

Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de benzocaína y antipirina en solución bucal tópica por HPLC

Diana Carolina Eraso Burbano

Universidad de Nariño

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Programa de Química

San Juan de Pasto, Colombia

2019

Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de benzocaína y antipirina en solución bucal tópica por HPLC

Diana Carolina Eraso Burbano

Directora:

Viviana Cristina Morales Andrade

B. Sc., de Química

Co-director:

Nelson Humberto Hurtado Gutiérrez

Ph.D. en Ciencias químicas

Universidad de Nariño

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Programa de Química

San Juan de Pasto, Colombia

2019

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva del autor”

Artículo 1º del acuerdo No 324 de octubre de 1966, emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

Viviana Cristina Morales

Director

Nelson H. Hurtado Gutiérrez

Codirector

David Eduardo Arturo Perdomo

Jurado 1

Freddy Hernán Pantoja Timarán

Jurado 2

San Juan de Pasto, 15 de noviembre de 2019

AGRADECIMIENTOS

A la directora y al codirector de este trabajo: Viviana Morales y Nelson H. Hurtado por su apoyo brindado.

A los profesores e integrantes del Departamento de Química por haber aportado en mí, la formación académica necesaria para llegar a este título.

A los evaluadores de mi trabajo Freddy Pantoja y David Arturo por su apoyo, sus aportes y recomendaciones.

A toda mi familia, en especial a Yolanda Burbano por ser una segunda madre y a Carlos Burbano por ser un apoyo incondicional para mi familia.

A mis primos “Sofía, Andrea, Marcela, Yulie, Camilo, Dario, Mónica” por estar presentes en cada momento importante de mi vida.

A Alejandro por su constante apoyo en cada momento importante de la realización de este proyecto y por ser un gran compañero de vida.

A mis amigos por brindarme su apoyo incondicional en esta etapa importante que está culminando.

A todos.

DEDICATORIA

La presente tesis está dedicada en primer lugar a mis padres “Jaime y Tere”, por su confianza y constante apoyo en cada decisión que he tomado, a mis abuelos por sus sabios consejos y a mis hermanos Lina María, Karen Melissa y Daniel Alejandro por darme la fuerza necesaria para seguir adelante.

RESUMEN

En el presente Trabajo de Grado, desarrollado en el Laboratorio Quality Farma Análisis de la ciudad de Bogotá, se encuentra descrita la validación de un método analítico para la cuantificación de la valoración de benzocaína y antipirina llevada a cabo por RP-HPLC, con el propósito de demostrar que el mencionado laboratorio reporta resultados confiables, con un grado de exactitud y precisión adecuados y por consiguiente prueba frente a los entes reguladores del Estado Colombiano la competencia del laboratorio al momento de analizar productos farmacéuticos, ayudando así a la certificación del mismo bajo la Resolución 3619 de 2013 emanada del Ministerio de Salud y Protección Social en buenas prácticas de laboratorio (BPL).

La validación se realizó utilizando un equipo HITACHI L-7000 Series, una columna Shodex C₁₈, a una longitud de onda de 285 nm y un flujo de 1,2 mL/minuto. Dentro de los parámetros de validación evaluados se encuentra la selectividad en condiciones normales y condiciones de estrés; la linealidad del método y del sistema, evaluada en un rango de 15,0 – 45,0 µg/mL para antipirina y 12,5 - 37,5 µg/mL para benzocaína, se obtuvieron relaciones lineales significativas ($R^2 > 0,99$); la exactitud fue evaluada del 24-36 µg/mL para antipirina y 20-30 µg/mL para antipirina, obteniendo que no hay diferencias significativas entre los porcentajes de recuperación y el 100% de concentración; en la precisión intermedia, se realizó un análisis de varianza para demostrar que no hay diferencias significativas en los resultados debido a los factores evaluados (día y analista). Se calcularon los límites de detección (0,157 ppm antipirina; 0,143 ppm benzocaína); y los límites de cuantificación (1,056 ppm antipirina; 0,436 ppm benzocaína). La robustez fue evaluada mediante el método de Plackett y Burman, concluyendo que el método es robusto para el cambio de columna y de flujo.

Palabras Clave: Validación, benzocaína, antipirina, cuantificación.

ABSTRACT

In this Degree Work, developed through a interned at the Quality Pharmaceutical Laboratory of the city of Bogota, the validation of an analytical method for the quantification of the benzocaine and antipyrine carried out by RP-HPLC, is described in order to demonstrate that the aforementioned laboratory reports reliable results, with an adequate accuracy and precision, and therefore proves to the regulators of the Colombian State the competence of the laboratory when analyzing pharmaceutical products, helping to certify it under Resolution 3619 of 2013 emanating from the Ministry of Health and Social Protection in good laboratory practice (GLP).

The validation was carried out using a HITACHI L-7000 Series equipment, a Shodex C18 column, at a wavelength of 285 nm and a flow rate of 1.2 mL/minute. Among the validation parameters evaluated is the selectivity in normal conditions and stress conditions; the linearity of the method and the system, evaluated in a range of 50 - 150% (15,0 – 45,0 µg/mL for antipyrine y 12,5 - 37,5 µg/mL for benzocaine), significant linear relationships were obtained ($R^2 > 0.99$); accuracy was evaluated within the range 80 - 120% (24-36 µg/mL for antipyrine and 20-30 µg/mL for antipyrine), obtaining that there are no significant differences between recovery percentages and 100% concentration; in the intermediate precision, a variance analysis was performed to demonstrate that there are no significant differences in results due to the factors evaluated (day and analyst); detection limits (0,157 ppm antipyrine; 0,143 ppm benzocaine) and limits of quantification (1,056 ppm antipyrine; 0,436 ppm benzocaine) were calculated. Robustness was evaluated using the Placket and Burman method, concluding that the method is robust for column and flow change.

Keywords: Validation, benzocaine, antipyrine, quantification.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción	20
Objetivos	21
Objetivo General	21
Objetivos Específicos.....	21
Marco de referencial	22
Benzocaína	22
Antipirina	22
Cromatografía líquida de alta eficiencia	23
Bases de Separación.....	23
Volumen de elución (V_e)	23
Volumen muerto (V_o)	24
Tiempo de retención (RT).....	24
Tiempo de retención neto o relativo (t'_n).....	24
Velocidad lineal (u).....	25
Factor de capacidad (k').....	25
Factor de separación (α).....	25
Resolución (R_s)	26
Ancho de pico (W).....	26
Platos teóricos	27
Asimetría (As).....	28
Cuantificación por HPLC	28
Cromatografía en fase normal y en fase reversa	29
Estudios de estabilidad de medicamentos	29
Antecedentes	30
Marco contextual	32
Metodología	32
Preparación de muestras	32

Preparación de la solución de estándar combinado de benzocaína y antipirina 1000%	33
Preparación de la solución de estándar combinado de benzocaína y antipirina 100%	33
Preparación de la solución placebo al 1000%.....	33
Preparación de la solución placebo al 100%.....	34
Preparación de la solución producto (placebo adicionado) 100%:.....	34
Parámetros a ser validados.....	34
Condiciones del análisis y equipamiento	35
Sistema cromatográfico	35
Condiciones del análisis.....	35
Identificación e Idoneidad del Sistema (System Suitability Test)	36
Soluciones estándar.....	36
Selectividad.....	36
Análisis en condiciones normales.....	36
Análisis en condiciones de estrés.....	36
Linealidad del sistema.....	36
Linealidad del método.....	37
Límites de Detección y Cuantificación.....	37
Exactitud	37
Precisión.....	37
Repetibilidad.....	38
Precisión intermedia.....	38
Robustez.....	38
Resultados y Discusión	39
Identificación	39
Idoneidad del sistema (System Suitability Test).....	40
Selectividad.....	41
Linealidad del sistema.....	46
Linealidad del método.....	53
Exactitud	56

Efecto matriz.....	58
Precisión.....	59
Repetibilidad del sistema.....	59
Repetibilidad del método.....	60
Precisión Intermedia.....	60
Límites de detección (LD) y cuantificación (LQ).....	62
Robustez.....	67
Conclusiones.....	70
Impactos.....	71
Recomendaciones.....	72
Referencias.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Benzocaína (etil 4-aminobenzoato).....	22
Figura 2. Antipirina (1, 5-dimetil-2-fenil-4-pirazolin-3-ona).	23
Figura 3. Cromatograma con algunos parámetros de medición frecuentes..	24
Figura 4. HPLC HITACHI L-7000 Series.....	35
Figura 5. Cromatograma de estándar combinado de antipirina y benzocaína medido a 285 nm. 39	
Figura 6. Cromatogramas de las degradaciones acida, básica, oxidativa y fotolítica (UV) de placebo.	42
Figura 7. Cromatograma de la degradación ácida de la solución producto..	43
Figura 8. Cromatograma de la degradación básica de la solución.....	43
Figura 9. Cromatograma de la degradación oxidativa de la solución producto.....	44
Figura 10. Cromatograma de la degradación UV de la solución producto.....	44
Figura 11. Recta de calibrado que relaciona el área cromatográfica con la concentración de antipirina en la solución estándar combinado.	49
Figura 12. Recta de calibrado que relaciona el área cromatográfica con la concentración de benzocaína en la solución estándar combinado.	50
Figura 13. Recta de calibrado que relaciona el área cromatográfica con la concentración de antipirina en la solución producto.....	55
Figura 14. Recta de calibrado que relaciona el área cromatográfica con la concentración de benzocaína en la solución producto..	55
Figura 15. Recta de calibrado que relaciona concentración Vs. Área de antipirina en solución producto.	63
Figura 16. Recta de calibrado que relaciona concentración Vs. Área de benzocaína en solución producto.	64
Figura 17. Recta de calibrado que relaciona concentración Vs. desviación estándar de antipirina en solución producto.	65
Figura 18. Recta de calibrado que relaciona concentración Vs. desviación estándar de benzocaína en solución producto.	65

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de la cromatografía en fase normal y en fase reversa.....	29
Tabla 2. Formula cualicuantitativa del producto benzocaína y antipirina solución bucal tópica.	33
Tabla 3. Parámetros validados en la cuantificación de benzocaína y antipirina en producto terminado.	34
Tabla 4. Equipo utilizado para la validación.	35
Tabla 5. Condiciones cromatográficas.....	36
Tabla 6. Concentración de muestras para linealidad del sistema y linealidad del método.....	37
Tabla 7. Concentración de muestras para evaluar LD-LQ	37
Tabla 8. Condición normal y modificada	38
Tabla 9. Condiciones de análisis de las muestras para evaluar la robustez del método	38
Tabla 10. System Suitability Test para antipirina en estándar combinado.	40
Tabla 11. System Suitability Test para benzocaína en estándar combinado.	41
Tabla 12. Criterio de aceptación del System Suitability Test.....	41
Tabla 13. Resultado de degradación en condiciones de estrés de la solución producto para antipirina.....	45
Tabla 14. Resultado de degradación en condiciones de estrés de la solución producto para benzocaína.....	45
Tabla 15. Daño de acuerdo al porcentaje de analito alterado (degradado) en la solución producto.	46
Tabla 16. Resultados y análisis de residuos para la linealidad del sistema de antipirina en solución de estándar combinado.....	46
Tabla 17. Resultados y análisis de residuos para la linealidad del sistema de benzocaína en solución de estándar combinado.	48
Tabla 18. Parámetros estadísticos linealidad del sistema de la solución estándar combinado para antipirina.	51
Tabla 19. Parámetros estadísticos linealidad del sistema de la solución estándar combinado para benzocaína.....	51
Tabla 20. Resultados y análisis de residuos para la linealidad del método de antipirina en solución producto.	53
Tabla 21. Resultados y análisis de residuos para la linealidad del método de benzocaína en la solución producto.....	54
Tabla 22. Parámetros estadísticos linealidad del método para antipirina en solución producto..	56
Tabla 23. Parámetros estadísticos linealidad del método para benzocaína en solución producto.	56
Tabla 24. Exactitud de antipirina en solución producto.	57
Tabla 25. Exactitud de benzocaína en solución producto.....	58
Tabla 26. Repetibilidad del sistema para antipirina y benzocaína.	59

Tabla 27. Repetibilidad del método antipirina en solución producto.	60
Tabla 28. Repetibilidad del método benzocaína en solución producto.	60
Tabla 29. Precisión intermedia antipirina en solución producto.....	61
Tabla 30. Precisión intermedia benzocaína en solución producto.	61
Tabla 31. Análisis de varianza precisión intermedia antipirina en solución producto.	62
Tabla 32. Análisis de varianza precisión intermedia benzocaína en solución producto.....	62
Tabla 33. Límites de detección y de cuantificación de antipirina en solución producto.	66
Tabla 34. Límites de detección y de cuantificación de benzocaína en solución producto.	67
Tabla 35. Porcentaje de recuperación de la muestra de antipirina en solución producto.	67
Tabla 36. Porcentaje de recuperación de la muestra de benzocaína en solución producto.	68
Tabla 37. Influencia de los factores modificados de antipirina en solución producto.....	69
Tabla 38. Influencia de los factores modificados de benzocaína en solución producto.	69

LISTA DE ANEXOS

Anexo A: Certificados de estándares primarios USP de benzocaína y antipirina.	75
Anexo B: Cromatogramas de robustez..	79

GLOSARIO

Validación de métodos analíticos

La Validación de un procedimiento analítico es el proceso que establece, mediante un estudio de laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. Las características del procedimiento analítico se refieren a la forma de realizar el análisis. Se describe en detalle los pasos necesarios para realizar cada prueba analítica. Esto incluye, pero no se limita a: la muestra, el estándar de referencia y los reactivos preparaciones, uso del aparato, generación de la curva de calibración, uso de fórmulas para el cálculo, etc (Ich, 2005).

Especificidad

La especificidad es la capacidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de componentes que pueden esperarse que estén presentes. Típicamente estos podrían incluir impurezas, degradantes, matrices, etc. La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual puede ser compensada por otros apoyos a los procedimientos analíticos. Esta definición tiene las siguientes implicaciones: Identificación: para asegurar la identidad de un analito. Pruebas de pureza: para garantizar que todos los procedimientos analíticos realizados permitan una declaración precisa del contenido de impurezas de un analito, es decir, ensayos de sustancias relacionadas, metales pesados, contenido de disolventes residuales, etc. Ensayo (contenido o potencia): para proporcionar un resultado exacto que permita una declaración precisa en el contenido o potencia del analito en una muestra (Ich, 2005).

Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que se acepta como un valor verdadero convencional o como un valor aceptado, valor de referencia y el valor encontrado (Ich, 2005).

Precisión

La precisión de un procedimiento analítico expresa la proximidad del acuerdo (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos de la misma muestra homogénea bajo las condiciones prescritas. La precisión puede ser considerado en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. La precisión debe investigarse utilizando muestras homogéneas y auténticas. Sin embargo, si no es posible obtener una muestra homogénea, se puede investigar utilizando muestras preparadas artificialmente o una solución de muestra. La precisión de un procedimiento analítico se suele expresar como la varianza, Desviación estándar o coeficiente de variación de una serie de mediciones (Ich, 2005).

Repetibilidad

La repetibilidad expresa la precisión en las mismas condiciones de operación en un corto intervalo de tiempo. La repetibilidad también se denomina precisión intraensayo (Ich, 2005).

Precisión intermedia

La precisión intermedia expresa variaciones dentro de los laboratorios: diferentes días, Diferentes analistas, diferentes equipos, etc (Ich, 2005).

Reproducibilidad

La reproducibilidad expresa la precisión entre laboratorios (estudios colaborativos, Generalmente aplicada a la estandarización de la metodología) (Ich, 2005).

Límite de Detección

El límite de detección de un procedimiento analítico es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada como una exacta valor (Ich, 2005).

Límite de Cuantitación

El límite de cuantificación de un procedimiento analítico es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede determinarse cuantitativamente con la precisión adecuada y la exactitud. El límite de cuantificación es un parámetro de ensayos cuantitativos para bajos niveles de compuestos en matrices de muestra, y se usa particularmente para la determinación de impurezas y / o productos de degradación (Ich, 2005).

Linealidad

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad (dentro de un rango determinado) para obtener resultados de prueba que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de analito en la muestra (Ich, 2005).

Rango

El rango de un procedimiento analítico es el intervalo entre la parte superior e inferior Concentración (cantidades) de analito en la muestra (incluidas estas concentraciones) para demostrar que el procedimiento analítico tiene un nivel adecuado de Precisión, exactitud y linealidad (Ich, 2005).

Robustez

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para no verse afectado por pequeñas, pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y proporciona una indicación de su fiabilidad durante el uso normal (Ich, 2005).

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ACN	Acetonitrilo
AEFI	Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria
BPL	Buenas prácticas de laboratorio
Conc.	Concentración
FDA	Food and Drug Administration
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
ICH	International Conference on Harmonisation
k'	Factor de capacidad
LD	Límite de detección
LQ	Límite de cuantificación
N	Platos teóricos (teorical plates)
NaOH	Hidróxido de sodio
n	Número total de datos
MeOH	Metanol
mL/min	Mililitros por minuto
POE	Procedimiento operativo estándar
RP-HPLC	Reverse phase – high performance liquid chromatography
RSD	Desviación estándar relativa
S	Desviación estándar
Sa	Desviación estándar del intercepto
Sb	Desviación estándar de la pendiente
S _{y,x}	Estadístico estimador de errores aleatorios en la dirección Y.
SST	System Suitability Test (Idoneidad del sistema)

SYSTEM	Idoneidad del Sistema (system suitability test)
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta
VIS	Visible
X	Media aritmética
Σ	Sumatoria

INTRODUCCIÓN

El control integral de la calidad es un conjunto de procedimientos tendiente a verificar el nivel de calidad y la conformidad con las especificaciones de: materias primas, materiales de empaque, productos en proceso, productos terminados, áreas y operaciones de fabricación y empaque, comprobando su pureza, actividad, uniformidad, seguridad, biodisponibilidad, estabilidad durante el tiempo de vida útil (INVIMA, 2002).

La valoración o cuantificación es una prueba específica indicadora de la estabilidad para determinar la concentración (contenido) de un medicamento. En general, la aceptación a priori de una variación de $\pm 10\%$ en los límites de un atributo de calidad a partir de la cantidad declarada esperada (100%), en la mayoría de los casos se pretende tomar en cuenta la variabilidad de la fabricación y la estabilidad durante la vida útil, y se basa principalmente en la noción de que tal variación en un atributo de calidad que tiene poca probabilidad de ocasionar un impacto adverso perceptible en el resultado clínico deseado (USP 41, 2018).

La antipirina (fenazona), es un medicamento que normalmente se toma para aliviar el dolor o reducir la inflamación, existen varios métodos analíticos para la determinación de antipirina sola o con otros fármacos, incluyendo espectrofotometría, HPLC, TLC, GC, electroforesis de zona capilar y métodos de titulación no acuosos. Por su parte, la benzocaína se utiliza como anestésico local o superficial del dolor relacionado a infecciones bucales, se puede determinar por varios métodos incluyendo; espectrofotometría, y HPLC (Merey, 2016).

En el presente Trabajo de Grado, desarrollado a través de una Práctica Empresarial en el Laboratorio Quality Farma Análisis de la ciudad de Bogotá, en el periodo comprendido entre los meses de junio de 2018 y mayo de 2019, se presentará la validación de un método analítico para la cuantificación simultánea de benzocaína y antipirina en solución bucal tópica por RP-HPLC, con el fin de realizar la determinación confiable del contenido del producto terminado y de cumplir con los requisitos necesarios para el proceso de certificación en Buenas Prácticas De Laboratorio.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de benzocaína y antipirina en solución bucal por HPLC.

Objetivos Específicos

- Desarrollar un método analítico por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para la cuantificación benzocaína y antipirina en solución bucal.
- Desarrollar un protocolo, con los procedimientos de validación establecidos, para la cuantificación de benzocaína y antipirina en solución bucal por HPLC.
- Documentar el procedimiento de análisis de la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) que se desarrolla actualmente en el laboratorio Quality Farma Análisis, en aspectos relacionados con el procedimiento estándar de operación (SOP), para la cuantificación de benzocaína y antipirina en solución bucal.

MARCO DE REFERENCIAL

Benzocaína

También conocida como ácido benzoico, 4-amino, ácido etil éster (etil 4-aminobenzoato) éster (Figura 1). Se utiliza como anestésico local, para anestesia superficial, para el alivio local y temporal del dolor relacionado a las infecciones bucales, es un fármaco oficial en USP y BP farmacopea (Merey, 2016).

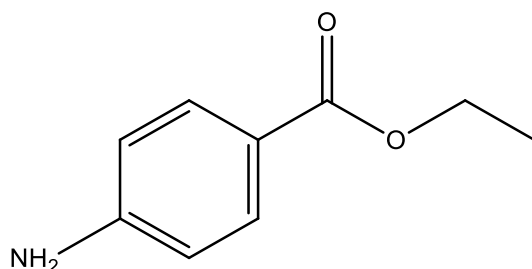


Figura 1. Benzocaína (etil 4-aminobenzoato). Tomado de: Merey, 2016.

Algunos anestésicos locales como la benzocaína pueden utilizarse tópicamente en la cavidad bucal para producir anestesia superficial. Su efecto real, sin embargo, es muy cuestionable. Lo que se busca con este tipo de anestésicos es preparar la mucosa para aliviar el efecto ulterior de la punción; también se emplea para controlar el reflejo nauseoso en la toma de impresiones, en la realización de radiografías del sector posterior en pacientes con excesivo reflejo nauseoso; aliviar temporalmente el dolor de ulceraciones, decúbitos por prótesis, gingivitis; como anestesia intrapulpar; alivio pasajero del dolor dental; extracción de restos radiculares a punto de eliminarse, de dientes temporales muy reabsorbidos, en casos de hiperestésias dentinales, etc. Los métodos de aplicación más habituales son: aplicación tópica de pastas, nebulizadores o rociadores, pistolas eyectoras y refrigeración (Vallejo & Vallejo, 2004). La benzocaína es un anestésico local de tipo éster, poco hidrosoluble que permanece en su lugar más tiempo, lo que le proporciona una duración de acción larga. Está disponible en aerosol, en gel (que contiene dosis variables desde 63, 75, 100, 150, 180 a 200 mg/ml), en parche de gel, en pomada 161, 200 mg/ml o en solución de 2, 50, 200 mg/ml; 65 y 75 mg/ml (Kirk et al., 2015)

Antipirina

También conocida como fenazona o como 1, 5-dimetil-2-fenil-4-pirazolin-3-ona, (Figura 2), es un medicamento que normalmente se toma para aliviar el dolor o reducir la inflamación, que puede aliviar el dolor leve a dolor moderado. Es una droga oficial en la USP y la BP farmacopea. Existen varios métodos analíticos para la determinación de antipirina sola o con otros fármacos incluyendo

espectrofotometría, quimiometría, TLC, GC, electroforesis de zona capilar, HPLC y métodos de titulación no acuosa (Cardona, et al., 2009).

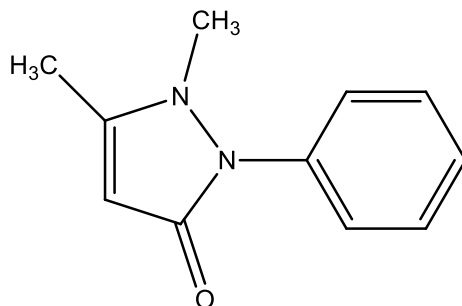


Figura 2. Antipirina (1, 5-dimetil-2-fenil-4-pirazolin-3-ona). Tomado de: Cardona, et al., 2009.

Cromatografía líquida de alta eficiencia

La cromatografía líquida es en esencia, como todos los métodos cromatográficos, un método separativo. Así, el lugar donde se produce la separación, la columna, puede considerarse el corazón del sistema cromatográfico, alrededor de la cual se monta un equipo de mayor o menor complejidad. En el caso más simple el cromatógrafo líquido estará constituido por: reservorio, inyector, bomba, detector. Como resultado se obtienen dos productos: el cromatograma y un eluido o eluato (flujo proveniente de la columna que, de recolectarse en forma secuencial o escalonada, contiene la fase móvil e idealmente, los componentes de la muestra separados (Quattrocchi et al., 1992)

Bases de Separación

Cuando la muestra y la fase móvil son forzadas a atravesar la fase estacionaria, entran en juego distintos tipos de interacción entre cada uno de estos componentes. Interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrogeno, interacciones dipolares y electrostáticas, son las responsables de la mayor o menor afinidad de cada uno de los componentes de la muestra por la fase móvil o la fase estacionaria. Así, el componente más afín a la fase estacionaria se retiene más y tarda más en eluir y el más afín a la fase móvil se retiene menos y eluye antes (Quattrocchi et al., 1992).

Volumen de elución (V_e)

Es el volumen de fase móvil eluida entre la inyección y la elución de la concentración máxima del soluto. A caudal constante, el tiempo transcurrido entre dichos puntos corresponde al tiempo de elución o tiempo de retención (Quattrocchi et al., 1992).

Volumen muerto (V_0)

Es el volumen total de solvente entre el punto de inyección y el de detección, exceptuando el correspondiente a las partículas de fase estacionaria. Comprende al volumen que la fase móvil puede ocupar entre las partículas y la pared de la columna en el interior de las tuberías, uniones, etc. Evidentemente la solución atraviesa “limpiamente” estos espacios, sin participar en ningún proceso separativo. En el caso de que la solución inyectada contenga algún soluto que no se retenga en la fase estacionaria, su elución no será instantánea, sino que corresponderá a un volumen de elución igual al volumen muerto. Este volumen corresponde, de trabajar a caudal constante, a un tiempo conocido como tiempo muerto (t_0) y se visualiza (No siempre) en el cromatograma como el primer pico o disturbio de la línea base (Quattrocchi et al., 1992).

Tiempo de retención (RT)

Es el tiempo medido entre la inyección y la elución de la concentración máxima del soluto enésimo (máxima señal). La distancia entre este máximo de la señal y la línea de base es la altura de pico (h_n) en cuestión (Quattrocchi et al., 1992).

Tiempo de retención neto o relativo (t'_n)

Dado que el volumen extracolumnar depende de varios factores ajenos a la separación misma, es frecuente expresar el tiempo de retención neto de un pico determinado como diferencia entre su tiempo de retención y el tiempo muerto en lugar del tiempo de retención absoluto. Así, para el pico enésimo (Quattrocchi et al., 1992):

$$t'_n = RT - t_0 \quad (1)$$

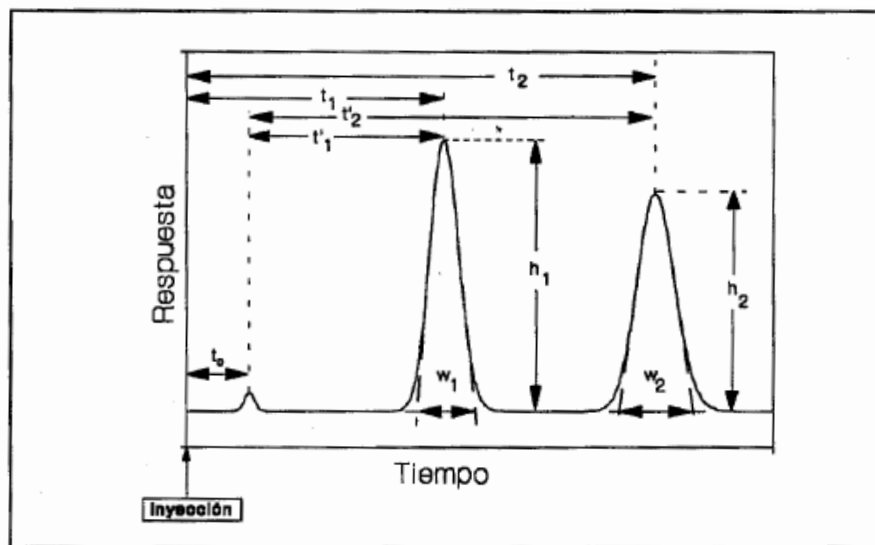


Figura 3. Cromatograma con algunos parámetros de medición frecuentes Tomado de: Quattrocchi et al., 1992.

Velocidad lineal (u)

Velocidad a la cual la fase móvil se desplaza a través de la columna no es sólo función del caudal sino también de la sección interna de la misma, la comparación de métodos que emplean columnas de diferente diámetro interno hace preferible la expresión de la velocidad lineal en lugar del caudal. Si “L” es la longitud de la columna expresada en cm y t_o el tiempo muerto medido en segundos, la velocidad lineal en cm/segundos puede calcularse como (Quattrocchi et al., 1992):

$$u = \frac{L}{t_o} \quad (2)$$

Factor de capacidad (k')

Es el cociente entre el número de moles de soluto en la fase estacionaria y el número de moles de soluto en la fase móvil y está relacionado con el coeficiente de distribución entre ambas fases

$$k' = \frac{\text{número de moles de soluto en la fase estacionaria}}{\text{número de moles de soluto en la fase móvil}} \quad (3)$$

En fase reversa, k' disminuye al aumentar la proporción del componente orgánico (AcN, MeOH, THF) y aumenta al aumentar la proporción de agua.

En fase normal, k' disminuye al aumentar la proporción de solvente polar y aumenta al aumentar la proporción no polar.

La medición de k' es una operación muy frecuente, ya que como su valor se emplea tanto para evaluar la retención como para ajustar la separación. Así, el valor de k' se regula entre 2 y 10 para mezclas de pocos componentes, o entre 0,5 y 20 si fuera necesario “hacer lugar” en el cromatograma para alojar un gran número de picos (Quattrocchi et al., 1992).

Factor de separación (α)

Es el cociente entre los factores de capacidad de un par de picos. Si no existe separación, alfa es igual a la unidad y su valor aumenta cuando aumenta la separación. El alfa de los picos “1” y “2” se calcula como:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \quad (4)$$

α depende de la fuerza de la afinidad del soluto respecto a la fase móvil y de la columna. Así, una disminución de la fuerza de la fase móvil produce un aumento de la retención, que en general no se acompaña de cambios de selectividad. Es decir, el aumento será proporcional para todos los solutos y el cociente entre ellos se mantendrá aproximadamente constante. La variación de α puede lograrse de varios modos, pero lo que se intenta es, en definitiva, variar el tipo de interacción entre las variables del sistema, es decir, soluto-fase móvil-fase estacionaria (Quattrocchi et al., 1992). Las variaciones usuales son:

- Modificación del componente “activo” de la fase móvil (en fase reversa, MeOH por AcN o THF; en fase normal, cloroformo por cloruro de metileno o metil terc butil éter)
- Modificación del pH de la fase móvil
- Empleo de aditivos (reactivos de apareamiento, complejantes, etc).
- Cambio de la fase estacionaria.

Resolución (R_s)

Como se ha dicho, el objetivo primario de la cromatografía es la separación de los constituyentes de una muestra. Es natural, entonces, la necesidad de contar con una expresión cuantitativa de la calidad de la separación. Esta expresión, la resolución, se calcula por cada par de picos adyacentes como:

$$R_s = 1,18 * \frac{(t_2 - t_1)}{(W_{1,h/2} - W_{2,h/2})} \quad (5)$$

Donde t_2 y t_1 corresponden a los tiempos de retención de los picos 2 y 1, W_2 y W_1 a los anchos de pico medidos en la mitad de su altura (Quattrocchi et al., 1992).

Ancho de pico (W)

Esta medición se puede efectuar con varios objetivos: para calcular la eficiencia de la columna (platos teóricos), la resolución, para el cálculo manual del área de picos y en algunos integradores electrónicos se ingresa como dato de ajuste de integración.

El ancho de pico puede tomarse en varias posiciones (a varias alturas) y si la señal fuera perfectamente gaussiana, las apreciaciones que resultan de esta medición serían equivalentes. Sin embargo, esta condición raramente se cumple, debe indicarse cuál es el método empleado. En general el ancho de pico suele tomarse:

- Al 60,7 % de la altura de pico. En este lugar se encuentran los puntos de inflexión y en una distribución normal, la elección horizontal de la curva corresponde a 2 desviaciones estándar
- Al 50 % de la altura del pico, ancho de pico a media onda).

- En la base del pico. Este valor se obtiene prolongando la línea base por debajo del pico y midiendo el segmento de esta línea, delimitado por la extrapolación de las ramas ascendente y descendente del pico.
- Para obtener un mayor reflejo de la asimetría sobre la medición, no es infrecuente encontrar medidas tomadas en otros sectores del pico (Quattrocchi et al., 1992).

Platos teóricos

El concepto de plato teórico fue desarrollado en 1941 por Martin y Synge para la cromatografía de partición líquido-líquido (LLC). Para explicar el fenómeno separativo, compararon la LLC con un proceso de distribución en contracorriente, donde la extracción en las dos fases se repite varias veces en forma encadenada. La diferencia fundamental residía en que la cromatografía, el proceso es continuo. Sin embargo, la columna podía dividirse en cortes o rodajas imaginarias donde se conseguía un equilibrio transitorio, antes de que la fase móvil avance hacia el siguiente. Cada corte se llamó “plato” y su espesor “altura equivalente del plato teórico” (H o HEPT). Entonces, para una columna de longitud L, con N platos teóricos, la altura del plato resulta:

$$H = \frac{L}{N} \quad (6)$$

La eficiencia de una columna cromatográfica y por lo tanto su “poder” separativo se mide en función de su número de platos teóricos. Para lograr la separación de dos componentes dados, no sólo deben eluir a distintos tiempos de retención, sino que el ancho de los picos debe ser tan bajo como sea posible. El número de platos teóricos, puede calcularse en función del ancho de pico como:

$$N = 16 \left(\frac{t_n}{w_{tan}} \right)^2 \quad (7)$$

Donde t_n es el tiempo de retención del pico n -ésimo y w_{tan} su ancho, medido sobre la línea de base y expresado en unidades de tiempo (el cálculo puede también expresarse en función del volumen de retención y el ancho del pico, en unidades de volumen).

H (y consecuentemente N) depende no solo el diámetro, morfología y calidad de la partícula sino también de la calidad del empaquetamiento, de su envejecimiento y eventuales vaciamientos o canales producidos por disolución o golpes. Por otra parte, no sólo la columna determina el valor de N. Muchos factores instrumentales contribuyen al ensanchamiento de los picos (longitud y diámetro de tuberías, volumen y geometría de la celda del detector, etc.). Otros factores determinantes y ajenos a la columna “física” corresponden a los procesos por los cuales la

geometría del pico se aleja del ideal, es decir, de la curva normal o gaussiana (Quattrocchi et al., 1992).

En la literatura no existe un criterio unificado para la medición de la eficiencia. Es decir, no existe una forma operativa, especificaciones instrumentales, solutos de referencia, ni tampoco forma de expresar el resultado (platos/m, platos/columna, etc).

Por esta razón, no puede compararse directamente la eficiencia reportada por distintos fabricantes de columnas para sus productos. Por otra parte, si se efectúan mediciones en un cromatograma que contiene más de un pico, puede observarse alguna ligera variación en el número de platos teóricos calculado para cada soluto. Esto no significa que la determinación de N no tenga importancia. Por el contrario, la eficiencia suele medirse en varias ocasiones (Quattrocchi et al., 1992).

Asimetría (As)

La asimetría (tailing) es una de las formas más comunes de alejamiento de la curva gaussiana y su medición es importante puesto que puede llevar, de acuerdo a su magnitud, a errores considerables de cuantificación, e incluso a oscurecer picos adyacentes. Si bien no existe un criterio único para el cálculo de asimetría, las formulas empleadas con mayor frecuencia son:

$$A_s = \frac{a}{b} \quad (8)$$

$$A_s = \frac{a'}{b'} \quad (9)$$

Donde a y b son las medidas entre la línea que une al máximo del pico con la línea de base y los extremos anterior y posterior del pico, tomados al 10 % de su altura. Por su parte, a' y b' son los mismos parámetros al 5 % de dicha altura (Quattrocchi et al., 1992).

Cuantificación por HPLC

La cuantificación del presente trabajo, se llevó a cabo por el método de estándar externo, que consiste en la preparación de estándares de concentración semejante al analito en la muestra y en el ensayo cromatográfico de ambas, muestra y estándar, en las mismas condiciones operativas. La concentración de analito en la muestra se determina comparando el área del pico en cuestión con el área correspondiente al estándar de referencia. El porcentaje de recuperación del activo, o la concentración en términos de porcentaje de activo en la muestra, se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ Recuperado activo} = \frac{\text{Área muestra} * \text{Concentración del estándar}}{\text{Área del estándar} * \text{Concentración de la muestra}} * 100 \quad (10)$$

El Área de la muestra o del estándar puede corresponder al promedio de las respuestas (áreas) del analito o a una sola respuesta (área) en las diferentes soluciones (solución muestra o solución estándar) dependiendo del procedimiento realizado (Quattrocchi et al., 1992).

Cromatografía en fase reversa

Los principales logros de la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se concentraron en tres parámetros fundamentales: Resolución, reproducibilidad y rapidez. La cromatografía de fase ligada puede clasificarse en fase normal y fase reversa de acuerdo a la polaridad relativa de la fase móvil y de los grupos funcionales químicamente ligados a la matriz. En fase reversa, la partícula base de silicagel se modifica químicamente para reemplazar sus grupos funcionales activos, los sinaloles, de características polares, por determinados grupos funcionales: octadecilsilano (frecuentemente llamado ODS o C₁₈), octilsilano (C₈), fenilo, cinano, amino, diol, etc.

La fase estacionaria es no polar y la fase móvil polar. Este cambio de polaridad de fases resulta, naturalmente, en un cambio en el orden de elución de los componentes de las muestras de estudio. Las variaciones de cromatografía en fase normal y fase reversa se encuentran descritas en la tabla 1 (Quattrocchi et al., 1992).

Tabla 1. Características de la cromatografía en fase normal y en fase reversa. Tomado de: Quattrocchi et al., 1992.

Fase	Normal	Reversa
Polaridad del relleno	Alta	Baja
Polaridad del solvente	Baja	Alta
Orden de elución	Primero el menos polar	Primero el más polar
Efecto del incremento de la polaridad del solvente	Reduce los tiempos de retención	Aumenta los tiempo de retención

Estudios de estabilidad de medicamentos

Los estudios de estabilidad de un medicamento, son aquellas actividades experimentales que conducen a la obtención de la información necesaria y suficiente, para sustentar la vida útil del producto, mediante la que se puede establecer la fecha de expiración de cada uno de los lotes de producto fabricado.

El propósito, es suministrar la evidencia necesaria y suficiente, de cómo la calidad del producto final terminado, varía con el tiempo por la influencia de diferentes factores ambientales, tales como la temperatura, la humedad y la luz, entre otros (radiaciones electromagnéticas, etc.). El estudio de estabilidad también incluye la evaluación de factores relacionados con el producto mismo que influyen en su calidad, como ejemplo, la interacción de los activos con los componentes del

excipiente, con el sistema de envase y cierre y los materiales de empaque, así como la incompatibilidad entre activos dentro de una misma formulación. El resultado de estos estudios de estabilidad, logra establecer el periodo de reanálisis de una materia prima, la vida útil de un producto terminado y las condiciones de almacenamiento recomendadas según la zona de comercialización del medicamento (INVIMA, 2002).

Antecedentes

Pocos métodos analíticos han sido reportados para la determinación de benzocaína y antipirina, tal como el método espectrofotométrico para tabletas desarrollado por Levine en 1964, en el que se describe el procedimiento para la determinación de la antipirina combinada con otros fármacos como cafeína, destacando la cuantificación de benzocaína realizando una ligera modificación del método desarrollado, utilizando una columna cromatográfica de partición de Celite dividida en tres fases diferentes unida directamente a otra columna cromatográfica en presencia de FeCl_3 , leyendo a longitudes de onda de 272 nm para la antipirina y 293 nm para la benzocaína. (Levine & Weber, 1964). Sin embargo, es un método ortodoxo y económicamente no viable, además del excesivo tiempo análisis.

En 1977, Gupta desarrolló un método para la determinación cuantitativa de antipirina y la benzocaína por cromatografía líquida de alta eficiencia en una columna C_8 , utilizando KH_2PO_4 0,02M en metanol y agua como la fase móvil. Ambos compuestos lograron determinarse al realizar el análisis simultáneamente y sin interferencia entre sí. El método fue preciso, y requirió un tiempo de análisis de 30 minutos (Gupta, 1977).

Annamaria Szoke en 1996, encontró un método de extracción y cuantificación por HPLC para benzocaína y tres de sus metabolitos para ser utilizados en conjunto con una técnica de isótopos inversos. Los metabolitos fueron: ácido p-aminobenzoico, ácido acetil-p-aminobenzoico y acetilbenzocaína. El sistema de HPLC consistió en dos bombas modelo 10B, detector UV, colector de fracciones Pharmacia modelo FRAC-100, columna analítica C_{18} de 15 cm x 4.6 mm, modelo LC-18-DB y una precolumna de 2 cm, modelo Supelguard LC-18-DB. El gradiente de fase móvil consistió en: 0-3 min: fase móvil A; 3-8 min: gradiente a 100% de fase móvil B; 8-23 min: fase móvil B; 23-24 min: gradiente lineal a 100% de fase móvil A. (fase móvil A: 5 %v/v de metanol, 94 %v/v de agua, 1%v/v de ácido acético. Fase móvil B: 55 %v/v de metanol, 44 %v/v de agua, 1 %v/v de ácido acético). La detección se realizó mediante absorbancia UV a 286 nm y el método fue selectivo (Szoke & Hayton, 1997).

En 2005, Perez y compañía desarrollaron y validaron un nuevo método de HPLC-RP para la determinación simultánea de benzocaína, dos conservantes (propilparabeno (nipasol) y alcohol bencílico) y productos de degradación de la benzocaína en una forma de dosificación farmacéutica semisólida (gel de benzocaína). El sistema cromatográfico consistió en un Hewlett-Packard 1100

(Agilent Technologies) que cuenta con un horno de columna (79856A), una bomba cuaternaria (G1311A), un inyector automático (G1313A) y un detector DAD automático (G1315A), que se ajusta a 258 nm, el método utiliza una columna Nucleosil 120 C₁₈ y elución en gradiente, La fase móvil consistió en una mezcla de metanol y ácido acético glacial (10 %v/v) a un flujo de 2.0 ml/min. Se demostró que es adecuado para un método de control de calidad rápido y confiable (Perez, 2005).

Finalmente, se encuentran dos metodos para benzocaína y antipirina en solucion, reportados por la USP , el primero consisten en un analisis por HPLC para una solución ótica de antipirina y benzocaína en glicerina, el sistema cromatográfico consiste en equipar un cromatógrafo de líquidos con un detector a 280 nm y una columna de 4 mm x 15 cm rellena con material L15 de 5 µm. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,0 mL por minuto y la fase móvil consiste en una solución de acetato de amonio y acetonitrilo (3:1).

El segundo metodo consiste en un analisis para una solución ótica de antipirina, benzocaína, y clorhidrato de Fenilefrina en un disolvente no acuoso adecuado. La fase móvil utilizada corresponde a acetonitrilo y una solución de 1-heptanosulfonato de sodio 0,005 M en agua y ácido fosfórico. El sistema cromatográfico consiste en un cromatógrafo de líquidos con un detector a 272 nm y una columna de 4,6 mm x 30 cm rellena con material L1. La velocidad de flujo es de aproximadamente 1,5 mL por minuto (USP 41, 2018).

MARCO CONTEXTUAL

Quality Farma Análisis es un laboratorio de control de calidad que presta el servicio de análisis microbiológico y fisicoquímico a industrias del sector farmacéutico, el área de análisis fisicoquímico cuenta actualmente con tres equipos HPLC, un espectrofotómetro UV-Vis, un TOC, un multiparámetro, una balanza analítica, entre otros. Todos los equipos cuentan con su respectiva calibración y calificación, se trabajó con material volumétrico clase A calibrado, y en cuanto a las condiciones ambientales donde se realizaron las diferentes pruebas y ensayos de validación fueron: una temperatura de $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa menor a 70%.

METODOLOGÍA

Preparación de muestras

La muestra de trabajo corresponde a una solución bucal tópica de baja viscosidad la cual pertenece a una forma farmacéutica líquida. Los analitos de interés antipirina y benzocaína se encuentran a una concentración de 3,0 y 2,5 g por cada 100 mL de solución de producto terminado respectivamente (tabla 2), dado que el producto terminado aún no se encuentra disponible comercialmente, todas las muestras se prepararon usando el método de placebo adicionado, este método es usado para la preparación de muestras de manera artificial a partir de la mezcla de las materias primas y los activos presentes en el producto terminado (Aguirre et al., 2001), las muestras preparadas por este método serán denominadas solución producto en el presente documento.

En la tabla 2 se encuentra la fórmula cualicuantitativa del producto terminado, la cual describe los componentes (placebo y activos) y su respectiva concentración en la solución. El placebo (matriz) corresponde a la mezcla de todos los componentes de la tabla a excepción de los activos (antipirina y benzocaína).

Tabla 2. Formula cualicuantitativa del producto benzocaína y antipirina solución bucal tópica. Tomado de: Quality Farma SAS.

MATERIA PRIMA	g/100mL.
Benzocaína	2,5
Antipirina	3,0
Alcohol	65,0
Esencia	1,0
Colorante	0,0125
Agua purificada necesaria para completar	100 mL

*Los nombres específicos de los componentes no se mencionan porque el producto aún no se encuentra disponible comercialmente. (Quality Farma SAS).

Para la cuantificación de los activos se utilizó el método de estándar externo, que consiste en la preparación de estándares de concentración semejante al analito en la muestra (Quattrocchi et al., 1992). Las concentraciones establecidas en la etapa de desarrollo del método (dado que cumple los criterios de la idoneidad del sistema) fueron 25 µg/mL (ppm) para la benzocaína y 30 µg/mL (ppm) para antipirina, estas concentraciones corresponden al 100% e indican la concentración de los analitos al momento de realizar el análisis de rutina.

En la preparación de las muestras se utilizó estándares primarios (USP) material volumétrico clase A calibrado y una balanza analítica de marca OHAUS modelo PA224 calibrada, el diluyente utilizado es la misma fase móvil descrita en la tabla 5. A continuación, se describe la preparación del estándar combinado y la solución producto por el método de placebo adicionado:

Preparación de la solución de estándar combinado de benzocaína y antipirina 1000%

Se pesó 12,5 mg de estándar primario USP de benzocaína (Lote: J2M122) y 15 mg de estándar primario USP de antipirina (Lote: R02990), se llevó a un volumen de 50 mL con diluyente (fase móvil) en un balón aforado.

Preparación de la solución de estándar combinado de benzocaína y antipirina 100%

Se tomó con una pipeta aforada 2 mL de la solución de estándar combinado al 1000% y se llevó a un volumen de 20 mL en un balón aforado con diluyente.

(Concentración final 25 µg/mL Benzocaína y 30 µg/mL de antipirina).

Preparación de la solución placebo al 1000%.

Se preparó 100 mL a partir de la formula cualicuantitativa (tabla 2) del producto solución bucal tópica (sin adicionar benzocaína ni antipirina)

Preparación de la solución placebo al 100%

Se tomó con una pipeta aforada 2mL de la solución placebo al 1000% y se diluyó en un balón de 20 mL, se aforó con diluyente.

Preparación de la solución producto (placebo adicionado) 100%:

De la solución de estándar combinado al 1000%, se tomó una alícuota de 2 mL en un balón aforado de 20 mL, se adicionó 2 mL de solución placebo al 1000% y se aforó utilizando diluyente.

(Concentración final 25 µg/mL Benzocaína y 30 µg/mL Antipirina)

Todos los reactivos, muestras y estándares se prepararon el mismo día del análisis y antes de ser inyectados se filtraron a través de membranas de nylon de 0,45 µm.

Parámetros validados

Los parámetros evaluados para llevar a cabo la validación de la cuantificación de benzocaína y antipirina fueron:

Tabla 3. Parámetros validados para la cuantificación de benzocaína y antipirina en producto terminado. Modificado de: Ermer y Miller, 2005.

Parámetro	Debe ser validado
Especificidad	Si
Rango	Si
Linealidad	Si
Exactitud	Si
Precisión	Si
Repetibilidad	Si
Precisión intermedia	Si
Reproducibilidad	En este caso, No
Efecto matriz	Si
Límite de detección	Si
Límite de cuantificación	Si
Robustez	Si

Condiciones del análisis y equipamiento

Sistema cromatográfico

Tabla 4. Equipo utilizado para la validación. Fuente: Esta investigación.

Equipo HITACHI L-7000 Series	
Detector	UV Detector longitud de Onda variable L7400
Automuestreador	Inyector automático estándar L7200
Bomba	L7100
Software	D-7000 HPLC system manager

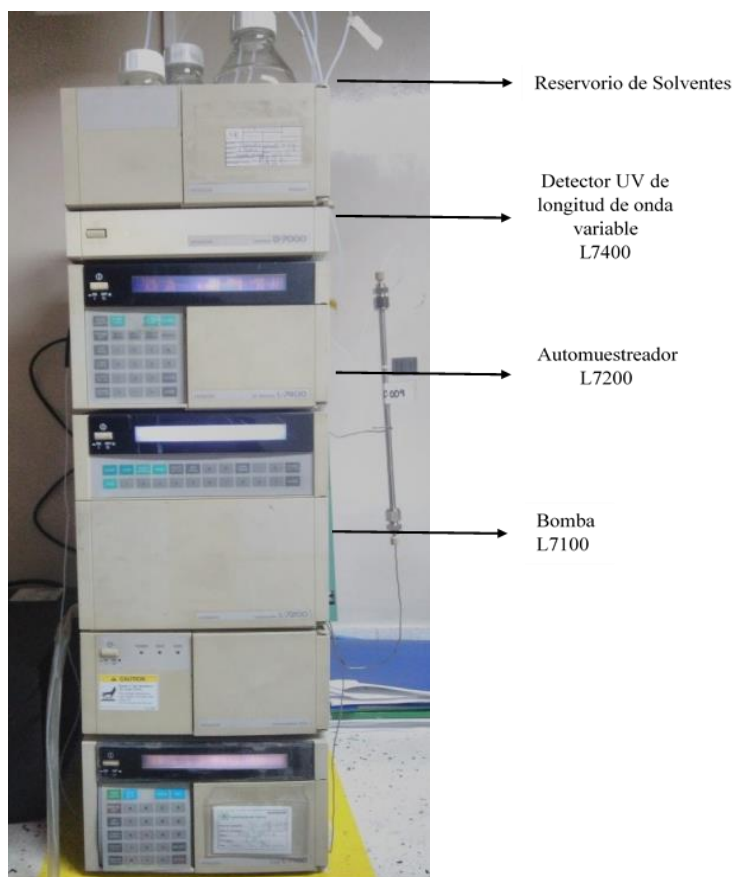


Figura 4. HPLC HITACHI L-7000 Series. Fuente: Esta investigación.

Condiciones del análisis

Tabla 5. Condiciones cromatográficas. Fuente: Esta investigación.

Condiciones Cromatográficas	
Longitud de onda	285 nm
Volumen de inyección	10,0 mL
Flujo	1,2 mL/minuto
Columna	Shodex C18 encapsada, 250x4,6 mm 5µm 120 Å
Temperatura	Ambiente
Fase móvil	60 % v/v de metanol y 40 % v/v de solución A Solución A- 97,9 % v/v de agua, 2,0 % v/v de ácido acético y 0,1 % v/v de trietilamina

Las condiciones cromatográficas (Tabla 5) se establecieron en la etapa de desarrollo del método, se eligieron teniendo en cuenta que cumplen los criterios de la idoneidad del sistema.

Identificación e Idoneidad del Sistema (System Suitability Test)

Soluciones estándar.

Se inyectó seis veces la solución de estándar combinado al 100% de benzocaína (25 µg/mL) y antipirina (30 µg/mL).

Selectividad

Análisis en condiciones normales.

Para comprobar que ninguno de los componentes y/o impurezas comunes del producto interfería, se llevó a cabo el análisis de: solución estándar benzocaína, solución estándar de antipirina, solución estándar combinado de benzocaína y antipirina, solución de placebo, solución placebo adicionado al 100% y diluyente (fase móvil).

Análisis en condiciones de estrés

Se realizó la degradación acida (HCl 0,1 N), básica (NaOH 0,1 N), oxidativa (H₂O₂ 3 %v/v) y fotolítica del producto y placebo. En los tres primeros casos las muestras se expusieron a dichas condiciones por un tiempo de 30 minutos a 40°C, mientras que la muestra que se sometió a degradación fotolítica se expuso a la luz UV durante 8 horas.

Linealidad del sistema

La linealidad del sistema fue evaluada mediante la preparación de 5 soluciones de estándar combinado de benzocaína y antipirina de diferentes concentraciones, desde el 50% hasta el 150% de la concentración de los analitos al momento del análisis, y por triplicado (ICH. p. 8, 20), como se indica en la tabla 6.

Tabla 6. Concentración de muestras para linealidad del sistema y linealidad del método. Fuente: Esta investigación.

Nivel (%)	50	80	100	120	150
Concentración de Antipirina ($\mu\text{g/mL}$)	15	24	30	36	45
Concentración de Benzocaína ($\mu\text{g/mL}$)	12,5	20	25	30	37,5

Linealidad del método

La linealidad del método fue evaluada mediante la preparación de 5 soluciones de diferentes concentraciones de solución producto preparadas a partir del método placebo adicionado, desde el 50% hasta el 150% de la concentración de los analitos al momento del análisis, y por triplicado (Ich, 2005), con los mismos niveles de concentración que la linealidad del sistema (tabla 6).

Límites de Detección y Cuantificación

Se prepararon tres muestras de diferente concentración como lo indica la tabla 7 y se realizaron inyecciones por triplicado de cada nivel.

Tabla 7. Concentración de muestras para evaluar LD-LQ. Fuente: Esta investigación.

Nivel	1	2	3
Concentración de Antipirina (ppm)	1,8	3,6	7,2
Concentración de Benzocaína (ppm)	1,5	3	6

Exactitud

La exactitud del método se evaluó mediante la prueba de recuperación de cantidades conocidas de estándar de benzocaína y antipirina adicionadas al placebo (Método del placebo adicionado). Se prepararon por triplicado soluciones al 80%, 100% y 120% y se inyectó por duplicado cada solución (Ich, 2005), la cuantificación se realizó con el método de estándar externo utilizando la ecuación 10.

Precisión

En el presente estudio se evaluó se evaluó repetibilidad (precisión del sistema y repetibilidad del método) y precisión intermedia.

Repetibilidad

Precisión del sistema

Se preparó y analizó una muestra de la solución de estándar combinado al 100% seis veces (System Suitability Test).

Repetibilidad del método

A partir de una solución producto de placebo adicionado, un analista en un mismo día preparó 6 muestras, se utilizaron tres de las muestras preparadas por el analista para evaluar la precisión intermedia.

Precisión intermedia

Dos analistas en diferentes días prepararon 3 soluciones estándar al 100%. Se realizó la valoración de los dos activos inyectando cada muestra por triplicado.

Robustez

Se prepararon muestras de producto terminado al 100%, se analizaron realizando los siguientes cambios:

Tabla 8. Condición normal y modificada. Fuente: Esta investigación.

Factor	Condición normal	Condición modificada
Columna	Shodex C18 4E	Sharlab C18 (5 μ m)
Fase Móvil	Solución A: Metanol (40:60)	Solución A: Metanol (50:50)
Flujo (mL/min)	1,2	1,0

Se analizaron 8 muestras para evaluar la robustez donde γ indica la condición normal y β la condición modificada según el método de Plackett y Burman. Se inyectó una vez cada muestra.

Tabla 9. Condiciones de análisis de las muestras para evaluar la robustez del método. Modificado de: Quattrocchi et al, 1992.

	Muestra							
Factor (Vi)	1	2	3	4	5	6	7	8
Columna	B	B	β	β	γ	Γ	γ	Γ
Fase Móvil	B	B	γ	γ	β	B	γ	Γ
Flujo	B	Γ	β	γ	β	Γ	β	Γ

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación

Se realizó la identificación de los componentes utilizando como material de referencia estándar primario USP de antipirina y benzocaína con una concentración de 30 y 25 ppm respectivamente, se analizaron muestras de los estándares de forma individual y estándar combinado (ver preparación de muestras), a continuación, se muestra el cromatograma del estándar combinado:

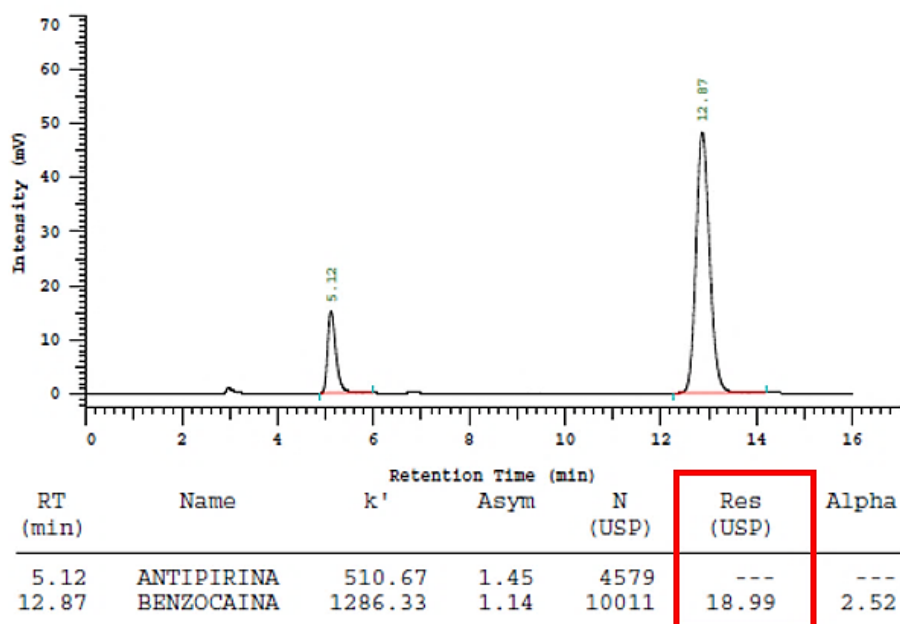


Figura 5. Cromatograma de estándar combinado de antipirina y benzocaína medido a 285 nm.
Fuente: Esta investigación.

En el cromatograma se puede observar que la antipirina eluye más rápido que la benzocaína, esto debe a que la antipirina es un compuesto aromático que presenta un efecto dieléctrico de polarización por la resonancia de $N-C=C-C=O$, lo cual contribuye a que la molécula tenga mayor polaridad, (Brown, et al., 1949), también se observa que la intensidad de la benzocaína es más alta debido a que a aproximadamente 285nm se encuentra su máximo de absorbancia (Ali, 1983), como podrá observarse más adelante, no se ve afectada la sensibilidad del método analítico en el rango estudiado, para evaluarla se calcularon los límites cuantificación y de detección. Cabe aclarar que las muestras que se analizarán por este método corresponden a producto terminado, por lo cual el resultado esperado es próximo al 100% de concentración (25 $\mu\text{g/mL}$ para la benzocaína y 30 $\mu\text{g/mL}$ para antipirina).

Idoneidad del sistema (System Suitability Test)

Se evaluó la idoneidad del sistema diariamente durante la validación, los datos se utilizaron respectivamente para realizar el cálculo estadístico de cada parámetro de validación. Teniendo en cuenta que se debe asegurar la aptitud del sistema verificando el cumplimiento de los criterios establecidos (tabla 12), los cuales se cumplieron para todos los casos.

En las tablas 10 y 11 se encuentran calculados los valores del promedio de platos teóricos, asimetría o factor de cola, %RSD de las áreas respuesta y factor de capacidad para antipirina y benzocaína respectivamente, los cuales, cumplen los criterios establecidos (tabla 12). Por otra parte, la resolución solamente se encuentra reportada para benzocaína con un valor promedio de 19,24 lo cual cumple con el criterio de aceptación, este es reportado con respecto al pico antipirina debido a que no hay ningún otro pico reportado. Cabe resaltar que no se reporta la resolución en la antipirina en los cromatogramas, esto puede ser debido a que el software no integra ningún pico cercano que haya eluido antes del activo, sin embargo, se realizó el cálculo aproximado teniendo en cuenta el ancho de pico y los tiempos de retención (ecuación 5).

Tabla 10. System Suitability Test para antipirina en estándar combinado. Fuente: Esta investigación.

Inyección	Área	Asimetría	Res	N	k'	RT
1	179880	1,43	4,18	4692	508,00	5,09
2	180644	1,42	4,18	4674	508,00	5,09
3	177321	1,41	4,18	4675	508,00	5,09
4	177023	1,40	4,17	4712	507,33	5,08
5	178413	1,41	4,18	4656	508,00	5,09
6	178935	1,40	4,18	4689	507,67	5,09
X	178703	1,41	4,18	4683	507,83	5,09
S	1415,84					
RSD (%)	0,792					
	Rango del tiempo de retención			5,088	±	0,510
	Límite superior				5,597	
	Límite inferior				4,58	

El rango de tiempo de retención del principio activo, dado por el tiempo de retención promedio \pm 10 % es el intervalo de tiempo que define el software del equipo para identificar el activo.

Tabla 11. System Suitability Test para benzocaína en estándar combinado. Fuente: Esta investigación.

Inyección	Área	Asimetría	Res	N	k'	RT
1	948436	1,16	19,240	10147	1285,00	12,86
2	950876	1,16	19,220	10132	1285,67	12,87
3	940526	1,14	19,220	10111	1286,33	12,87
4	939036	1,15	19,300	10165	1285,67	12,87
5	966455	1,15	19,240	10141	1287,00	12,88
6	946577	1,16	19,230	10083	1286,33	12,87
X	948651	1,15	19,24	10129	1286,00	12,87
S	9846,2642					
RSD (%)	1,038					
Rango del tiempo de retención				12,870	±	1,287
Límite superior					14,157	
Límite inferior					11,583	

El rango de tiempo de retención del principio activo, dado por el tiempo de retención promedio \pm 10 % es el intervalo de tiempo que define el software del equipo para identificar el activo.

Tabla 12. Criterio de aceptación del System Suitability Test. Tomado de: USP 41, 2019

Criterios de aceptación
Platos teóricos (N) mayor a 2000
Asimetría (T) menor a 2,0
%CV o RSD menor al 2,0%
Factor de capacidad mayor a 2

Selectividad

Se realizaron análisis en condiciones normales y en condiciones de estrés, es decir, se sometió el placebo y la solución producto (placebo adicionado) en una solución ácida, básica, oxidativa y fotolítica, con el fin de efectuar un estudio de selectividad que brinde la máxima información sobre las impurezas y productos de degradación potencialmente presentes en la muestra, así como posibles interferencias debidas a excipientes u otros componentes, este grado de selectividad se encuentra asociado a una de las finalidades del presente estudio, evaluar la estabilidad de la forma farmacéutica (Aguirre et al., 2001).

Se evidenció que no hay picos que coeluyan con los analitos e interfieran con la identificación y cuantificación de los activos. Para evaluar la resolución de los picos de los cromatogramas

obtenidos para la solución producto, el laboratorio establece un valor de resolución mayor a 1,5 para cada una de las respuestas de los activos asegurando una correcta selectividad.

En cuanto a la degradación del placebo (Figura 7), no se evidencia ningún pico que pueda interferir con el análisis de los activos, cumpliendo con el parámetro de validación.

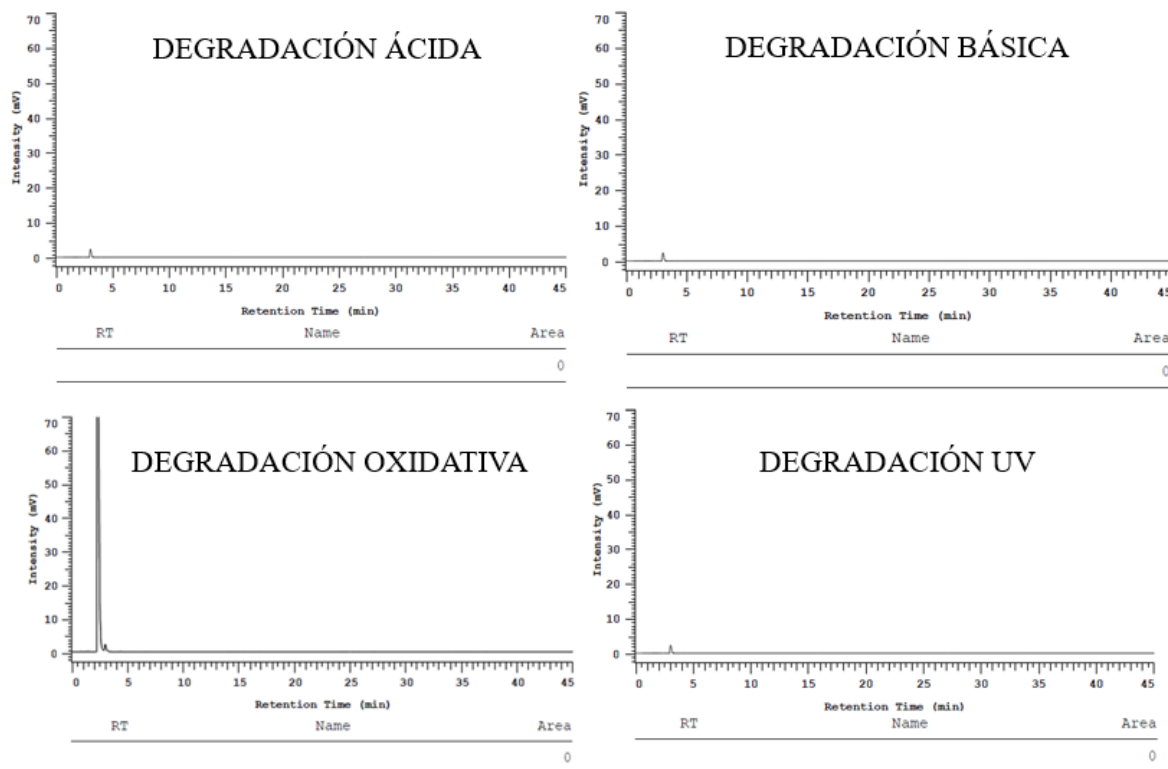


Figura 6. Cromatogramas de las degradaciones ácida, básica, oxidativa y fotolítica (UV) de placebo. Fuente: Esta investigación.

En cuanto a la degradación de la solución de producto terminado, se puede observar en los cromatogramas (figuras 8, 9, 10 y 11), el resultado de la degradación ácida, básica, oxidativa y fotolítica respectivamente, obteniendo valores de resolución que se encuentran dentro de las especificaciones y por lo tanto el cumplimiento para el parámetro de validación. Por otra parte, también se observa que no se encuentran picos nuevos debido a la degradación de la solución producto a excepción de la degradación oxidativa donde se puede ver un pico muy intenso debido al peróxido (Kahan, et al., 2012).

El análisis demostró que el método es capaz de discriminar sin interferencias entre el analito, sustancias de composición similar, impurezas y los demás productos que se encuentren en la muestra al momento de llevar a cabo el análisis (Ich, 2005).

DEGRADACIÓN ÁCIDA

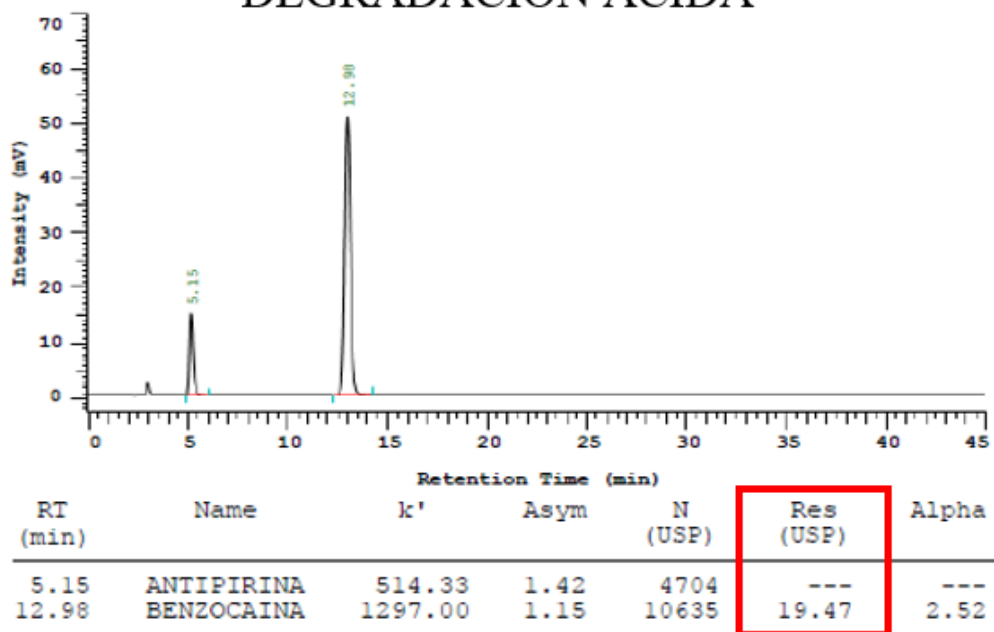


Figura 7. Cromatograma de la degradación ácida de la solución producto. Fuente: Esta investigación.

DEGRADACIÓN BÁSICA

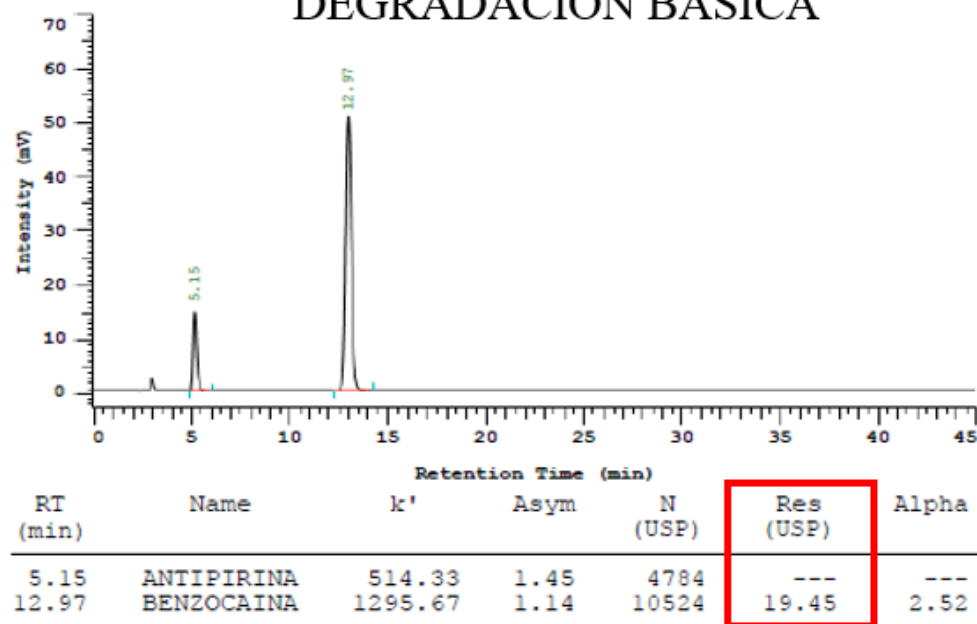


Figura 8. Cromatograma de la degradación básica de la solución producto. Fuente: Esta investigación.

DEGRADACIÓN OXIDATIVA

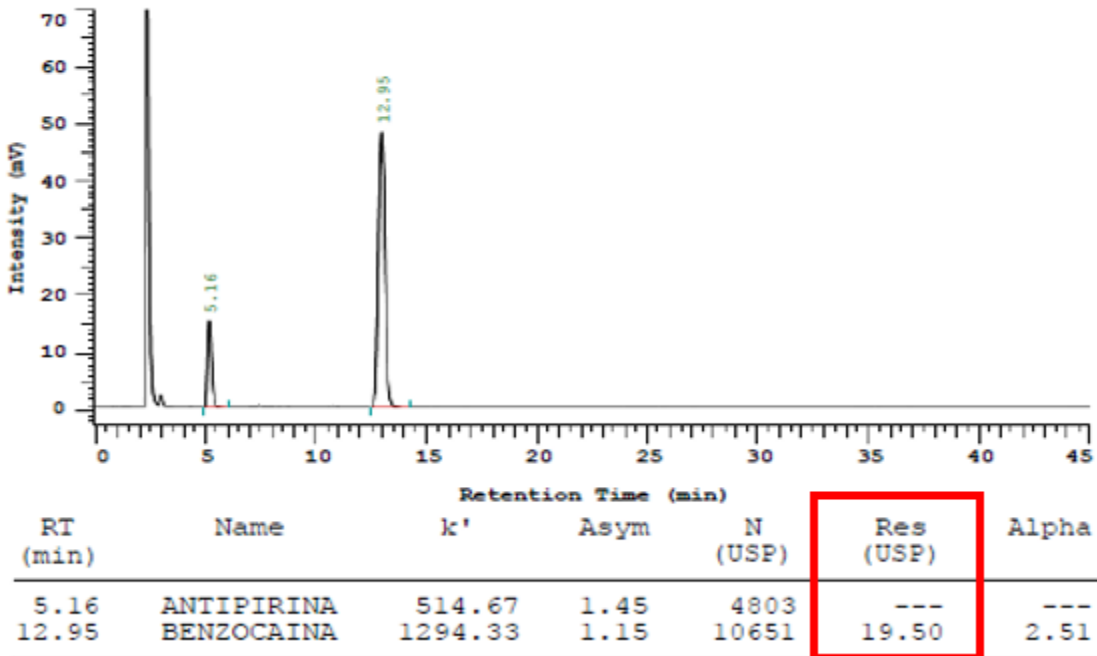


Figura 9. Cromatograma de la degradación oxidativa de la solución producto. Fuente: Esta investigación.

DEGRADACIÓN UV

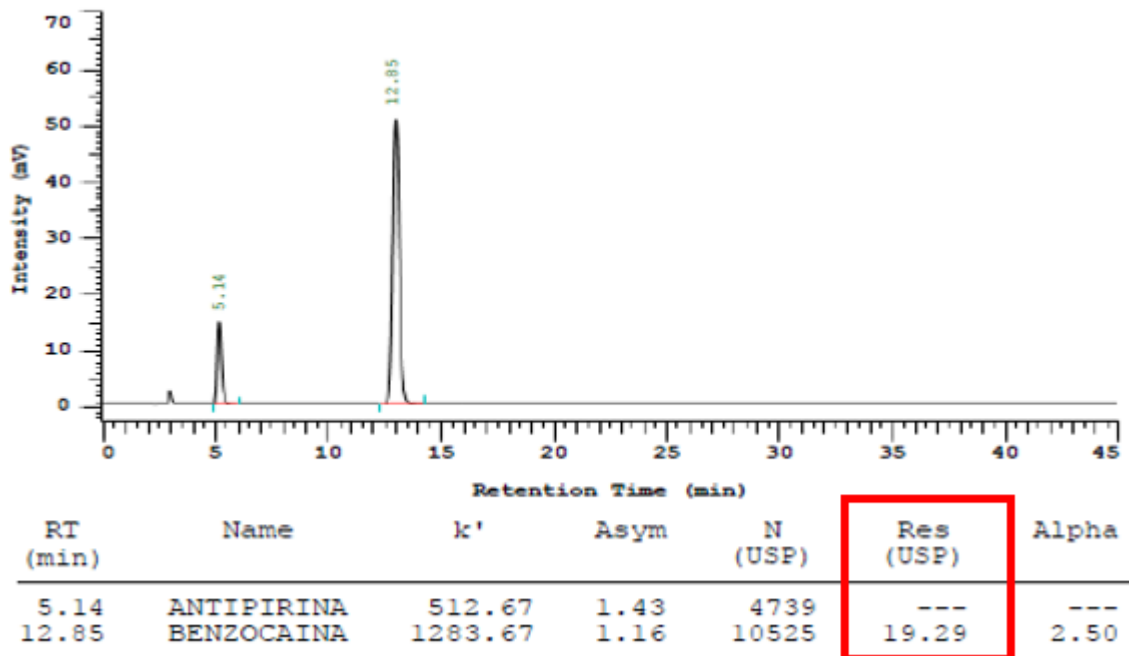


Figura 10. Cromatograma de la degradación UV de la solución producto. Fuente: Esta investigación.

Tabla 13. Resultado de degradación en condiciones de estrés de la solución producto para antipirina. Fuente: Esta investigación.

Estándar	Peso (mg)	Concentración (ppm)	Área promedio			
Antipirina	15	30	180287			
Degradación	Muestra	Concentración (ppm)	Área	Recobro (%)	Degradación (%)	Promedio Degradación (%)
Ácida	1	30	172197	95,513	4,487	4,878
	2	30	170789	94,732	5,268	
Básica	1	30	170696	94,680	5,320	5,442
	2	30	170255	94,436	5,564	
Oxidativa	1	30	174342	96,702	3,298	3,539
	2	30	173472	96,220	3,780	
Fotolítica	1	30	175230	97,195	2,805	3,242
	2	30	173653	96,320	3,680	

Tabla 14. Resultado de degradación en condiciones de estrés de la solución producto para benzocaína. Fuente: Esta investigación.

Estándar	Peso (mg)	Concentración (ppm)	Área promedio			
Benzocaína	12,1	24,1	949656			
Degradación	Muestra	Concentración (ppm)	Área	Recobro (%)	Degradación (%)	Promedio Degradación (%)
Ácida	1	25,6	977704	97,323	2,677	2,901
	2	25,4	973633	96,874	3,126	
Básica	1	25,4	966682	96,984	3,016	3,465
	2	25,4	965717	96,086	3,914	
Oxidativa	1	25,0	923109	94,094	5,906	6,336
	2	25,0	922299	93,235	6,765	
Fotolítica	1	26,0	986741	96,712	3,288	3,535
	2	25,8	982272	96,218	3,782	

Tabla 15. Daño de acuerdo al porcentaje de analito alterado (degradado) en la solución producto. Tomado de: Aguirre et al., 2001.

Porcentaje de analito alterado	Daño
100 - 80%	Leve
80 - 50%	Moderado
50 - 1%	Severo
<1%	Total

En las tablas 13 y 14 se encuentra calculado el porcentaje de degradación de antipirina y benzocaína respectivamente, se observa que el porcentaje de degradación en todos los casos es menor al 10%, que al compararlo con el rango de analito alterado de la tabla 15, se deduce que el daño ocasionado es leve y por lo tanto se afirma que el daño de los activos es leve (tabla 15).

Para calcular el porcentaje de degradación, inicialmente se calculó el porcentaje de recobro (Ecuación 10), posteriormente se resta el valor obtenido al 100%, esta diferencia corresponde al porcentaje de degradación.

Linealidad del sistema

Dentro del rango establecido se recomienda estudiar al menos 5 niveles de concentración. Los niveles hacen referencia a concentraciones definidas que se establece un rango en el cual se encuentra la concentración de los activos al momento de realizar el análisis (100%). Los niveles de concentración para los activos de interés se encuentran descritos en la tabla 6, el rango para los niveles fue establecido por el laboratorio ($100 \pm 50\%$), las muestras se analizaron por triplicado y en sentido creciente de concentración para minimizar posibles efectos memoria en el equipo, aunque, estadísticamente lo correcto sería analizar las muestras de forma aleatoria. (Aguirre et al., 2001).

En las tablas 16 y 17 se encuentra la relación concentración área y el análisis de residuos para antipirina.

Tabla 16. Resultados y análisis de residuos para la linealidad del sistema de antipirina en solución de estándar combinado. Fuente: Esta investigación.

Nivel de concentración	Concentración mg/mL	Área (Promedio)	x*y	x ²	y ²	Yi (Área corregida)
50%	0,0150	94723	1419	2,25E-4	8,97E+09	96109
	0,0150	97452	1460	2,25E-4	9,50E+09	96109
	0,0150	96719	1449	2,25E-4	9,35E+09	96109
75%	0,0240	151848	3641	5,75E-4	2,31E+10	152730
	0,0240	154367	3701	5,75E-4	2,38E+10	152730
	0,0240	151626	3635	5,75E-4	2,30E+10	152730
100%	0,0300	187429	5617	8,98E-4	3,51E+10	190478
	0,0300	189598	5682	8,98E-4	3,59E+10	190478
	0,0300	188975	5664	8,98E-4	3,57E+10	190478
125%	0,0360	228383	8214	1,29E-3	5,22E+10	228226
	0,0360	230314	8283	1,29E-3	5,30E+10	228226
	0,0360	233966	8414	1,29E-3	5,47E+10	228226
150%	0,0450	285012	12813	2,02E-3	8,12E+10	284848
	0,0450	283049	12724	2,02E-3	8,01E+10	284848
	0,0450	283716	12754	2,02E-3	8,05E+10	284848
Σ	0,4496	2857174	95472	1,50E-2	6,06E+11	2857174
X	0,0300	190478	6365	1,00E-3	7,58E+10	190478
n=	15					
Sb ²	3,10E+09			Sa ²	3107267,46	
Sb	55676			Sa	1763	
Sy,x	4844664					

*Corresponde a los valores de área calculados a partir de la ecuación de la recta (figura 12).

Tabla 17. Resultados y análisis de residuos para la linealidad del sistema de benzocaína en solución de estándar combinado. Fuente: Esta investigación.

Nivel de concentración	Concentración mg/mL	Área (Promedio)	x*y	x ²	y ²	Yi (Área corregida)
50%	0,0125	448066	5601	1,56E-4	2,01E+11	453076
	0,0125	456920	5711	1,56E-4	2,09E+11	453076
	0,0125	457546	5719	1,56E-4	2,09E+11	453076
75%	0,0200	714920	14298	4,00E-4	5,11E+11	722241
	0,0200	730107	14602	4,00E-4	5,33E+11	722241
	0,0200	719300	14386	4,00E-4	5,17E+11	722241
100%	0,0250	890575	22264	6,25E-4	7,93E+11	901684
	0,0250	895796	22395	6,25E-4	8,02E+11	901684
	0,0250	895504	22388	6,25E-4	8,02E+11	901684
125%	0,0300	1079660	32390	9,00E-4	1,17E+12	1081127
	0,0300	1088623	32659	9,00E-4	1,19E+12	1081127
	0,0300	1108307	33249	9,00E-4	1,23E+12	1081127
150%	0,0375	1348148	50556	1,41E-3	1,82E+12	1350292
	0,0375	1343792	50392	1,41E-3	1,81E+12	1350292
	0,0375	1348002	50550	1,41E-3	1,82E+12	1350292
Σ	0,3750	13525261	377160	1,05E-2	1,36E+13	13525261
X	0,0250	901684	25144	6,98E-4	1,70E+12	901684
n=	15					
Sb ²	8,70E+10			Sa ²	60655082,9	
Sb	294891			Sa	7788	
Sy,x	94569753					

*Corresponde a los valores de área calculados a partir de la ecuación de la recta (figura 13).

Con el fin de calcular los errores aleatorios de la pendiente y la ordenada en el origen, en primer lugar, se calculó el estadístico $S_{y/x}$, que estima los errores aleatorios en la dirección y, a partir de la siguiente ecuación:

$$S_{\frac{y}{x}} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (11)$$

Se comprueba que esta ecuación utiliza los residuos de y, $y_i - \hat{y}_i$, donde los valores de \hat{y}_i son los puntos sobre la recta de regresión calculada (Figura 12 y 13), es decir, los valores de y “ajustados” (valores en la columna de área corregida, Yi) (tabla 16 y 17).

. Una vez obtenido el valor de $S_{y/x}$, se calcularon Sb y Sa, las desviaciones estándar de la pendiente (b) y ordenada en el origen (a). Estas vienen dadas por

Desviación estándar de la pendiente:

$$S_b = \frac{S_y}{\sqrt{\sum_i(x_i - \bar{x})^2}} \quad (12)$$

Desviación estándar de la ordenada en el origen:

$$S_a = S_y * \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i(x_i - \bar{x})^2}} \quad (13)$$

Los valores de S_b y S_a se utilizaron para estimar los límites de confianza de la pendiente y de la ordenada en el origen. Así pues, los límites de confianza de la pendiente vienen dados por:

$$b \pm t_{(n-2)} * S_b \quad (14)$$

Donde el valor de t se obtiene para un nivel de confianza deseado ($\alpha=0,05$) y $(n-2)$ grados de libertad.

Similarmente los límites de confianza para la ordenada en el origen vienen dados por (Aguirre et al., 2001):

$$a \pm t_{(n-2)} * S_a \quad (15)$$

Los límites de confianza calculados se encuentran en las tablas 18 y 19.

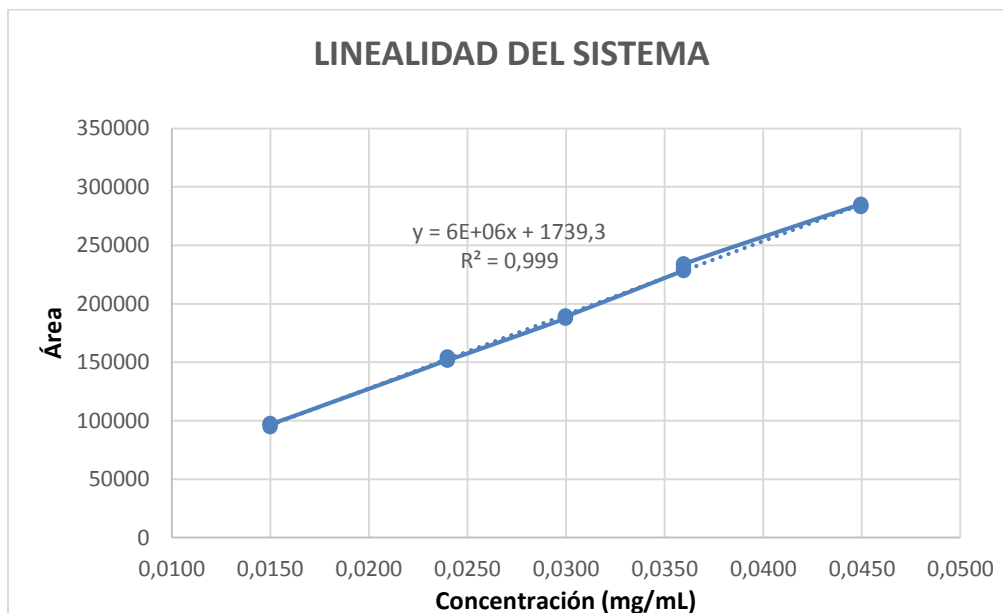


Figura 11. Recta de calibrado que relaciona el área cromatográfica con la concentración de antipirina en la solución estándar combinado. Fuente: Esta investigación.

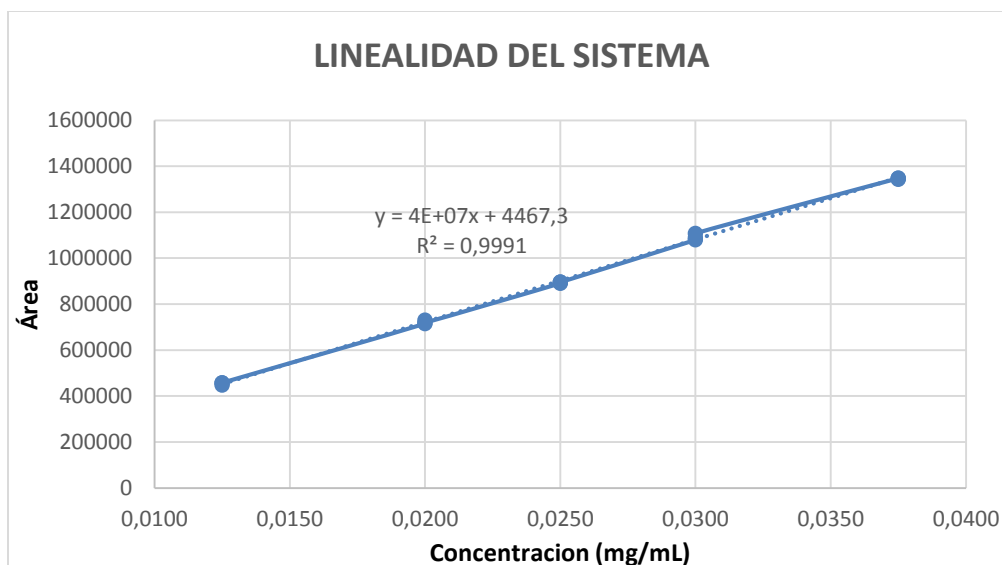


Figura 12. Recta de calibrado que relaciona el área cromatográfica con la concentración de benzocaína en la solución estándar combinado. Fuente: Esta investigación.

En las gráficas 12 y 13 se puede observar la relación de la concentración (x), con la respuesta área (y) y la ecuación de la recta, la relación entre las variables se expresa matemáticamente como una recta de regresión de tipo:

$$y = bx + a \quad (16)$$

La representación gráfica de la recta de regresión en un sistema de valores experimentales permite visualizar el ajuste. La pendiente b se encuentra relacionada con la sensibilidad del método (respuesta del método frente a los cambios de concentración del analito). El término a , u ordenada en el origen, es la intersección de la recta con el eje de ordenadas y es indicativo del error sistemático, no difiriendo de cero en caso de no existir sesgo. En las tablas 18 y 19 se puede observar la ecuación de la recta y los valores de r y r^2 para antipirina y benzocaína.

El coeficiente de correlación nos indica el grado de relación entre la variable " x " (concentración) y la variable " y " (respuesta). Su valor máximo es 1. Dado que en los dos casos los valores son mayores a 0,99 y r es cercano a la unidad significa que existe correlación entre " x " e " y " con una probabilidad elevada. Un valor nulo indica ausencia de relación lineal entre las variables.

La información obtenida mediante el cálculo de r es limitada y no justifica por si sola la linealidad, siendo r^2 coeficiente de determinación el que aporta una mayor significación estadística ya que expresa la proporción de la variación total de y explicada por el modelo. Dado que los valores obtenidos se encuentran por encima del criterio de aceptación (0,98) se verifica la relación lineal entre las variables.

Tabla 18. Parámetros estadísticos linealidad del sistema de la solución estándar combinado para antipirina. Fuente: Esta investigación.

Ecuación de la recta: $y = 6297596*x + 1739$			
	Experimental	Criterio de aceptación	
Coefficiente de correlación (R)	0,9994	0,99	
Coefficiente de determinación (R ²)	0,9990	0,98	
Prueba t-student			
Parámetro	t calculada	t tabulada	Criterio de aceptación
R ²	113,11	2,16	t calculada > t tabulada
Pendiente (b)	113,11	2,16	t calculada > t tabulada
Intercepto (a)	0,99	2,16	t calculada < t tabulada
Intervalos de confianza			
Pendiente (b)	6177335 – 6417857		No debe incluir el cero
Intercepto (a)	-2068 – 5546		Debe incluir el cero

Tabla 19. Parámetros estadísticos linealidad del sistema de la solución estándar combinado para benzocaína. Fuente: Esta investigación.

Ecuación de la recta: $y = 35888670*x + 4467$			
	Experimental	Criterio de aceptación	
Coefficiente de correlación (R)	0,9996	0,99	
Coefficiente de determinación (R ²)	0,9991	0,98	
Prueba t-student			
Parámetro	t calculada	t tabulada	Criterio de aceptación
R ²	121,70	2,16	t calculada > t tabulada
Pendiente (b)	121,70	2,16	t calculada > t tabulada
Intercepto (a)	0,57	2,16	t calculada < t tabulada
Intervalos de confianza			
Pendiente (b)	35251705 – 36525634		No debe incluir el cero
Intercepto (a)	-12355 – 21289		Debe incluir el cero

Se realizó la prueba t para el r con el fin de demostrar que existe correlación alta entre “x” (concentración) y “y” (área), la t tabulada se obtienen de tablas para un nivel de confianza del 95% y (n-2) grados de libertad (para todos los casos) y el t calculado se obtiene a partir de la siguiente ecuación:

$$t = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (17)$$

En este caso la hipótesis nula es la no correlación entre “x” e “y”, dado que el valor observado en los dos casos el t calculado es mayor al t tabulado, se rechaza esa hipótesis, siendo la correlación lineal significativa para la linealidad del sistema de antipirina y benzocaína (Quattrocchi et al., 1992).

Otra prueba realizada para verificar la linealidad del sistema es la significación estadística de la desviación estándar de la pendiente, donde, se trata de comprobar que existe una pendiente significativamente distinta de cero mediante una prueba t de Student, siendo t tabulado en este caso el valor de la distribución de Student para n-2 grados de libertad y un grado de significación $\alpha = 0,05$, la t calculada se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:

$$t = \frac{|b|}{s_b} \quad (18)$$

La pendiente tiene que ser estadísticamente distinta de cero para un grado de significación $\alpha = 0,05$. Dado que en los dos casos la t calculada es mayor a la t tabulada se rechaza la hipótesis nula (H_0 : La pendiente no difiere significativamente de cero) y por lo tanto se comprueba que la pendiente difiere significativamente de cero (se acepta H_i). Los intervalos de confianza de la pendiente no deben incluir el cero, lo cual se cumple para todos los casos.

Finalmente se realiza el test de proporcionalidad, el cual permite evaluar si la recta pasa por el origen de coordenadas determinando si la variable independiente es significativamente distinta de cero. Habitualmente suele aceptarse que el valor de dicha ordenada sea como máximo el que corresponde a un 1% de la respuesta del analito a valor nominal.

Para llevar a cabo este test se recurre como el caso anterior a la prueba de significación t de Student (n-2 grados de libertad, $\alpha = 0,05$) la t calculada se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$t = \frac{|a|}{s_a} \quad (19)$$

La ordenada en el origen tiene que ser estadísticamente igual a cero para el grado de significación escogido. Dado que en los dos casos la t calculada es menor a la t tabulada se acepta la hipótesis nula H_0 y se demuestra que la pendiente no difiere significativamente de cero (se rechaza la hipótesis alterna H_i). Los intervalos de confianza del intercepto deben incluir el cero, lo cual se cumple para todos los casos.

El cumplimiento de los criterios establecidos comprueba la linealidad del sistema.

Linealidad del método

Para evaluar la linealidad del método, se realizó el mismo tratamiento estadístico que el parámetro de validación linealidad del sistema, la diferencia radica en que la linealidad del método se realiza con solución producto, mientras que la linealidad del sistema se realiza con solución de estándar combinado. Inicialmente se calcularon los residuos como se indica en la tabla 20 y 21, con el propósito de estimar los intervalos de la pendiente y el intercepto, en seguida se observa el ajuste y la ecuación de la recta en las figuras 14 y 15 y, finalmente se calculan todos los parámetros estadísticos evaluados en la linealidad incluyendo las pruebas t de Student con sus respectivos criterios de aceptación, donde al realizar la comparación de cada uno se observa que cumplen con los criterios (Tabla 22 y 23), por lo cual se puede concluir el método es lineal.

Tabla 20. Resultados y análisis de residuos para la linealidad del método de antipirina en solución producto. Fuente: Esta investigación.

Nivel de concentración	Concentración mg/mL	Área (Promedio)	x*y	x ²	y ²	Yi (Área corregida)
50%	0,0150	88298	1324	2,25E-4	7,80E+09	88488
	0,0150	89795	1347	2,25E-4	8,06E+09	88488
	0,0150	88136	1322	2,25E-4	7,77E+09	88488
75%	0,0240	138914	3334	5,76E-4	1,93E+10	141309
	0,0240	141925	3406	5,76E-4	2,01E+10	141309
	0,0240	142864	3429	5,76E-4	2,04E+10	141309
100%	0,0300	174370	5231	9,00E-4	3,04E+10	176523
	0,0300	175620	5269	9,00E-4	3,08E+10	176523
	0,0300	177613	5328	9,00E-4	3,15E+10	176523
125%	0,0360	214021	7705	1,30E-3	4,58E+10	211737
	0,0360	210070	7563	1,30E-3	4,41E+10	211737
	0,0360	212380	7646	1,30E-3	4,51E+10	211737
150%	0,0450	270196	12159	2,03E-3	7,30E+10	264559
	0,0450	260610	11727	2,03E-3	6,79E+10	264559
	0,0450	263041	11837	2,03E-3	6,92E+10	264559
Σ	0,4500	2647851	88626	1,51E-2	5,21E+11	2647851
X	0,0300	176523	5908	1,00E-3	6,52E+10	176523
n=	15					
Sb ²	3,69E+09			Sa ²	3706604,4 9	
Sb	60748			Sa	1925	
Sy,x	5779115					

*Corresponde a los valores de área calculados a partir de la ecuación de la recta (figura 14).

Tabla 21. Resultados y análisis de residuos para la linealidad del método de benzocaína en la solución producto. Fuente: Esta investigación.

Nivel de concentración	Concentración mg/mL	Área (Promedio)	x*y	x ²	y ²	Yi (Área corregida)
50%	0,0125	501101	6264	1,56E-4	2,51E+11	504088
	0,0125	508318	6354	1,56E-4	2,58E+11	504088
	0,0125	500915	6261	1,56E-4	2,51E+11	504088
75%	0,0200	788487	15770	4,00E-4	6,22E+11	802821
	0,0200	828875	16577	4,00E-4	6,87E+11	802821
	0,0200	805985	16120	4,00E-4	6,50E+11	802821
100%	0,0250	984672	24617	6,25E-4	9,70E+11	1001977
	0,0250	992458	24811	6,25E-4	9,85E+11	1001977
	0,0250	1006921	25173	6,25E-4	1,01E+12	1001977
125%	0,0300	1218804	36564	9,00E-4	1,49E+12	1201132
	0,0300	1193049	35791	9,00E-4	1,42E+12	1201132
	0,0300	1199724	35992	9,00E-4	1,44E+12	1201132
150%	0,0375	1528947	57336	1,41E-3	2,34E+12	1499865
	0,0375	1480531	55520	1,41E-3	2,19E+12	1499865
	0,0375	1490865	55907	1,41E-3	2,22E+12	1499865
Σ	0,3750	15029649	419057	1,05E-2	1,68E+13	15029649
X	0,0250	1001977	27937	6,98E-4	2,10E+12	1001977
n=	15					
Sb ²	2,14E+11			Sa ²	149286677	
Sb	462635			Sa	12218	
Sy,x	232758798					

*Corresponde a los valores de área calculados a partir de la ecuación de la recta (figura 15).

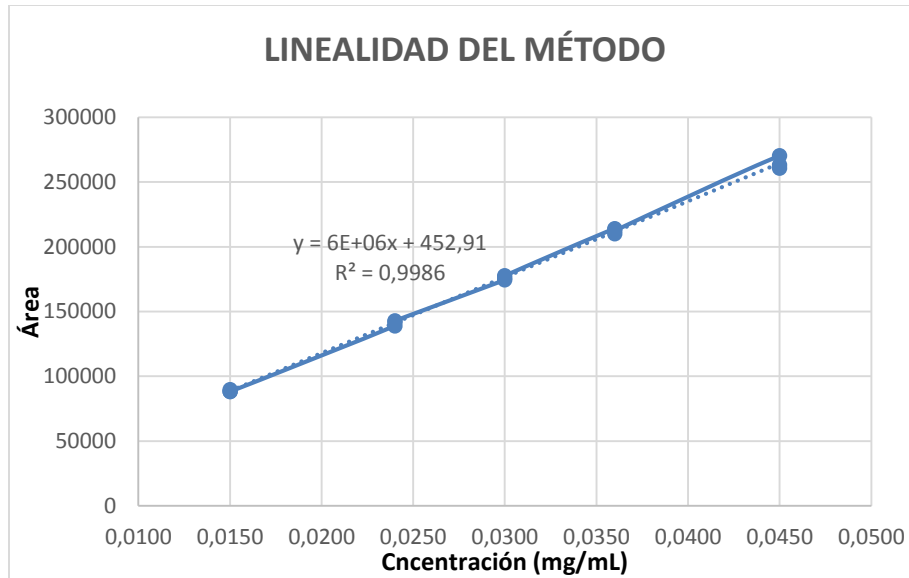


Figura 13. Recta de calibrado que relaciona el área cromatográfica con la concentración de antipirina en la solución producto. Fuente: Esta investigación.

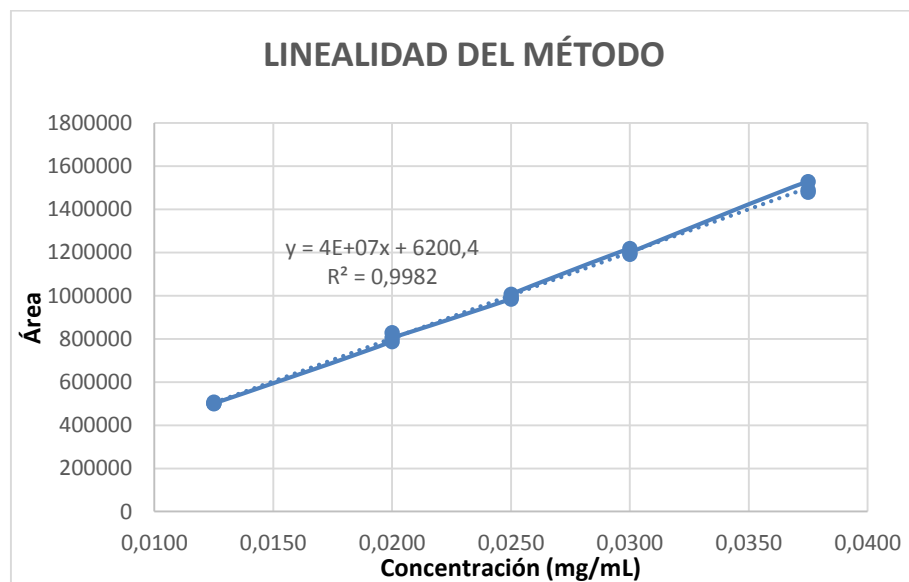


Figura 14. Recta de calibrado que relaciona el área cromatográfica con la concentración de benzocaína en la solución producto. Fuente: Esta investigación.

Tabla 22. Parámetros estadísticos linealidad del método para antipirina en solución producto.
Fuente: Esta investigación.

Ecuación de la recta: $y = 5869015*x + 452$			
	Experimental	Criterio de aceptación	
Coeficiente de correlación (R)	0,9993	0,99	
Coeficiente de determinación (R ²)	0,9986	0,98	
Prueba t-student			
Parámetro	t calculada	t tabulada	Criterio de aceptación
R ²	96,61	2,16	t calculada > t tabulada
Pendiente (b)	96,61	2,16	t calculada > t tabulada
Intercepto (a)	0,23	2,16	t calculada < t tabulada
Intervalos de confianza			
Pendiente (b)	5737798 - 6000231		No debe incluir el cero
Intercepto (a)	-3705 - 4611		Debe incluir el cero

Tabla 23. Parámetros estadísticos linealidad del método para benzocaína en solución producto.
Fuente: Esta investigación.

Ecuación de la recta: $y = 39831048*x + 6200$			
	Experimental	Criterio de aceptación	
Coeficiente de correlación (R)	0,9991	0,99	
Coeficiente de determinación (R ²)	0,9982	0,98	
Prueba t-student			
Parámetro	t calculada	t tabulada	Criterio de aceptación
R ²	86,10	2,16	t calculada > t tabulada
Pendiente (b)	86,10	2,16	t calculada > t tabulada
Intercepto (a)	0,51	2,16	t calculada < t tabulada
Intervalos de confianza			
Pendiente (b)	38831756 - 40830339		No debe incluir el cero
Intercepto (a)	-20191 - 32591		Debe incluir el cero

Exactitud

La exactitud se evaluó en 3 niveles (80, 100 y 120%) teniendo en cuenta que el método se utilizará para la valoración de producto terminado con tres muestras en cada nivel, los resultados se encuentran en la tabla 24 y 25 para antipirina y benzocaína respectivamente. La exactitud se calcula

como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de analito añadida a la muestra como se indica a continuación (Quattrocchi et al., 1992):

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Valor medio}}{\text{Valor aceptado como referencia (Estándar)}} * 100\% \quad (20)$$

Dado que la cuantificación se llevó a cabo por el método de estándar externo, para realizar el cálculo del porcentaje de recuperación (tabla 24 y 25), se utilizó la ecuación 10.

La recuperación esperada puede verse afectada por la matriz de la muestra, el procedimiento de preparación (más o menos complejo) y por la concentración de analito en la misma, para muestras de la industria farmacéutica el porcentaje recuperado debe estar entre 97-103%, dicho intervalo debe incluir el 100% (Aguirre et al., 2001), dado que como se observa en las tablas 24 y 25 todos los niveles evaluados para los dos activos se encuentran dentro del rango e incluyen el 100%, se concluye que las muestras cumplen con el criterio de aceptación para exactitud.

Tabla 24. Exactitud de antipirina en solución producto. Fuente: Esta investigación.

Estándar	Peso (mg)	Concentración (µg/mL)		Área promedio	
Antipirina	14,9	29,80		174063	
Nivel de concentración	Concentración (µg/mL)	Muestra	Área promedio	Porcentaje recuperado	Intervalo de confianza
80%	23,518	1	136916	99,662	99,33 - 100,54
		2	137542	100,117	
		3	137439	100,042	
100%	29,397	1	171966	100,14	99,32 - 101,44
		2	173236	100,879	
		3	171972	100,143	
120%	35,276	1	204558	99,265	97,17 - 102,26
		2	207908	100,891	
		3	204017	99,003	
t calculada			t tabulada	Criterio de aceptación	
0,07387132			2,306	t calculada < t tabulada	

Tabla 25. Exactitud de benzocaína en solución producto. Fuente: Esta investigación.

Estándar	Peso (mg)	Concentración (µg/mL)		Área promedio	
Benzocaína	12,5	25		988858	
Nivel de concentración	Concentración (µg/mL)	Muestra	Área promedio	Porcentaje recuperado	Intervalo de confianza
80%	20,000	1	784443	99,16	98,146 - 101,47
		2	795017	100,497	
		3	789258	99,769	
100%	25,000	1	980904	99,196	98,58 - 100,67
		2	989252	100,04	
		3	985347	99,645	
120%	30,000	1	1183409	99,729	98,91- 101,55
		2	1188677	100,173	
		3	1195964	100,787	
t calculada			t tabulada		Criterio de aceptación
0,612707			2,306		t calculada < t tabulada

En general, se requiere que el valor promedio no difiera significativamente del aceptado como referencia, para determinarlo se realizó un ensayo t de Student, la t calculada se obtiene con la ecuación descrita a continuación:

$$t = \frac{|100-X|*\sqrt{n}}{RSD} \quad (\text{Ecuación 21})$$

Se compara con la t calculada con la t tabulada para (n-1) grados de libertad para un nivel de confianza 95%, se puede observar en los dos casos la t calculada es menor que la t tabulada y por tanto se concluye que el valor medido no difiere significativamente del valor aceptado como referencia verificando la exactitud del método (Aguirre et al., 2001).

Efecto matriz

Para el caso la matriz es denominada placebo, que se compone de alcohol, esencia, colorante y agua purificada, El efecto matriz puede clasificarse de acuerdo a su naturaleza en aditivos y multiplicativos. Los aditivos se refieren a un desplazamiento positivo del cero en presencia de la matriz y los multiplicativos a un cambio de pendiente (Quattrocchi et al., 1992).

Una posible solución al problema de efecto matriz es que todas las medidas analíticas, incluyendo la línea de calibrado, deban ser realizadas de alguna manera utilizando la propia muestra, es decir utilizando el método de adición estándar (Miller & Miller, 2002). Este método no fue utilizado en

el presente estudio, pero se recurrió al método de placebo adicionado, para preparar muestras con concentraciones conocidas del producto. Al evaluar la exactitud, se obtuvo que los porcentajes de activo recuperado no difieren significativamente del 100% y por lo tanto se descarta un posible efecto matriz multiplicativo, dado a que si este efecto existiese se observarían diferencias significativas en los porcentajes de activo recuperado a medida que se aumenta la concentración del activo en la solución muestra.

Independientemente de la apariencia de la recta, resulta conveniente evaluar los siguientes estimadores de regresión para un nivel de confianza del 95%: coeficiente de regresión lineal (ajuste al modelo lineal), la pendiente (sensibilidad del método) y la ordenada de origen (que la recta pase por el origen y que cualquier desviación pueda adjudicarse a un error aleatorio) (Quattrocchi et al., 1992). El comprobar que las rectas obtenidas en linealidad del sistema y del método no difieren significativamente del origen de coordenadas comprueba que no existe efecto matriz aditivo (Tabla 22 y 23). La evaluación de los estimadores puede encontrarse realizada en la linealidad del método y del sistema, dado que se cumple con los criterios establecidos, se puede concluir que para el caso no se evidencia efecto matriz

Precisión

La precisión de un método analítico se expresa generalmente como el coeficiente de variación (CV o RSD) de una serie de medidas y se calcula matemáticamente de la siguiente manera:

$$\%CV = \frac{s}{x} * 100 \quad (22)$$

Donde s corresponde a la desviación estándar y x la media aritmética de los resultados.

Repetibilidad del sistema

Para evaluar este parámetro no se realiza ninguna variación de factores en el estudio de la precisión (equipo, día de análisis, analista), ya que estudia la variabilidad debida al instrumento. Se tomaron los valores del %RSD de las 6 inyecciones de la idoneidad del sistema, un %RSD menor al 2% verifica una adecuada repetibilidad del sistema (Aguirre et al., 2001), lo cual se cumple para los dos activos como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 26. Repetibilidad del sistema para antipirina y benzocaína. Tomado de: El presente estudio.

Activo	RSD de las 6 inyecciones sucesivas de estándar	Criterio de aceptación
Antipirina	0,792%	Menor al 2%
Benzocaína	1,038%	

Repetibilidad del método

Para evaluar este parámetro se tomaron los valores del %RSD de las 6 muestras preparadas por un analista el mismo día. Un %RSD menor al 2% verifica una adecuada repetibilidad del método (Aguirre et al., 2001), lo cual se cumple para antipirina y benzocaína como se puede observar en las tablas 27 y 28 respectivamente.

Tabla 27. Repetibilidad del método antipirina en solución producto. Fuente: Esta investigación.

	Peso (mg)	concentración (µg/mL)	Área	Porcentaje recuperado
Estándar	14,9	29,8	173051	-
Muestra 1	3	30	173903	99,72
Muestra 2	3	30	173331	99,40
Muestra 3	3	30	174496	100,06
Muestra 4	3	30	173636	99,57
Muestra 5	3	30	176424	101,17
Muestra 6	3	30	176305	101,10
			X	100,17
			S	0,779
			RSD (%)	0,778

Tabla 28. Repetibilidad del método benzocaína en solución producto. Fuente: Esta investigación.

	Peso (mg)	concentración (µg/mL)	Área	Porcentaje recuperado
Estándar	12,5	25,00	921083	-
Muestra 1	2,5	25,00	921012	99,99
Muestra 2	2,5	25,00	917217	99,58
Muestra 3	2,5	25,00	923727	100,29
Muestra 4	2,5	25,00	921706	100,07
Muestra 5	2,5	25,00	931515	101,13
Muestra 6	2,5	25,00	936277	101,65
			X	100,45
			S	0,780
			RSD (%)	0,777

Precisión Intermedia

Para evaluar este parámetro se realizó el análisis en diferente día y por diferentes analistas, cada análisis se realizó por triplicado y se calculó el porcentaje de recuperación para cada muestra con el fin de comprobar que la variabilidad aportada por el conjunto de factores está dentro de los

límites establecidos, el %RSD total no debe ser mayor al 4% (Aguirre et al., 2001), lo cual se cumple para los dos activos tal como lo indican las tablas 29 y 30.

Tabla 29. Precisión intermedia antipirina en solución producto. Fuente: Esta investigación.

	% Recuperación	
	Analista 1	Analista 2
Día 1	100,48	100,00
	100,15	100,70
	100,83	100,53
RSD	0,335	0,362
Día 2	99,53	100,06
	99,59	100,98
	100,34	100,55
RSD	0,451	0,454
	RSD total	0,456

Tabla 30. Precisión intermedia benzocaína en solución producto. Fuente: Esta investigación.

	% Recuperación	
	Analista 1	Analista 2
Día 1	99,99	99,77
	99,58	100,08
	100,29	100,70
RSD	0,355	0,472
Día 2	99,68	100,41
	99,77	100,94
	100,27	99,75
RSD	0,316	0,597
	RSD total	0,429

De igual manera se realizó el ANOVA factorial para los dos activos tal como se indica en la tabla 31 y 32. Se puede afirmar que no hay diferencias significativas en los resultados debido a los factores o a la interacción entre ellos, puesto que para todos los casos se obtiene que la F-calculada es menor que F-tabulada y se acepta la hipótesis nula H_0 : No existe efecto debido al factor o a la interacción entre ellos.

Tabla 31. Análisis de varianza precisión intermedia antipirina en solución producto. Fuente: Esta investigación.

Fuente de la variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Estimador	F experimental	Probabilidad (p)
Analista	0,223	1	0,223	1,361	0,277
Día	0,300	1	0,300	1,825	0,214
Interacción (analista-día)	0,465	1	0,465	2,829	0,131
Residuales	1,314	8	0,164		
Hipótesis			Criterio de aceptación		
Ho: No existe efecto debido al factor o a la interacción entre ellos			Probabilidad > $\alpha=0,05$		
Hi: existe efecto debido al factor o a la interacción entre ellos			Probabilidad < $\alpha=0,05$		

Tabla 32. Análisis de varianza precisión intermedia benzocaína en solución producto. Fuente: Esta investigación.

Fuente de la variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Estimador	F experimental	Probabilidad (p)
Analista	0,014	1	0,014	0,067	0,802
Día	0,361	1	0,361	1,789	0,218
Interacción (analista-día)	0,040	1	0,040	0,198	0,669
Residuales	1,617	8	0,202		
Hipótesis			Criterio de aceptación		
Ho: No existe efecto debido al factor o a la interacción entre ellos			Probabilidad > $\alpha=0,05$		
Hi: existe efecto debido al factor o a la interacción entre ellos			Probabilidad < $\alpha=0,05$		

Límites de detección (LD) y cuantificación (LQ)

Para la evaluación de los límites se realizaron rectas de calibrado en 3 niveles de concentración (tabla 7), con una señal de respuesta cercana a cero para cada activo (figura 16 y 17), la intersección con el eje “y” corresponde teóricamente al valor de la respuesta a concentración cero del analito.

Dado que anteriormente se demostró que la concentración y la señal respuesta de los activos tienen una relación lineal, esto debe cumplirse también para estas rectas de calibrado. En las gráficas

también se puede observar que existe correlación entre los datos, ya que el r^2 se encuentra muy cercano a la unidad.

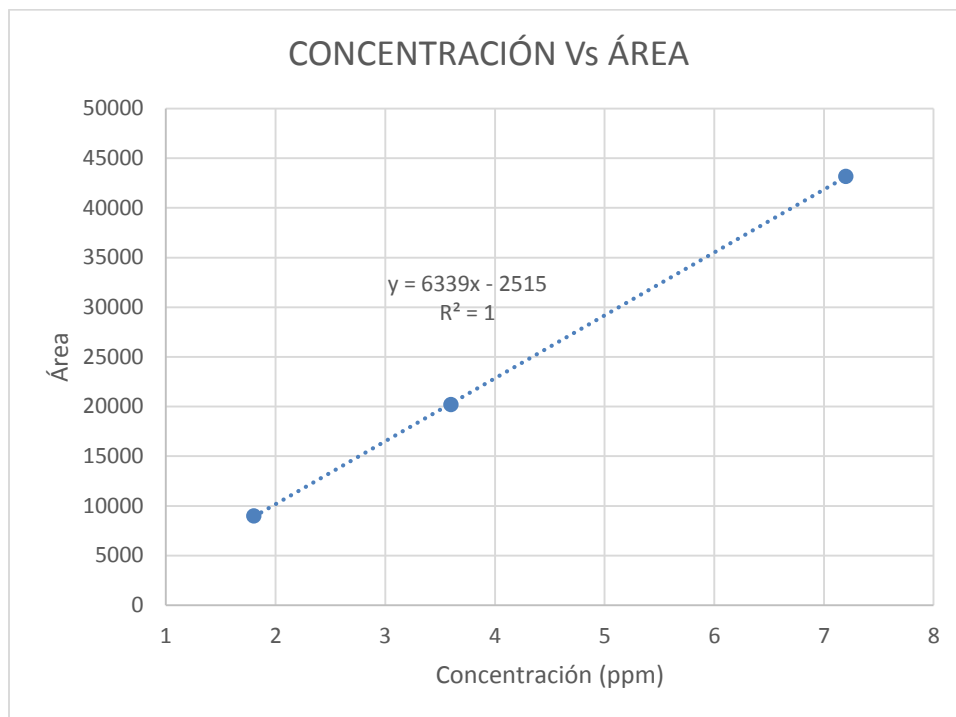


Figura 15. Recta de calibrado que relaciona concentración Vs. Área de antipirina en solución producto. Fuente: Esta investigación.

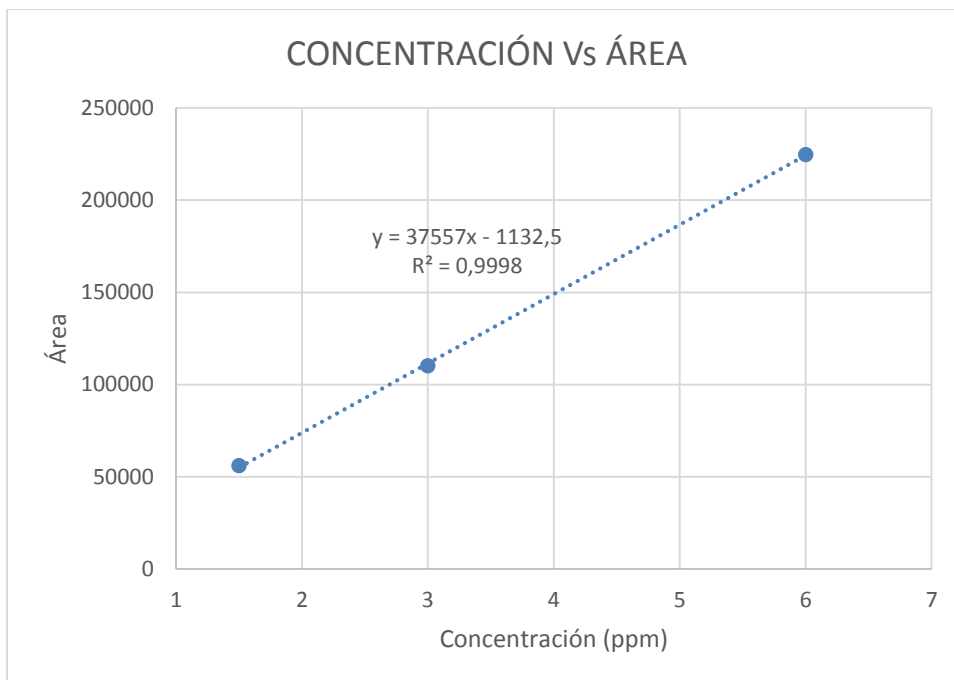


Figura 16. Recta de calibrado que relaciona concentración Vs. Área de benzocaína en solución producto. Fuente: Esta investigación.

Para el cálculo de la desviación estándar de la señal proporcionada por el ruido se construyó una recta, tomando como eje de ordenadas las desviaciones estándar de las respuestas y como eje de abscisas las concentraciones estudiadas (Tabla 33 y 34). De esta forma se obtuvo la ecuación de la recta para cada activo (figura 17 y 18), se observa que la desviación estándar se hace mayor a medida que disminuye la concentración, de igual manera, se observa que en las dos graficas se obtuvo un r^2 cercano a la unidad, lo que indica la correlación lineal entre los datos.

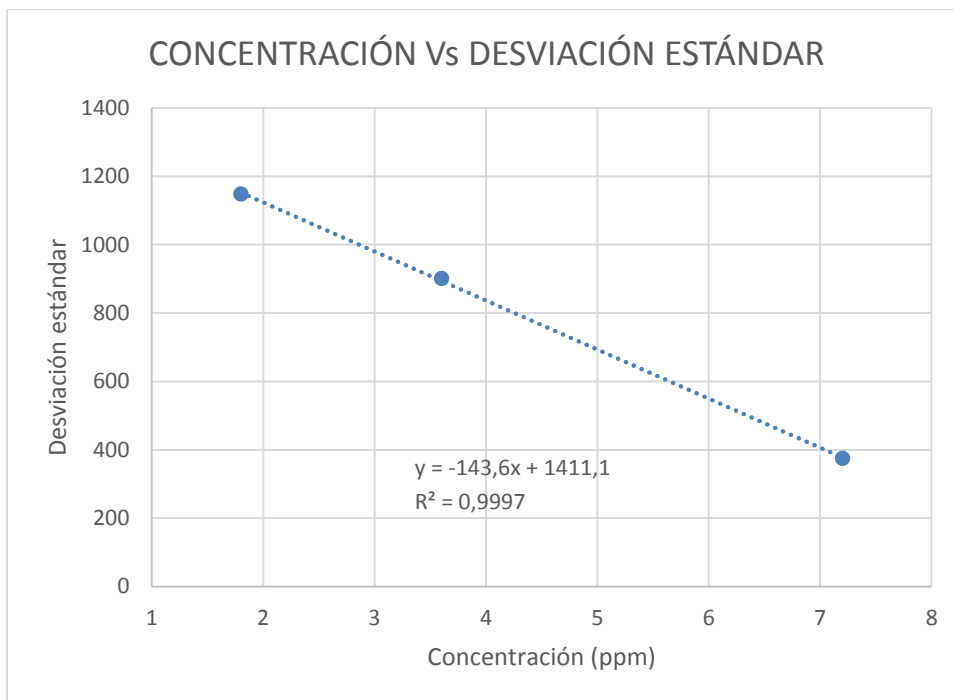


Figura 17. Recta de calibrado que relaciona concentración Vs. desviación estándar de antipirina en solución producto. Fuente: Esta investigación.

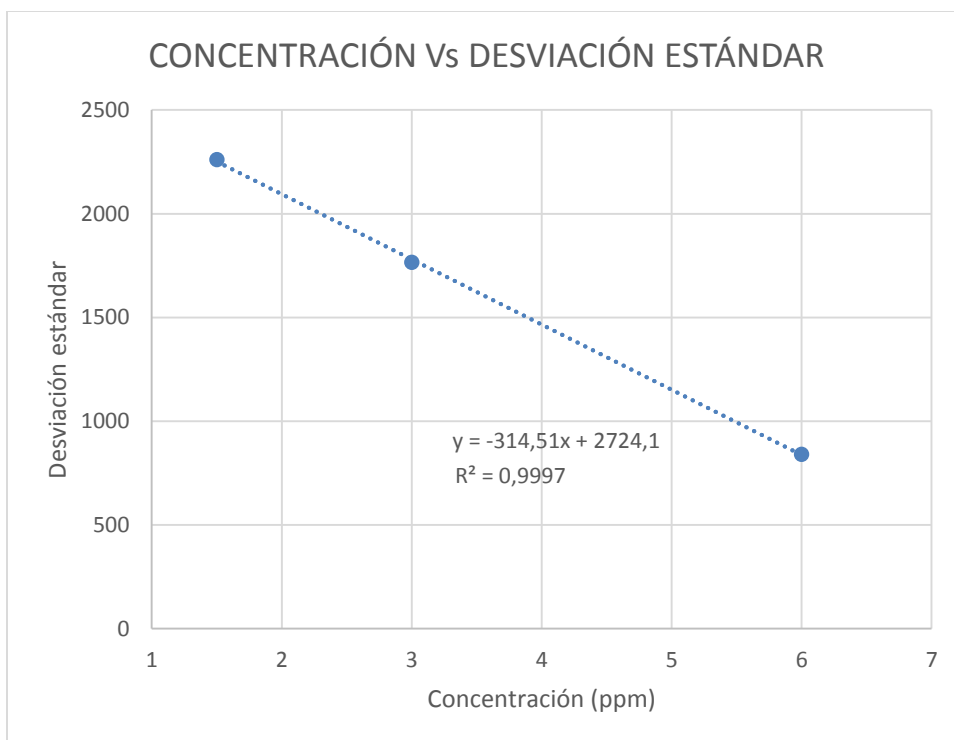


Figura 18. Recta de calibrado que relaciona concentración Vs. desviación estándar de benzocaína en solución producto. Fuente: Esta investigación.

Posteriormente se realizó el cálculo de los límites teniendo en cuenta la siguiente ecuación:

$$LD \text{ o } LQ = \frac{Y_{bl} + (K \times S_{bl})}{b \times \sqrt{n}} \quad (23)$$

Dónde:

Y_{bl} : Intercepto de la recta de concentración vs área

K: 3 para el límite de detección (LD) y 10 para el límite de cuantificación (LQ)

S_{bl} : Intercepto de la recta de concentración vs desviación estándar

b: Pendiente de la recta de concentración vs área

n: Numero de determinaciones por nivel (3)

Los límites de detección para antipirina y benzocaína son 0,157 y 0,143 ppm y los de cuantificación 1,056 y 0,436 ppm respectivamente (tablas 33 y 34). Se puede observar que para antipirina los límites son menores que los de benzocaína, esto puede ser debido a que las áreas respuesta obtenidas para la benzocaína durante el análisis presentan valores más altos, dado a que el análisis se realiza con una longitud de onda que corresponde a un máximo de absorción del activo (280 nm).

Tabla 33. Límites de detección y de cuantificación de antipirina en solución producto. Fuente: Esta investigación.

Nivel Concentración (ppm)	Área	Desviación estándar
	8973	
1,8	10606	1147,900
	11187	
	20189	
3,6	21879	901,281
	21577	
	43165	
7,2	43742	374,836
	43039	
LD (ppm)		0,157
LQ (ppm)		1,056

Tabla 34. Límites de detección y de cuantificación de benzocaína en solución producto. Fuente: Esta investigación.

Nivel de concentración (ppm)	Área	Desviación estándar
1,5	56032	2261,357
	57412	
3	60452	1767,009
	110294	
	113819	
	112275	
6	224623	841,526
	226306	
	225476	
LD (ppm)		0,143
LQ (ppm)		0,436

Robustez

La evaluación de robustez se realizó por el diseño de Plackett y Burman, teniendo en cuenta las variaciones a evaluar (tabla 9): columna, fase móvil y flujo. Los resultados obtenidos se encuentran en la tabla 37 y 38, donde se encuentra calculado el porcentaje de recuperación de cada muestra según el factor modificado.

Tabla 35. Porcentaje de recuperación de la muestra de antipirina en solución producto. Fuente: Esta investigación.

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8
Peso estándar (mg)	15	15	15	15	15	15	15	15
Concentración del estándar (µg/mL)	30	30	30	30	30	30	30	30
Área promedio del estándar	175929	176214	176085	191969	119995	171333	186090	173288
Peso muestra (mg)	15	15	15	15	15	15	15	15
Concentración muestra (µg/mL)	30	30	30	30	30	30	30	30
Área Muestra	174763	173994	176532	190698	119049	169693	186860	173903
% recuperación	99,34	98,74	100,25	99,34	99,21	99,04	100,41	100,36

Tabla 36. Porcentaje de recuperación de la muestra de benzocaína en solución producto. Fuente: Esta investigación.

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8
Peso estándar (mg)	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Concentración del estándar (µg/mL)	25	25	25	25	25	25	25	25
Área promedio del estándar	974822	933536	920690	1074059	668207	910628	944666	920863
Peso muestra (mg)	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Concentración muestra (µg/mL)	25	25	25	25	25	25	25	25
Área Muestra	973262	913012	924208	1062215	661149	906683	957015	921012
% recuperación	99,84	97,80	100,38	98,90	98,94	99,57	101,31	100,02

La influencia de cada factor se calculó utilizando la (ecuación 24). Siendo V_i el valor de la influencia del factor, φ^* el resultado del análisis de las muestras con el nivel modificado del factor evaluado y φ el resultado del análisis de las muestras con el nivel normal del factor. Se afirma que la influencia del factor es significativa si el valor absoluto de V_i es mayor al valor obtenido del producto entre la desviación estándar del método y raíz de 2

$$V_i = \frac{\sum \varphi^*}{4} - \frac{\sum \varphi}{4} \quad (24)$$

En las tablas 39 y 40 se puede observar la influencia de los factores modificados para antipirina y benzocaína, la influencia del factor es significativa si es mayor que $S^*\sqrt{2}$ (donde S es la desviación estándar obtenida en la repetibilidad del método). Se obtuvo que para la antipirina no hay influencia significativa en ninguno de los 3 factores modificados. El cambio de columna y flujo no es significativo para el análisis de benzocaína, sin embargo, el cambio de fase móvil si tiene influencia significativa en el método ya que V_i (1,113) es mayor que 1,103.

Tabla 37. Influencia de los factores modificados de antipirina en solución producto. Fuente: Esta investigación.

	Columna	Fase móvil	Flujo
Influencia del factor calculada	0,339	1,007	0,435
La influencia es significativa	NO	NO	NO
La influencia del factor es significativa si		$ V_i > S^* \sqrt{2}$ $ V_i > 1,102$	

Tabla 38. Influencia de los factores modificados de benzocaína en solución producto. Fuente: Esta investigación.

	Columna	Fase móvil	Flujo
Influencia del factor calculada	0,728	1,113	1,048
La influencia es significativa	NO	SI	NO
La influencia del factor es significativa si		$ V_i > S^* \sqrt{2}$ $ V_i > 1,103$	

De lo anterior se puede deducir que el método es robusto para el cambio de columna y de flujo, pero no para el cambio de fase móvil, por lo tanto, es crítico para la separación que no se produzcan modificaciones de la misma.

CONCLUSIONES

La evaluación de la linealidad del método de análisis para benzocaína y antipirina demostró tener una correlación significativa entre los valores de concentración y las áreas de respuesta obtenidas, esto se vio reflejado al evaluar el coeficiente de correlación (r), el análisis de residuos y el test de linealidad.

La validación de la metodología analítica propuesta para el análisis de producto terminado de benzocaína y antipirina en solución bucal realizada en el laboratorio Quality Farma Análisis permitió establecer que existen adecuados niveles de linealidad, exactitud y precisión en el rango comprendido entre 23,5 – 35,3 $\mu\text{g/mL}$ para antipirina y entre 20,0 – 30,0 $\mu\text{g/mL}$ para benzocaína, teniendo en cuenta que se espera obtener resultados cercanos al 100% (30 $\mu\text{g/mL}$ y 25 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente).

Se evidenció que el método es robusto para el cambio de columna y de flujo, sin embargo, el cambio de fase móvil es un factor significativo, por lo tanto, es crítico para la cuantificación que no se produzcan modificaciones de la misma.

El método validado es idóneo para el análisis de estudios de muestras en estabilidad, ya que cuando las muestras se sometieron a condiciones de estrés, se evidenció que no hay picos que coeluyan con los analitos e interfieran con la identificación y cuantificación de los activos.

El método no presenta efecto matriz, dado que los porcentajes de recuperación de los activos no difieren significativamente del 100% como fue demostrado en la evaluación de la exactitud y a que la recta obtenida para la linealidad del método no difiere significativamente del origen de coordenadas.

Se concluye que realizar la Práctica Empresarial en el laboratorio Quality Farma Análisis fue beneficiosa, debido a que influyó en mi formación personal y profesional por la experiencia y el conocimiento obtenido en el manejo de equipos HPLC, en el campo de análisis farmacéutico, la normatividad legal vigente y en el ambiente laboral.

IMPACTOS

Se realizó el protocolo, con los procedimientos detallados de validación establecidos, para la cuantificación de benzocaína y antipirina en solución bucal por HPLC.

Se documentó el informe de validación del método para para la cuantificación de benzocaína y antipirina en solución bucal por HPLC con el análisis estadístico requerido y sus respectivas evidencias.

Se redactó el procedimiento analítico de la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) que se desarrolla actualmente en el laboratorio Quality Farma Análisis, en aspectos relacionados con el procedimiento estándar de operación (SOP), para la cuantificación de benzocaína y antipirina en solución bucal.

Se obtuvo experiencia en otras actividades desarrolladas durante la Práctica Empresarial realizada en el Laboratorio Quality Farma Análisis, entre ellas se encuentran: preparación de muestras para análisis, realización de ensayos de disolución, peso promedio, desintegración, uniformidad de contenido, manejo y programación de mantenimientos, calificaciones y calibraciones para los equipos del laboratorio, apoyo en el área de estabilidad de los productos farmacéuticos, actualización, seguimiento y modificación a la documentación del sistema de gestión de calidad, implementación en el control de condiciones ambientales en los puntos críticos del laboratorio y manejo y uso de termohigrómetros e informes de calibración, apoyo en la capacitación al personal del sistema de gestión de calidad y su aplicación, manejo del listado maestro de documentos, evaluación de los resultados de las calibraciones y/o calificaciones de equipos, revisión de inventarios de materiales y reactivos, y muestreo de trazas en plantas de producción, entre otros.

RECOMENDACIONES

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la robustez, se recomienda verificar la fase móvil en la programación del equipo, debido a que este factor influye en la cuantificación del pico de benzocaína.

Se recomienda estimar la incertidumbre de los métodos validados, aunque por el momento no ha sido exigido por el INVIMA, es necesaria, debido a que aumenta la confianza en la validez del resultado de medición.

Dado que al evaluar la selectividad del método los porcentajes de degradación de los activos fueron bajos, se sugiere que cuando suceda esto, las muestras sean sometidas a condiciones de estrés más fuertes, con el fin de tener mayor certeza en que los posibles productos de degradación no afectan el parámetro mencionado.

El laboratorio actualmente cuenta con tres equipos HPLC, por tanto, se recomienda incluir y evaluar en la precisión intermedia el factor de equipos.

REFERENCIAS

- Aguirre, L., García, F. J., García, T., Illera, M., Juncadella, M., & Lizondo, C. M. (2001). *Validación de métodos analíticos*. Barcelona, España: AEFI. 23, 24, 46-105
- Ali, S. L. (1983). Benzocaine. In *Analytical Profiles of Drug Substances* (Vol. 12, pp. 73-104). Academic Press.
- B Brown, R. D., Hukins, A. A., Le Fèvre, R. J. W., Northcott, J., & Wilson, I. R. (1949). 592. Dielectric polarisation and spectroscopic data for antipyrin, certain of its derivatives, and phenylisooxazolone. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 2812-2816.
- Cardona, R., Ramírez, R. H., Reina, Z., & Escobar, M. F. (2009). Alergia e intolerancia a antiinflamatorios no esteroides : desensibilización exitosa en tres casos y revisión de la literatura, 181–190.
- Gupta, 1997. (1977). Quantitative Determinations of Antipyrine and Benzocaine in Ear Drops by High-pressure Liquid Chromatography, *66*(6), 897–898.
- Ich. (2005). ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology. *International Conference on Harmonization*. https://doi.org/http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf, 1- 20.
- INVIMA. (2002). Republica de colombia ministerio de salud instituto nacional de salud. *Normas de Calidad y Guia de Analisis*, 1-29 Retrieved from https://www.invima.gov.co/images/normas_tecnicas.pdf
- Kahan, T. F., Washenfelder, R. A., Vaida, V., & Brown, S. S. (2012). Cavity-Enhanced Measurements of Hydrogen Peroxide Absorption Cross Sections from 353 to 410 nm, 5941-5947.
- Kirk, L. A., Levine, B. J., Weber, J. D., Miao, H., Cao, M., Xu, D., ... Merey, H. A. (2015). Lack of Methemoglobin Elevations After Topical Applications of Benzocaine Alone or Benzocaine Plus Tetracaine to the Oral Mucosa. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, *54*(2), 920–927. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.051>
- Levine, B. J., & Weber, J. D. (1964). Antipyrine in Combinations with Other Drugs, (3050).
- Merey, H. A. (2016). Simple spectrophotometric methods for the simultaneous determination of antipyrine and benzocaine. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, *54*(2), 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2016.05.003>
- Perez. (2005). A new validated method for the simultaneous determination of benzocaine , propylparaben and benzyl alcohol in a bioadhesive gel by HPLC, *39*, 920–927. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.05.033>

Quattrocchi et al. (1992). *Introduccion a la HPLC , Aplicacion y Practica.*, 241-328

Szoke, A., & Hayton, W. L. (1997). Quantification of benzocaine and its metabolites in channel catfish tissues and fluids by HPLC, *16*, 69–75.

The United States Pharmacopeia 2018: USP 41 ; The national formulary : NF 36. (2018). USP 41, 378, 379.

Vallejo, A. P., Vallejo, M. J. G., & Clasificacion, E. Q. (2004). Anestésicos locales en odontoestomatología, (1), 438–443.

ANEXOS

Anexo A: Certificados de estándares primarios USP de benzocaína y antipirina

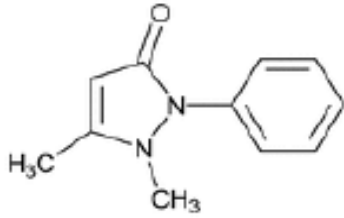


Certificate

ANTIPYRINE

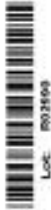
(2,3-Dimethyl-1-phenyl-3-pyrazolin-5-one)

USP Catalog No.:	1040005
USP Lot No.:	R02990

	CAS No.:	60-80-0
	Molecular Formula:	C ₁₃ H ₁₃ N ₂ O
	Molecular Weight:	188.23

LABEL TEXT

For use with specified USP compendial tests.
Not for use in drug. See GDS 2015 to 2019 for
current regulations.



USP REFERENCE STANDARD

ANTIPYRINE 200 mg



Warning! Harmful if swallowed. May cause
an allergic skin reaction.

Do not dry. For quantitative applications, use a value of
0.998 mg of antipyrine per mg of material on the as is basis.
Keep container tightly closed. Protect from light.

USP, 1201 Taubman Place, Rockville, MD, +1-301-581-0888
CAT No. 503885 Material net in India

Wash thoroughly after handling. Contaminated work
clothing must not be allowed out of the workplace. Wear
protective gloves. If swallowed: Call a poison
center/doctor if you feel unwell. Rinse mouth. If on skin:
Wash with plenty of water. If skin irritation or rash
occurs: Get medical advice/attention. Wash
contaminated clothing before reuse. Dispose of
contents/container in accordance with
local/regional/national/international regulations.

Jeri L. Joth
Quality Assurance

Calculation Value

If a value is not provided on the label or accompanying documentation and the Reference Standard has a quantitative USP compendial application, a value of 100.0% is used. The purity value is not applicable for qualitative uses. Please refer to the specific Reference Standard label for further information.

Expiration

Current lots are identified in the current USP Catalog. In some cases, the previous lot may still be considered valid for use. If so, it is identified in the column marked "Previous Lot/Valid Use Date."

It is the responsibility of each user to determine that this lot is current or valid when used. For the most up-to-date information, please refer to the USP Store at www.usp.org.

Instructions for Use

Follow the instructions on the label of the USP Reference Standard and in the appropriate USP documentary standard(s).

Non-Monograph Use

The suitability of this Reference Standard for use in non-compendial applications is solely the responsibility of the user.

LEGAL NOTICE

USP WARRANTS GOOD TITLE TO USP REFERENCE STANDARDS ON DISPATCH FROM USP. THE FOREGOING WARRANTY IS IN LIEU OF ANY OTHER WARRANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION ANY WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, OR ANY WARRANTY THAT THE PRODUCTS, INCLUDING THIS CERTIFICATE, ARE OF MERCHANTABILITY QUALITY. USP'S LIABILITY ARISING OUT OF OR RELATING TO THE SUPPLY OF USP REFERENCE STANDARDS AND THIS CERTIFICATE SHALL IN NO EVENT INCLUDE LOSS OF PROFITS, COST OF PROCURING SUBSTITUTE GOODS OR SERVICES, OR ANY INCIDENTAL, INDIRECT, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES OF ANY KIND, EVEN IF USP IS AWARE OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. WITHOUT LIMITING THE GENERALITY OF THE FOREGOING, USP DOES NOT WARRANT THAT THE USE OR RESALE OF USP REFERENCE STANDARDS, INCLUDING THEIR USE TO PERFORM TESTS AND ASSAYS PUBLISHED BY USP, WILL NOT INFRINGE UNITED STATES OR ANY OTHER PATENTS.

USP Reference Standards are not intended for use as drugs, dietary supplements, or as medical devices.

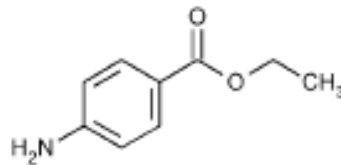
This certificate may not be reproduced without the express written permission of USP.



U.S. Pharmacopeia
The Standard of Quality™

USP Certificate

Benzocaine LOT J2M122



Molecular Formula

C₉H₁₁NO₂

Molecular Weight

165.19

CAS Number

94-09-7

LABEL TEXT



USP REFERENCE STANDARD

BENZOCAINE 500 mg

Warning: Causes skin irritation. Causes redness/eye irritation. May cause allergic skin reaction.



Do not dry. For quantitative applications, use a value of 1000 mg of benzocaine per mg of material on the as is basis. Keep container tightly closed.

USP, 12801 Twinbrook Pkwy, Rockville, MD, +1-301-881-0888
CMTN: 004000

Intentionally one-labeled for USP compliance

For use in non-labeled USP compound
Part of USP Reference Standards
LOT# J2M122 (REVISED 08/2012)

Wash thoroughly after handling. Contaminated work clothing must not be allowed out of the workplace. Wear protective gloves. Wear eye/face protection. For skin: Wash with plenty of water. If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention. Take off contaminated clothing and wash it before reuse. If in eyes: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: Get medical advice/attention. Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

Jeri L. Ioth

Quality Assurance

Calculation Value

Unless otherwise stated on the Reference Standard label, a value of 100.0% should be used in the compendial applications for which the use of this Reference Standard is intended. Please refer to the specific Reference Standard label for further information.

Expiration

Current lots are identified in the current USP Catalog. In some cases, the previous lot may still be considered valid for use. If so, it is identified in the column marked "Previous Lot/Valid Use Date."

It is the responsibility of each user to determine that this lot is current or valid when used. For the most up-to-date information, please refer to the USP Store at www.usp.org.

Instructions for Use

Follow the instructions on the label of the USP Reference Standard and in the appropriate USP documentary standard(s).

Non-Monograph Use

The suitability of this Reference Standard for use in non-compendial applications is solely the responsibility of the user.

LEGAL NOTICE

USP WARRANTS GOOD TITLE TO USP REFERENCE STANDARDS ON DISPATCH FROM USP. THE FOREGOING WARRANTY IS IN LIEU OF ANY OTHER WARRANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION ANY WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, OR ANY WARRANTY THAT THE PRODUCTS, INCLUDING THIS CERTIFICATE, ARE OF MERCHANTABILITY QUALITY. USP'S LIABILITY ARISING OUT OF OR RELATING TO THE SUPPLY OF USP REFERENCE STANDARDS AND THIS CERTIFICATE SHALL IN NO EVENT INCLUDE LOSS OF PROFITS, COST OF PROCURING SUBSTITUTE GOODS OR SERVICES, OR ANY INCIDENTAL, INDIRECT, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES OF ANY KIND, EVEN IF USP IS AWARE OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. WITHOUT LIMITING THE GENERALITY OF THE FOREGOING, USP DOES NOT WARRANT THAT THE USE OR RESALE OF USP REFERENCE STANDARDS, INCLUDING THEIR USE TO PERFORM TESTS AND ASSAYS PUBLISHED BY USP, WILL NOT INFRINGE UNITED STATES OR ANY OTHER PATENTS.

USP Reference Standards are not intended for use as drugs, dietary supplements, or as medical devices.

This certificate may not be reproduced without the express written permission of USP.

Copyright 2013 The United States Pharmacopoeial Convention. All rights reserved.

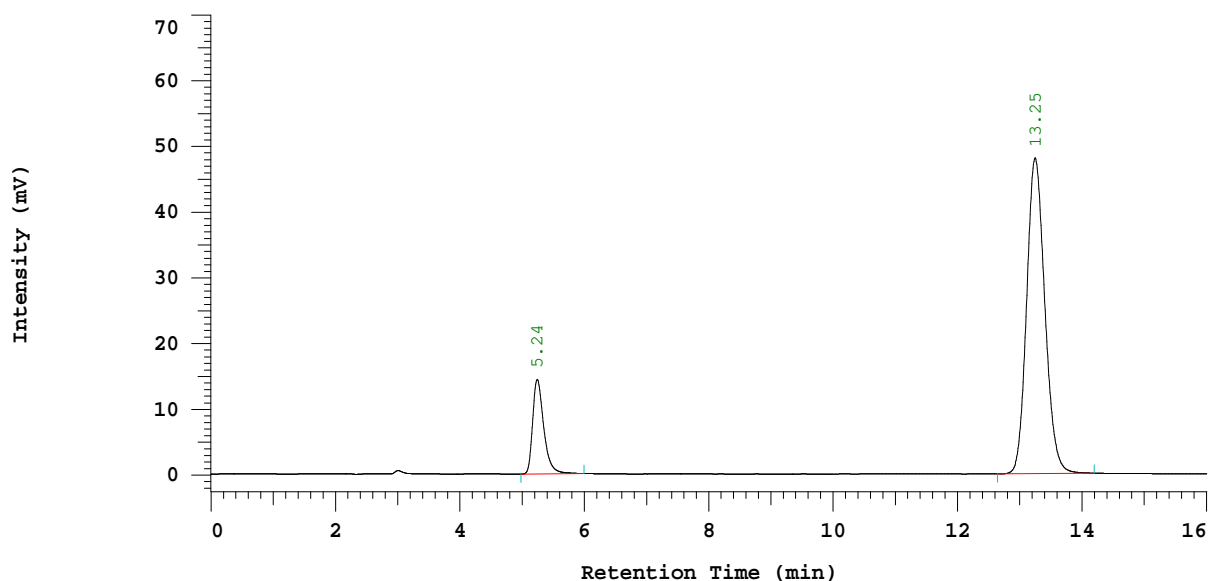
Anexo B: Cromatogramas de robustez

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed day: 2019-04-02
Sample Name: SST ROBUSTEZ 1

Reported: 2019-04-03
Processed: 2019-04-03
Vial Number: 1
Injection from this vial: 1 of 3

Chrom Type: HPLC Channel : 1



No.	RT	Name	Area
1	5.24	ANTIPIRINA	176000
2	13.25	BENZOCAINA	973213
			1149213

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
5.24	ANTIPIRINA	523.33	1.44	4604	---	---	---	---
13.25	BENZOCAINA	1323.67	1.14	9972	19.06	2.53	---	---

Asymmetry warning outside the range of: 0.800 to 2.000

No. of theoretical plates warning at less than: 2000

Resolution warning at less than: 1.500

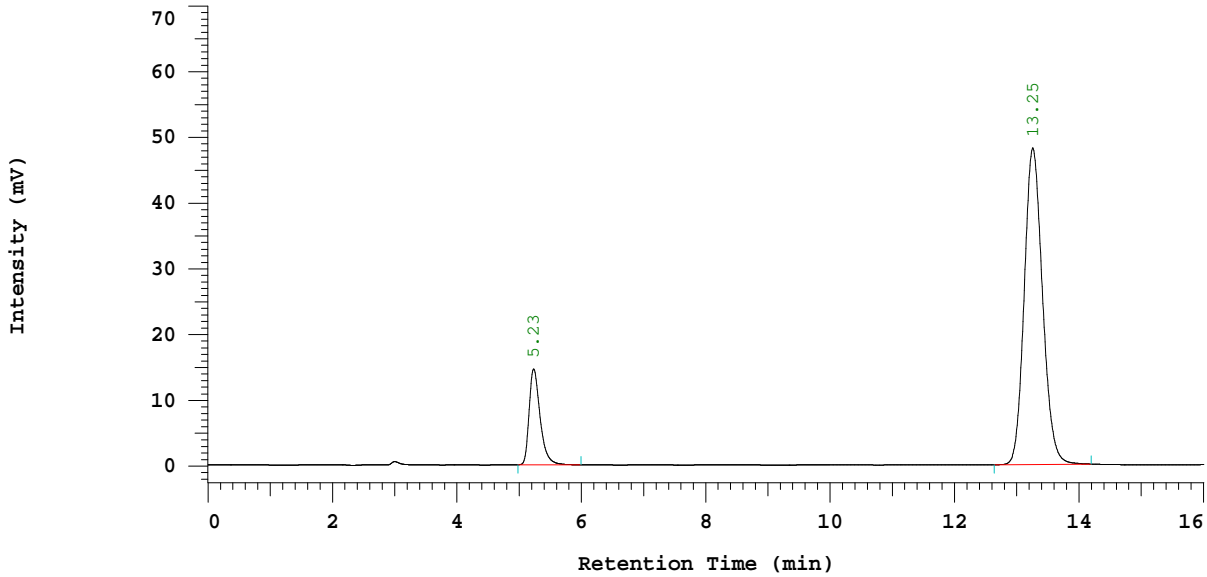
Signal to noise ratio warning at less than: 3

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed day: 2019-04-02
Sample Name: SST ROBUSTEZ 1

Reported: 2019-04-03
Processed: 2019-04-03
Vial Number: 1
Injection from this vial: 2 of 3

Chrom Type: HPLC Channel : 1



No.	RT	Name	Area
1	5.23	ANTIPIRINA	176610
2	13.25	BENZOCAINA	980108
			1156718

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
5.23	ANTIPIRINA	522.33	1.43	4619	---	---	---	---
13.25	BENZOCAINA	1324.33	1.15	9882	19.07	2.54	---	---

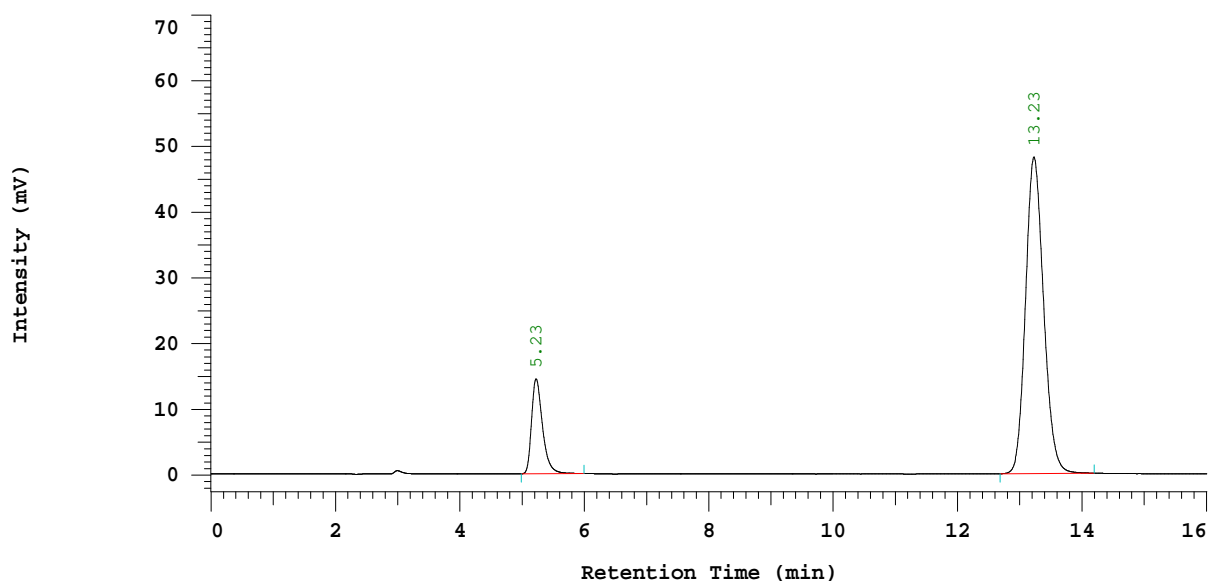
Asymmetry warning outside the range of: 0.800 to 2.000
No. of theoretical plates warning at less than: 2000
Resolution warning at less than: 1.500
Signal to noise ratio warning at less than: 3

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed day: 2019-04-02
Sample Name: SST ROBUSTEZ 1

Reported: 2019-04-03
Processed: 2019-04-03
Vial Number: 1
Injection from this vial: 3 of 3

Chrom Type: HPLC Channel : 1



No.	RT	Name	Area
1	5.23	ANTIPIRINA	175177
2	13.23	BENZOCAINA	971146
			1146323

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
5.23	ANTIPIRINA	521.67	1.41	4604	---	---	---	---
13.23	BENZOCAINA	1321.67	1.15	10029	19.13	2.53	---	---

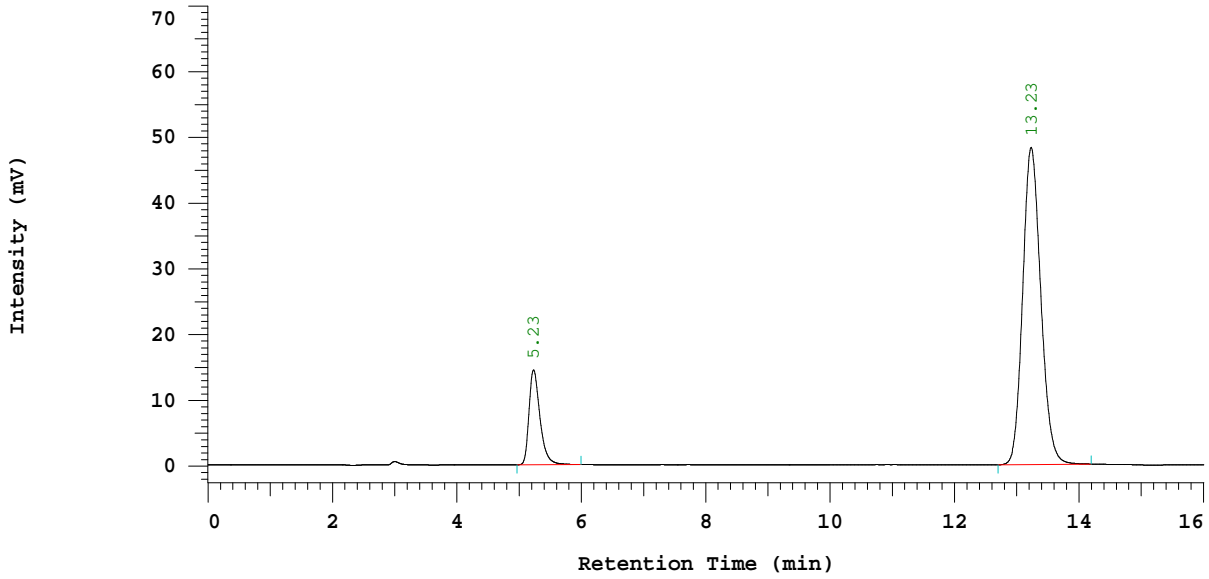
Asymmetry warning outside the range of: 0.800 to 2.000
No. of theoretical plates warning at less than: 2000
Resolution warning at less than: 1.500
Signal to noise ratio warning at less than: 3

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed day: 2019-04-02
Sample Name: ROBUSTEZ MUESTRA 1

Reported: 2019-04-03
Processed: 2019-04-03
Vial Number: 2
Injection from this vial: 1 of 1

Chrom Type: HPLC Channel : 1



No.	RT	Name	Area
1	5.23	ANTIPIRINA	174763
2	13.23	BENZOCAINA	973262
			1148025

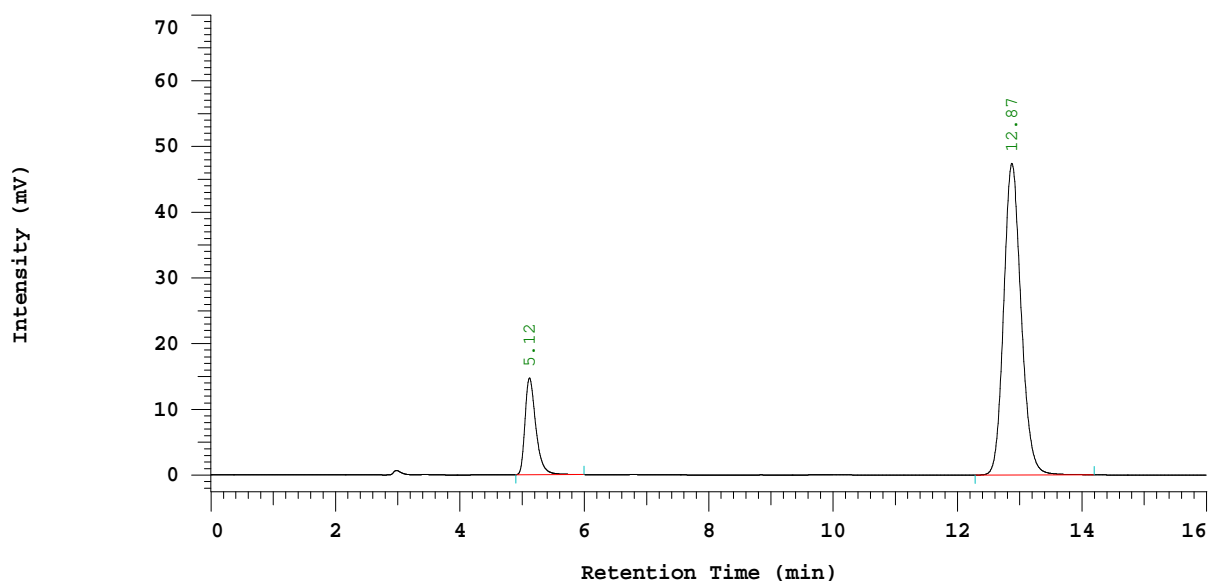
Peak rejection level: 0

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed day: 2019-04-02
Sample Name: SST ROBUSTEZ 2

Reported: 2019-04-03
Processed: 2019-04-03
Vial Number: 3
Injection from this vial: 1 of 3

Chrom Type: HPLC Channel : 1



No.	RT	Name	Area
1	5.12	ANTIPIRINA	176023
2	12.87	BENZOCAINA	934562
			1110585

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
5.12	ANTIPIRINA	511.00	1.42	4566	---	---	---	---
12.87	BENZOCAINA	1285.67	1.17	10030	18.96	2.52	---	---

Asymmetry warning outside the range of: 0.800 to 2.000

No. of theoretical plates warning at less than: 2000

Resolution warning at less than: 1.500

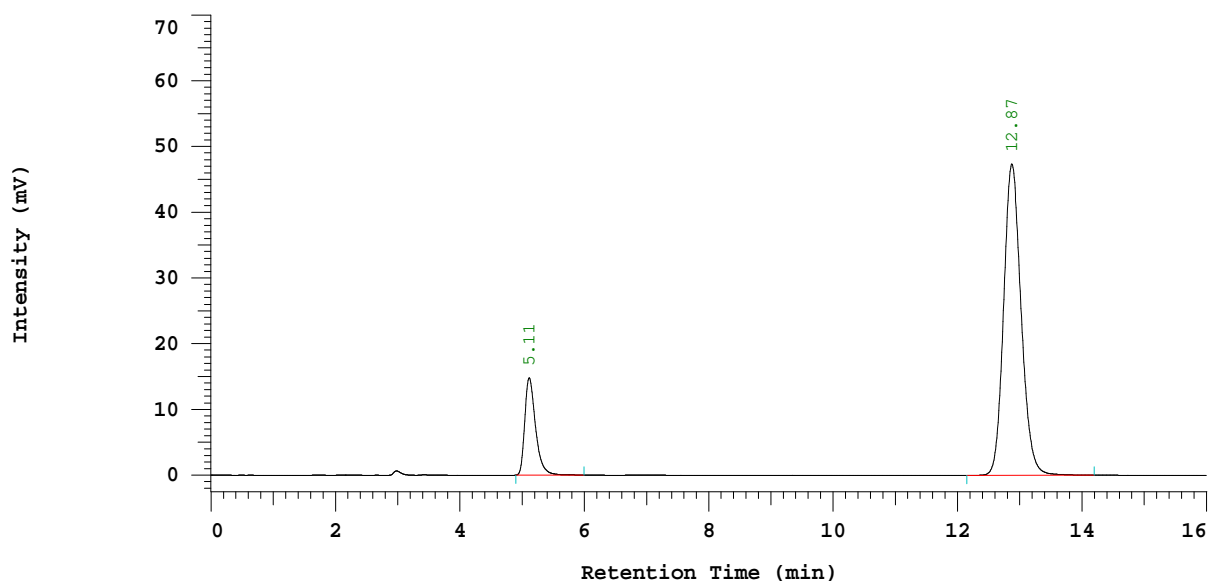
Signal to noise ratio warning at less than: 3

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed day: 2019-04-02
Sample Name: SST ROBUSTEZ 2

Reported: 2019-04-03
Processed: 2019-04-03
Vial Number: 3
Injection from this vial: 2 of 3

Chrom Type: HPLC Channel : 1



No.	RT	Name	Area
1	5.11	ANTIPIRINA	176443
2	12.87	BENZOCAINA	936384
			1112827

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
5.11	ANTIPIRINA	510.33	1.45	4586	---	---	---	---
12.87	BENZOCAINA	1285.67	1.16	9981	18.98	2.52	---	---

Asymmetry warning outside the range of: 0.800 to 2.000

No. of theoretical plates warning at less than: 2000

Resolution warning at less than: 1.500

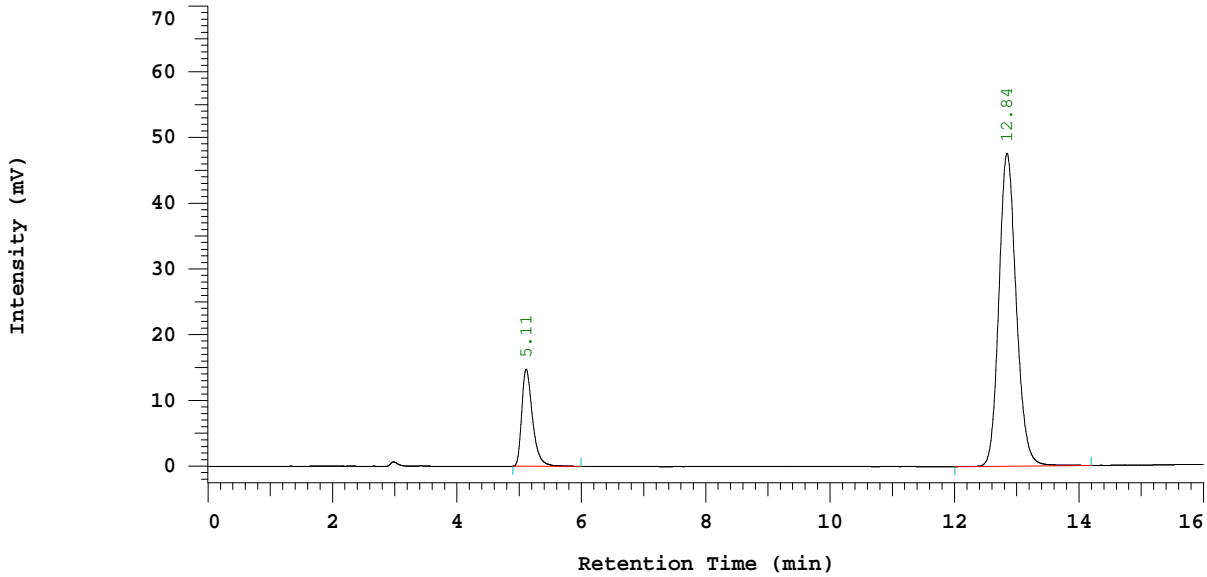
Signal to noise ratio warning at less than: 3

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed day: 2019-04-02
Sample Name: SST ROBUSTEZ 2

Reported: 2019-04-03
Processed: 2019-04-03
Vial Number: 3
Injection from this vial: 3 of 3

Chrom Type: HPLC Channel : 1



No.	RT	Name	Area
1	5.11	ANTIPIRINA	176177
2	12.84	BENZOCAINA	929662
			1105839

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
5.11	ANTIPIRINA	510.33	1.44	4594	---	---	---	---
12.84	BENZOCAINA	1283.00	1.16	10183	19.06	2.51	---	---

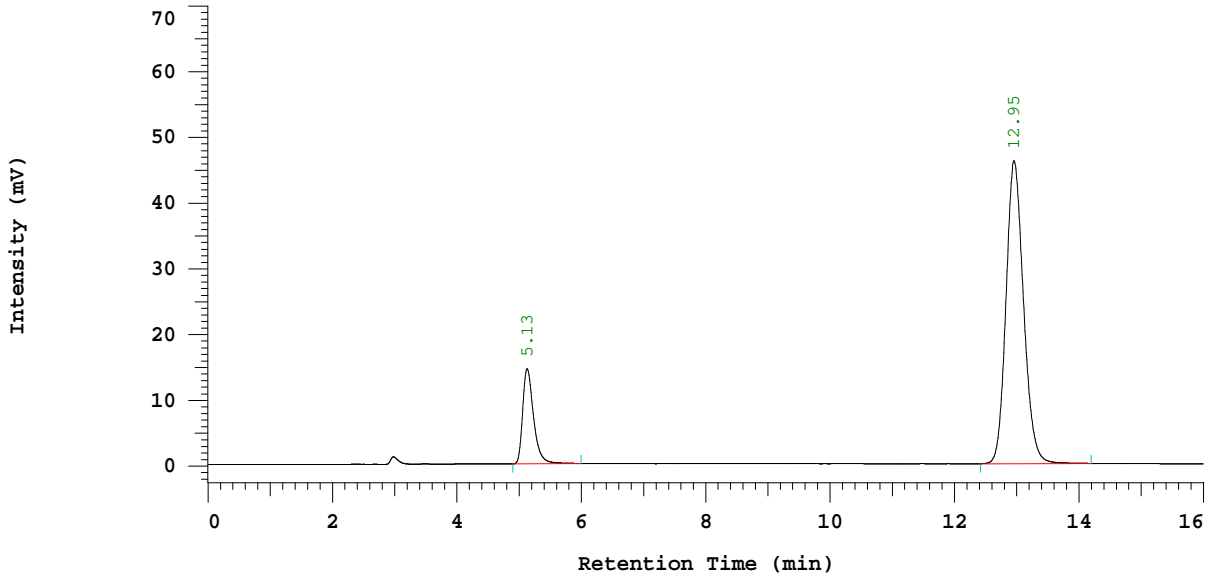
Asymmetry warning outside the range of: 0.800 to 2.000
No. of theoretical plates warning at less than: 2000
Resolution warning at less than: 1.500
Signal to noise ratio warning at less than: 3

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed day: 2019-04-02
Sample Name: ROBUSTEZ MUESTRA 2

Reported: 2019-04-03
Processed: 2019-04-03
Vial Number: 4
Injection from this vial: 1 of 1

Chrom Type: HPLC Channel : 1



No.	RT	Name	Area
1	5.13	ANTIPIRINA	173994
2	12.95	BENZOCAINA	913012
			1087006

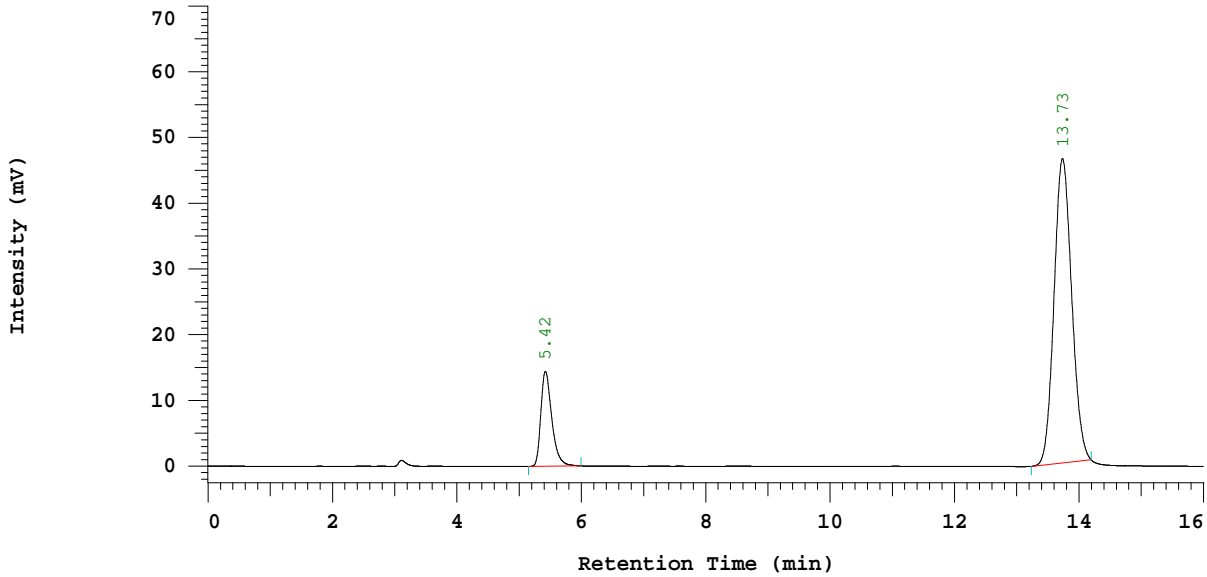
Peak rejection level: 0

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed day: 2019-04-02
Sample Name: SST ROBUSTEZ 3

Reported: 2019-04-03
Processed: 2019-04-03
Vial Number: 5
Injection from this vial: 1 of 3

Chrom Type: HPLC Channel : 1



No.	RT	Name	Area
1	5.42	ANTIPIRINA	175074
2	13.73	BENZOCAINA	907827
			1082901

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
5.42	ANTIPIRINA	541.33	1.41	4944	---	---	---	---
13.73	BENZOCAINA	1372.33	1.12	11163	20.06	2.54	---	---

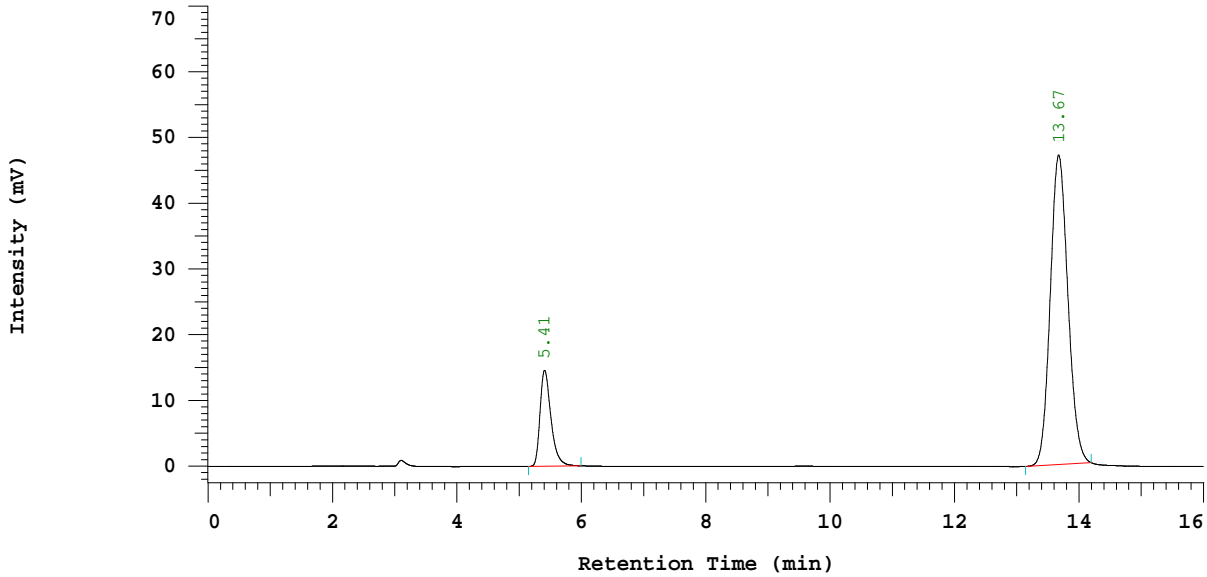
Asymmetry warning outside the range of: 0.800 to 2.000
No. of theoretical plates warning at less than: 2000
Resolution warning at less than: 1.500
Signal to noise ratio warning at less than: 3

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed day: 2019-04-02
Sample Name: SST ROBUSTEZ 3

Reported: 2019-04-03
Processed: 2019-04-03
Vial Number: 5
Injection from this vial: 2 of 3

Chrom Type: HPLC Channel : 1



No.	RT	Name	Area
1	5.41	ANTIPIRINA	176259
2	13.67	BENZOCAINA	925783
			1102042

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
5.41	ANTIPIRINA	540.00	1.42	4963	---	---	---	---
13.67	BENZOCAINA	1366.33	1.12	11128	20.02	2.53	---	---

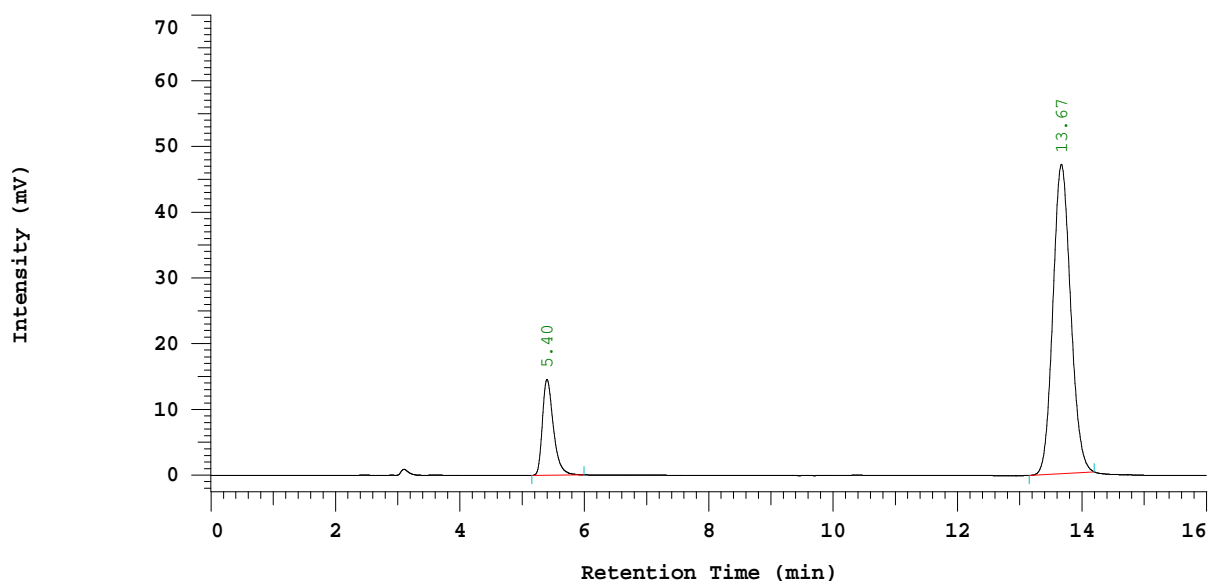
Asymmetry warning outside the range of: 0.800 to 2.000
No. of theoretical plates warning at less than: 2000
Resolution warning at less than: 1.500
Signal to noise ratio warning at less than: 3

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed day: 2019-04-02
Sample Name: SST ROBUSTEZ 3

Reported: 2019-04-03
Processed: 2019-04-03
Vial Number: 5
Injection from this vial: 3 of 3

Chrom Type: HPLC Channel : 1



No.	RT	Name	Area
1	5.40	ANTIPIRINA	176922
2	13.67	BENZOCAINA	928461
			1105383

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
5.40	ANTIPIRINA	539.00	1.42	4889	---	---	---	---
13.67	BENZOCAINA	1365.67	1.13	11044	19.94	2.53	---	---

Asymmetry warning outside the range of: 0.800 to 2.000

No. of theoretical plates warning at less than: 2000

Resolution warning at less than: 1.500

Signal to noise ratio warning at less than: 3

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed day: 2019-04-02

Sample Name: ROBUSTEZ MUESTRA 3

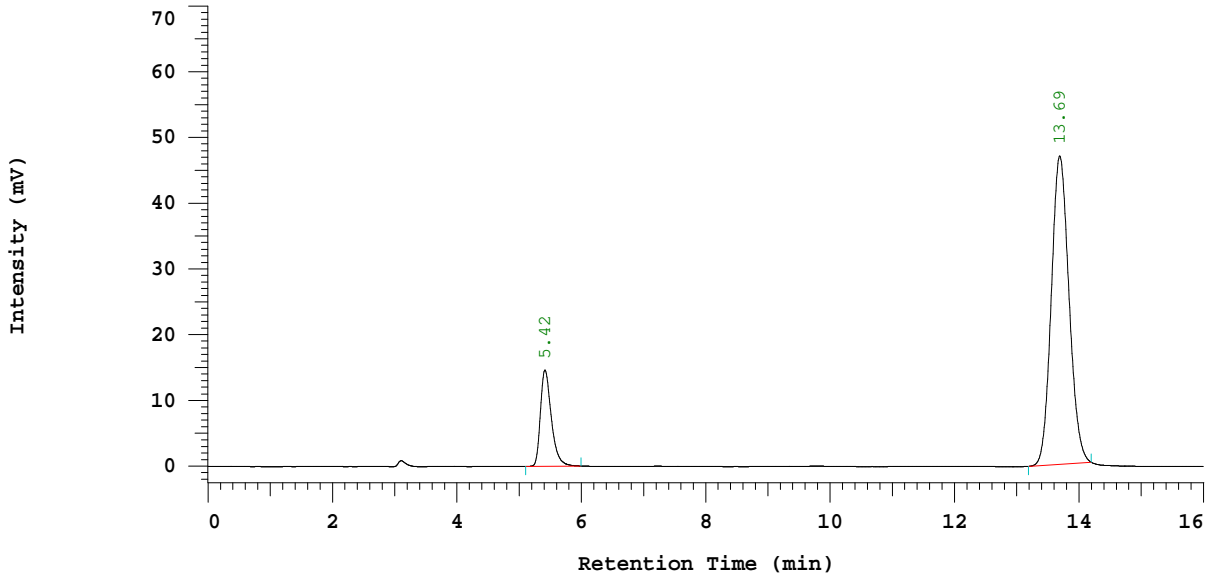
Reported: 2019-04-03

Processed: 2019-04-03

Vial Number: 6

Injection from this vial: 1 of 1

Chrom Type: HPLC Channel : 1



No.	RT	Name	Area
1	5.42	ANTIPIRINA	176532
2	13.69	BENZOCAINA	924208
			1100740

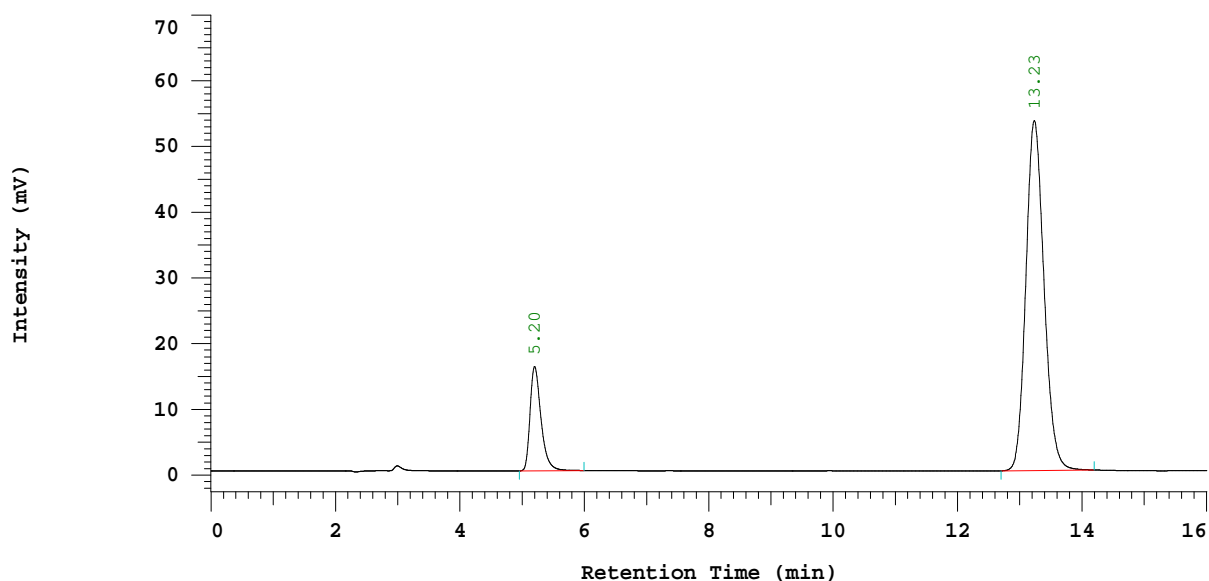
Peak rejection level: 0

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed day: 2019-04-02
Sample Name: SST ROBUSTEZ 4

Reported: 2019-04-03
Processed: 2019-04-03
Vial Number: 7
Injection from this vial: 1 of 3

Chrom Type: HPLC Channel : 1



No.	RT	Name	Area
1	5.20	ANTIPIRINA	192588
2	13.23	BENZOCAINA	1076061
			1268649

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
5.20	ANTIPIRINA	519.00	1.44	4586	---	---	---	---
13.23	BENZOCAINA	1322.33	1.15	10037	19.23	2.55	---	---

Asymmetry warning outside the range of: 0.800 to 2.000

No. of theoretical plates warning at less than: 2000

Resolution warning at less than: 1.500

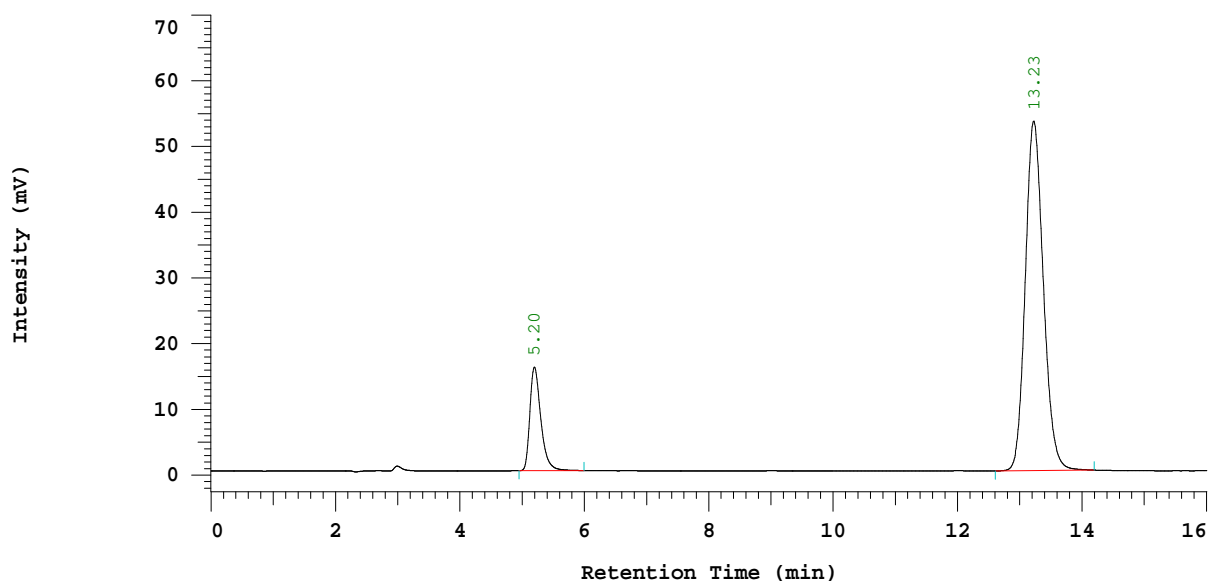
Signal to noise ratio warning at less than: 3

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed day: 2019-04-02
Sample Name: SST ROBUSTEZ 4

Reported: 2019-04-03
Processed: 2019-04-03
Vial Number: 7
Injection from this vial: 2 of 3

Chrom Type: HPLC Channel : 1



No.	RT	Name	Area
1	5.20	ANTIPIRINA	190948
2	13.23	BENZOCAINA	1071535
			1262483

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
5.20	ANTIPIRINA	518.67	1.43	4579	---	---	---	---
13.23	BENZOCAINA	1321.67	1.14	10085	19.26	2.55	---	---

Asymmetry warning outside the range of: 0.800 to 2.000

No. of theoretical plates warning at less than: 2000

Resolution warning at less than: 1.500

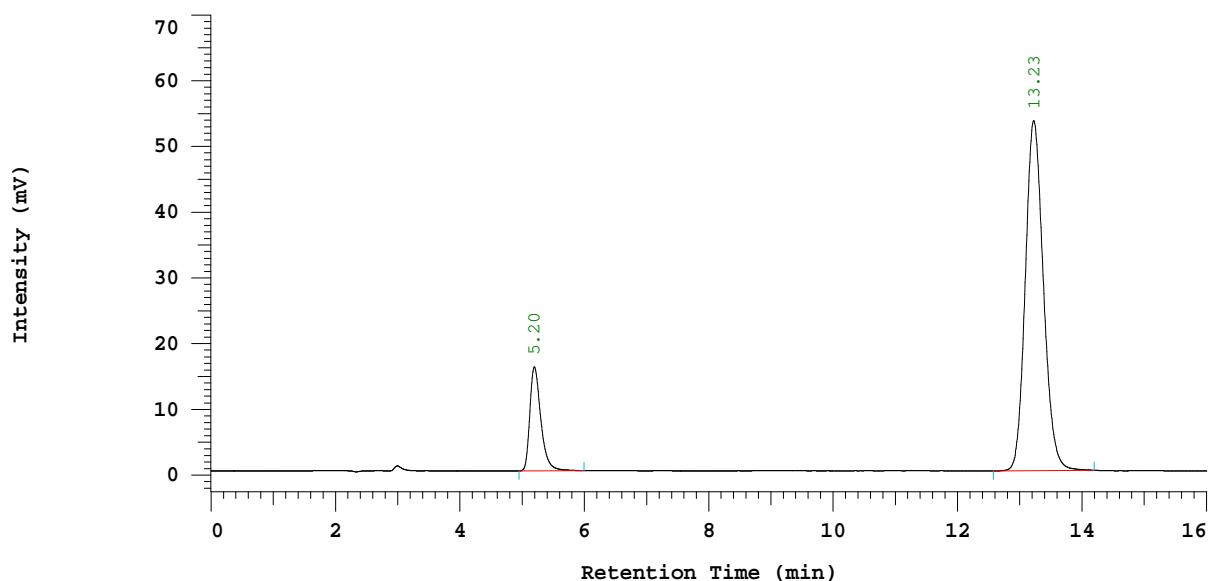
Signal to noise ratio warning at less than: 3

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed day: 2019-04-02
Sample Name: SST ROBUSTEZ 4

Reported: 2019-04-03
Processed: 2019-04-03
Vial Number: 7
Injection from this vial: 3 of 3

Chrom Type: HPLC Channel : 1



No.	RT	Name	Area
1	5.20	ANTIPIRINA	192370
2	13.23	BENZOCAINA	1074582
			1266952

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
5.20	ANTIPIRINA	518.67	1.44	4565	---	---	---	---
13.23	BENZOCAINA	1321.67	1.14	10079	19.24	2.55	---	---

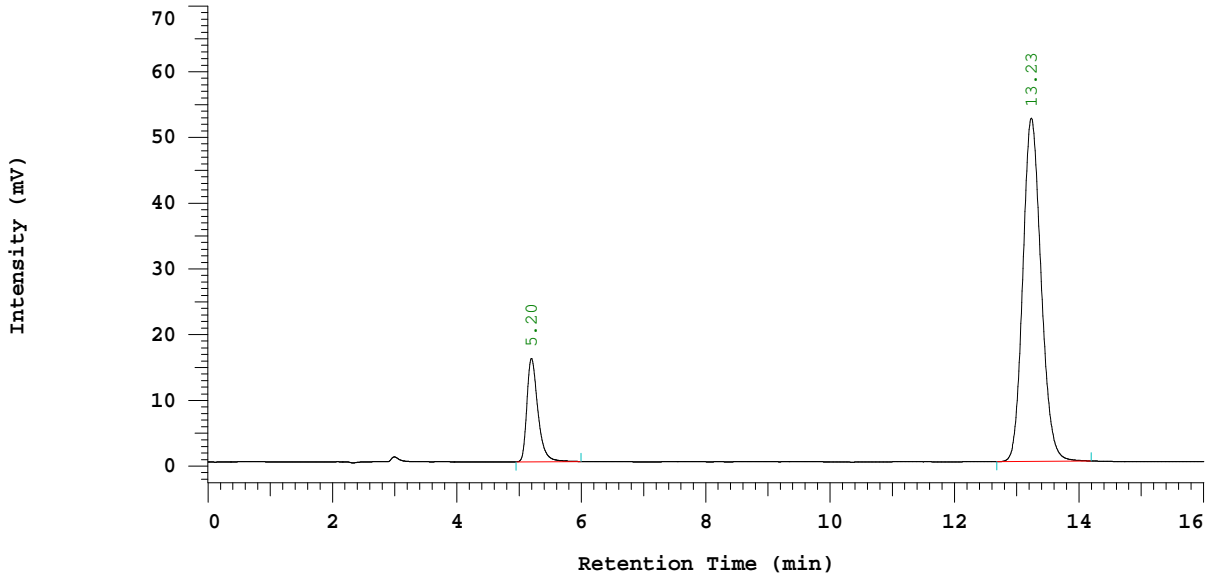
Asymmetry warning outside the range of: 0.800 to 2.000
No. of theoretical plates warning at less than: 2000
Resolution warning at less than: 1.500
Signal to noise ratio warning at less than: 3

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed day: 2019-04-02
Sample Name: ROBUSTEZ MUESTRA 4

Reported: 2019-04-03
Processed: 2019-04-03
Vial Number: 8
Injection from this vial: 1 of 1

Chrom Type: HPLC Channel : 1



No.	RT	Name	Area
1	5.20	ANTIPIRINA	190698
2	13.23	BENZOCAINA	1062215
			1252913

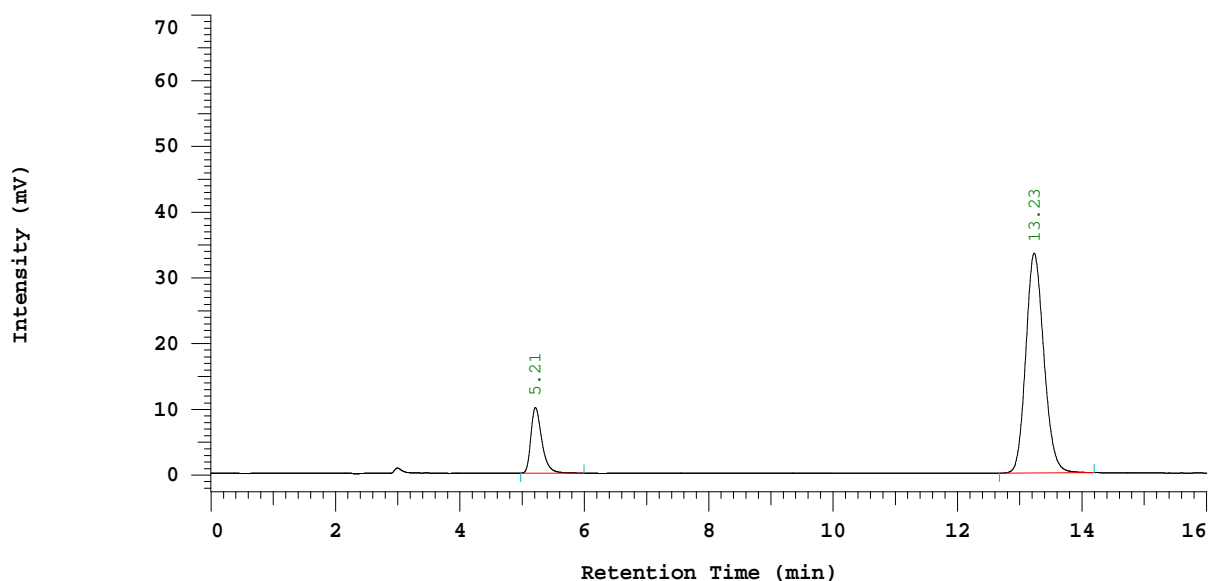
Peak rejection level: 0

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed day: 2019-04-02
Sample Name: SST ROBUSTEZ 5

Reported: 2019-04-03
Processed: 2019-04-03
Vial Number: 9
Injection from this vial: 1 of 3

Chrom Type: HPLC Channel : 1



No.	RT	Name	Area
1	5.21	ANTIPIRINA	121213
2	13.23	BENZOCAINA	674225
			795438

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
5.21	ANTIPIRINA	520.33	1.43	4614	---	---	---	---
13.23	BENZOCAINA	1322.33	1.14	10048	19.21	2.54	---	---

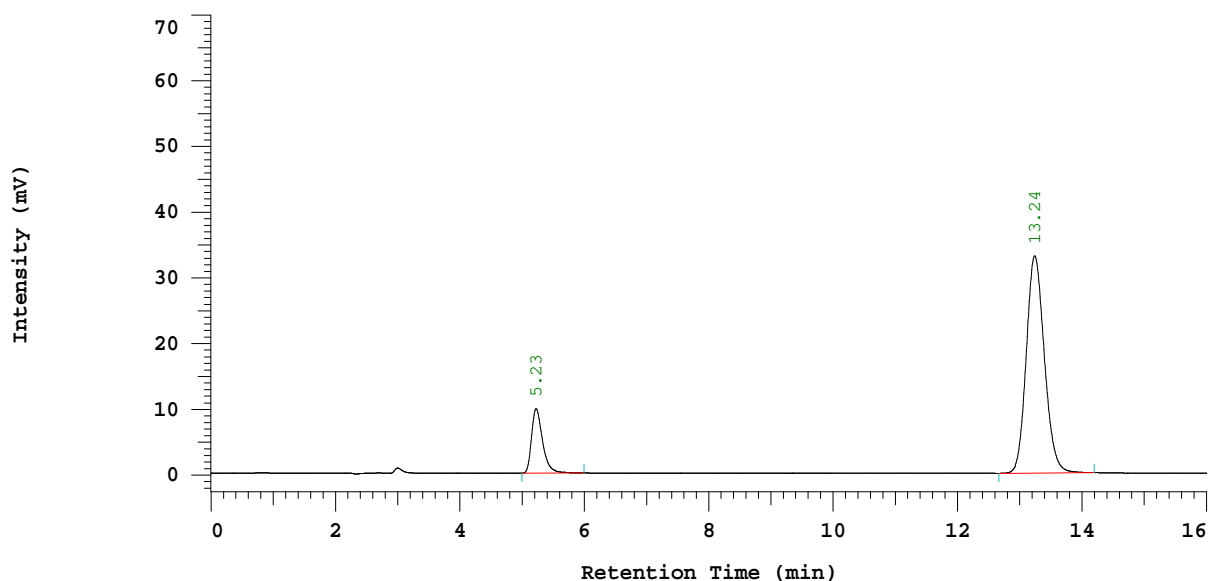
Asymmetry warning outside the range of: 0.800 to 2.000
No. of theoretical plates warning at less than: 2000
Resolution warning at less than: 1.500
Signal to noise ratio warning at less than: 3

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed day: 2019-04-02
Sample Name: SST ROBUSTEZ 5

Reported: 2019-04-03
Processed: 2019-04-03
Vial Number: 9
Injection from this vial: 2 of 3

Chrom Type: HPLC Channel : 1



No.	RT	Name	Area
1	5.23	ANTIPIRINA	119655
2	13.24	BENZOCAINA	668006
			787661

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
5.23	ANTIPIRINA	521.67	1.42	4566	---	---	---	---
13.24	BENZOCAINA	1323.00	1.14	10070	19.14	2.54	---	---

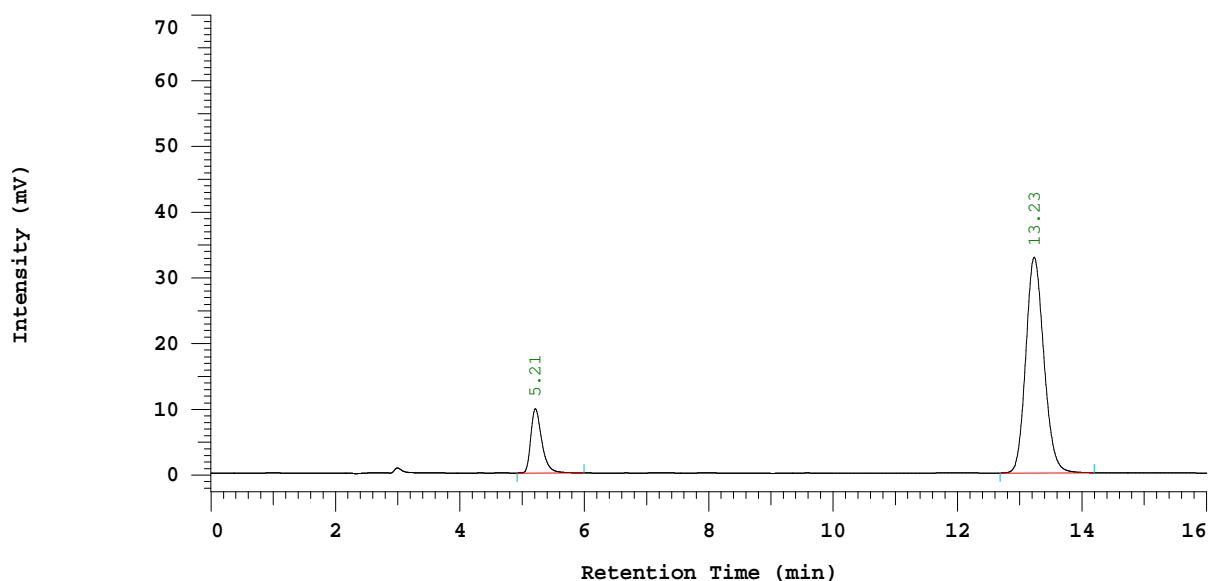
Asymmetry warning outside the range of: 0.800 to 2.000
No. of theoretical plates warning at less than: 2000
Resolution warning at less than: 1.500
Signal to noise ratio warning at less than: 3

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed day: 2019-04-02
Sample Name: SST ROBUSTEZ 5

Reported: 2019-04-03
Processed: 2019-04-03
Vial Number: 9
Injection from this vial: 3 of 3

Chrom Type: HPLC Channel : 1



No.	RT	Name	Area
1	5.21	ANTIPIRINA	119117
2	13.23	BENZOCAINA	662391
			781508

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
5.21	ANTIPIRINA	520.33	1.42	4562	---	---	---	---
13.23	BENZOCAINA	1322.33	1.14	10075	19.19	2.54	---	---

Asymmetry warning outside the range of: 0.800 to 2.000
No. of theoretical plates warning at less than: 2000
Resolution warning at less than: 1.500
Signal to noise ratio warning at less than: 3

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed day: 2019-04-02

Sample Name: ROBUSTEZ MUESTRA 5

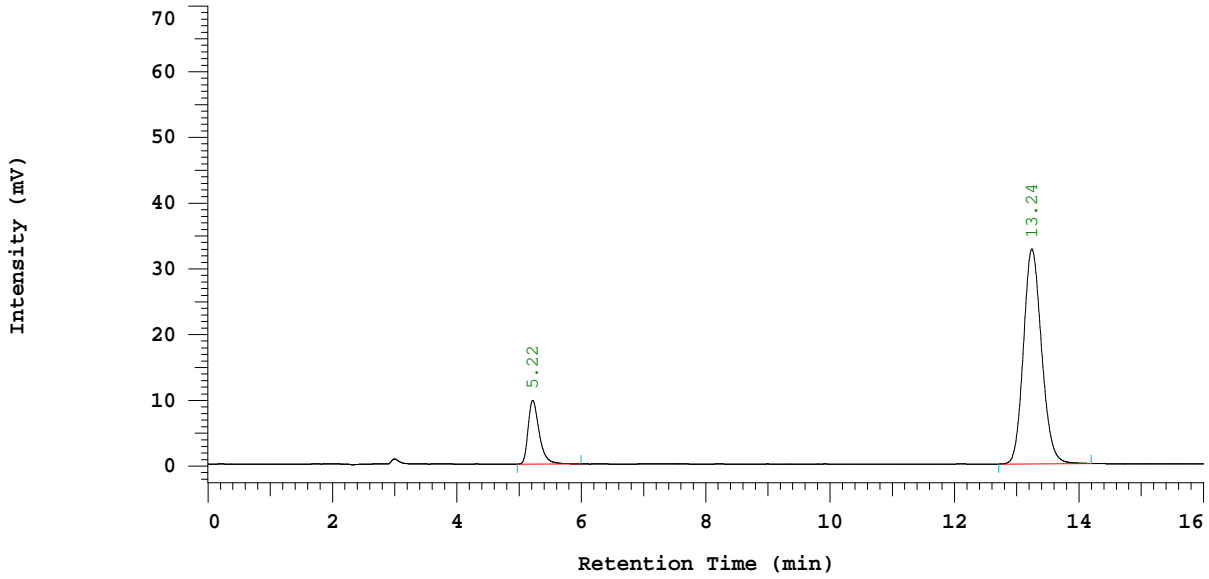
Reported: 2019-04-03

Processed: 2019-04-03

Vial Number: 10

Injection from this vial: 1 of 1

Chrom Type: HPLC Channel : 1



No.	RT	Name	Area
1	5.22	ANTIPIRINA	119049
2	13.24	BENZOCAINA	661149
			780198

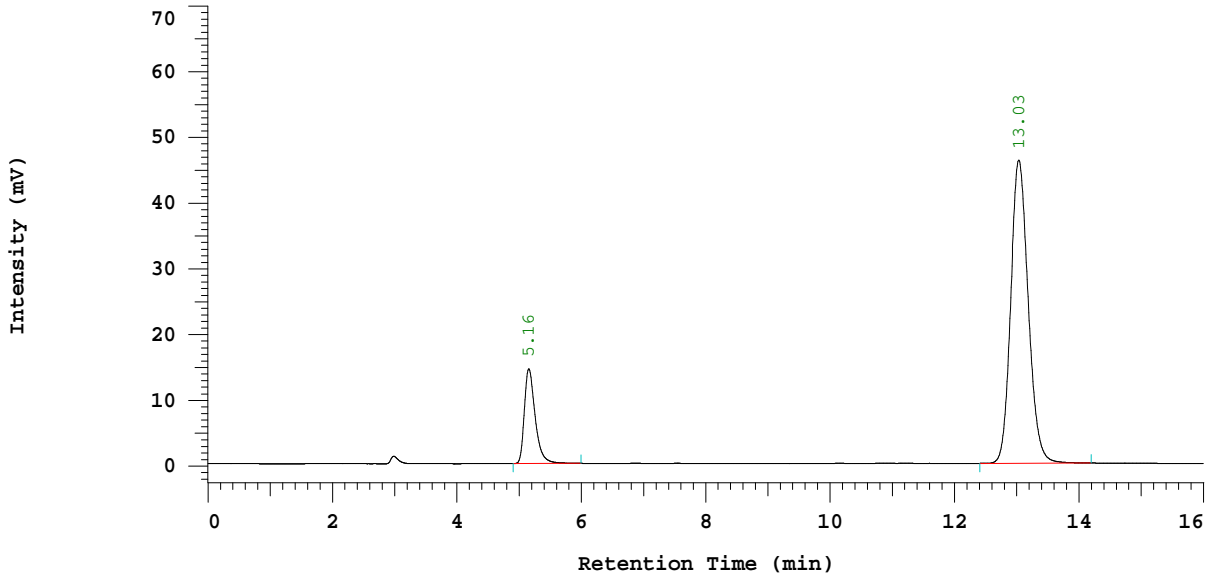
Peak rejection level: 0

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed day: 2019-04-02
Sample Name: SST ROBUSTEZ 6

Reported: 2019-04-03
Processed: 2019-04-03
Vial Number: 11
Injection from this vial: 1 of 3

Chrom Type: HPLC Channel : 1



No.	RT	Name	Area
1	5.16	ANTIPIRINA	172342
2	13.03	BENZOCAINA	908934
			1081276

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
5.16	ANTIPIRINA	514.67	1.44	4663	---	---	---	---
13.03	BENZOCAINA	1302.33	1.14	10281	19.30	2.53	---	---

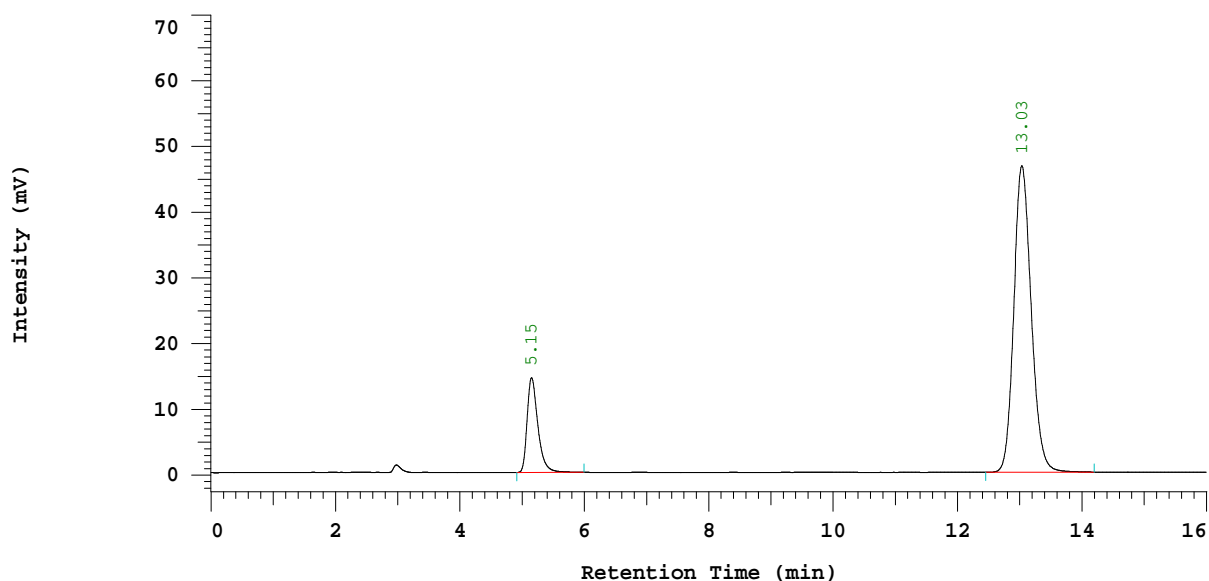
Asymmetry warning outside the range of: 0.800 to 2.000
No. of theoretical plates warning at less than: 2000
Resolution warning at less than: 1.500
Signal to noise ratio warning at less than: 3

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed day: 2019-04-02
Sample Name: SST ROBUSTEZ 6

Reported: 2019-04-03
Processed: 2019-04-03
Vial Number: 11
Injection from this vial: 2 of 3

Chrom Type: HPLC Channel : 1



No.	RT	Name	Area
1	5.15	ANTIPIRINA	171598
2	13.03	BENZOCAINA	914443
			1086041

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
5.15	ANTIPIRINA	514.33	1.42	4686	---	---	---	---
13.03	BENZOCAINA	1302.33	1.15	10412	19.41	2.53	---	---

Asymmetry warning outside the range of: 0.800 to 2.000

No. of theoretical plates warning at less than: 2000

Resolution warning at less than: 1.500

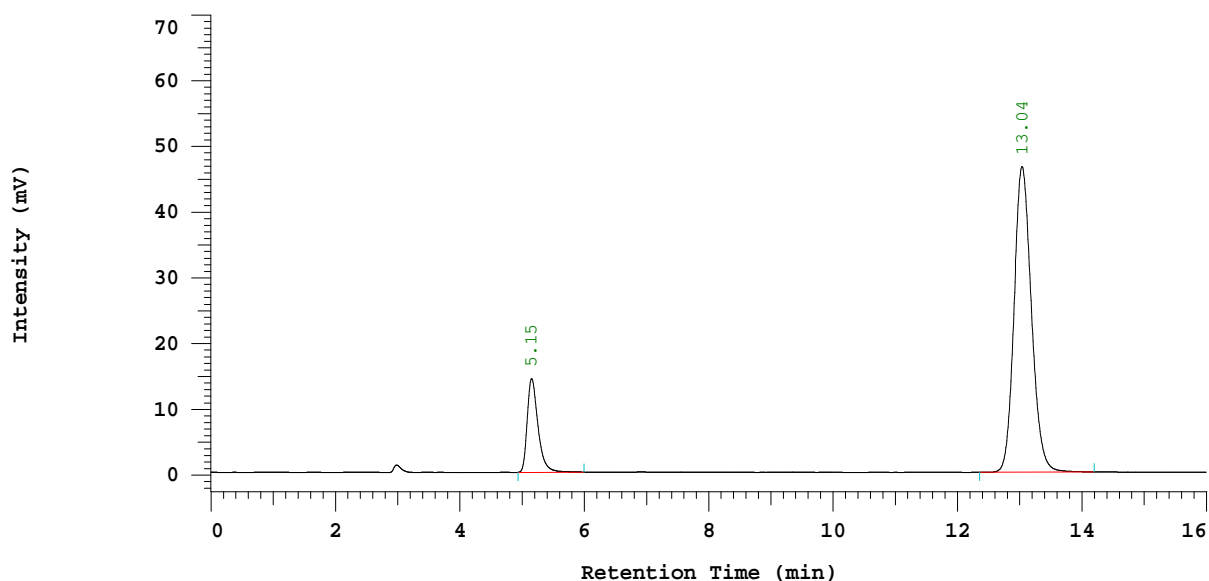
Signal to noise ratio warning at less than: 3

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed day: 2019-04-02
Sample Name: SST ROBUSTEZ 6

Reported: 2019-04-03
Processed: 2019-04-03
Vial Number: 11
Injection from this vial: 3 of 3

Chrom Type: HPLC Channel : 1



No.	RT	Name	Area
1	5.15	ANTIPIRINA	170059
2	13.04	BENZOCAINA	908508
			1078567

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
5.15	ANTIPIRINA	514.33	1.45	4687	---	---	---	---
13.04	BENZOCAINA	1303.00	1.13	10482	19.46	2.53	---	---

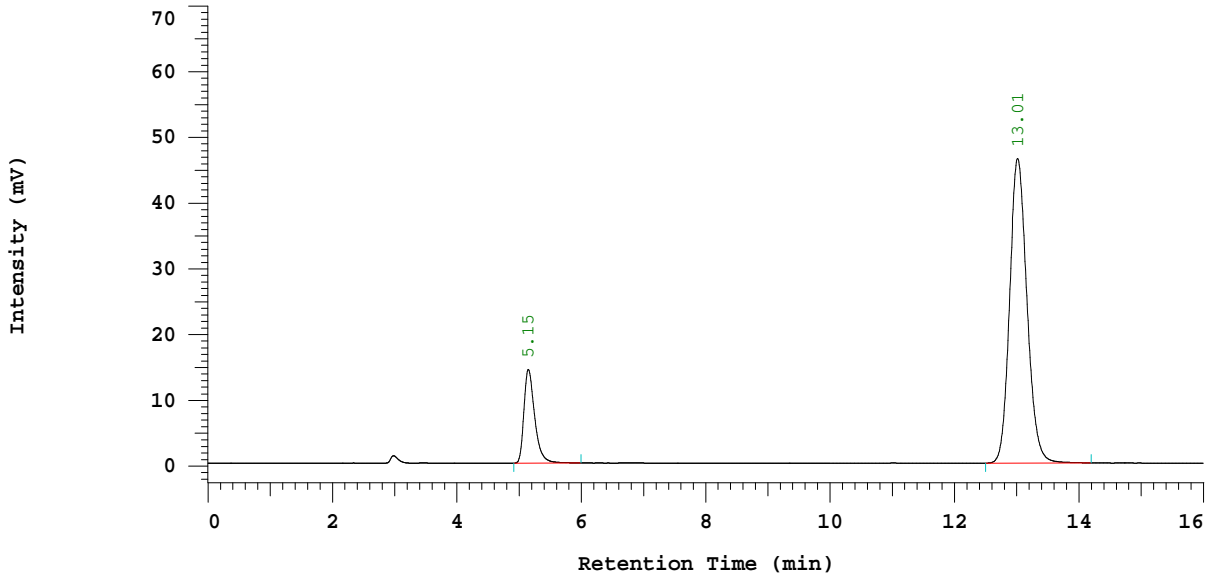
Asymmetry warning outside the range of: 0.800 to 2.000
No. of theoretical plates warning at less than: 2000
Resolution warning at less than: 1.500
Signal to noise ratio warning at less than: 3

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed day: 2019-04-02
Sample Name: ROBUSTEZ MUESTRA 6

Reported: 2019-04-03
Processed: 2019-04-03
Vial Number: 12
Injection from this vial: 1 of 1

Chrom Type: HPLC Channel : 1



No.	RT	Name	Area
1	5.15	ANTIPIRINA	169693
2	13.01	BENZOCAINA	906683
			1076376

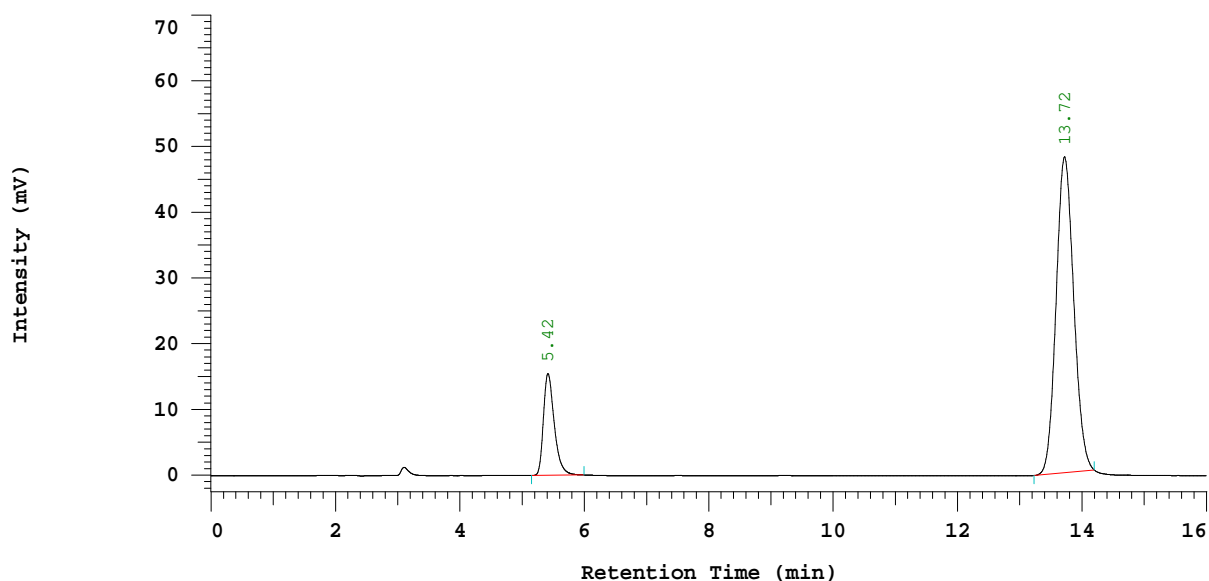
Peak rejection level: 0

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed day: 2019-04-02
Sample Name: SST ROBUSTEZ 7

Reported: 2019-04-03
Processed: 2019-04-03
Vial Number: 13
Injection from this vial: 1 of 3

Chrom Type: HPLC Channel : 1



No.	RT	Name	Area
1	5.42	ANTIPIRINA	185475
2	13.72	BENZOCAINA	942364
			1127839

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
5.42	ANTIPIRINA	540.67	1.39	5002	---	---	---	---
13.72	BENZOCAINA	1371.00	1.12	11146	20.10	2.54	---	---

Asymmetry warning outside the range of: 0.800 to 2.000

No. of theoretical plates warning at less than: 2000

Resolution warning at less than: 1.500

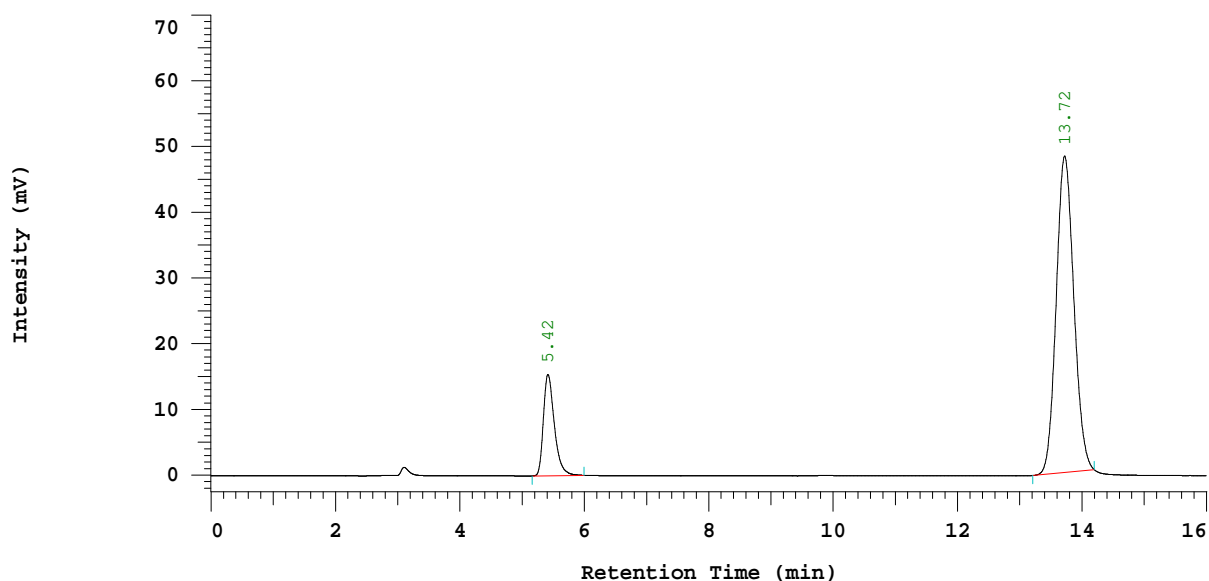
Signal to noise ratio warning at less than: 3

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed day: 2019-04-02
Sample Name: SST ROBUSTEZ 7

Reported: 2019-04-03
Processed: 2019-04-03
Vial Number: 13
Injection from this vial: 2 of 3

Chrom Type: HPLC Channel : 1



No.	RT	Name	Area
1	5.42	ANTIPIRINA	186629
2	13.72	BENZOCAINA	943462
			1130091

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
5.42	ANTIPIRINA	540.67	1.40	4922	---	---	---	---
13.72	BENZOCAINA	1371.00	1.13	11176	20.06	2.54	---	---

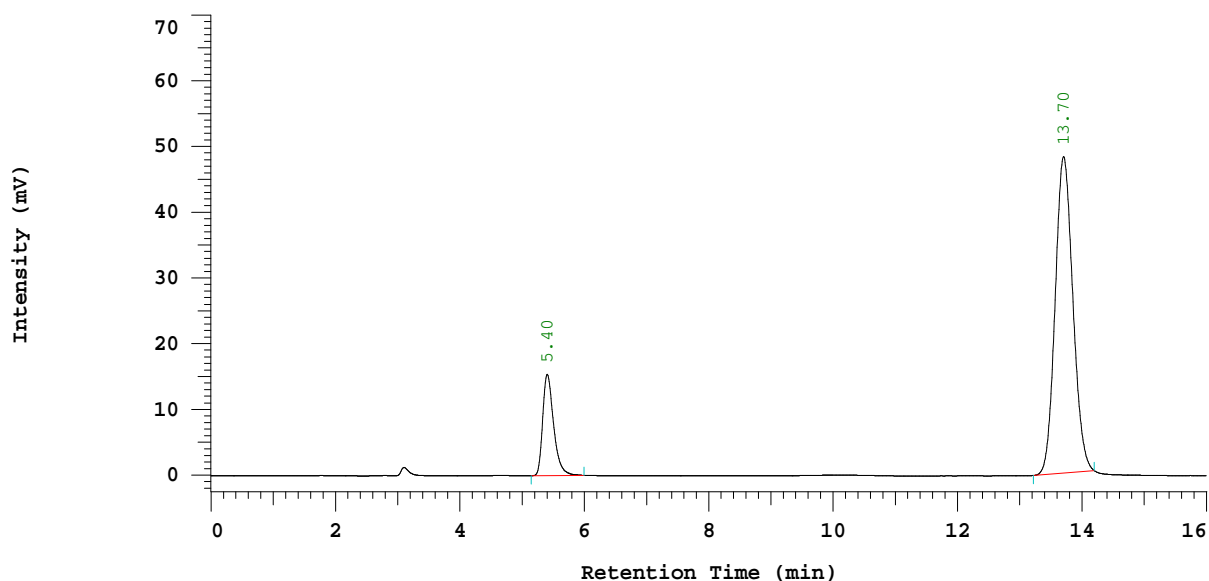
Asymmetry warning outside the range of: 0.800 to 2.000
No. of theoretical plates warning at less than: 2000
Resolution warning at less than: 1.500
Signal to noise ratio warning at less than: 3

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed day: 2019-04-02
Sample Name: SST ROBUSTEZ 7

Reported: 2019-04-03
Processed: 2019-04-03
Vial Number: 13
Injection from this vial: 3 of 3

Chrom Type: HPLC Channel : 1



No.	RT	Name	Area
1	5.40	ANTIPIRINA	186166
2	13.70	BENZOCAINA	948172
			1134338

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
5.40	ANTIPIRINA	539.33	1.42	4926	---	---	---	---
13.70	BENZOCAINA	1369.00	1.14	11048	20.01	2.54	---	---

Asymmetry warning outside the range of: 0.800 to 2.000

No. of theoretical plates warning at less than: 2000

Resolution warning at less than: 1.500

Signal to noise ratio warning at less than: 3

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed day: 2019-04-02

Sample Name: ROBUSTEZ MUESTRA 7

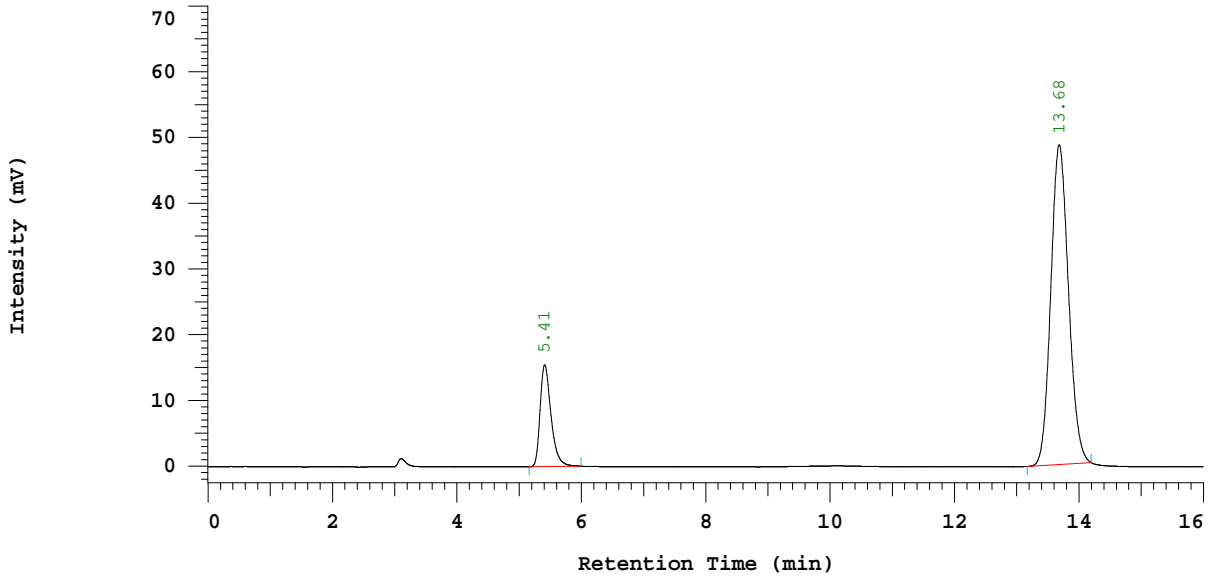
Reported: 2019-04-03

Processed: 2019-04-03

Vial Number: 14

Injection from this vial: 1 of 1

Chrom Type: HPLC Channel : 1



No.	RT	Name	Area
1	5.41	ANTIPIRINA	186860
2	13.68	BENZOCAINA	957015
			1143875

Peak rejection level: 0