

Desarrollo y validación de un método analítico por RP-HPLC para la determinación simultánea de clorhidrato de ambroxol y loratadina en jarabes

Development and validation of an analytical method by RP-HPLC for simultaneous determination of ambroxol hydrochloride and loratadine in syrup

ZURIMA PARRA^{A,*}, MARISABEL BOR^A, LUIS GÓMEZ^B

Resumen

El propósito de la siguiente investigación consistió en el desarrollo y validación de una metodología analítica por RP-HPLC para la determinación simultánea del clorhidrato de ambroxol y loratadina en jarabes. El método fue validado de acuerdo a los requerimientos establecidos en el apartado <1225> de la USP. Las condiciones cromatográficas establecidas para el análisis fueron las siguientes: columna C-18 (3,9 mm x 150 mm, 5 µm), fase móvil buffer fosfato monobásico de amonio 0,05 M (pH 4,00) y metanol en proporción 50:50, pH 3,40 ajustado con ácido ortofosfórico al 85%, a un flujo de 0,8 mL/min. Detección UV-Visible a una longitud de onda de 248 nm. La metodología es lineal en un rango de concentración entre 0,12 mg/mL a 0,90 mg/mL para el clorhidrato de ambroxol y 0,02 mg/mL a 0,16 mg/mL para la loratadina. Los resultados demuestran que el método desarrollado es robusto y confiable bajo las condiciones de análisis, preciso, exacto y selectivo, ya que permite reconocer inequívocamente la presencia del clorhidrato de ambroxol y loratadina y discriminar la presencia de productos de degradación. El método analítico desarrollado y validado se puede aplicar como un procedimiento rutinario para pruebas de control de calidad.

Palabras clave: clorhidrato de ambroxol, loratadina, RP-HPLC, validación

Abstract

The purpose of the present study was to develop and validate an analytical method by RP-HPLC for simultaneous determination of ambroxol hydrochloride and loratadine in syrups. The method was validated according to the requirements established in section <1225> of the USP. The chromatographic conditions used in this method were: C-18 column, 3.9 mm x 150 mm, 5 µm, a mobile phase of monobasic ammonium phosphate buffer 0.05 M (pH 4,00) and methanol (50:50), adjusted with 85% orthophosphoric acid to a pH of 3.40; a flow rate of 0.8 mL/min, UV-visible detection at wavelength of 248 nm. The methodology is linear over the range of concentration from 0.12 mg/mL to 0.90 mg/mL for ambroxol hydrochloride and 0.20 mg/mL to 0.16 mg/mL for loratadine. The results show that the developed method is robust and of trust under the analysis conditions, precise, accurate and selective, because it allows to unequivocally recognize the presence of ambroxol hydrochloride and loratadine and to discriminate the presence of degradation products. The developed and validated analytical method can be applied as a routine procedure for quality control testing.

Key words: ambroxol hydrochloride, loratadine, RP-HPLC, validation

A Laboratorio de Análisis de Medicamentos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.

B Centro de Química Analítica, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

* Correspondencia: Apdo. 40109 - Caracas 1040A, Venezuela. zurimaparra@gmail.com.

Introducción

El ambroxol (*trans*-4-(2-amino-3,5-dibromofenil-metil-amino) ciclohexanol) ó (2-amino-3,5-dibromo-*N*-(*trans*-4-hidroxiciclohexil)encilamina) administrado como sal hidroclicórica (**Figura 1**) es usado como expectorante mucolítico broncosecretolítico en diferentes preparaciones farmacéuticas (Beeh y col., 2008). Debido a su capacidad para promover la secreción y el aclaramiento bronquial es comúnmente usado para el tratamiento de enfermedades respiratorias agudas o crónicas asociadas con un aumento de la producción de mucosidad. Entre los efectos farmacológicos de ambroxol se incluyen: la regulación de mucosidad en las células de la glándula, el aumento y fabricación de agente tensoactivo pulmonar, la supresión de la replicación del virus respiratorio, así como, efectos anestésicos locales (BPM, 2004).

En aquellos casos en los cuales los pacientes muestran condiciones broncopulmonares de origen alérgico, asociados con tos, que cursen con aumento de la viscosidad y adherencia de mucosidad, es requerido un tratamiento que no solo actúe sobre la tos sino también sobre el estado alérgico. Es por ello que

surgen preparaciones farmacéuticas constituidas tanto por agentes expectorantes y/o mucolíticos como por agentes antihistamínicos, empleados para el alivio sistemático de los procesos alérgicos respiratorios; asociados o no con la presencia de mucosidad en el tracto respiratorio. Siendo la loratadina uno de los agentes antihistamínicos comúnmente empleado a nivel comercial.

La loratadina (etil-4-(8-cloro-5,6-dihidro-1H-benzo(5,6)ciclohepta(1,2-b)piridin-1-ilideno-a-piperidincarboxilato) (**Figura 1**) es un antihistamínico de acción prolongada, selectivo de los receptores periféricos H₁, de actividad antagonista. Empleado en procesos alérgicos tales como rinitis alérgica, alergia a picaduras de insectos y/o medicamentos (Alcántara, 2006). La loratadina está desprovista de efectos de sedación y anticolinérgicos significativos sobre el sistema nervioso central y sistema nervioso autónomo, debido a que este fármaco se une a las proteínas plasmáticas en elevada proporción y prácticamente no atraviesa la barrera hematoencefálica (Tello y col., 1997).

La combinación de ambroxol y loratadina, como principios activos en formulaciones de solución oral, es empleada en el tratamiento contra

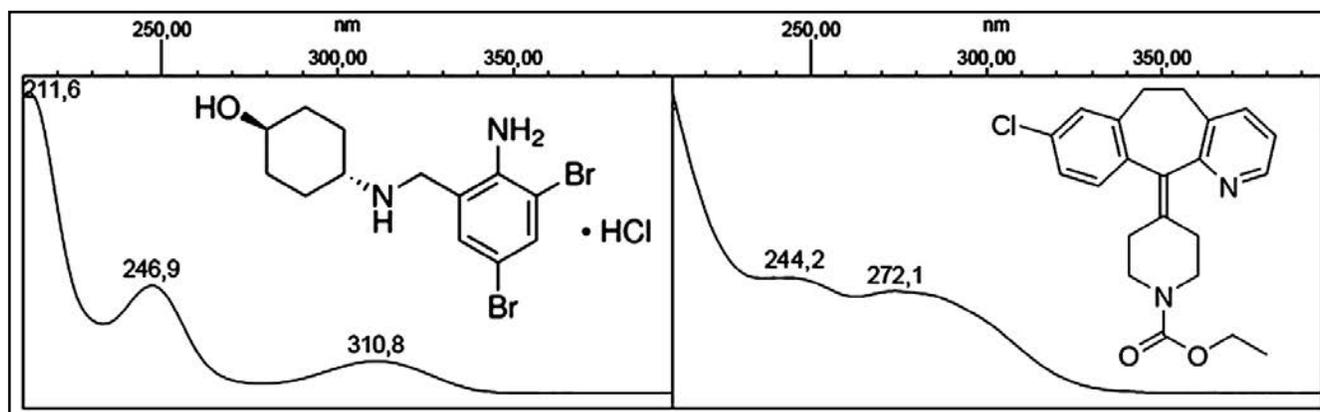


Figura 1. Estructura química y barrido de longitudes de onda de los principios activos clorhidrato de ambroxol (izquierda) y loratadina (derecha) en un rango de 200 nm a 400 nm

enfermedades respiratorias, los cuales presentan una acción complementaria al combinar carácter de un antihistamínico no sedante de acción prolongada (loratadina) y un expectorante y mucolítico (ambroxol); indicada para el tratamiento de pacientes que muestran condiciones broncopulmonares de origen alérgico, asociados con tos, en los cuales se incrementa la viscosidad y adherencia mucosa, dificultando la permeabilidad de las vías aéreas (Alcántara, 2006).

La USP 36 (2014), reporta un método por HPLC para la determinación individual de loratadina solución oral, la cual establece el uso de columna L11 (30 cm x 3,9 mm, 10 μ m), volumen de inyección de 10 μ L, fase móvil mezcla acetonitrilo: buffer fosfato monobásico de potasio 6,8 g/L pH 3,0 (30:70). Flujo de 2,0 mL/min, longitud de onda 254 nm. Temperatura columna 20-30 °C. Solución estándar de 5 mg/mL de loratadina en diclorometano, estándar interno butilparabeno 0,3 mg/mL. Solución diluyente mezcla de acetonitrilo: agua (30:70). El tratamiento de la muestra establece una cantidad equivalente a 10 mg de loratadina, a la cual se adicionan 10 mL de hidróxido de sodio 0,2 N y 2,0 mL diclorometano. Una vez preparada esta solución se procede a centrifugar por 10 minutos, considerando la fase orgánica para el análisis de la muestra.

Actualmente, escasas investigaciones plantean métodos por HPLC para la determinación simultánea del contenido de ambroxol y loratadina en tabletas, sin embargo, no se presentan metodologías validadas y estandarizadas para presentaciones farmacéuticas en jarabe para la mezcla de componentes de interés. Los jarabes presentan en su formulación farmacéutica preservativos, excipientes, colorantes, saborizantes y agentes edulcorantes; la presencia

de este tipo de sustancias podrían interferir en la determinación de los principios activos, así como afectar los resultados esperados para este tipo de formulación, por tal motivo se llevó a cabo el desarrollo y validación de un procedimiento analítico por HPLC para la determinación simultánea del contenido de clorhidrato de ambroxol y loratadina presentes en formulaciones farmacéuticas tipo jarabe.

Materiales y métodos

EQUIPOS

Cromatógrafo líquido de alta eficiencia, Waters conformado por: bomba modelo 600E, automuestreador modelo 717 Plus, acoplado a un detector UV-Visible de arreglo de diodos, modelo 996 PDA. Programa para la adquisición y procesamiento de datos, *Millennium*³². Columna C-18 (3,9 mm x 150mm, 5 μ m). Waters, XTerra.

Balanzas electrónicas. Mettler-Toledo, modelo AG245. Adventurer OHAUS, modelo AR3130. Las mediciones de pH fueron realizadas con el pHmetro. Thermo Electron Corporation Orion, modelo 420A+.

REACTIVOS

Reactivos grado HPLC: acetonitrilo (Mallinckrodt ChromARHPLC), metanol (Merck KgaA). Agua 18 M Ω , obtenida por una combinación de un sistema de pre-tratamiento y desionización. Cascada RO MK2 -Pall Corporation. Ultrapurificador Barnstead, NANOpure.

Reactivos grado analítico: fosfato monobásico de amonio (SIGMA-ALDRICH), hidróxido de sodio (Merck KgaA), peróxido de hidrógeno al 35% (Riedel-de Haën), ácido clorhídrico al 37% (Merck KGaA),

ácido fosfórico al 85% (Fisher Scientific).

PATRONES DE REFERENCIA

Se emplearon patrones secundarios de referencia, provenientes de materia prima de alta pureza: clorhidrato de ambroxol, 99,34% de pureza; loratadina, 99,87% de pureza.

MUESTRAS

Las muestras analizadas corresponden a productos comerciales en su forma farmacéutica jarabe, constituidos por la mezcla de los componentes activos clorhidrato de ambroxol y loratadina. Los mismos declaran que cada 5 mL de jarabe, contienen 5 mg de loratadina y 30 mg de clorhidrato de ambroxol, densidad ($1,1588 \pm 0,0003$) g/mL, valor determinado a ($25 \pm 0,2$) °C.

PREPARACIÓN DE PATRONES

Se prepararon soluciones estándar individuales y combinadas de clorhidrato de ambroxol 0,6 mg/mL y loratadina 0,1 mg/mL, empleando como disolvente, mezcla de acetonitrilo: agua grado HPLC en proporción 30:70.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se pesaron 5,0 mL de solución oral, se añadió un volumen de 10 mL de disolvente acetonitrilo: agua en relación 30:70, seguido de agitación mecánica por 5 minutos. Se llevó a un volumen final de 50,0 mL con disolvente. Cada solución fue filtrada a través de una membrana de poliamida de 0,2 μ m.

OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

La determinación de la longitud de onda de máxima absorción se realizó

mediante el estudio de los barridos de longitudes de onda en el rango UV de 200 nm a 400 nm, con un detector de arreglo de diodos, para ambos principios activos (**Figura 1**). Se observa que los máximos de absorción de ambas especies se encuentran próximos, lo que permite el análisis simultáneo a una longitud de onda de 248 nm.

La selección de la fase móvil adecuada para el método de análisis se realizó mediante el desarrollo de diferentes combinaciones de fase móvil, establecidas a partir de investigaciones para el análisis de uno de los componentes de interés.

Se obtuvieron resultados satisfactorios al emplear metanol, proponiéndose la fase móvil compuesta por la mezcla de buffer fosfato monobásico de amonio 0,05 M y metanol, ajustado a $\text{pH } 3,40 \pm 0,01$ con ácido ortofosfórico. A pH mayores de 3,4 se genera irreproducibilidad en el tiempo de retención para el caso de la loratadina, esto podría ser atribuido a que la especie es afectada por variaciones de pH . En función a estos resultados se procedió a optimizar y evaluar las condiciones cromatográficas. Seguidamente se procedió a variar las proporciones de los eluentes, de mayor a menor fuerza elutropica. Para ello se estudiaron las proporciones (40:60, 45:55 y 50:50).

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Las condiciones cromatográficas establecidas fueron las siguientes: columna C-18 (3,9 mm x 150 mm, 5 μ m) Waters, XTerra, fase móvil de buffer fosfato monobásico de amonio 0,05 M: metanol en proporción 50:50, a pH de $3,40 \pm 0,01$ a un flujo de 0,8 mL/min, detector UV a 248 nm, y un volumen de inyección de 10 μ L.

VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

La validación del método se realizó siguiendo los lineamientos establecidos para la cuantificación de principios activos en productos farmacéuticos terminados requeridos por la categoría I del apartado 1225> de la USP 36 (2014). Los parámetros evaluados fueron los siguientes: linealidad, precisión, exactitud, especificidad y robustez.

ADECUACIÓN DEL SISTEMA

La evaluación de la repetibilidad instrumental consistió en estudiar la dispersión de los parámetros: tiempo de retención y área de pico cromatográfico, así como los factores cromatográficos: factor de retención (k), factor de asimetría (A_s) y resolución (R_s) para las bandas cromatográficas de los analitos de interés en una disolución estándar combinada de clorhidrato de ambroxol y loratadina. Para ello se realizaron 20 inyecciones consecutivas de la disolución estándar bajo las condiciones de análisis.

LINEALIDAD Y RANGO

La linealidad del método y rango de concentración fue determinada a partir de patrones combinados de ambos compuestos de interés en un rango de concentración de 0,12 a 0,90 mg/mL para el clorhidrato de ambroxol y 0,02 a 0,16 mg/mL para la loratadina. La ecuación de la regresión lineal fue calculada para cada analito y sus respectivas curvas de calibración fueron construidas trazando el promedio de las áreas de la señal cromatográfica en función de la concentración del analito correspondiente. La linealidad de los gráficos de calibración fue verificada mediante el uso de los métodos de coeficiente de determinación (R^2), análisis de residuales del modelo de

regresión y la prueba estadística de falta de ajuste (F_0) la cual permite validar la linealidad del método. La comparación de la linealidad inter-diaria de las regresiones se realizó mediante los estadísticos de la función de la respuesta lineal y el estudio de contraste F , para la comprobación de la idoneidad del modelo de regresión.

PRECISIÓN

PRECISIÓN DEL SISTEMA

La precisión del método analítico se estudió sobre el sistema cromatográfico, para ello se evaluó la dispersión en los tiempos de retención y las áreas cromatográficas de inyecciones consecutivas del estándar nivel 100% correspondiente a una concentración de 0,6 mg/mL de clorhidrato de ambroxol y 0,1 mg/mL de loratadina.

REPETIBILIDAD

La precisión del método bajo condiciones analíticas de repetibilidad (mismo analista, mismo día, mismo equipo) fue evaluada mediante la dispersión de las concentraciones de los analitos en seis preparaciones homogéneas de muestra al 100% de la concentración. La determinación del contenido de clorhidrato de ambroxol y loratadina en las muestras, fue determinada a partir de curvas de calibración.

PRECISIÓN INTERMEDIA

La precisión intermedia fue determinada bajo condiciones y procedimientos del análisis cromatográfico reproducida por tres analistas, empleando el mismo sistema cromatográfico. La cual fue evaluada mediante la adecuación del sistema a partir de una serie de cinco inyecciones consecutivas de estándar

y mediante la evaluación de tres preparaciones homogéneas de muestra al 100% de la concentración.

EXACTITUD

La determinación de la exactitud se realizó según el método de enriquecimiento de muestras con estándar (Lister, 2005), el cual consiste en añadir a las muestras una cantidad conocida de estándar, para obtener tres niveles de concentración correspondientes a 80%, 100% y 130% de la curva de calibración. Se realizaron nueve determinaciones (tres réplicas de cada nivel de concentración); el porcentaje de recuperación fue determinado según la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de recuperación} = (C_{\text{enriquecida}} - C_{\text{sin enriquecer}}) * 100 / C_{\text{Analito añadido}}$$

ESPECIFICIDAD

La especificidad del método fue evaluada mediante estudios de degradación forzada en conjunto con la evaluación de la pureza de pico cromatográfico de los analitos objeto de estudio. Al no poseer estándares de impurezas y/o excipientes que permitan demostrar que el ensayo no es afectado por la presencia de dichas materiales, se evaluó la especificidad del método mediante pruebas de degradación según lo establecido en el apartado <1225>, Validación de procedimientos USP (2014).

DEGRADACIÓN FORZADA

El procedimiento consistió en pesar 5,0 mL de solución oral, en un matraz aforado de 50 mL, procedimiento realizado para cada una de las condiciones. Una vez pesadas, las muestras fueron sometidas a distintas condiciones de estrés.

MUESTRA CONTROL: no fue sometida a ningún tratamiento previo.

HIDRÓLISIS ÁCIDA: adición de 10 mL de ácido clorhídrico 1 N a la muestra. Reposo durante 7 días.

HIDRÓLISIS ALCALINA: adición de 10 mL de hidróxido de sodio 1 N a la muestra. Reposo durante 7 días.

OXIDACIÓN: adición de 10 mL de peróxido de hidrógeno al 10% a la muestra. Reposo durante 7 días.

FOTÓLISIS: la muestra se sometió a la exposición de radiación visible durante 7 días continuos.

TERMÓLISIS: la muestra fue sometida a calentamiento en un baño térmico de agua (60,0 ± 0,2) °C, durante 4 horas, procedimiento realizado el día del análisis cromatográfico.

Una vez culminado el tiempo de exposición, cada muestra fue llevada a volumen con disolvente, adicionalmente se preparó un patrón control. La concentración de clorhidrato de ambroxol y loratadina en las muestras y patrón control fue de 0,6 y 0,1 mg/mL, respectivamente. Los cromatogramas y los gráficos de pureza de pico cromatográficos obtenidos fueron estudiados para cada una de las pruebas.

PUREZA DE PICO CROMATOGRÁFICO

La interpretación de los gráficos de pureza está relacionada con los valores del ángulo de pureza (PA) y ángulo del

umbral (TH), si PA es mayor que TH, se presume que hay una coelución del analito con una impureza, al existir diferencias espectrales significativas.

ROBUSTEZ

La evaluación de la robustez del método se realizó mediante variaciones deliberadas de los parámetros cromatográficos, según el diseño experimental descrito por Plackett y Burman (1946), el cual plantea que los parámetros de validación se evalúan utilizando un enfoque de dos niveles para cada variable que sea puesta a prueba (Lister, 2005). Según lo antes expuesto se estableció modificaciones de $\pm 0,1$ unidades en flujo y pH de la fase móvil $\pm 2\%$ en la composición de la fase móvil. El efecto de estos cambios fue evaluado utilizando ocho experimentos, presentados en la **Tabla I**. La influencia de cada parámetro sobre el resultado se determinó mediante la relación del producto de la desviación estándar del estudio y la raíz de dos, considerando diferencias significativas al valor absoluto de aquellos resultados por encima de este valor (Quattrocchi y col., 1992).

Resultados y discusión

OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

En las pruebas A y B correspondientes a las fases móviles de buffer fosfato monobásico de amonio y metanol en proporciones (40:60 y 45:55)% v/v, los factores de retención para la especie menos retenida están por debajo de 1 (prueba A 0,75; prueba B 0,87), la condición C (50:50% v/v) presentó un factor de retención satisfactorio (1,29). En relación a lo antes expuesto, la mezcla buffer fosfato monobásico de amonio y metanol cumple con el requisito de adecuación (k mayor de 1 y menor a 10), según el factor de retención obtenido mayor a la unidad.

Los resultados obtenidos para los parámetros de tiempo de retención y área de pico cromatográfico de los analitos de interés indican una dispersión poco significativa del conjunto de datos, al presentar coeficientes de variación en los tiempos de retención de 0,56% y 0,41% para el clorhidrato de ambroxol y loratadina, respectivamente. Así como coeficientes de variación alrededor del 1% en el área de pico,

Tabla I
Configuración de parámetros empleados para la evaluación de la robustez del método

Parámetro	Descripción	Experimento							
		1	2	3	4	5	6	7	8
A	Flujo de la fase móvil ($0,8 \pm 0,1$ mL/min)	a	a	a	a	A	A	A	A
B	pH de la fase móvil ($3,4 \pm 0,1$)	b	b	B	B	B	B	b	b
C	Composición de la fase móvil (50: 50 $\pm 2\%$)*	c	C	C	c	C	c	c	C

* Buffer fosfato monobásico de amonio 0,05 M: Metanol (proporción C: 52:48, c: 48:52).
Las letras mayúsculas representan parámetros por encima del valor del método.
Las letras minúsculas representan parámetros por debajo del valor del método.

Tabla II
Linealidad del clorhidrato de ambroxol y loratadina. Verificación de la idoneidad del método de regresión

	Clorhidrato de ambroxol			Loratadina		
	Ecuación de la regresión	R ²	F ₀ (95%, F _{4, 10} 4,468)	Ecuación de la regresión	R ²	F ₀ (95%, F _{4, 10} 4,468)
Linealidad día 1	y = 18809944x - 52595	0,9996	113713	y = 19856273x - 22423	0,9995	59118
Linealidad día 2	y = 19075206x - 57255	0,9997	19078	y = 20414904x - 39241	0,9995	12895
Linealidad día 3	y = 18589219x - 22499	0,9993	10042	y = 19900582x - 3467	0,9992	7190

R²: coeficiente de determinación. F₀: Prueba estadística de falta de ajuste

valores que se encuentran dentro de los límites establecidos para métodos cromatográficos, la USP (2014) establece valores menores al 2% (2012).

Los resultados correspondientes a los factores de retención para el clorhidrato de ambroxol y la loratadina fueron 1,29 y 9,00 respectivamente, los mismos son valores aceptables para una cromatografía por HPLC (*k* mayor a 1 y menor de 10). Por otra parte, las bandas cromatográficas completamente resueltas presentan valores de asimetría cercanos a la unidad, valores correspondientes a 1,33 para el clorhidrato de ambroxol y 1,11 para la loratadina, lo cual indica una forma

apropiada de las bandas lo que permite una adecuada integración de las mismas.

VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

LINEALIDAD Y RANGO

Las curvas de calibración concernientes a la evaluación de la linealidad presentan un comportamiento ideal al exhibir valores de coeficientes de determinación de 0,9997 y 0,9995 para el clorhidrato de ambroxol y loratadina, **Figuras 2 y 3**, respectivamente. Al evaluar la respuesta medida y calculada de cada punto de la curva, del clorhidrato de ambroxol y loratadina, se observó la ausencia de

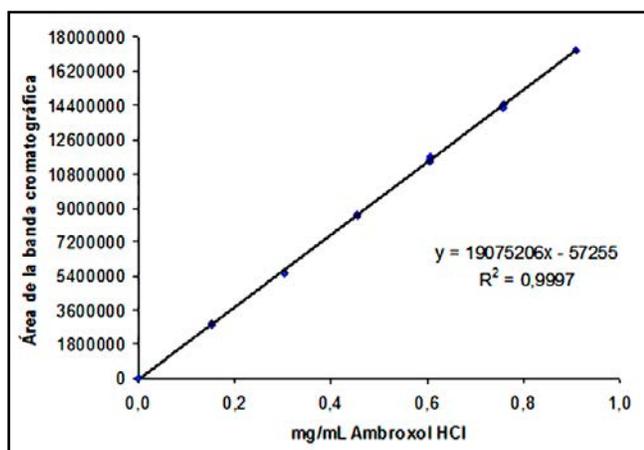


Figura 2. Curva de calibración en un rango de concentración entre 0,12 a 0,90 mg/mL de clorhidrato de ambroxol

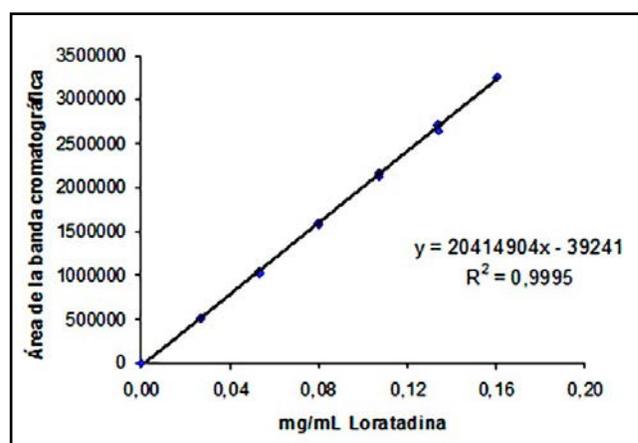


Figura 3. Curva de calibración en un rango de concentración entre 0,02 a 0,16 mg/mL de loratadina

Tabla III

Comparación de linealidad inter-diaria del clorhidrato de ambroxol mediante el estudio de contraste F (estadístico de Fisher) y la hipótesis estadística función de la respuesta lineal

	Parámetros de linealidad			Prueba de contraste F ($F_{15,14}=2,949$) ($v_1=15, v_2=14, 95\%, p=0,05$)			Función de respuesta lineal ($a^{\wedge} - a_0$) / s_a^{\wedge} ($t_{14} = 2,14, 95\%, p=0,05$)		
	Día 1	Día 2	Día 3	$\frac{S(\text{Día 2})}{S(\text{Día 3})}$	$\frac{S(\text{Día 1})}{S(\text{Día 2})}$	$\frac{S(\text{Día 1})}{S(\text{Día 3})}$		a^{\wedge}/a_0	a_0/a^{\wedge}
Ecuación de la regresión	$y = 8809943x - 52594$	$y = 19075206x - 57255$	$y = 18589219x - 22499$						
$S_{y/x}$	94938	89192	134470	1,13	2,01	2,27	$\frac{\text{Día 1}}{\text{Día 2}}$	5,63	5,42
S_b	98832	85198	130331	1,35	1,74	2,34	$\frac{\text{Día 1}}{\text{Día 3}}$	4,69	2,99
S_a	47086	48938	73773	1,08	2,46	2,27	$\frac{\text{Día 2}}{\text{Día 3}}$	9,93	6,59

$S_{y/x}$: desviación estándar de la regresión, S_b : desviación estándar de la pendiente, S_a : desviación estándar de la ordenada en el origen

tendencias marcadas en el residuo, lo que indica que las curvas presentan un ajuste lineal. El modelo de regresión lineal simple es el adecuado para el ajuste de datos. Dado que estos valores no suministran información directa acerca del ajuste del modelo de regresión, se realizó una prueba de falta de ajuste la cual permite

validar la linealidad del modelo de regresión, en función a estos resultados es posible establecer que el modelo de regresión lineal es el indicado, al exhibir $F_0 > F$ ($v_1=4, v_2=10, p=0,05$) al nivel de 95% ($F_{0,05, 4,10} = 4,468$), **Tabla II**. Lo que evidencia una excelente relación entre el factor de respuesta y la concentración

Tabla IV

Comparación de linealidad inter-diaria de la loratadina mediante el estudio de contraste F (estadístico de Fisher) y la hipótesis estadística función de la respuesta lineal

	Parámetros de linealidad			Prueba de contraste F ($F_{15,14}=2,949$) ($v_1=15, v_2=14, 95\%, p=0,05$)			Función de respuesta lineal ($a^{\wedge} - a_0$) / s_a^{\wedge} ($t_{14} = 2,14, 95\%, p=0,05$)		
	Día 1	Día 2	Día 3	$\frac{S(\text{Día 2})}{S(\text{Día 3})}$	$\frac{S(\text{Día 1})}{S(\text{Día 2})}$	$\frac{S(\text{Día 1})}{S(\text{Día 3})}$		a^{\wedge}/a_0	a_0/a^{\wedge}
Ecuación de la regresión	$y = 19856273x - 22423$	$y = 20414904x - 39241$	$y = 19900582x - 3467$						
$S_{y/x}$	20380	22817	26786	1,25	1,73	1,38	$\frac{\text{Día 1}}{\text{Día 2}}$	55,26	44,63
S_b	121053	123558	147720	1,04	1,49	1,43	$\frac{\text{Día 1}}{\text{Día 3}}$	4,38	3,01
S_a	10109	12517	14697	1,53	2,11	1,38	$\frac{\text{Día 2}}{\text{Día 3}}$	41,09	34,99

$S_{y/x}$: desviación estándar de la regresión, S_b : desviación estándar de la pendiente, S_a : desviación estándar de la ordenada en el origen

Tabla V
Precisión del sistema

Estándar 100% (0,6 mg/mL ambroxol HCl - 0,1 mg/mL loratadina)					
Clorhidrato de ambroxol			Loratadina		
Inyección	Tiempo de retención (min)	Área cromatográfica	Inyección	Tiempo de retención (min)	Área cromatográfica
1	3,80	11251147	1	16,60	2112919
2	3,79	11360560	2	16,68	2083171
3	3,84	11294451	3	16,54	2065419
4	3,82	11091607	4	16,69	2116474
5	3,82	11106579	5	16,52	2067246
6	3,81	11065748	6	16,67	2070976
7	3,80	11200196	7	16,57	2071933
8	3,77	11230762	8	16,60	2065984
9	3,82	11092439	9	16,64	2072263
10	3,78	11085194	10	16,51	2058138
11	3,77	11211158	11	16,68	2082676
12	3,79	11381651	12	16,51	2053919
13	3,82	11164601	13	16,66	2078008
14	3,82	11087025	14	16,57	2117656
15	3,78	11048604	15	16,58	2117197
16	3,80	11153983	16	16,64	2079261
17	3,83	11125205	17	16,50	2080637
18	3,77	11193166	18	16,67	2064400
19	3,79	11325478	19	16,64	2073454
20	3,79	10956878	20	16,49	2039350
Promedio	3,80	11171322	Promedio	16,60	2078554
Desviación estándar	0,02	111858	Desviación estándar	0,07	21850
Coefficiente de variación (%)	0,56	1,00	Coefficiente de variación (%)	0,41	1,05

dentro del rango de concentración indicado anteriormente, tanto para el clorhidrato de ambroxol como para la loratadina.

La comparación de la linealidad interdiaria de las regresiones se realizó mediante los estadísticos de función de respuesta lineal y estudio de contraste F , para la comprobación de la idoneidad del modelo de regresión. Los resultados concernientes a la hipótesis estadística función de la respuesta lineal,

demuestran similitud en la sensibilidad del método de análisis, valores mayores a los reportados para un contraste t al nivel de 95% ($p=0,05$) y $(n-2)$ grados de libertad ($t_{14}=2,14$), por tanto no hay diferencia significativa entre las pendientes del conjunto de datos tanto de la loratadina como del clorhidrato de ambroxol (**Tablas III y IV**).

La precisión de la pendiente evaluada para las curvas de calibración mediante el estadístico de Fisher, estudio de

Tabla VI
Repetibilidad. Precisión del método

Muestra	Clorhidrato de ambroxol			Loratadina		
	Tiempo de retención (min)	Área	Concentración Promedio (mg/ 5 mL)	Tiempo de retención (min)	Área	Concentración Promedio (mg/ 5 mL)
1	4,30	11058672	30,3	18,70	1883407	5,25
	4,30	11145939		18,71	1895400	
2	4,31	11013443	30,2	18,72	1871608	5,22
	4,31	11022207		18,72	1873367	
3	4,31	10809041	29,6	18,73	1832912	5,12
	4,32	10833662		18,74	1840325	
4	4,32	11082047	30,3	18,75	1882663	5,25
	4,32	11031581		18,76	1881266	
5	4,32	10824590	29,7	18,76	1849137	5,17
	4,33	10919587		18,77	1862872	
6	4,33	11058978	30,2	18,78	1881669	5,23
	4,33	11022637		18,79	1875956	
Promedio	4,32	10985199	30,0	18,74	1869215	5,21
Desviación estándar	0,01	111140	0,3	0,03	19147	0,05
Coficiente de variación (%)	0,25	1,01	1,0	0,16	1,02	1,00

contraste F ($p=0,05$), exponen resultados que demuestran similitud en la precisión del conjunto de datos, por tanto no hay diferencia significativa entre las varianzas del conjunto de datos correspondientes tanto a la loratadina como al clorhidrato de ambroxol (**Tablas III y IV**).

PRECISIÓN

PRECISIÓN DEL SISTEMA

Los valores de desviación estándar relativa, en los tiempos de retención y áreas de pico cromatográfico, tanto para el clorhidrato de ambroxol como para la loratadina, presentados en la **Tabla V**, son inferiores al 2%, lo cual demuestra que el método cumple con los criterios establecidos en la USP (2014) para la precisión del sistema.

REPETIBILIDAD

La evaluación de la precisión del método basado en la variación de la concentración demostró una desviación estándar de 0,30 de contenido de clorhidrato de ambroxol y 0,05 de contenido de loratadina en 5 mL de solución oral, exhibiendo ambos principios activos coeficientes de variación menores al 2% (**Tabla VI**). La precisión evaluada a través de la repetibilidad del método se encuentra dentro de los límites establecidos para métodos cromatográficos.

PRECISIÓN INTERMEDIA

Los resultados para evaluar la precisión intermedia del método analítico se muestran en la **Tabla VII**. Los coeficientes de variación encontrados presentan valores menores al 2%, en los tiempos de retención y áreas de pico cromatográfico, así como en las concentraciones de

Tabla VII
Evaluación de la precisión intermedia del análisis cromatográfico. Clorhidrato de ambroxol y loratadina

Ensayo	Clorhidrato de ambroxol							Loratadina						
	Adecuación del sistema cromatográfico				Precisión del método			Adecuación del sistema cromatográfico				Precisión del método		
	Tiempos de retención		Área cromatográfica		Ambroxol HCl			Tiempos de retención		Área cromatográfica		Loratadina		
	$t_{R\text{ prom}}$ (min) ($s = 0,02$)	CV (%)	Área promedio ($s = 111858$)	CV (%)	C_{prom} (mg/ 5mL)	S	CV %	$t_{R\text{ prom}}$ (min) ($s = 0,07$)	CV (%)	Área promedio ($s = 21850$)	CV (%)	C_{prom} (mg/ 5mL)	S	CV (%)
Analista 1	3,88	0,5	11162498	0,7	30,0	0,5	1,8	15,52	0,3	2058906	0,6	4,83	0,07	1,5
Analista 2	3,88	0,3	11233308	1,0	30,2	0,4	1,2	15,65	0,1	2032100	1,0	4,91	0,08	1,6
Analista 3	3,90	0,8	11106992	1,1	31,0	0,6	1,9	15,82	0,4	2092663	1,1	5,06	0,09	1,8

* $t_{R\text{ prom}}$: tiempo de retención promedio, C_{prom} : concentración promedio, S: desviación estándar, CV: coeficiente de variación

clorhidrato de ambroxol y loratadina. Se establece que el método desarrollado es preciso, con una dispersión de datos menor al 2%, con lo cual se garantiza la capacidad del método para generar resultados reproducibles.

EXACTITUD

Los resultados correspondientes a los ensayos de exactitud son presentados

en la **Tabla VIII**. Para enriquecimientos entre el 80% y 130%, la exactitud medida como porcentaje de recuperación para el clorhidrato de ambroxol se encuentra entre 98,9% y 100,4%, y para la loratadina se encuentra entre 99,2% y 100,7%. Los resultados presentados como porcentajes de recuperación para ambos analitos, se encuentran dentro de los límites del criterio de aceptabilidad comprendido entre 98,0% a 102,0% promedio para

Tabla VIII
Recuperación del contenido de clorhidrato de ambroxol y loratadina. Evaluación de la exactitud del método

Analito	Clorhidrato de ambroxol			Loratadina		
	Recuperación (%)	Recuperación promedio (%)	CV (%)	Recuperación (%)	Recuperación promedio (%)	CV (%)
80%	101,8	98,9	2,6	101,2	99,6	1,5
	98,3			98,3		
	96,8			99,3		
100%	100,6	100,4	2,9	100,9	100,7	2,6
	103,2			103,2		
	97,3			98,0		
130%	99,9	99,4	0,8	99,8	99,2	0,8
	98,5			98,3		
	99,8			99,7		

Tabla IX
Especificidad del método de análisis.
Resultados del análisis de pureza de pico
 cromatográfico en las muestras sometidas a
 condiciones de degradación forzada

Condición (7 días)	Clorhidrato de ambroxol		Loratadina	
	PA	TH	PA	TH
Muestra control	0,811	1,197	0,045	0,225
Fotólisis	0,923	1,086	0,089	0,228
Oxidación	0,813* ¹	0,827* ¹	0,061	0,228
	0,875*²	0,822*²		
Hidrólisis ácida	1,043	1,244	0,074	0,226
Hidrólisis básica	1,497	0,248	0,409	0,583
Termólisis	0,817	1,18	0,057	0,246

*¹Primera derivada, *²segunda derivada del análisis de pureza. **Nota:** los valores en negrilla indican PA>TH. PA: Ángulo de pureza, TH: ángulo del umbral

cada nivel, según lo establecido en la ICH (Baber, 1994)

ESPECIFICIDAD

Tabla XI
Evaluación de la robustez del método

Combinación de parámetros	Diferencia de respuestas por parámetro	
	Clorhidrato de ambroxol	Loratadina
A	1,89	0,23
B	0,32	0,73
C	1,11	0,05
AB	0,84	0,76
AC	2,08	0,64
BC	2,06	1,00
ABC	2,89	2,17
S*√2	3,60	2,04

Parámetros: A flujo de la fase móvil (0,8 ± 0,1) mL/min, B pH de la fase móvil (3,4 ± 0,1), C composición de la fase móvil (50:50 ± 2)%. **Nota:** el valor en negrilla indica una diferencia significativa de la media para la combinación de los parámetros ABC por encima del producto S*√2, según el diseño experimental descrito por Plackett y Burman (1946)

En las **Figuras 4 y 5** se presentan los cromatogramas y en la **Tabla IX** los ángulos de pureza (PA) y ángulo del umbral (TH), correspondientes a las

Tabla X
Especificidad del método de análisis. Contenido de clorhidrato de ambroxol y loratadina en las muestras sometidas a condiciones de degradación forzada

Analito	Clorhidrato de ambroxol			Loratadina		
	C _{prom} (mg/ 5mL)	CV (%)	Porcentaje degradación	C _{prom} (mg/ 5mL)	CV (%)	Porcentaje degradación
Muestra control	30,2	0,1	4,8	0,2
Muestra control	30,4	0,2	-0,7	4,7	0,6	3,1
Fotólisis	28,6	0,5	5,3	4,5	0,5	7,9
Oxidación	27,2	0,2	9,9	4,5	0,2	6,6
Hidrólisis ácida	31,6	0,3	-4,6	4,6	0,1	5,2
Hidrólisis básica	7,7	0,7	74,5	0,4	3,9	91,7
Termólisis	29,7	0,8	1,6	4,6	0,7	4,1

C_{prom}: concentración promedio, CV: coeficiente de variación

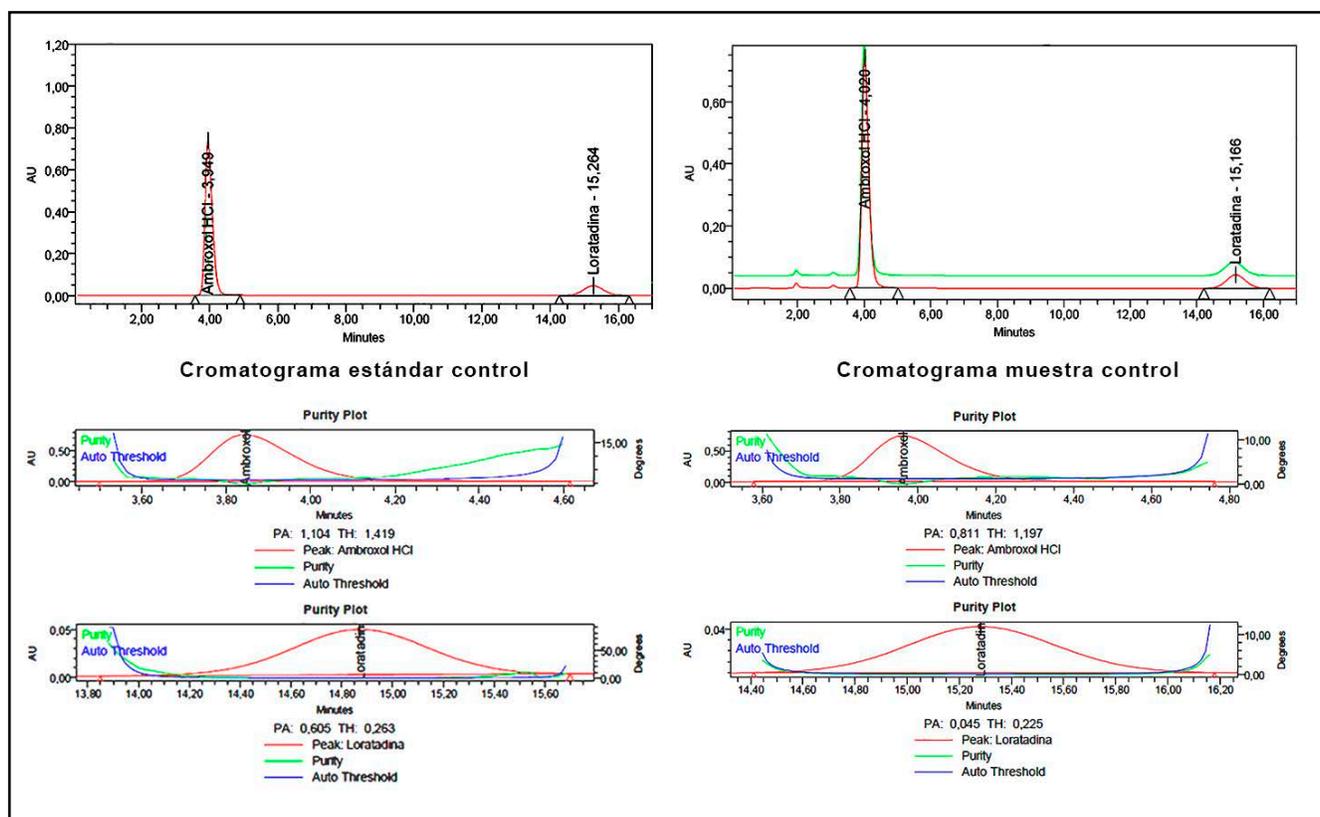


Figura 4. Especificidad del método de análisis. Cromatogramas y gráficos de pureza de los picos correspondientes a muestra y estándar control de clorhidrato de ambroxol y loratadina

señales cromatográficas de interés en las muestras sometidas las pruebas de degradación bajo condiciones extremas de análisis. En las condiciones de fotólisis, termólisis e hidrólisis ácida existe una marcada estabilidad del contenido de ambos analitos al presentar variaciones dentro del error del análisis. Dando lugar a porcentajes de degradación menores al 10% del contenido en la muestra inicial, presentados en la **Tabla X**.

Al evaluar la cuantificación de los analitos en la condición de estrés oxidativo no se observa cambio significativo en el contenido de loratadina. Sin embargo, el contenido de clorhidrato de ambroxol es menor al obtenido en la muestra control, (degradación del 9,9%). Resultado que establece una mayor inestabilidad del clorhidrato de ambroxol bajo condición de oxidación. La evaluación de la pureza de la señal cromatográfica indica la presencia

de producto(s) de degradación oxidativa que se superponen al del clorhidrato de ambroxol, evidenciado en la diferencia entre el ángulo de pureza (PA) y el ángulo umbral (TH) para la segunda derivada, datos presentados en la **Tabla IX**.

La condición de hidrólisis básica generó degradaciones del 74,5% para el clorhidrato de ambroxol y 91,7% para la loratadina, resultados que establecen una disminución significativa del contenido de ambos analitos. En medio básico las moléculas de ambos analitos sufren alteraciones en su composición química, generando producto(s) de degradación.

Los principios activos clorhidrato de ambroxol y loratadina en presencia de un agente oxidante como peróxido de hidrógeno y bajo condiciones de hidrólisis básica, tienden a generar productos de degradación que interfieren con su cuantificación.

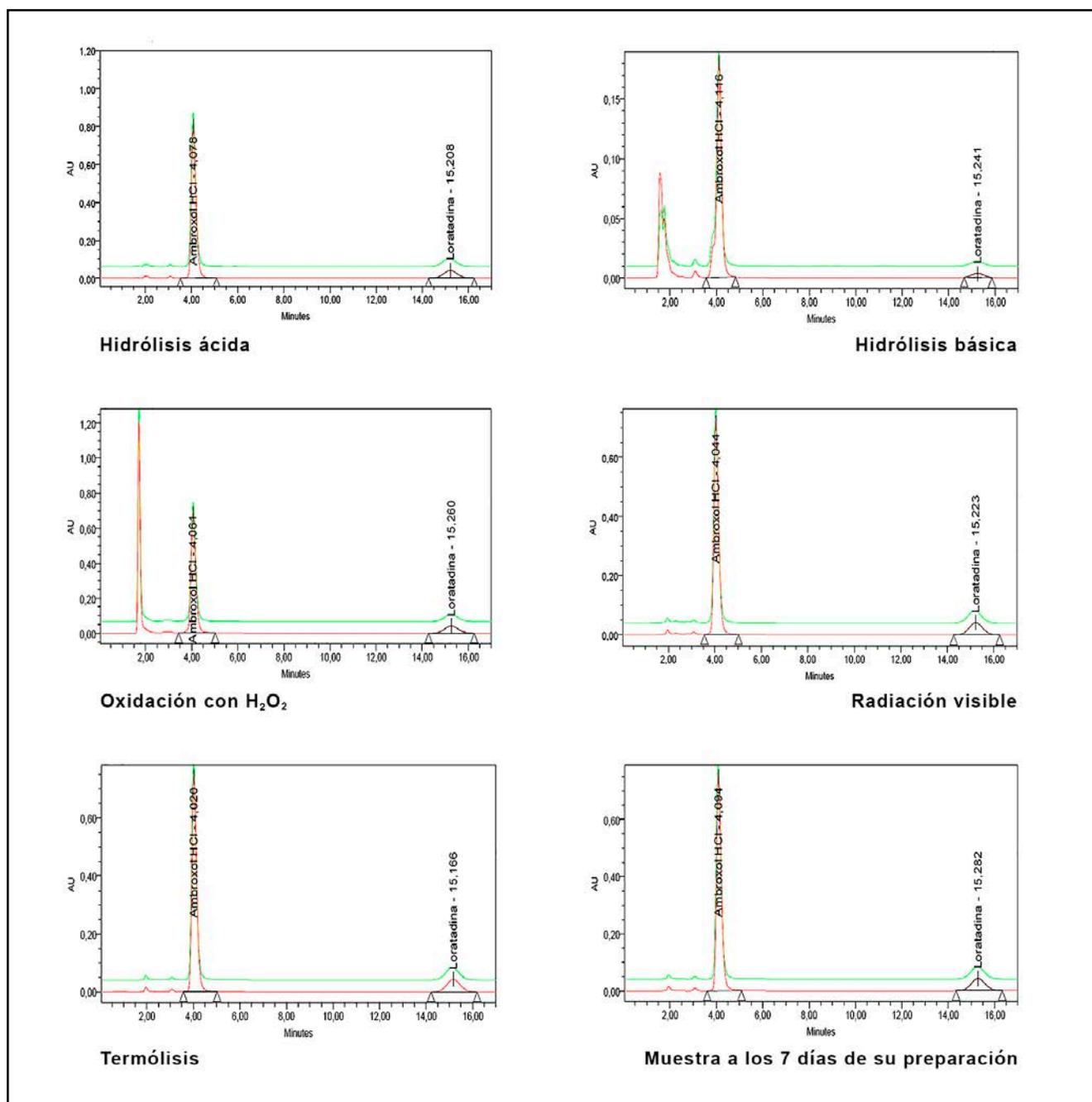


Figura 5. Especificidad del método de análisis. Cromatogramas correspondientes a muestras sometidas a diferentes condiciones de degradación forzada

ROBUSTEZ

El método analítico es robusto para la determinación de clorhidrato de ambroxol, incluso bajo la combinación de cambios deliberados de las tres condiciones de análisis estudiadas (fase móvil buffer fosfato monobásico de amonio 0,05 M y metanol en proporción

50:50 ± 2, pH 3,4 ± 0,1, y flujo de fase móvil 0,8 ± 0,1 mL/ min), el resultado estable un método capaz de soportar diferentes alteraciones experimentales sin afectar la determinación del contenido de clorhidrato de ambroxol.

La evaluación de la robustez del método analítico para la determinación

de loratadina mostró diferencias significativas para la combinación de cambios deliberados de las tres condiciones de análisis propuesto (flujo, pH y composición de la fase móvil representados como ABC en la **Tabla XI**). El método de análisis cromatográfico no es robusto para la determinación de loratadina bajo cambios deliberados de las tres condiciones de análisis estudiadas. Sin embargo, el método es robusto bajo cambios simultáneos de una o dos condiciones de análisis. Los resultados son presentados en la **Tabla XI**.

Conclusiones

Se desarrolló y validó una metodología analítica para la determinación simultánea del contenido de clorhidrato de ambroxol y loratadina presentes en jarabes, bajo las condiciones cromatográficas: columna C-18 (3,9 mm x 150 mm, 5 µm) a temperatura ambiente, fase móvil compuesta por la mezcla de buffer fosfato monobásico de amonio 0,05 M, (pH 4,00) y metanol en proporción 50:50, a pH de 3,40 ajustado con ácido ortofosfórico al 85%, flujo de la fase móvil 0,8 mL/min. Detección UV-Visible a una longitud de onda de 248 nm. Se estableció la linealidad del método en un rango de concentración entre 0,12 mg/mL a 0,90 mg/mL para el clorhidrato de ambroxol y entre 0,02 mg/mL a 0,16 mg/mL para la loratadina. La evaluación de la precisión del sistema, repetibilidad y precisión del método demostraron que el mismo es preciso, con lo cual se garantiza la capacidad del método para generar resultados reproducibles.

El análisis de pureza de pico cromatográfico en las pruebas de degradación, dio lugar a diferencias espectrales en presencia del agente oxidante peróxido de hidrógeno y

bajo condiciones de hidrólisis básica, generando productos de degradación que interfieren en su cuantificación. El método cromatográfico desarrollado es selectivo al permitir reconocer inequívocamente la presencia del clorhidrato de ambroxol y loratadina y discriminar la presencia de productos de degradación, así como distinguir la presencia de otros componentes en la matriz de la muestra.

El método propuesto para la determinación del clorhidrato de ambroxol es robusto y confiable bajo cambios simultáneos de las tres condiciones de análisis de fase móvil buffer fosfato monobásico de amonio 0,05 M y metanol en proporción 50:50 ± 2, pH 3,4 ± 0,1, y flujo de fase móvil 0,8 ± 0,1 mL/min. La determinación de la loratadina bajo el método desarrollado es robusta y confiable bajo cambios simultáneos de una o dos condiciones de análisis establecidas.

El método desarrollado para la determinación del contenido de clorhidrato de ambroxol y loratadina en jarabes es selectivo, preciso y lineal en el rango de concentraciones establecidas.

Referencias bibliográficas

- Alcántara F. Caracterización farmacocinética de las tabletas individuales de loratadina, ambroxol y de su combinación en voluntarios sanos. Tesis de Posgrado. Escuela Superior de Medicina. Sección Estudios de Posgrado e Investigación: México, DF. 2006.
- Baber H. 1994. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). *Br J Clin Pharmacol* 37(5): 401-404.
- Beeh KM, Beier J, Esperester A, Paul LD. 2008. Anti-inflammatory properties of

- ambroxol. Eur J Med Res 13: 557–562.
- BPM: Manual de Buenas Prácticas de Manufactura para la Fabricación de Productos Farmacéuticos de la Organización Mundial de la Salud (OMS). República Bolivariana de Venezuela. Ministerio de Salud y Desarrollo Social. 2004.
- Lister A. Validation of HPLC methods in pharmaceutical analysis. Analytical Sciences, World Reseach & Development, Purdue Pharma. In: Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC. 2005.
- Plackett RL, Burman JP. The design of optimum multifactorial experiments. Biometrika, Oxford Academic. 33(4) 1946, Pp. 305–325.
- Quattrocchi O, Abelaira S, Laba R. Capítulo 10. En: Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Análisis Cuantitativo. Artes Gráficas Farro S.A. Buenos Aires. 1992.
- Tello M, Daza J, Rocha M. 1997. Validación de las metodologías analíticas para el control de calidad de tabletas de loratadina. Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas 26: 43–47.
- United States Pharmacopeia (USP) 36. <1225>. The United States Pharmacopeia Convention USA. 2014.