

DOI: <https://doi.org/10.53287/uyik2074md70j>

Desarrollo y validación de un método analítico para la valoración simultánea de Acetaminofeno, bromhidrato de Dextrometorfano, clorhidrato de Fenilefrina, Cafeína y ácido Áscórbico en polvo oral por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)

Standardization and validation of an analytical method for acetaminophen, dextromethorphan hydrobromide, phenylephrine hydrochloride, caffeine and ascorbic acid simultaneous detection by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in Oral Powder

Karla Giovana Urbano Yucra, <https://orcid.org/0000-0002-5799-2632>

Myriam Lina Trigo Orsini, <https://orcid.org/0000-0002-0874-4093>

Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos y Biodisponibilidad, Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnostico e Investigación en Salud (SELADIS), Universidad Mayor de San Andrés, Av. Saavedra 2224. La Paz, Bolivia.

*Autor de correspondencia: karlaurbanoyucra@gmail.com

Fecha de recepción: 08 octubre 2024

Fecha de aceptación: 20 julio 2025

Resumen

Introducción. El desarrollo de un método analítico implica realizar pruebas estándar y ajustar parámetros para asegurar su correcto funcionamiento. La validación es esencial para garantizar precisión, sensibilidad y especificidad, permitiendo una evaluación objetiva de la calidad de productos farmacéuticos. En este estudio se presenta un método innovador por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), para la valoración simultánea de Acetaminofeno, bromhidrato de Dextrometorfano, clorhidrato de Fenilefrina, Cafeína y ácido Áscórbico en polvo oral ante la falta de un método validado en Bolivia para este fin.

Objetivo. Desarrollar y validar un método analítico para la valoración simultánea de Acetaminofeno, bromhidrato de Dextrometorfano, clorhidrato de Fenilefrina, Cafeína y ácido Áscórbico en polvo oral, por HPLC

Metodología. Se utilizó una columna de fenilo a 30°C, la elución en gradiente, tampón fosfato a pH 3,5 y acetonitrilo grado HPLC como fase móvil, una longitud de onda de 202 nm y un volumen de inyección de 10 µL con un HPLC. La validación de la metodología se confirmó de acuerdo con la USP-NF e ICH Q2(R2).

Resultados. En el desarrollo del método analítico se evaluaron un total de 14 parámetros, que incluye la selección de la fase móvil y estacionaria, condiciones cromatográficas, con picos bien definidos y sin interferencias significativas. Respecto a la validación, la linealidad del método se confirmó con un coeficiente de determinación (R^2) > 0,990 y un análisis ANOVA con $p < 0,05$. La precisión del método encontró coeficientes de variación $\leq 2\%$. La especificidad fue validada a través de la prueba t de Student con valores de $t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$ (2,78). Finalmente, la exactitud se evaluó en tres niveles de concentración, encontrando porcentajes de recuperación entre 98,1% y 100,5%.

Conclusiones. El método desarrollado y validado para la valoración simultánea de Acetaminofeno, bromhidrato de Dextrometorfano, clorhidrato de Fenilefrina, Cafeína y ácido Ascórbico oral por HPLC es específico, lineal, exacto y preciso, y puede ser utilizado de manera rutinaria en la evaluación de polvo oral.

Palabras clave: Método analítico, validación, Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Abstract

Introduction. The development of an analytical method requires standardization and adjusting of parameters tests to ensure its correct operation. Furthermore, validation of the method is also essential to guarantee specificity, sensitivity and precision of the quality of the pharmaceutical products. This study presents an innovative method using High Performance Liquid Chromatography (HPLC), for the simultaneous detection of Acetaminophen, Dextromethorphan hydrobromide, Phenylephrine hydrochloride, Caffeine and Ascorbic acid in oral powder. This protocol is the first validated method in Bolivia for this purpose.

Objective. To develop and validate an analytical method for the simultaneous Acetaminophen, Dextromethorphan hydrobromide, Phenylephrine hydrochloride, Caffeine and Ascorbic acid detection in oral powder using HPLC

Methodology. HPLC couple to a phenyl column at 30°C was used for the test. Phosphate buffer at pH 3,5 was used for gradient elution and acetonitrile as mobile phase. The detection was performed at wavelength of 202 nm, and the sample injection volume was 10 µL. The validation of the methodology was confirmed in accordance with USP-NF and ICH Q2(R2).

Results. A total of 14 parameters, including the selection of mobile and stationary phases, chromatographic conditions, high peak resolution and negligible interferences, were measured for the analytical method. In terms of validation of the method, the linearity ($R^2 > 0.99$) of the method was confirmed statistically by ANOVA ($p < 0.05$). The precision of the method found coefficients of variation \leq

2%. The specificity was validated through the t Student test with values of $t_{exp} < t_{tab}$ (2,78). Finally, the accuracy was evaluated at three concentration levels, finding recovery percentages between 98,1% and 100%.

Conclusion. The validated method for the simultaneous detection of Acetaminophen, Dextromethorphan hydrobromide, Phenylephrine hydrochloride, Caffeine, and Ascorbic acid in oral powder by HPLC is specific, linear, accurate, precise and can be routinely used for oral powder composition evaluation

Keywords: Analytical method, validation, High-Performance Liquid Chromatography

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de un método analítico comienza con pruebas estándar iniciales, aplicando el método en muestras reales y definiendo los parámetros de ajuste para asegurar el correcto funcionamiento del sistema durante el análisis. La validación del método analítico es el último paso, una vez determinadas las características y requisitos que debe cumplir, tales como la precisión requerida, sensibilidad deseada, grado de selectividad, costo de tiempo y tipo de instrumento requerido. Este proceso nos permitirá comprender la confiabilidad del método en aplicaciones diarias (USP-NF, 2024b).

La validación analítica debe demostrar que las metodologías analíticas brindan resultados que permiten una evaluación objetiva de la calidad especificada de los productos farmacéuticos (WHO, 2014). Además, es fundamental que las metodologías farmacopeicas adaptadas para otros usos y las metodologías no farmacopeicas sean validadas apropiadamente (USP-NF, 2024b).

Adquirir conocimientos científicos y tecnológicos nos permite contribuir a satisfacer las necesidades de la sociedad y ofrecer soluciones a los problemas de salud a través de la medicina. En este sentido, se sabe que los medicamentos orales en polvo para la gripe son efectivos en el alivio de los síntomas asociados a esta enfermedad, gracias a su combinación de ingredientes activos. Por ejemplo, la vitamina C (Ácido L-ascórbico) actúa como un antioxidante, protegiendo las células y apoyando el sistema inmunológico (Flores, 2013). El Clorhidrato de Fenilefrina alivia la congestión nasal (García, 2014), mientras que el Acetaminofeno o paracetamol reduce la fiebre al inhibir la síntesis hipotalámica de prostaglandina. La Cafeína disminuye la sensación de fatiga (Flores, 2013), y el Bromhidrato de Dextrometorfano, un antitusígeno sin actividad opioide, actúa sobre el sistema nervioso central para reducir la tos (Urbina, 2020).

En el presente trabajo se desarrolló y validó un método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), que presenta ventajas sobre los métodos tradicionales, ya que actualmente, no existe un método analítico validado descrito en alguna Farmacopea reconocida en Bolivia que permita la valoración simultánea de estos cinco principios activos en polvo oral.

METODOLOGÍA

Equipo Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución Agilent Technologies 1260 y 1290 Infinity II, conformado por una bomba binaria, modelo G7112B; automuestreador, modelo G7129A; compartimento de columna termostatzado, modelo G7116B; detector con arreglo de diodos (DAD), modelo G7115A y Software OpenLAB CDS edición ChemStation

Reactivos y estándares de referencia Metanol grado HPLC (JT Baker); acetonitrilo grado HPLC (Supelco), fosfato monobásico de potasio (Innovating Science Aldon Corporation); ácido fosfórico al 85% (Sigma-Aldrichy) agua HPLC. Estándar de trabajo de acetaminofeno (Paracetamol) pureza: 99,40%; bromhidrato de dextrometorfano, pureza: 99,92%; clorhidrato de fenilefrina pureza: 100,61%; cafeína, pureza: 99,38%; ácido Ascórbico, pureza: 100,19%.

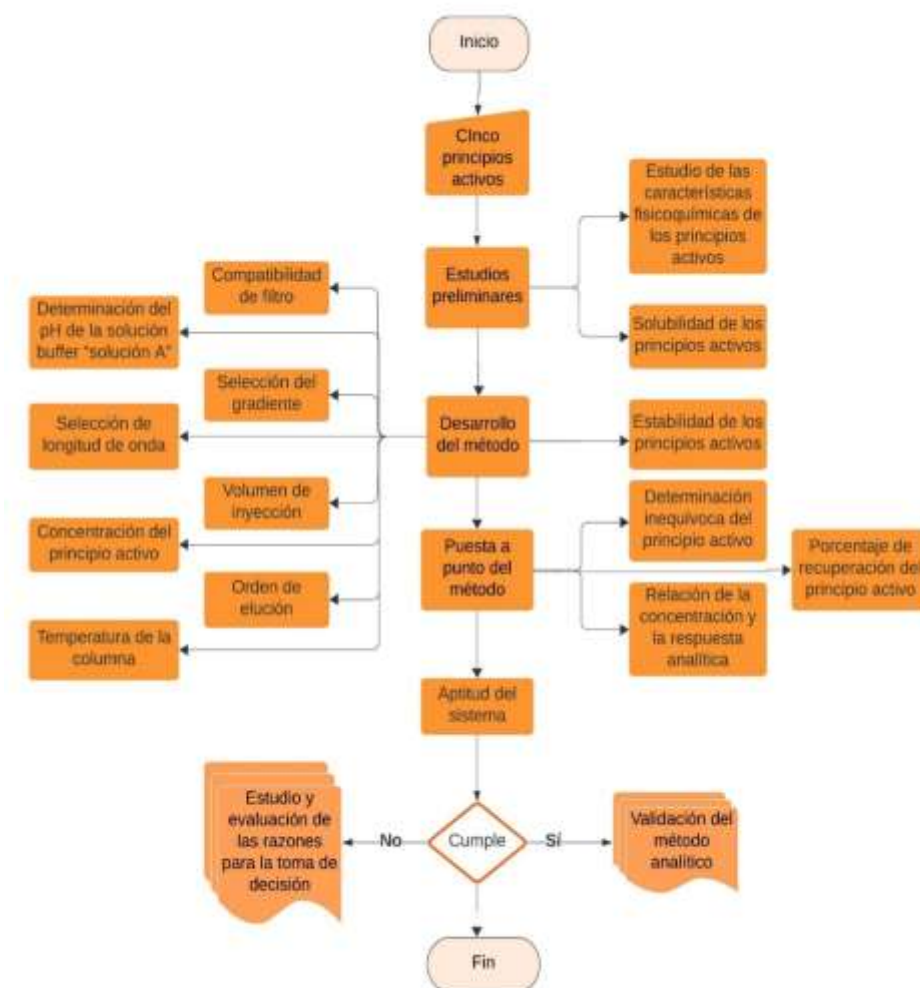
Condiciones cromatográficas Cromatógrafo equipado con una columna ZORBAX Eclipse XDB-Phenyl (L11) de 4,6 x 150 mm de 5-Micron, precolumna Eclipse XDB-Phenyl de 4,6 x 12,5 mm 5-Micron; longitud de onda de 202 nm y volumen de inyección de 10 µL. Además, se utilizó una fase móvil compuesta por fosfato monobásico de potasio 20 mM tamponada a pH 3,5 con ácido fosfórico al 10% (solución A) y acetonitrilo grado HPLC (solución B), y agua a pH 3,5 ajustado con ácido fosfórico al 10% como diluyente.

Preparación de la solución estándar. Se preparó la solución estándar pesando 32,5 mg de acetaminofeno y 25,0 mg de ácido ascórbico ~~en un matraz aforado de 25 mL~~ (preparación 1); se añadió 1 mL de metanol HPLC y diluyente, agitando mecánicamente para favorecer la disolución. Paralelamente, se pesaron 12,5 mg de clorhidrato de fenilefrina, 37,5 mg de cafeína y 18,8 mg de bromhidrato de dextrometorfano ~~en un matraz aforado de 50 mL~~ (preparación 2), al que se agregó diluyente y se agitó. Ambas preparaciones se sometieron a ultrasonido durante 20 minutos, luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente. La preparación 2 se llevó a volumen con diluyente. Se tomó una alícuota de 2 mL de la preparación 2 y se transfirió al matraz de la preparación 1, completando el volumen con diluyente para obtener concentraciones finales de 1 mg/mL de ácido ascórbico, 0,02 mg/mL de clorhidrato de fenilefrina, 1,3 mg/mL de acetaminofeno, 0,06 mg/mL de cafeína y 0,03 mg/mL de bromhidrato

de dextrometorfano. Finalmente, las soluciones se filtraron a través de filtros de jeringa de NYLON de 0,45 μm antes del análisis.

Parámetros de evaluación para el desarrollo del método analítico

Figura 1. Flujograma del desarrollo del método analítico



Nota. Estudios preliminares, desarrollo del método y puesta a punto del método analítico.

Preparación de la solución muestra. La matriz fue fortificada con los cinco principios activos y se añadió diluyente junto con 1 mL de metanol HPLC. La mezcla se sometió a baño maría a 60 °C con agitación continua hasta la disolución completa. Posteriormente, se ajustaron las concentraciones de los analitos para que coincidieran con las establecidas en la solución estándar. Finalmente, las soluciones se filtraron a través de filtros de jeringa de NYLON de 0,45 μm antes del análisis.

Parámetros de validación. Linealidad instrumental en 5 niveles de concentración de principio activo (80, 90, 100, 110 y 120%), con 12 réplicas por nivel; linealidad del método en 5 niveles de concentración de principio activo más matriz (80, 90, 100, 110 y 120%), con 12 réplicas por nivel; precisión, repetibilidad instrumental en un nivel de concentración de principio activo (100%), con 10 réplicas, repetibilidad del método en 3 niveles de concentración de principio activo más matriz (90, 100, 110%), con 12 réplicas por nivel, precisión intermedia en 3 niveles de concentración de principio activo más matriz (80, 100 y 120%), durante 3 días y con 2 analistas diferentes, con 10 réplicas por nivel; exactitud en 3 niveles de concentración de principio activo y principio activo más matriz (80, 100 y 120%), cada nivel con 10 réplicas; especificidad en un nivel de concentración de principio activo y principio activo más matriz (100%), con 6 réplicas.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Desarrollo del método analítico

En el desarrollo del método analítico se evaluaron un total de 14 parámetros. El estudio inició con el estudio de las características fisicoquímicas de cada analito y la predicción del posible orden de elución. Posteriormente, se realizaron pruebas de solubilidad en agua a pH 3,5, tanto a temperatura ambiente para la solución estándar, como a 60 °C para la solución muestra con agitación mecánica, determinando que la solubilidad óptima para la preparación estándar y la muestra se alcanzaba en aproximadamente una hora bajo agitación continua.

La concentración de los principios activos en la solución estándar se definió de manera que se obtuvieran áreas cromatográficas representativas, cuidando al mismo tiempo la integridad de la columna, dado que la matriz contiene una cantidad considerable de azúcar. En este sentido la tabla 1 presenta el gradiente desarrollado, que fue diseñado en función de las características fisicoquímicas de los compuestos analizados y el tipo de relleno de la fase estacionaria. La estabilidad de los principios activos fue evaluada mediante corridas cromatográficas sucesivas de la solución estándar y la muestra, calculando el porcentaje de recuperación, y demostrando estabilidad mínima de 9 horas en solución.

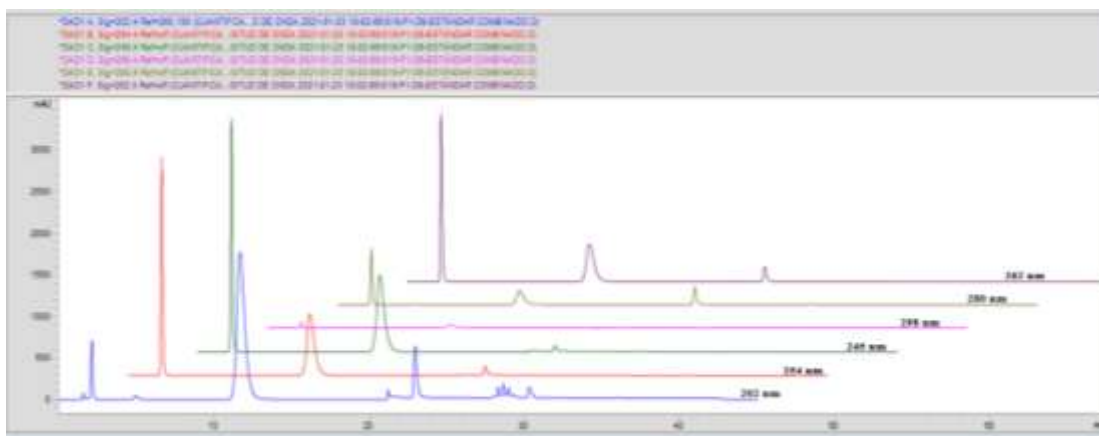
Tabla 1. Gradiente desarrollado para la valoración simultanea de ácido Ascórbico, clorhidrato de Fenilefrina, Acetaminofeno, Cafeína y bromhidrato de Dextrometorfano

Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)	Velocidad de flujo (mL/min)
0,00	100	0	1,0
8,00	100	0	1,0
8,01	100	0	1,5
18,00	100	0	1,5
18,01	80	20	1,0
22,00	80	20	1,0
22,01	80	20	0,5
25,00	80	20	0,5
25,01	70	30	1,0
40,00	70	30	1,0
40,01	100	0	1,0
45,00	100	0	1,0

Nota. Solución A (solución buffer de fosfato monobásico de potasio a pH 3,5) y solución B (Acetonitrilo).

Asimismo, se realizaron corridas cromatográficas a 6 longitudes de onda en el espectro Ultravioleta (UV): 202, 245, 298, 280 y 262 nm, como se muestra en la figura 2.

Figura 2. Perfiles cromatográficos con un DAD a 6 longitudes de onda

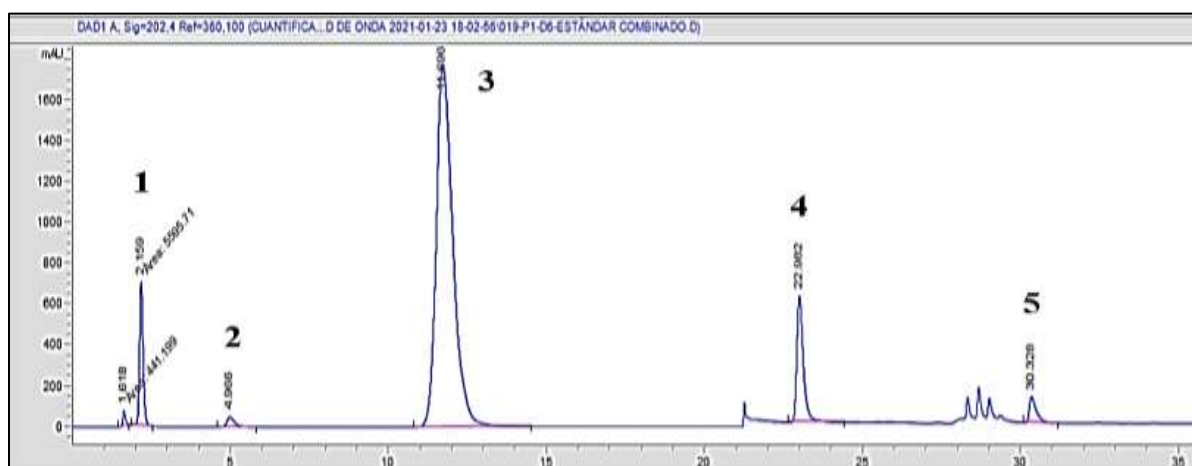


Nota. Picos de principios activos a 6 longitudes de onda. Obtenido de OpenLAB CDS edición ChemStation Agilent Technologies del HPLC Agilent 1260 y 1290.

Estas longitudes corresponden a los de máxima absorción de cada uno de los principios activos, además de incluir 254 nm, donde absorben la mayoría de los compuestos. Para definir la longitud de onda de trabajo, se seleccionó aquella que permitiera detectar los cinco compuestos analizados en sus máximos de absorción, estableciendo la longitud de onda de trabajo a 202 nm.

La figura 3 muestra el cromatograma obtenido, evidenciando la resolución y el orden de elución de los cinco principios activos bajo las condiciones del método desarrollado. La temperatura de la columna se fijó en 30 °C, ya que a esta temperatura se obtuvo una resolución superior en comparación con los picos obtenidos a 20 °C, garantizando así una separación más eficiente.

Figura 3. Cromatograma del estándar combinado con los 5 principios activos



Nota. Los picos corresponden a Ácido Ascórbico (1), Clorhidrato Fenilefrina (2), Acetaminofeno (3), Cafeína (4) y Bromhidrato de Dextrometorfano (5). Obtenido de Software OpenLAB CDS edición ChemStation Agilent Technologies del HPLC Agilent 1260 y 1290.

La tabla 2 resume los parámetros evaluados durante el desarrollo del método, incluyendo análisis estadísticos con prueba t de Student y ANOVA. Para la compatibilidad de filtros, se usaron jeringas de NYLON de 0,45 µm, con recuperaciones entre 98,9% y 101,3% para los cinco principios activos, indicando ausencia de pérdidas significativas.

Tabla 2. Resumen de parámetros evaluados durante el desarrollo del método analítico

Principio activo	Características fisicoquímicas	Solubilidad	Conc. de principios activos	Selección del gradiente	Estabilidad (% de recuperación)	Selección de λ	T° de la columna Rs a 30°C	Compatibilidad de filtro	pH de la solución A	Volumen de inyección	Orden de elución	Interferencia de matriz	Evaluación de % de recuperación	Relación entre conc. y respuesta analítica					
								Prueba de exactitud t de STUDENT (t de Student exp)											
ANOVA (F exp)																			
1	1ro en eluir	Agua a pH 3,5 ultrasonido, sin T°. (solución estándar) BM a 60°C con agitación constante. (solución muestra)	1,00 mg/mL	Ver tabla 1 El gradiente con tiempo de estabilización al final de cada corrida con el fin de regresar a su condición inicial, asegurando reproducibilidad de las corridas posteriores	99,1%	202 nm	-	2,14	0,15	1,30	0,03	0,63	0,02	37378,9					
2	2do en eluir		0,02 mg/mL		100,5%		15,1	2,11	2,08	1,88	0,01	1,66	0,08	14721,4					
3	3ro en eluir		1,30 mg/mL		99,9%		17,0	2,04	1,88	1,66	0,02	1,16	0,00	199003,9					
4	4to en eluir		0,06 mg/mL		99,6%		29,7	2,10	1,68	1,38	0,02	1.14	0,01	122574,6					
5	5to en eluir		0,03 mg/mL		99,1%		32,4	0,77	1,56	1,16	0,03	2,1	0,01	83054,2					
Conclusión	Se determinó en función de la polaridad y grupos funcionales	Tiempo aprox. de disolución 20 minutos	Picos con una Rs≥1,5	Resultados fiables y reproducibles en gradiente	Estable hasta 9 horas	λ a la cual absorben los 5 analitos.	Picos con una Rs≥1,5	No existe interferencia de filtro	El pH de la solución A no interfiere en resultados	Volumen inyección apto	Método exacto	La matriz no es un interferente	Método exacto	La regresión es lineal					
								t exp>t tab (2,1448)	t exp>t tab (2,2622)						t exp>t tab (2,1448)	t exp>t tab (3,16)	t exp>t tab (2,78)	t exp>t tab (3,16)	a=0 y b≠0 F exp>F tab (4,965)
																(2,1448)	(2,2622)	(2,1448)	(3,16)

Nota. parámetros evaluados durante el desarrollo del método analítico. Rs= resolución, λ = longitud de onda, conc. =concentración, T°= temperatura, BM= Baño María, 1= Ácido Ascórbico, 2= Fenilefrina HCl, 3= Acetaminofeno, 4= Cafeína, 5= Dextrometorfano HBr

Se evaluó el pH a 3,0 y 3,5, sin observar interferencias relevantes; se seleccionó pH 3,5 para compatibilidad con la fase estacionaria. El volumen de inyección se fijó en 10 μ L, adecuado para detectar incluso el principio activo en menor concentración, bromhidrato de dextrometorfano, con un área promedio de 1735,59 a nivel 80%. El orden de elución se definió mediante corridas individuales y combinadas de estándares, la figura 3 muestra y confirma buena separación. La matriz no constituye un interferente significativo para la cuantificación de los principios activos, en cuanto a las recuperaciones, estas se encuentran entre 99,5% y 100,5%. Finalmente, la relación concentración-respuesta fue estadísticamente lineal en cinco niveles de concentración para los cinco analitos.

Validación del método analítico

Linealidad. El ácido Ascórbico, clorhidrato de Fenilefrina, Acetaminofeno, Cafeína y bromhidrato de Dextrometorfano presentaron linealidad en los siguientes rangos: 0,8 a 1,2 mg/mL; 0,016 a 0,024 mg/mL; 1,04 a 1,56 mg/mL; 0,048 a 0,072 mg/mL y 0,024 a 0,036 mg/mL respectivamente. Todos los compuestos mostraron un coeficiente de determinación (R^2) superior a 0,990 y una regresión lineal adecuada. La tabla 3 presenta datos de coeficiente de correlación (r) mayores a 0,990; así como resultados de la pendiente e intercepto, indicando una linealidad aceptable.

Tabla 3. Resultados de linealidad instrumental y linealidad del método

Análisis	Ácido ascórbico	Clorhidrato de Fenilefrina	Acetaminofeno	Cafeína	Bromhidrato de Dextrometorfano	Criterio de aceptación
Linealidad Instrumental						
b (t_{exp})	108,0197	141,8681	133,5230	123,3886	117,1975	$t_{exp} > t_{tab}$ (2,1604)
a (t_{exp})	0,2504	2,0395	2,1153	0,2259	1,8350	$t_{exp} < t_{tab}$ (2,1604)
r	0,9994	0,9997	0,9996	0,9996	0,9995	$\geq 0,990$
ANOVA valor p	1,38E-20	3,99E-22	8,77E-22	2,45E-21	4,77E-21	$p < 0,05$
Linealidad del método						
b (t_{exp})	111,8783	108,2006	208,2187	162,5851	96,7421	$t_{exp} > t_{tab}$ (2,1604)
a (t_{exp})	1,1051	2,0995	2,0347	1,8384	2,0602	$t_{exp} < t_{tab}$ (2,1604)
r	0,9995	0,9994	0,9999	0,9998	0,9993	$\geq 0,990$
ANOVA valor p	8,72E-21	1,34E-20	2,72E-24	6,79E-23	5,76E-20	$p < 0,05$

Nota. Tratamiento estadístico para comprobar la linealidad. **b** pendiente, **a** intercepto, **r** coeficiente de correlación.

Precisión. En la tabla 4 indica que el método es preciso, independientemente del analista que lo ejecute y del día de análisis (condiciones ambientales diferentes). Esto se evidencia por los coeficientes de variación obtenidos, que fueron inferiores al 2 %.

Tabla 4. Resultados de precisión del método

Principio activo	Concentración (%)	Concentración (mg/mL)	Precisión CV (%)
Ácido ascórbico	80	0,8	0,89 (PI)
	90	0,9	0,48 (RM)
	100	1	0,27 (RI); 0,44 (RM); 0,38 (PI)
	110	1,1	0,20 (RM)
	120	1,2	0,57 (PI)
Clorhidrato de Fenilefrina	80	0,016	2,00 (PI)
	90	0,018	1,32 (RM)
	100	0,02	0,81 (RI); 0,46 (RM); 0,80 (PI)
	110	0,022	0,82 (RM)
	120	0,024	2,00 (PI)
Acetaminofeno	80	1,04	0,48 (PI)
	90	1,17	0,38 (RM)
	100	1,30	0,55 (RI); 0,11 (RM); 0,45 (PI)
	110	1,23	0,10 (RM)
	120	1,56	0,37 (PI)
Cafeína	80	0,048	0,26 (PI)
	90	0,054	0,27 (RM)
	100	0,06	0,21 (RI); 0,26 (RM); 0,24 (PI)
	110	0,066	0,28 (RM)
	120	0,072	0,37 (PI)
Bromhidrato de Dextrometorfano	80	0,024	0,48 (PI)
	90	0,027	0,24 (RM)
	100	0,030	0,44 (RI); 0,30 (RM); 0,52 (PI)
	110	0,033	0,23 (RM)
	120	0,036	0,26 (PI)
Criterio de aceptación (Máximo 2%)			Cumple

Nota. Coeficiente de variación (CV), Repetibilidad instrumental (RI), repetibilidad del método (RM) y precisión intermedia (PI).

Especificidad. La especificidad del método se evaluó mediante la prueba de Anderson-Darling, que demostró que los datos siguen una distribución normal. Además, el análisis de varianza de Fisher confirmó que las varianzas son equivalentes. La Tabla 5 presenta los resultados de la prueba t de Student, del principio activo más la matriz sobre el principio activo, que nos indica

que la matriz no actúa como un interferente significativo, ya que el valor t experimental es menor que el valor t de tablas para los cinco principios activos.

Tabla 5. Prueba de t de Student para verificar la Interferencia de matriz

Principio activo	Prueba de t -Student (Interferencia de matriz)	Criterio de aceptación
	t_{exp}	
Ácido Ascórbico	0,63	$t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}} (2,78)$
Clorhidrato de Fenilefrina	1,66	
Acetaminofeno	1,16	
Cafeína	1,14	
Bromhidrato de Dextrometorfano	2,1	

Nota. El método es específico para la valoración de los cinco principios activos. La muestra corresponde a y Principio activo + matriz /Principio activo

Exactitud. La exactitud del método se evaluó en 3 niveles de concentración (80, 100 y 120%). Se utilizó el estadístico de Cochran para probar la homogeneidad de varianzas, determinando que la concentración no influye en los resultados, ya que el valor G experimental es menor que el valor G de tablas. En la tabla 6 se presenta el porcentaje de recuperación de cada uno de los cinco principios activos en los tres niveles de concentración, mostrando resultados cercanos al 100% (98,1% a 100,5%). Además, se calculó el sesgo que surge de errores sistemáticos inherentes al método, que se situó entre -2% y +2%.

En la literatura científica existen métodos HPLC para la cuantificación simultánea de algunos de los principios activos estudiados. Mahesh et al. (2013) desarrollaron un método para Paracetamol, Cafeína, clorhidrato de Fenilefrina y bromhidrato de Dextrometorfano en tabletas, logrando alta precisión y tiempos de análisis menores a 20 minutos.

Elkady et al. (2020) validaron un método para ácido Ascórbico, Fenilefrina, Paracetamol y Cafeína en sus formas puras y en tabletas, con parámetros dentro de los límites ICH. Sin embargo, estos métodos no incluyen simultáneamente el Ácido Ascórbico y Bromhidrato de Dextrometorfano, ni emplean la matriz de polvo oral. Samaniego & Arias (2016) validaron un método para la cuantificación simultánea de Fenilefrina clorhidrato, Paracetamol, Salicilamida, Cafeína y Clorfeniramina maleato en tabletas, sin Acetaminofeno ni ácido Ascórbico.

Tabla 6. Porcentajes de recuperación de los cinco principios activos

Principio activo	Nivel de concentración (%)	Concentración mg/mL	Recuperación %	Sesgo %
Ácido Ascórbico	80	0,8	100,3	0,3
	100	1	100,0	-0,1
	120	1,2	100,1	0,1
Clorhidrato de Fenilefrina	80	0,016	100,2	0,2
	100	0,02	100,4	0,4
	120	0,024	100,0	0,0
Acetaminofeno	80	1,04	100,1	0,1
	100	1,3	99,3	-0,7
	120	1,56	100,5	0,5
Cafeína	80	0,048	100,2	0,2
	100	0,06	100,2	0,2
	120	0,072	100,1	0,1
Bromhidrato de Dextrometorfano	80	0,024	100,3	0,3
	100	0,03	100,2	0,2
	120	0,036	98,1	-1,9

Nota. El sesgo es la diferencia entre el resultado obtenido en la prueba y un valor de referencia aceptado (100%).

En contraste, el método desarrollado en este trabajo permite la valoración simultánea de cinco principios activos en polvo oral, una formulación muy utilizada en la industria farmacéutica. Optimizando el tiempo de análisis y usando una columna fenilo, descrita en la USP-NF (2024) para el análisis de antigripales. Esto confiere al método un carácter único y una mejora significativa respecto a los existentes.

CONCLUSIONES

Se desarrolló un método para la valoración simultánea de cinco principios activos en polvo oral, por HPLC utilizando una columna fenilo (L11) y una fase móvil compuesta por un buffer fosfato a pH 3,5 y acetonitrilo HPLC. La detección se realizó a 202 nm, con una temperatura de columna de 30°C y un tiempo de corrida de 45 minutos. Los tiempos de retención fueron 2,16 min (ácido Ascórbico), 4,96 min (clorhidrato de Fenilefrina), 11,68 min (Acetaminofeno), 23,07 min (Cafeína) y 30,38 min (bromhidrato de Dextrometorfano).

Después del desarrollo, el método fue validado conforme a la USP e ICH Q2(R2), éste demostró especificidad, linealidad (80% a 120% concentración, coeficiente de correlación ($r > 0,999$),

precisión ($CV \leq 2,0\%$), exactitud (recuperación entre de 90,0% y 110%) y un sesgo del $\pm 2\%$. Este método validado constituye una herramienta importante para la industria farmacéutica, porque de esta manera se asegura la obtención de resultados confiables conforme a normativas internacionales en formulaciones de antigripales en polvo oral, en consecuencia, representa un ahorro significativo de recursos y tiempo en comparación con la realización de análisis individuales. Además, garantiza la eficacia, seguridad y estabilidad del producto, protegiendo la salud del paciente mediante la minimización de variaciones en la concentración de los principios activos.

REFERENCIAS

- Elkady, Y., El-Adl, S., Baraka, M., & Sebaiy, M. (2020). HPLC Method for Simultaneous Determination of Ascorbic acid, Phenylephrine, Paracetamol, Caffeine in Their Pure and Dosage Forms. *International Journal of Advanced Research in Chemical Science*, 7(6), 7–16. <https://doi.org/10.20431/2349-0403.0706002>
- Flores, J. (2013). *Farmacología Humana* (6th ed.). Elsevier Masson.
- García, Á. (2014). Desarrollo de una nueva metodología para la cuantificación de Ibuprofeno, dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y ácido ascórbico presentes en preparaciones farmacéuticas, por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución. http://www.repositorio.usac.edu.gt/2145/1/06_3689.pdf
- Mahesh, P., Swapnalee, K., Aruna, M., Anilchandra, B., & Prashanti, S. (2013). Analytical Method Development and Validation of Acetaminophen, Caffeine, Phenylephrine Hydrochloride and Dextromethorphan Hydrobromide In Tablet Dosage Form By Rp-Hplc. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*, 2(2), 9–15. www.ijpsi.org
- Samaniego, J., & Arias, G. (2016). Desarrollo y validación de una metodología analítica por HPLC para la cuantificación simultánea de fenilefrina clorhidrato, paracetamol, salicilamida, cafeína y clorfeniramina maleato en tabletas. *Rev Soc Quím Perú*, 82(2), 12. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v82n2/a10v82n2.pdf>
- Urbina, C. (2020). Optimización del análisis para la determinación del contenido de principios activos de un medicamento antigripal en cápsula de gelatina blanda [Universidad Nacional de Educación a distancia]. <https://ru.dgb.unam.mx/bitstream/20.500.14330/TES01000830489/3/0830489.pdf>
- USP-NF. (2024a). Polvo Oral que Contiene por lo Menos Tres de los Sigüientes Fármacos—Acetaminofeno y Sales de Clorfeniramina, Dextrometorfano y Pseudoefedrina. In *Farmacopea de los Estados Unidos de América-Formulario Nacional* (2024th, Número 2 ed., p. 4). <https://doi.org/g1k9>
- USP-NF. (2024b). USP-NF (1225) Validación de Procedimientos Farmacopeicos. In *Farmacopea de los Estados Unidos de América-Formulario Nacional* (p. 7). <https://doi.org/rh21c>
- WHO. (2014). Good manufacturing practices for pharmaceutical products: main principles. <http://www.who.int/bookorders>