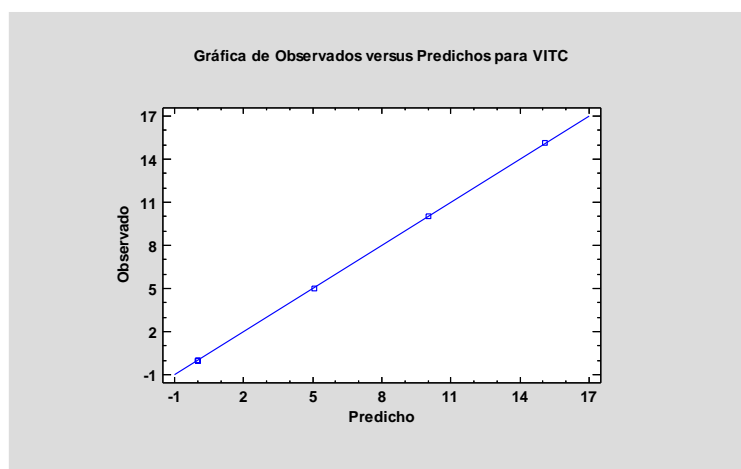


Figura 20: Gráfico valores reales vs. predichos VitC

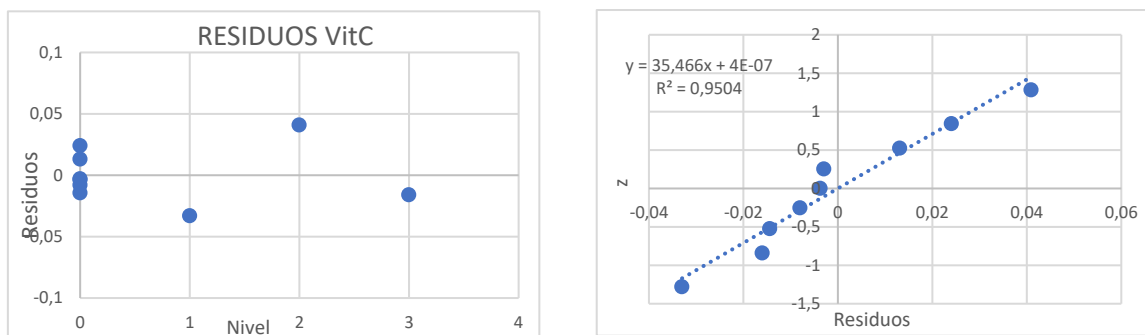


Figura 21: Residuos VitC

A partir de la representación gráfica de los coeficientes de regresión B obtenidos en el modelo (Figura 22), se observa la mayor o menor contribución de cada analito a cada parte del espectro. Se observa que no hay una buena separación entre los tres analitos y que el ácido acetilsalicílico tiene muy poca contribución.

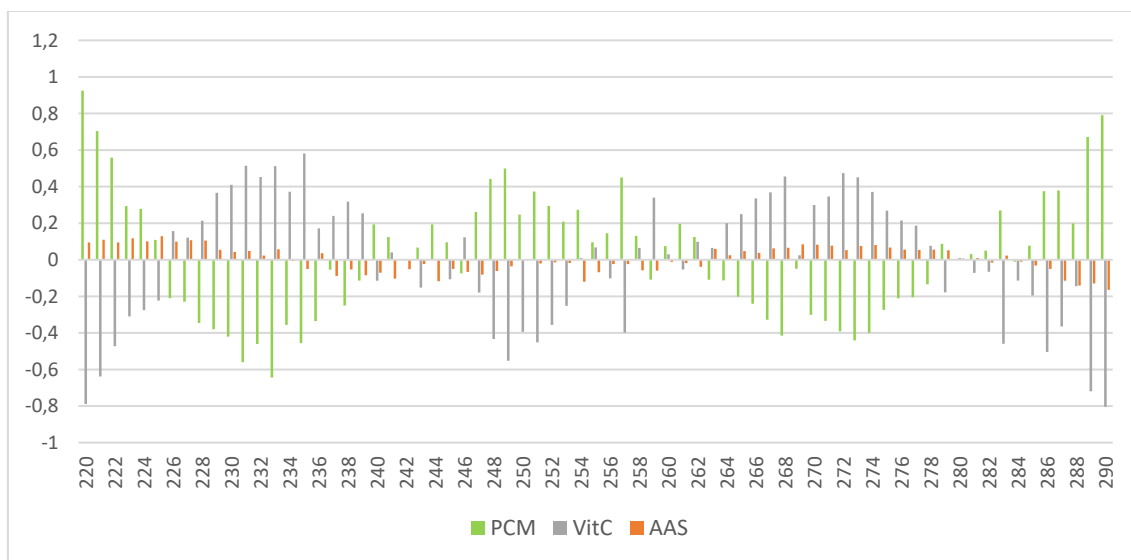


Figura 22: Coeficientes de regresión B del modelo PLS

Con todos estos datos analizados anteriormente ya es posible predecir la concentración de la muestra por el método GSAM-PLS. De forma análoga se determinaron las concentraciones de los componentes activos en el resto de medicamentos, empleando en cada caso el intervalo de longitudes de onda ya indicado.

Los resultados obtenidos, junto al error introducido por el método de regresión usado y la incertidumbre combinada, se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19: Resultados obtenidos por GSAM-PLS

	PCM (mg/compr)				AAS (mg/compr.)				VitC (mg/comprimido)			
	C <sub>ref</sub>	C <sub>obt</sub>	S <sub>c</sub>	u	C <sub>ref</sub>	C <sub>obt</sub>	S <sub>c</sub>	u	C <sub>ref</sub>	C <sub>obt</sub>	S <sub>c</sub>	u
As					400	404,6	0,438	22,1	240	277,4	1,569	78,9
Al	650	633,0	0,380	34,8					500	466,8	0,227	20,8
De					388,8	406,0	0,439	32,0	500	601,0	1,099	80,1
Do					500	711,1	0,273	17,1	250	244,3	0,514	31,9
Ef	330	329,6	0,088	3,5					200	212,0	0,065	2,6

Se observa que se obtienen buenos resultados para la Aspirina C, Algídol y Efferaldol, mientras que para Desenfriol y Dolmen la predicción es buena para uno solo de los componentes de la mezcla.

#### 4.2. Determinación por espectroscopía ATR-FTIR

En la Figura 23 se muestran tres ejemplos de los espectros obtenidos de las muestras de calibración.

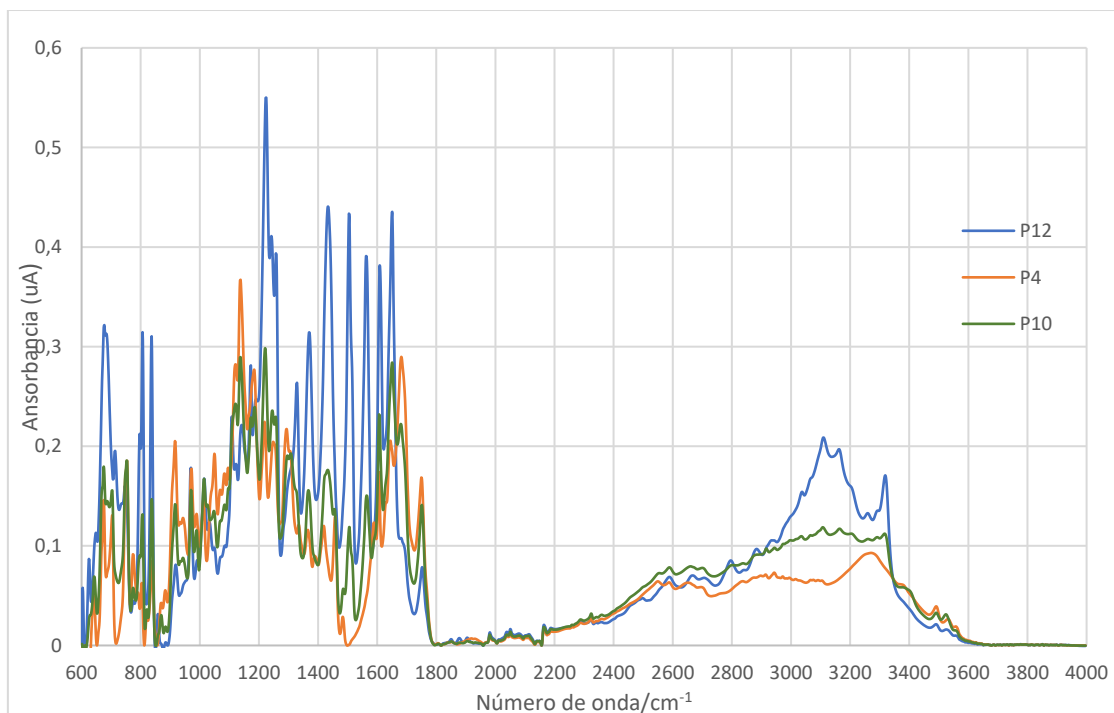


Figura 23: Espectros 3 patrones de calibración ATR-FTIR

En espectroscopía infrarroja (ATR-FTIR), el tratamiento matemático de los datos se realizó únicamente mediante calibración multivariable con ajuste por mínimos cuadrados parciales (PLS).

El intervalo de números de onda en el que se registra el espectro es muy grande, por lo que deben elegirse únicamente las regiones del espectro que contengan información relevante de los analitos estudiados. Tras estudiar las bandas características de cada analito en sus espectros puros se seleccionó el intervalo comprendido entre 950-1700  $\text{cm}^{-1}$ .

Primero se generó un modelo con las 25 muestras sintéticas como conjunto de calibración para predecir las concentraciones de las muestras de medicamentos, pero no se obtuvieron buenos resultados debido a las mismas razones que en UV-Vis, es decir, porque muestras de calibración y predicción no contienen los mismos excipientes en la matriz analítica.

Por ello, se obtuvo un modelo de regresión en el que se utilizaron las 20 primeras muestras sintéticas del conjunto de calibración y se predijo la concentración de las 5 muestras sintéticas restantes.

El número óptimo de componentes obtenido fue cinco, como se muestra en la Figura 24. La información que relaciona los tres analitos con las 390 absorbancias queda contenida en estos cinco componentes. El modelo explica un 93% de varianza, un valor algo inferior al que se obtuvo por espectrofotometría UV-vis.

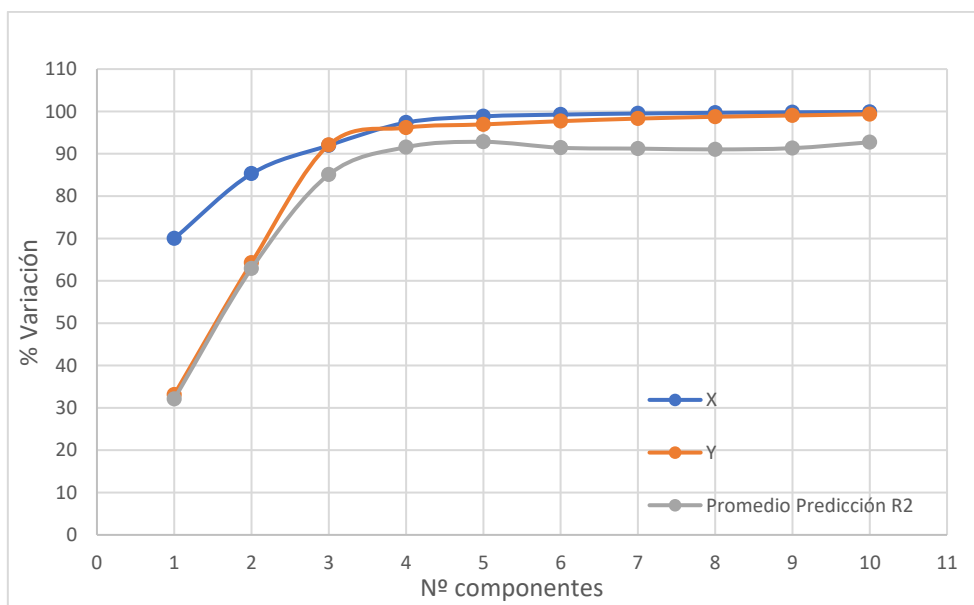


Figura 24: Elección N° óptimo de componentes



A continuación, se valida el modelo de regresión PLS. En el Análisis de Varianza se obtienen valores de p de 0.000 para todos los analitos, por lo que el modelo explica una cantidad significativa de varianza.

Los residuos son homocedásticos y siguen una distribución normal, pero son bastante más elevados que los obtenidos por UV-Vis, por lo que el modelo hará peores predicciones. Se muestra como ejemplo en la Figura 25 los valores obtenidos para el AAS.

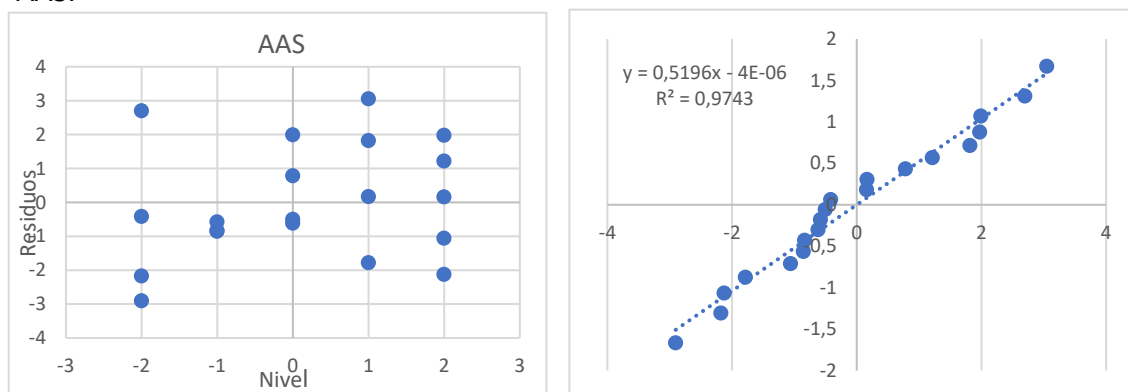


Figura 25: Residuos AAS

Por último, se predicen las concentraciones de las nuevas muestras a partir de los coeficientes de regresión B obtenidos.

Los resultados obtenidos para las muestras sintéticas se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20: Resultados muestras sintéticas por PLS

	PCM (%)		AAS (%)		VitC (%)	
	$C_{real}$	$C_{obt}$	$C_{real}$	$C_{obt}$	$C_{real}$	$C_{obt}$
<b>P21</b>	30,11	30,83	14,86	15,12	5,16	5,28
<b>P22</b>	30,78	29,69	4,55	5,19		
<b>P23</b>	9,98	9,42			5,07	2,87
<b>P24</b>			5,03	8,07	10,27	6,74
<b>P25</b>	10,01	10,68	10,20	9,80		

Se observa que para el PCM todas las predicciones son buenas, para el AAS son buenas excepto para la muestra 24, en el que se obtiene un valor demasiado alto, y para la VitC predice una cantidad inferior para las muestras 23 y 24.

Para el paracetamol se obtienen las mejores predicciones, ya que los residuos son menores y tiene las bandas menos solapadas del espectro (corresponden a las bandas en color azul comprendidas entre  $1300-1650\text{cm}^{-1}$  en la Figura 23). Para el AAS y VitC los

residuos son mayores y sus bandas características se encuentran solapadas entre ellas y con las bandas de los excipientes.

### 4.3. Determinación por RP-HPLC-UV

La Figura 26 muestra uno de los cromatogramas obtenidos para un multipatrón de PCM, AAS y VitC, en el que se observan los tiempos de retención de cada analito.

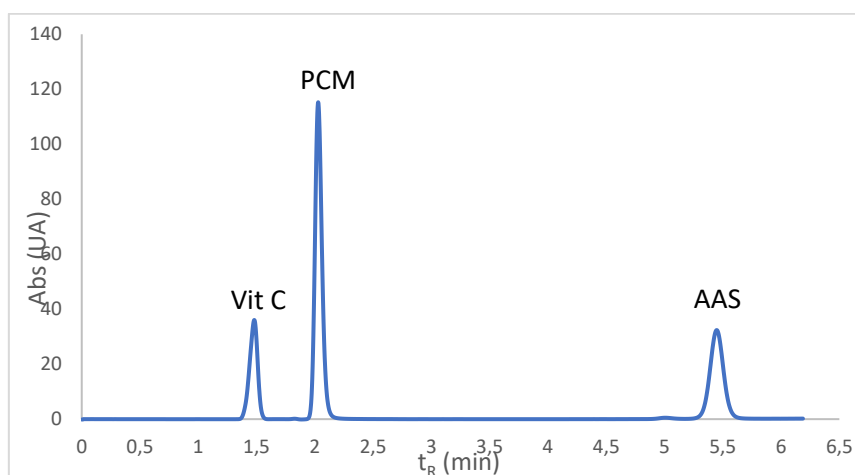


Figura 26: Cromatograma para PCM, AAS y VitC

Se puede ver que se obtiene una buena resolución de los picos en tan solo 6 minutos de separación.

#### - Calibración

Los resultados de las líneas de calibrado realizadas por RP-HPLC-UV en el intervalo de concentraciones entre 0,5- 16 ppm se muestran en la Figura 27. Se representa el área de cada pico frente a la concentración de analito.

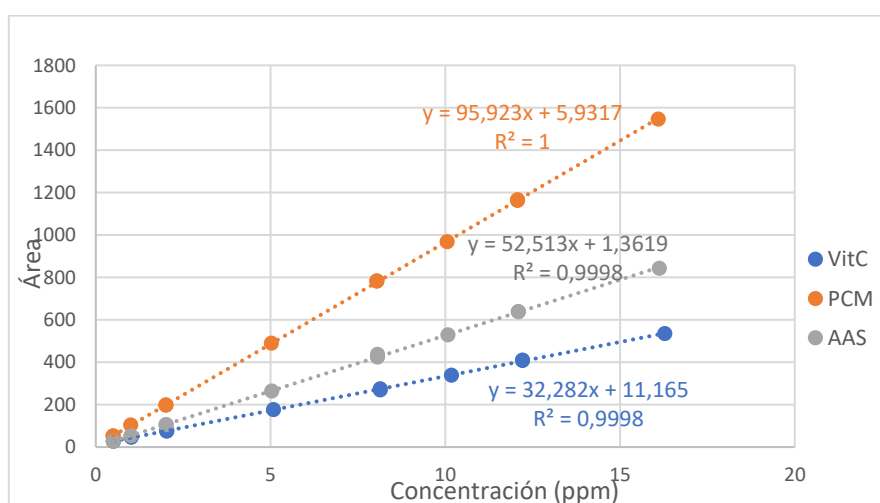


Figura 27: Líneas de calibrado obtenidas por HPLC

Los valores del coeficiente de correlación  $R^2$  son 1 o próximos a 1, por lo que hay linealidad en el intervalo de concentraciones estudiado (hasta 16 mg/l).

Para los tres analitos, los errores residuales se distribuyen aleatoriamente en torno a cero, son de pequeña magnitud y homocedásticos.

- Muestras

La concentración de cada analito en las muestras, tanto reales como sintéticas, se obtuvo por interpolación de las áreas de pico obtenidas en la línea de calibrado correspondiente.

Los valores obtenidos de cada réplica para las muestras de medicamentos, se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21: Resultados muestras de medicamentos obtenidos por HPLC

	PCM (mg/comprimido)				AAS (mg/comprimido)				VitC (mg/comprimido)			
	C <sub>ref</sub>	C <sub>obt</sub>	S <sub>c</sub>	u	C <sub>ref</sub>	C <sub>obt</sub>	S <sub>c</sub>	u	C <sub>ref</sub>	C <sub>obt</sub>	S <sub>c</sub>	u
As1					400	388,3	0,115	6,0	240	244,0	0,096	4,9
As2						384,0	0,115	5,5		247,9	0,096	4,7
As3						386,5	0,115	5,7		242,9	0,096	4,9
Al1	650	605,8	0,036	4,5					500	463,4	0,097	5,4
Al2		594,7	0,036	4,5						473,7	0,097	5,5
Al3		590,7	0,036	4,5						499,9	0,098	5,7
De1					388,8	373,7	0,116	8,4	500	510,9	0,095	7,0
De2						353,6	0,116	8,1		507,2	0,095	6,8
De3						353,1	0,116	8,1		493,2	0,095	6,7
Do1					500	492,5	0,115	7,6	250	241,9	0,097	6,0
Do2						505,8	0,115	7,7		253,2	0,097	6,1
Do3						503,0	0,116	7,5		255,9	0,096	5,9
Ef1	330	338,0	0,033	2,1					200	213,1	0,096	4,1
Ef2		342,6	0,033	2,1						211,4	0,096	4,1
Ef3		341,8	0,033	2,1						214,3	0,096	4,0

Se observa buena concordancia entre los valores obtenidos y los contenidos declarados por los fabricantes, con desviaciones estándar relativas entre réplicas inferiores al 4% en todos los casos. Además, se realizó una prueba t de comparación de la media experimental con el valor de referencia, obteniendo que no había diferencias significativas a excepción del caso del paracetamol en la muestra Algidol, ya que los valores obtenidos son bastante bajos.

Con respecto a las muestras sintéticas analizadas, se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 22), en los que también se observa una buena concordancia.

Tabla 22: Resultados muestras sintéticas obtenidos por HPLC

	PCM (%)				AAS (%)				VitC (%)			
	C <sub>real</sub>	C <sub>obt</sub>	S <sub>c</sub>	u	C <sub>real</sub>	C <sub>obt</sub>	S <sub>c</sub>	u	C <sub>real</sub>	C <sub>obt</sub>	S <sub>c</sub>	u
P5-1	40,2	40,9	0,039	0,12	4,8	3,8	0,121	0,30	30,0	28,6	0,099	0,25
P5-2		41,8	0,039	0,12		4,5	0,121	0,30		29,4	0,099	0,25
P17-1					15,1	14,4	0,115	0,28				
P17-2						14,4	0,115	0,28				
P20-1	20,3	20,8	0,033	0,09	15,1	14,2	0,115	0,28	20,1	21,5	0,096	0,24
P20-2		19,9	0,033	0,09		14,3	0,115	0,28		21,6	0,096	0,24

#### 4.4. Comparación de resultados

Con respecto a la determinación por espectroscopía UV-Vis los mejores resultados obtenidos con las técnicas multivariadas corresponden a la predicción de las muestras sintéticas mediante calibración multivariable con ajuste por mínimos cuadrados parciales (PLS). Esto se debe a que PLS es más selectivo a pesar de las pocas diferencias entre los coeficientes de regresión B de cada analito y a que estas muestras se habían preparado de la misma forma que las de calibración, por lo que contenían exactamente los mismos componentes y la misma variabilidad de producción.

En cambio, con la misma técnica para la predicción de muestras reales se obtuvieron mayores diferencias. Estas muestras contienen una gran variedad de excipientes y, en algunos casos, de otros componentes activos que no han sido introducidos en las muestras del conjunto de calibración, en el que solo se añadieron los tres principios activos seleccionados en este estudio y los excipientes más comunes. Por ejemplo, el medicamento Dolmen contiene, entre otros, codeína y benzoato de sodio, presentando ambos absorción a las mismas longitudes de onda del ácido acetilsalicílico (Anexo IV). Debido a esto se podría explicar los elevados valores de AAS obtenidos para Dolmen. Además, el proceso de producción industrial presenta diferente variabilidad al proceso de laboratorio, ya que se utilizan diferentes materiales instrumentales para su fabricación.

Para el caso del medicamento Algidol, la cantidad de paracetamol que se obtiene es baja para todos los casos, incluso por HPLC, lo que sugiere una degradación del analito.

Cabría esperar que el efecto matriz se eliminaría aplicando el método de adiciones patrón generalizado, pero en GSAM-CLS la poca selectividad de los coeficientes de K hace que las predicciones no sean buenas en varios casos. Con GSAM-PLS se obtienen mejores resultados, aunque también existen algunas discrepancias. Con el método GSAM aparecen otros problemas como la importancia de la precisión en las adiciones, la elección del número de adiciones y el nivel de cada analito (diseño de la matriz de adiciones patrón), que puede no haber sido adecuado para todas las muestras, o la baja pendiente de la línea de calibrado generada en el caso de que las adiciones aumenten poco la absorbancia (como para el ácido acetilsalicílico), lo que aumenta el error. Además, este método requiere un largo proceso experimental para cada tipo de muestra.

Con respecto a los resultados obtenidos por ATR-FTIR con PLS, hemos detectado algunos problemas ya identificados en UV-vis y otros adicionales. Para las muestras de medicamentos no se obtienen buenas predicciones, mientras que para las muestras sintéticas los resultados son mejores. Además de ser necesario la introducción de toda la variabilidad de las muestras a predecir en el conjunto de calibración, en IR hay un aún mayor solapamiento de las bandas, puede haber desviaciones en el comportamiento de la ley de Beer y es más difícil tener reproducibilidad en las medidas, ya que en el equipo utilizado no había un compartimento de muestra con un tamaño determinado para poder tener siempre el mismo camino óptico. Por todo ello, cuantificar por IR nos ha resultado más complejo.

En general, el mejor método para utilizar en la industria es la calibración multivariable con mínimos cuadrados parciales. El problema de la diferente matriz analítica del conjunto de calibración se puede solucionar generando un calibrado específico para cada medicamento, utilizando muestras sintéticas con todos los componentes o utilizando muestras reales dopadas. Además, el problema de la diferente variabilidad de la producción industrial con respecto a la fabricación en laboratorio se puede solucionar añadiendo muestras de producción al conjunto de calibración.

## 5. CONCLUSIONES

De los resultados de este trabajo se han podido extraer las siguientes conclusiones:

- 1- La creciente necesidad de utilizar técnicas analíticas rápidas, sencillas, fiables y económicas, como las técnicas espectroscópicas, para el control de calidad on-line en la industria farmacéutica, ha generado la necesidad de combinar los resultados analíticos de dichas técnicas, en general no selectivas, con técnicas quimiométricas multivariantes de calibración.
- 2- Debido al elevado solapamiento de los espectros de los tres analitos estudiados, paracetamol, ácido acetilsalicílico y ácido ascórbico, la determinación por espectrofotometría UV-Vis con tratamiento de los datos con ajuste por mínimos cuadrados clásicos no es adecuada, ya que los sensores son muy poco selectivos. Además, es esencial un diseño adecuado del conjunto de muestras de calibración que permita minimizar los errores del modelo de regresión.
- 3- El método de adiciones patrón generalizado (GSAM) soluciona el problema del efecto matriz, pero aparecen otros problemas asociados a la selección adecuada de las adiciones y orden de adición de los analitos, y al elevado proceso experimental que requiere.
- 4- La determinación por UV-Vis con tratamiento matemático por ajuste con mínimos cuadrados parciales es el método que proporciona mejores resultados, especialmente en el caso de la predicción de las muestras sintéticas. Esto demuestra la importancia de que el conjunto de calibración deba contener los mismos componentes (matriz analítica) que las muestras.
- 5- En la determinación por IR con PLS los mejores resultados también se obtienen para las muestras sintéticas, pero existen otros problemas debidos al propio método y el equipo utilizado, que causan mayores discrepancias. El tratamiento previo de las señales mediante técnicas de derivación o filtrado suele mejorar enormemente los resultados. No ha sido posible incorporar este tratamiento en este trabajo, pero se continuará la investigación de esta vía en breve.
- 6- En la industria, el modo de trabajo adecuado es construir un modelo de calibración para un producto concreto, en el que se incluyan muestras sintéticas o dopadas con todos los componentes en diferentes niveles de concentración,

además de muestras de producción que incluyan las variaciones propias de fabricación.

- 7- A pesar de que el desarrollo de la calibración pueda ser laborioso, una vez generado y validado el modelo la predicción de nuevas muestras es muy rápida, haciendo estas técnicas adecuadas para el control analítico de rutina y on line, tanto de materias primas como de productos intermedios y producto terminado.

## 6. REFERENCIAS

- Akay C., Gümüşel B., Degim T., Tartilmis S., Cevheroglu S. (1999). Simultaneous determination of acetaminophen, acetylsalicylic acid and ascorbic acid in Tablet form using HPLC. Vol.15, No. 2-3.
- Asadpour-Zeynali K., Saeb E. (2016). Simultaneous spectrophotometric determination of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide in a single step. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 15(4), 713-723.
- Asghari A., Hosseini A.H., Ghajarbeygi P. Fast and non-destructive determination of histamine in tuna fish by ATR-FTIR spectroscopy combined with PLS calibration method. *Infrared Physics and Technology*, 123, 104093.
- Bautista Mercader M. (2009). Avances en la aplicación de la espectroscopía NIR en la industria farmacéutica. Introducción a PAT y técnicas de imagen. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Belal F., Ibrahim F., Sheribah Z.A., Alaa H. (2018). Novel univariate and multivariate regression methods for the simultaneous analysis of ternary mixture of 1,4-benzodiazepines in dosage forms and human urine. *Clinica Chimica Acta*, 482, 108-119.
- Belal F., Ibrahim F., Sheribah Z. A., Alaa H. (2018). New spectrophotometric/chemometric assisted methods for the simultaneous determination of imatinib, gemifloxacin, nalbuphine and naproxen in pharmaceutical formulations and human urine. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 198, 51-60.
- Bouhsain Z., Garrigues S., de la Guardia M. (1997). PLS-UV spectrophotometric method for the simultaneous determination of paracetamol, acetylsalicylic acid and caffeine in pharmaceutical formulations. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 357, 973-976.
- Brereton R.G. (2000). Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. *Analyst*, 125, 2125-2154.
- Bunaciu A.A., Bacalum E., Aboul-Enein H. Y., Udristioiu G.E., Fleschin S. (2009). FT-IR Spectrophotometric analysis of ascorbic acid and biotin and their pharmaceutical formulations. *Analytical Letters*, 42, 1321-1327.
- Castillo Martínez M. (2007). Aplicación de la espectroscopía NIR al control analítico de procesos de la industria química. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Dinc E. (2003). Linear regression analysis and its application to the multivariate spectral calibrations for the multiresolution of a ternary mixture of caffeine, paracetamol and metamizol in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33, 605-615.
- Elkady Y., El-Adl S.M., Baraka M., Sebaiy M.M. (2020). HPLC method for simultaneous Determination of Ascorbic acid, Phenylephrine, Paracetamol, Caffeine in their pure and dosage forms. *International journal of advanced research in chemical science*, 7, 7-16.
- Fong S., Jeffrey A.L. (2019). Partial least squares (PLS) integrated transform infrared (FTIR) approach for prediction of moisture in transformer oil and lubricating oil. *Journal of Spectroscopy*.
- Franeta J., Agbaba D., Eric S., Pavkov S., Aleksic M., Vladimirov S. (2002). HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets. *Il Farmaco*, 57,709-713.



- Frank I. E., Kalivas J. H., Kowalski B.R. (1983). Partial Least Squares solutions for multicomponent analysis. *Analytical chemistry* Vol.55, No.11, 1800-1804.
- Kalivas J. H., Kowalski B.R. (1981). Generalized standard addition method for multicomponent instrument characterization and elimination of interferences in inductively coupled plasma spectrometry. *Analytical chemistry*, Vol. 53, 2207-2212.
- Kalivas J.H. (1987). Evaluation of volumetric and matrix effects for the generalized standard addition method. *Talanta*, 34, 899-903.
- Kazlauskienė D., Vainauskas P., Marksiene R., Kiliuviene G. (2003). UV spectrophotometric research of drug mixture in sudden poisoning cases. *Medicina (Kaunas)*, 39, 137-42.
- Mariano Maggio R. (2008). Control de calidad quimiométrico de formulaciones farmacéuticas. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Rosario, Argentina.
- Melucci D., Monti D., D'Elia M., Luciano G. (2012). Rapid In Situ repeatable analysis of drugs in powder form using reflectance near-infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Journal of Forensic Science*, 57, 86-92.
- Merckle P., Kovar K.-A. (1998). Assay of effervescent tablets by near-infrared spectroscopy in transmittance and reflectance mode: acetylsalicylic acid in mono and combination formulations. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 17, 365-374.
- Moreira A.B., Dias I.L.T., Neto G.O., Zagatto A.G., Ferreira M.M.C., Kubota L.T. (2005). Solid-phase spectrofluorometric determination of acetylsalicylic acid and caffeine in pharmaceutical preparations using partial least-squares multivariate calibration. *Talanta*, 67, 65-69.
- Müller A.L.H., Flores E.M.M., Müller E. I., Silva F.E.B., Ferrao M.F. (2011). Attenuated total reflectance with Fourier transform infrared spectroscopy (ATR/FTIR) and different PLS algorithms for simultaneous determination of clavulanic acid and amoxicillin in powder pharmaceutical formulation. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22, No.10, 1903-1912.
- Naes T., Isaksson T., Fearn T., Davies T. (2004). A user-friendly guide to Multivariate Calibration and Classification. NIR Publications, Chichester, UK.
- Omar J., Boix A., Ulberth F. (2020). Raman spectroscopy for quality control and detection of substandard painkillers. *Vibrational Spectroscopy*, 111, 103147.
- Pino Torres C. L. (2020). Desarrollo e implementación de metodologías espectroscópicas y quimiométricas para controles de calidad y de procesos productivos de medicamentos en la industria farmacéutica. Tesis doctoral. Universidad de Concepción, Chile.
- Pintado Martín S. (2021). Determinación espectrofotométrica simultánea de paracetamol, cafeína y ácido acetilsalicílico en formulaciones farmacéuticas mediante calibración multivariante. Trabajo de Fin de Grado. Universidad de Valladolid.

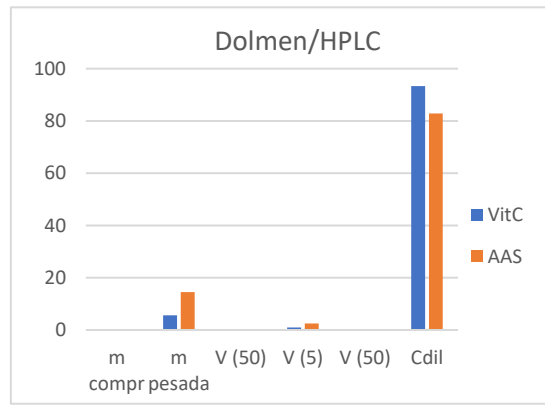
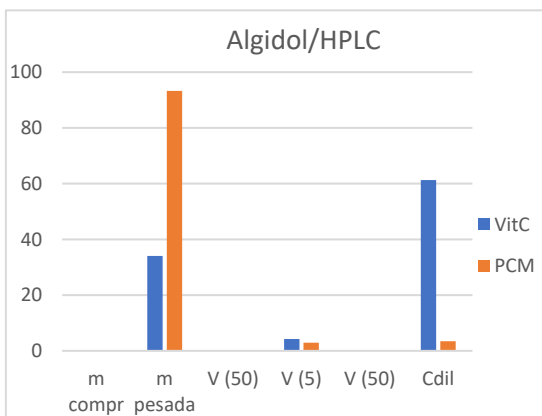
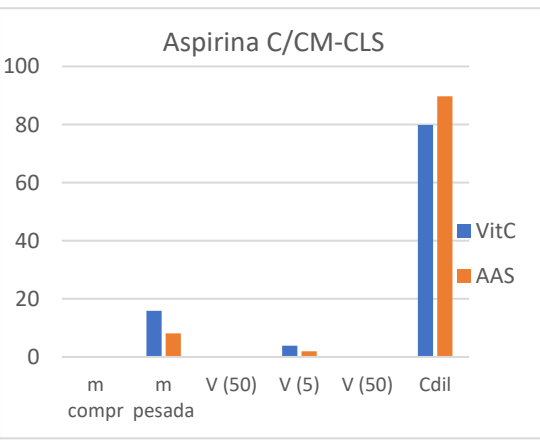
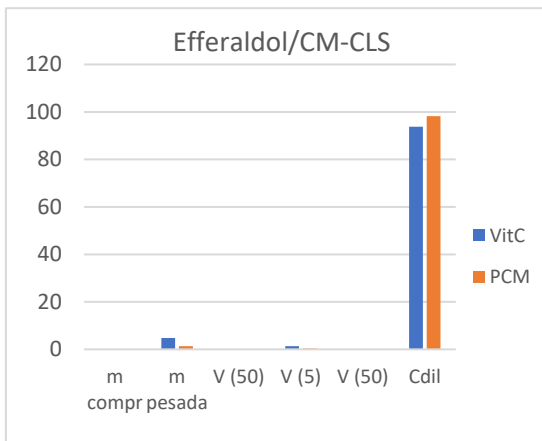
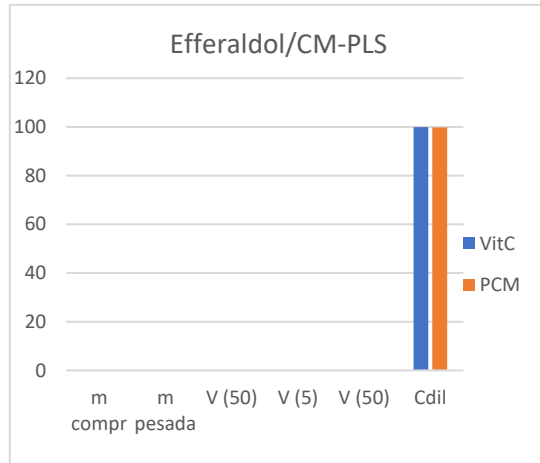
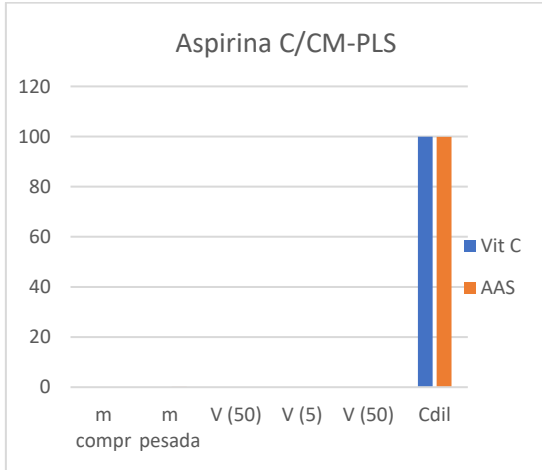
Pubchem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

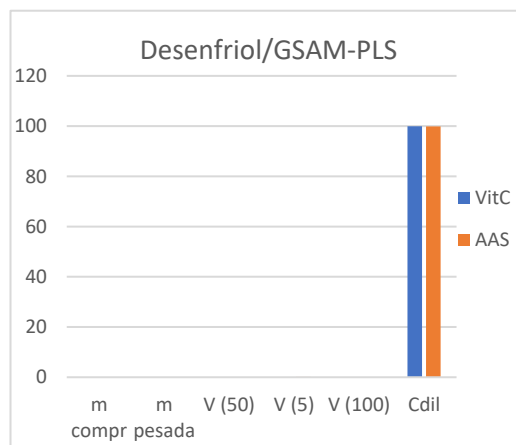
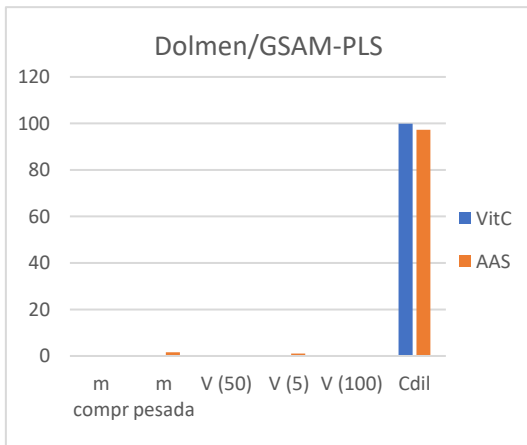
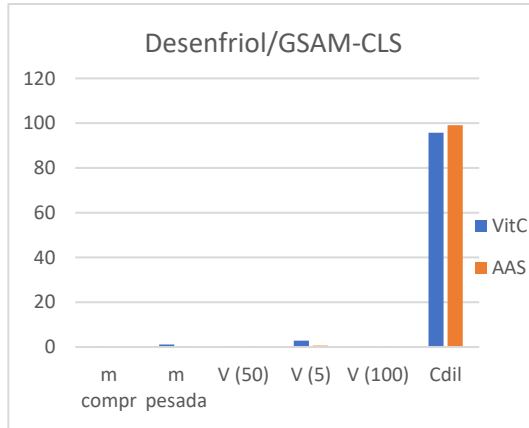
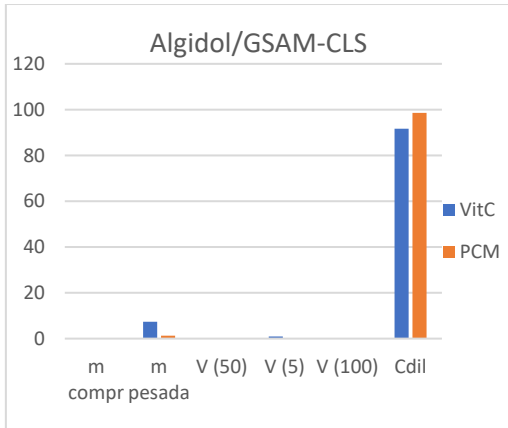
- Rizwan Khan M., Alothman Z. A., Naushad M., Ghfar A.A., Wabaidur S.M. (2012). Simultaneous analysis of vitamin C and aspirin in aspirin C effervescent tablets by high performance liquid chromatography-photodiode array detector. *Journal of liquid chromatography and related technologies*, 35, 2454-2561.
- Romero Gamero M.A. (2002). Desarrollo de nuevas metodologías analíticas en el control de calidad de la industria farmacéutica. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Shariati-Rad M., Irandoust M., Amin N., Shamsipur M. (2013). Solving matrix effect, spectral interferences and nonlinearity by generalized standard addition method coupled with radial basis functions-partial least squares: Application to simultaneous determination of drugs in urine. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 120, 77-83.
- Szostak R., Mazurek S. (2002). Quantitative determination of acetylsalicylic acid and acetaminophen in tablets by FT-Raman spectroscopy. *Analyst*, 127, 144-148.
- Vega M., Hernández M., Antolín B. Material docente de la asignatura Control y Gestión de Calidad, Grado en Química, Universidad de Valladolid, curso 2020/21.
- Wang M., Zhang J., Zhang Z., Liu X., Fan J., Liu W., Zhang X. (2020). Simultaneous ultraviolet spectrophotometric determination of sodium benzoate and potassium sorbate by BP-neural network algorithm and partial least squares. *Optik-International journal for light and electron optics*, 201, 163529.

## 7. ANEXOS

### ANEXO I

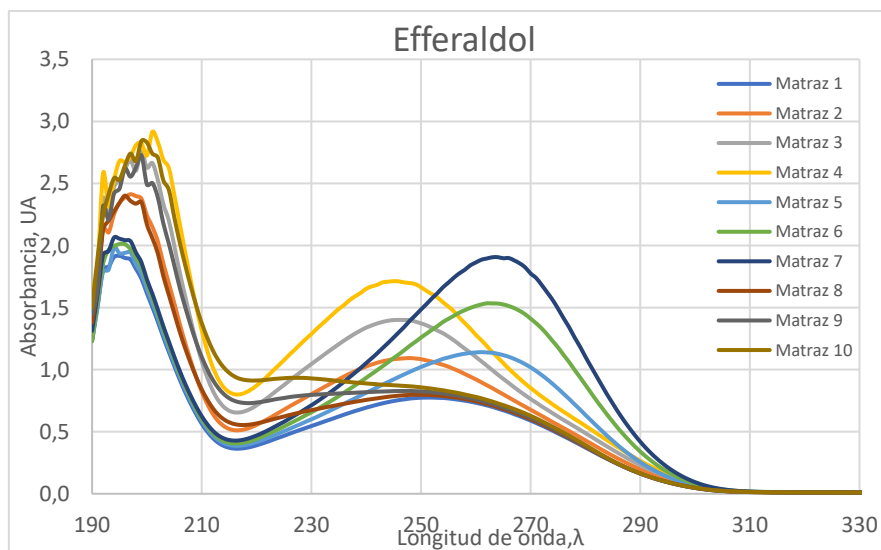
#### Porcentaje de contribución a la incertidumbre en los diferentes métodos

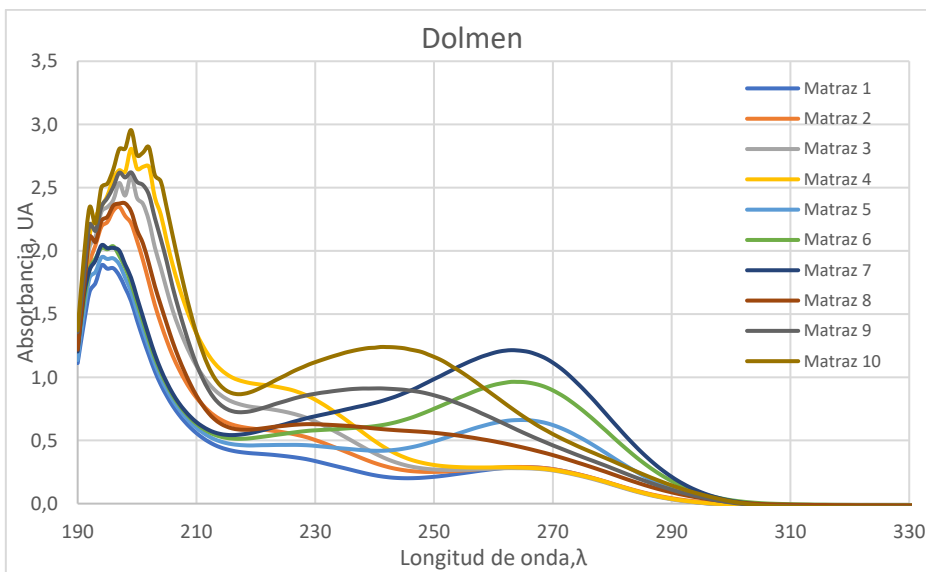
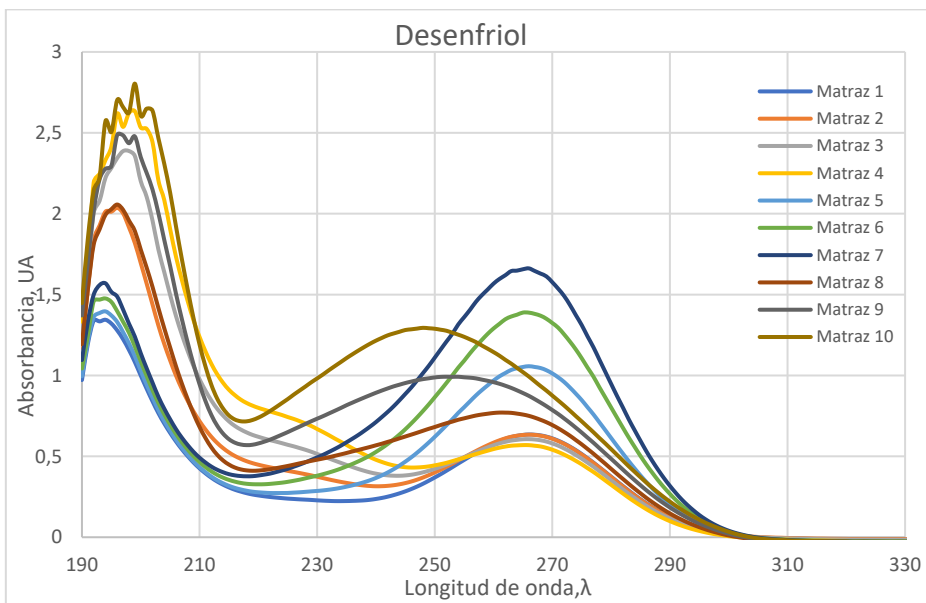
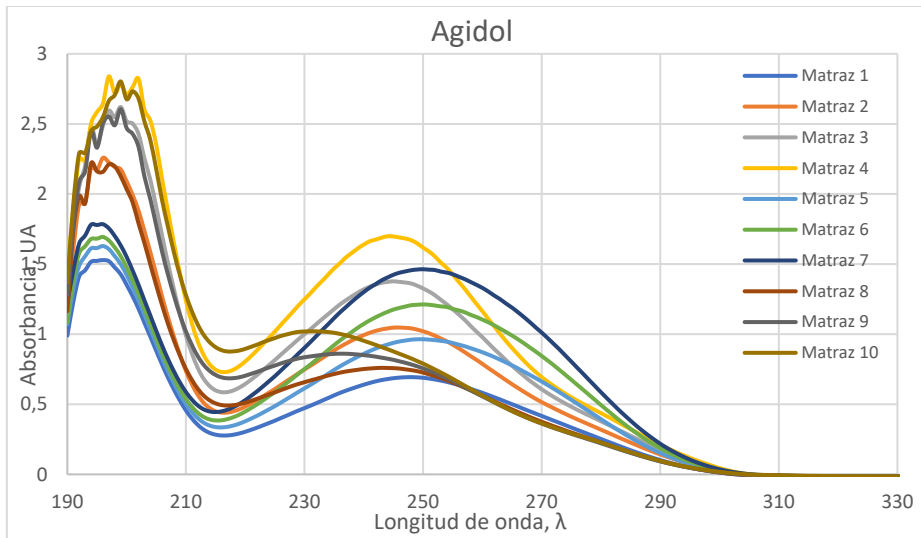




## ANEXO II

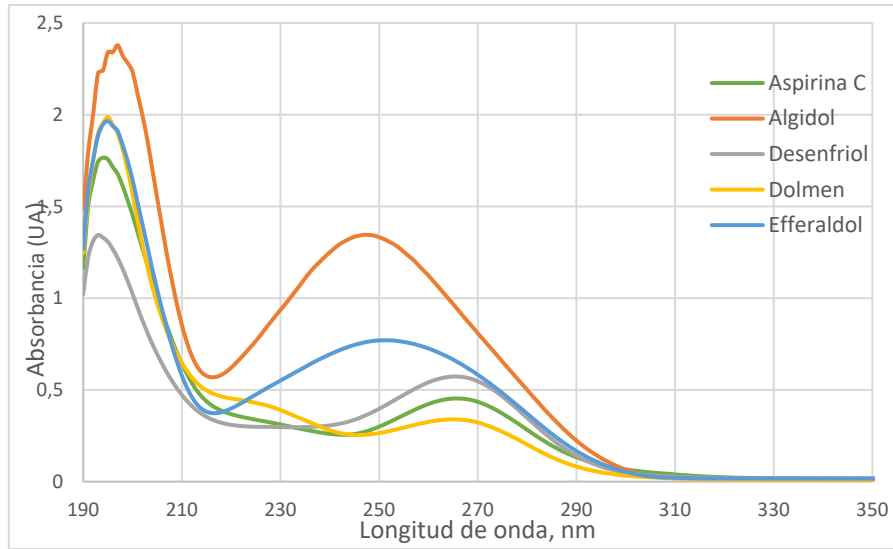
### Espectros obtenidos por el método GSAM para las diferentes muestras





### ANEXO III

#### Espectros de las muestras de medicamentos



### ANEXO IV

#### Espectros de absorción de algunos excipientes de los medicamentos

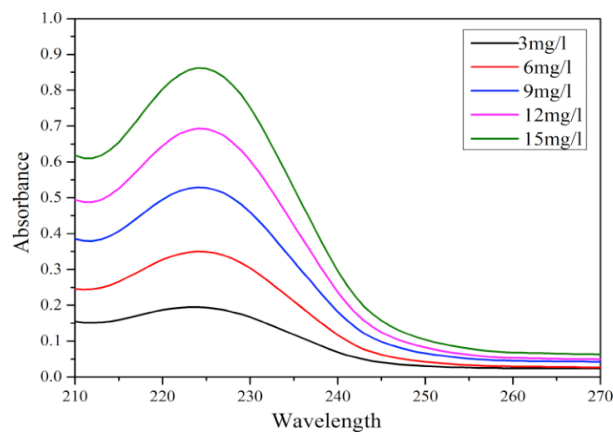
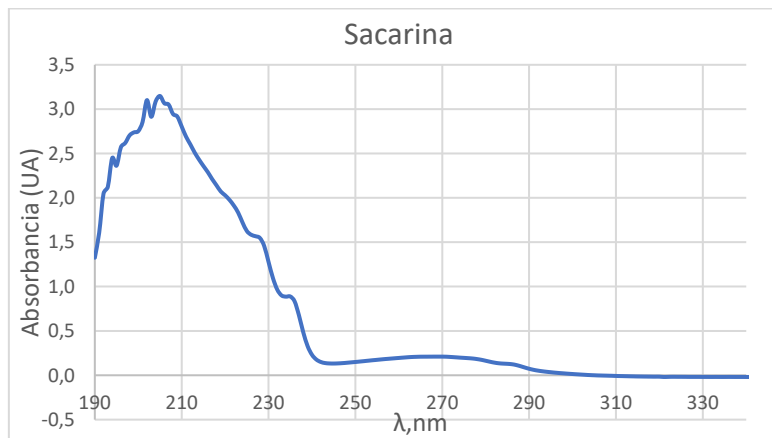


Fig. 2. Absorption spectra of different concentration of Sodium benzoate.

