

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



**“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA
DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE AMBROXOL Y CLENBUTEROL EN
JARABE POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)”**

Trabajo Especial de Grado
presentado ante la Ilustre Universidad
Central de Venezuela, por Br. José
Gabriel Guillen González, para optar
al título de Licenciado en Química.

Profesoras:

Esp. Marisabel Bor

Dra. Rosa Amaro

Caracas, mayo de 2019

Yo, profesora Marisabel Bor, investigadora del Laboratorio de Análisis de Medicamentos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela y la profesora Rosa Amaro, investigadora del Centro de Investigación de Química Analítica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela.

Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE AMBROXOL Y CLENBUTEROL EN JARABE POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)”.

Que presenta el Br. José Gabriel Guillen González, C.I. V-20.192.626 para aspirar al título de Licenciado en Química, se realizó en el Laboratorio de Análisis de Medicamentos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2017-2018, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, mayo de 2019.


Prof. Marisabel Bor


Prof. Rosa Amaro

RESUMEN

La combinación de ambroxol y clenbuterol, como principios activos, presentan una acción complementaria, al combinar un broncodilatador (clenbuterol) y un expectorante y mucolítico (ambroxol), esta combinación está diseñada para facilitar la eliminación de exceso de moco y flema, ayudando a abrir las vías respiratorias en aquellas enfermedades agudas y crónicas de las vías respiratorias que van acompañadas de broncoespasmo y alteración patológica de la formación y el transporte de la secreción en especial bronquitis espasmódicas, EPOC y asma bronquial. Actualmente, en el mercado nacional son expedidos una serie de medicamentos de diferentes marcas comerciales, los cuales contemplan la combinación de los fármacos clorhidrato de ambroxol y clenbuterol.

Sin embargo, no aparecen reportados métodos validados para la determinación simultánea de ambos componentes en formulaciones del tipo jarabe; debido a que los métodos analíticos validados son de vital importancia para el aseguramiento de la composición del medicamento como requisito necesario para su comercialización se planteó como objeto del presente trabajo desarrollar y validar un procedimiento analítico por HPLC para la determinación simultánea del clorhidrato de ambroxol y clenbuterol en jarabes, dando lugar a una metodología analítica que permita determinar ambos componentes de manera simultánea, logrando acortar los tiempos de trabajo y economizar reactivos.

El método fue desarrollado y posteriormente validado de acuerdo a los requerimientos establecidos en el apartado <1225> de la USP categoría I, para la cuantificación de componentes mayoritarios de fármacos, en productos farmacéuticos terminados.

Las condiciones cromatográficas óptimas para la separación y análisis fueron las siguientes: Columna X Terra RP18 (3,5µm, 4,5 x 100 mm), a temperatura ambiente y de forma isocrática, con una fase móvil constituida por acetonitrilo, metanol,

solución amortiguadora/par iónico (KH_2PO_4 y ácido 1-octano sulfónico, pH 3,0 ajustado con H_3PO_4) en composición (15:20:65)%v/v a pH de 3,70, un flujo de fase móvil de 1,5mL/min, un volumen de inyección de 15 μL y una longitud de onda de 245nm.

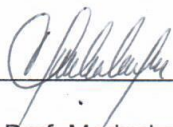
En la evaluación de la exactitud se encontraron porcentajes de recuperación para los niveles 70, 100 y 130 % entre (69,34; 100,86; 129,69) % y (68,76; 99,16; 127,71) % con coeficientes de variación de (0,38; 0,61; 0,24) y (0,20; 1,63; 0,35) para clenbuterol y ambroxol, respectivamente.

Los límites de detección y cuantificación encontrados con la metodología propuesta fueron los siguientes (0,23 / 0,70) y (0,07 / 0,22) para clenbuterol y ambroxol, respectivamente.

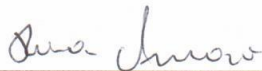
Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el método propuesto es preciso, exacto, selectivo, robusto y confiable bajo las condiciones de análisis desarrolladas.

Palabras clave: Validación, Indicadores de estabilidad, Ambroxol, Clenbuterol, Jarabe, HPLC.

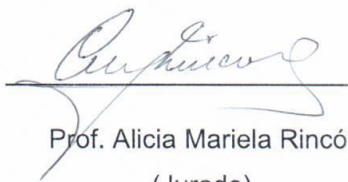
Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: Desarrollo y Validación de un método para la determinación simultánea de Ambroxol y Clenbuterol en jarabe por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Presentado por el Br. José Gabriel Guillen González, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.



Prof. Marisabel Bor
(Tutora)



Prof. Rosa Amaro
(Tutora)



Prof. Alicia Mariela Rincón
(Jurado)



Prof. Rafael Golding
(Jurado)

AGRADECIMIENTO

Primeramente agradezco a Dios por ser mi guía día a día y haberme dado la oportunidad de culminar este sueño, por enseñarme que puedo alcanzar todas mis metas con esfuerzo y dedicación.

A mis padres porque desde pequeño me ofrecieron la mejor educación. Por todos los sacrificios que hicieron para que hoy este logro fuese posible, ser un profesional. No hay palabras para definir el amor que les tengo, especialmente a mi madre por darme todo su amor, por su apoyo incondicional, por estar presente en cada etapa de mi vida, gracias por ser tan especial.

Agradezco a mi esposa, por ser ese impulso en mi vida para alcanzar mis metas y sueños, por su gran ayuda en todo momento, por su comprensión, amor y paciencia durante toda esta etapa.

Agradezco a mi tutora Marisabel Bor, a quien admiro y respeto por su dedicación al trabajo y a la familia, gracias por su apoyo incondicional, por guiarme en todo momento con paciencia, por confiar en mí y tener una palabra de aliento cada vez que la necesite, por formar no solo a excelentes profesionales sino a excelentes personas y por su amor a nuestra casa que vence la sombra. Infinitas gracias.

A mí querida tutora Rosa Amaro, Profesora de gran trayectoria en nuestra escuela de Química, digna de admirar por sus conocimientos y dedicación a nuestra profesión, gracias por su ayuda, enseñanza, cariño y atención brindada.

A la ilustre Universidad Central de Venezuela, la casa que vence la sombra, por abrirme sus puertas y permitir formarme en ella, no sólo en lo académico sino en todos los aspectos que se puedan imaginar.

Agradezco al Laboratorio Análisis de Medicamentos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela por permitirme realizar el desarrollo de la investigación en sus instalaciones. A la Lic. Dubraska Vega por su ayuda y apoyo en cada momento durante todo este trabajo.

Por último pero no menos importante a mi familia y amigos que estuvieron allí en todo momento, brindándome su apoyo cuando los necesite.

Gracias a todos los que de una u otra forma han estado conmigo en este largo proyecto.

¡¡Mil gracias!!

INDICE

INDICE DE TABLAS	1
INDICE DE FIGURAS	3
INDICE DE GRÁFICOS	5
GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	6
I. INTRODUCCION.....	7
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
II.1. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)	9
II.1.1 Expectorantes:	10
II.1.2 Mucolíticos:	10
II.1.3 Broncodilatadores:	10
II.2. Clorhidrato de Ambroxol	12
II.2.1. Propiedades físicas y químicas del Clorhidrato de Ambroxol.	12
II.2.2. Características farmacocinéticas.	13
II.2.3 Contraindicaciones.	13
II.2.4 Reacciones adversas.	14
II.3. Clorhidrato de Clenbuterol.	14
II.3.1 Propiedades físicas y químicas del Clorhidrato de Clenbuterol.	16
II.3.2 Características farmacocinéticas.	16
II.3.3 Contraindicaciones.	17
II.3.4 Reacciones adversas.	17
II.4. Combinación de ambroxol-clenbuterol.....	17
II.5. Métodos Cromatográficos.....	20
II.5.1 Cromatografía de líquidos.	21
II.5.2 Cromatografía de reparto.	21

II.5.2 Cromatografía de par iónico.	24
II.6 Parámetros fundamentales de la cromatografía.	24
II.7 Métodos analíticos.	30
II.7.1 Clasificación.	30
II.8. Validación de método analítico.	31
II.8.1 Parámetros de validación.	33
IV. JUSTIFICACIÓN	56
V. OBJETIVOS	57
V.1. Objetivo general:	57
V.2. Objetivos específicos:.....	57
VI. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	58
VI.1. Instrumentación.	58
VI.2. Materiales y equipos para filtración.	59
VI.3. Reactivos y solventes.....	59
VI.4. Patrones.....	59
VI.5. Muestra.	60
VI.6. Desarrollo de la metodología experimental.	61
VI.6.1. Condiciones cromatográficas preliminares para la determinación simultánea de ambroxol y clenbuterol.	61
VI.6.2 Evaluación de la aptitud del sistema cromatográfico.....	76
VI.7.1 Linealidad.	78
VI.7.2. Especificidad.	84
VI.7.3 Precisión.....	97
VI.7.4 Exactitud.....	103
VI.7.5 Robustez.	107

VI.7.6 Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).....	110
VI.8 Determinación del contenido de clorhidrato de Clenbuterol y Ambroxol en jarabe.	113
VII. CONCLUSIONES.....	117
VIII. RECOMENDACIONES.	119
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	120
Apéndice.....	124
Apéndice A. Evaluación de la adecuación del sistema cromatográfico.	124
Apéndice B. Linealidad. Curva de calibración.....	125
Apéndice C. Linealidad. Criterios de aceptación.	127
Apéndice D. Robustez.	133
Apéndice E. Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC).	135

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades químicas y físicas de Clorhidrato de Ambroxol [5].	13
Tabla 2. Propiedades químicas y físicas del Clorhidrato de Clenbuterol [12].	16
Tabla 3. Especialidades farmacéuticas registradas de la combinación ambroxol y clenbuterol en el INHRR.	18
Tabla 4. Datos requeridos para la validación [22].	32
Tabla 5. CV de Horwitz para diferentes concentraciones [24].	35
Tabla 6. Diseño para 3 variables en un estudio de robustez según Plackett y Burman.	41
Tabla 7. Calculo de la diferencia de respuesta para cada parámetro.	41
Tabla 8. Resumen de los antecedentes consultados.	54
Tabla 9. Características organolépticas de las muestras utilizadas.	60
Tabla 10. Pruebas para la selección de la fase móvil para la separación cromatográfica del ambroxol y clenbuterol.	70
Tabla 11. Continuación de las pruebas para la selección de la fase móvil para la separación cromatográfica del ambroxol y clenbuterol.	74
Tabla 12. Condiciones cromatográficas definidas.	76
Tabla 13. Pruebas de aptitud del sistema cromatográfico.	77
Tabla 14. Concentración de los analitos a partir de diferentes niveles del patrón.	79
Tabla 15. Criterios de aceptación para la linealidad del Ambroxol.	83
Tabla 16. Criterios de aceptación para la linealidad del Clenbuterol.	84
Tabla 17. Especificidad del método para clenbuterol.	96
Tabla 18. Especificidad del método para ambroxol.	96
Tabla 19. Precisión del sistema cromatográfico.	98
Tabla 20. Precisión del método para el clenbuterol.	99
Tabla 21. Precisión del método para el ambroxol.	100
Tabla 22. Precisión intermedia para el ambroxol y clenbuterol.	101
Tabla 23. Concentraciones fortificadas y sin fortificar para ambroxol.	104
Tabla 24. Concentraciones fortificadas y sin fortificar para clenbuterol.	105
Tabla 25. Recuperación del contenido de ambroxol.	105
Tabla 26. Recuperación del contenido de clenbuterol.	106

Tabla 27. Parámetros en la evaluación de la robustez. _____	108
Tabla 28. Matriz de Plackett y Burman empleada para la evaluación de la robustez del método. _____	108
Tabla 29. Interpretación de los resultados de la robustez de clenbuterol. _____	109
Tabla 30. Interpretación de los resultados de la robustez de ambroxol. _____	110
Tabla 31. Límite de detección y cuantificación. _____	113
Tabla 32. Determinación del contenido de clenbuterol en diferentes muestras de jarabe. _____	115
Tabla 33. Determinación del contenido de ambroxol en diferentes muestras de jarabe. _____	116
Tabla 34. Adecuación del sistema cromatográfico. _____	124
Tabla 35. Curva de calibración. Linealidad Ambroxol. _____	125
Tabla 36. Curva de calibración. Linealidad Clenbuterol. _____	126
Tabla 37. Criterios de aceptación para la linealidad de Ambroxol. Día 1. _____	127
Tabla 38. Criterios de aceptación para la linealidad de ambroxol. Día 2. _____	128
Tabla 39. Criterios de aceptación para la linealidad de ambroxol. Día 3. _____	129
Tabla 40. Criterios de aceptación para la linealidad de clenbuterol. Día 1. _____	130
Tabla 41. Criterios de aceptación para la linealidad de clenbuterol. Día 2. _____	131
Tabla 42. Criterios de aceptación para la linealidad de clenbuterol. Día 3. _____	132
Tabla 43. Evaluación de la robustez del clenbuterol. _____	133
Tabla 44. Evaluación de la robustez del ambroxol. _____	134
Tabla 45. Curva de calibración y determinación del coeficiente de variación de los factores de respuestas para el Clenbuterol. _____	135
Tabla 46. Curva de calibración y determinación del coeficiente de variación de los factores de respuestas para el ambroxol. _____	136

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estructural del Clorhidrato de Ambroxol [8].	12
Figura 2. Fórmula estructural del Clorhidrato de Clenbuterol [10].	15
Figura 3. Superficie de la sílice hidrolizada [15].	22
Figura 4. Reacción de formación de los siloxanos [15].	23
Figura 5. Separaciones correspondientes a tres valores de resolución (Rs) distintos [19].	28
Figura 6. Trompeta de Horwitz.	35
Figura 7. Cromatograma de un patrón ambroxol y doxofilina [25].	50
Figura 8. Cromatograma de una muestra ambroxol y doxofilina [25].	50
Figura 9. Cromatograma de clorhidrato de ambroxol (120 µg/µL) en solución acuosa (I), y en un simple jarabe (II). (1) Clorhidrato de Ambroxol; (2) metilparabeno; (3) propilparabeno.	53
Figura 10. Cromatograma de ambroxol a 211 nm (rojo) y 245 nm (verde).	63
Figura 11. Cromatograma de clenbuterol a 211 nm (rojo) y 245 nm (verde).	64
Figura 12. Espectros UV-Visible de ambroxol y clenbuterol en un rango de 200 a 400 nm.	65
Figura 13. Cromatograma de patrones de clenbuterol y ambroxol (prueba 1).	66
Figura 14. Cromatograma de patrones de clenbuterol y ambroxol (prueba 2).	68
Figura 15. Cromatograma de patrones de clenbuterol y ambroxol (prueba 3).	69
Figura 16. (a) Cromatograma del MRI (b) ampliación de la señal cromatográfica correspondiente a clenbuterol (prueba 4).	72
Figura 17. Cromatograma correspondiente al clenbuterol y ambroxol utilizando la prueba 5.	73
Figura 18. Cromatograma con las condiciones cromatográficas establecidas.	75
Figura 19. Cromatograma de patrón combinado de clenbuterol y ambroxol.	78
Figura 20. Cromatograma y gráficos de pureza de patrón control.	87
Figura 21. Cromatograma y gráficos de pureza de muestra control.	88
Figura 22. Cromatograma y gráficos de pureza de muestra a los 7 días de su preparación.	89
Figura 23. Cromatograma y gráficos de pureza de muestra expuesta a fotólisis.	90

Figura 24. Cromatograma y gráficos de pureza de muestra expuesta a estrés oxidativo. _____	91
Figura 25. Espectro de absorción molecular correspondiente a la muestra en presencia de peróxido de hidrógeno por 3 días. _____	92
Figura 26. Cromatograma y gráficos de pureza de muestra expuesta a hidrólisis acida. _____	93
Figura 27. Cromatograma y gráficos de pureza de muestra expuesta a hidrólisis básica. _____	94
Figura 28. Cromatograma y gráficos de pureza de muestra expuesta a termólisis. _____	95
Figura 29. Cromatograma correspondiente al medicamento A. _____	114
Figura 30. Cromatograma correspondiente al medicamento B. _____	114

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Linealidad día 1 para el ambroxol. _____	77
Gráfico 2. Linealidad día 2 para el ambroxol. _____	77
Gráfico 3. Linealidad día 3 para el ambroxol. _____	78
Gráfico 4. Linealidad día 1 para el clenbuterol. _____	78
Gráfico 5. Linealidad día 2 para el clenbuterol. _____	79
Gráfico 6. Linealidad día 3 para el clenbuterol. _____	79
Gráfico 7. Relación entre las concentraciones estimadas y las concentraciones reales (70, 100 y 130 %). Ambroxol. _____	101
Gráfico 8. Relación entre las concentraciones estimadas y las concentraciones reales (70, 100 y 130 %). Clenbuterol. _____	101
Gráfico 9. Curva de calibración para el clenbuterol. _____	112
Gráfico 10. Curva de calibración para el ambroxol. _____	112

GLOSARIO DE ABREVIATURAS.

BPM	Buenas Prácticas de Manufactura.
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución.
CF	Fibrosis Quística.
INHRR	Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel.
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.
USP	Farmacopea de los Estados Unidos.
EP	Farmacopea Europea.
ICH	Conferencia Internacional de Armonización.
t_m	Tiempo Muerto.
t_r	Tiempo de Retención.
As	Factor de Asimetría.
K	Constante de Distribución.
k'	Factor de Retención.
α	Factor de Selectividad.
R_s	Resolución Cromatográfica.
N	Número de Platos Teóricos.
LD	Límite de Detección.
LC	Límite de Cuantificación.
PDA	Detector de Arreglo de Diodos.
MRI	Material de referencia interno.
PA	Angulo de pureza de la señal cromatográfica.
TH	Ángulo umbral de la señal cromatográfica.
AEFI	Asociación Española de Farmacéuticos de La Industrial.

I. INTRODUCCION

La calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos han formado su propia historia a través de los años. En un mundo cada vez más globalizado, se ha generado una mayor competitividad de mercado, exigiendo altos niveles de calidad en los productos, más aún en los medicamentos, donde la salud de las personas está involucrada. Por lo antes expuesto, diferentes organismos, nacionales e internacionales, encargados de llevar a cabo la fiscalización en materia de medicamentos, han creado normas y mecanismos que estandarizan los procedimientos llevados a cabo por las industrias farmacéuticas, los cuales deben realizarse de forma clara y documentada, dejando al olvido el concepto de error en esta área.

Es así como en el año 1962 nacen las “Buenas Prácticas de Manufactura” (BPM o GMP), que dentro del concepto de garantía de la calidad, constituyen normas que aseguran la fabricación de medicamentos de forma uniforme y controlada, de acuerdo con las normas de calidad que se pretenden dar a los productos, y conforme a las condiciones exigidas para su comercialización. Las BPM describen los métodos, equipos, instalaciones y controles (incluyendo las pruebas analíticas) requeridas para producir alimentos, medicamentos e instrumentos de uso médico [1].

Por lo tanto las industrias farmacéuticas deben demostrar que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables y adecuados para la finalidad y propósito perseguido. Por ello, la validación de los métodos analíticos corresponde un requisito que permite a un fabricante de medicamentos demostrar que cumple con las buenas prácticas de manufactura de productos farmacéuticos, lo cual asegura a la autoridad reguladora que el medicamento es eficaz, seguro y de calidad.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una afección prevenible y tratable que dificulta la expulsión de aire de los pulmones. Esta dificultad para vaciar los pulmones (obstrucción del flujo de aire) puede causar falta de aire o sensación de cansancio debido al esfuerzo que realiza para respirar. EPOC es un término en el que se incluye la bronquitis crónica, el enfisema y una combinación de ambas enfermedades y es el problema respiratorio de mayor prevalencia e impacto socioeconómico en el mundo a pesar de ser una enfermedad potencialmente prevenible [2].

En la actualidad muchos pacientes son diagnosticados con esta enfermedad, ya que la principal causa es la exposición al humo del tabaco (fumadores pasivos y activos).

Entre los medicamentos utilizados para la EPOC se encuentran el clenbuterol, un agente broncodilatador efectivo, que actúa a través de la estimulación selectiva de los agonistas receptores adrenérgicos β -2 y el ambroxol, un agente expectorante y mucolítico, que ayuda a incrementar la secreción del tracto respiratorio. La combinación de estos dos fármacos ofrece beneficios superiores al uso de estos dos fármacos por separados.

Los requerimientos de validación de procedimientos analíticos son de mayor importancia en esta investigación, dado que se desarrollará y validará un método analítico por HPLC para la determinación simultánea de la cantidad de ambroxol y clenbuterol en jarabes a causa de que el método analítico de este tipo de medicamentos no se encuentra reportado en ninguna de las monografías oficiales.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)

La hipersecreción de mucosidad en las vías respiratorias es una característica de varias enfermedades respiratorias, incluyendo bronquitis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística (CF por sus siglas en inglés), bronquiectasia y asma [3].

Por otra parte, la EPOC es un cuadro clínico, que se caracteriza funcionalmente por una obstrucción o limitación al flujo aéreo muy poco reversible, como resultado de una serie de eventos tales como la inflamación crónica, el estrechamiento de las vías aéreas, destrucción del parénquima pulmonar y disminución del retroceso elástico. Estos eventos vienen acompañados de una serie de alteraciones que hacen parte del cuadro descrito, como metaplasia glandular, hipertrofia e hiperplasia muscular bronquial, alteraciones del aparato mucociliar, fibrosis periluminal, destrucción de los septos alveolares, y depósito de colágeno maduro, más la liberación de sustancias como radicales libres, proteasas otras enzimas y mediadores altamente tóxicos para el aparato respiratorio [4].

Los síntomas clínicos patentes de tos y expectoración, junto con la importancia concomitante percibida de mucosidad en la fisiopatología de muchas condiciones serias del pulmón, han llevado al desarrollo de medicamentos que afecten la mucosidad respiratoria.

A continuación se presenta un sencillo sistema de clasificación de medicamentos utilizados para este tipo de patologías. Esta clasificación está basada en los mecanismos de acción [3].

II.1.1 Expectorantes:

Son fármacos orales de los que se presume incrementan la eliminación de moco. Tales fármacos a menudo se utilizan como eméticos (estimulantes del vómito), se administran en dosis por debajo de la producción de vómito, la razón de ello se debe a que producen irritación gástrica, lo que podría estimular un incremento en la eliminación de moco por mecanismo reflujo. Sin embargo, no existen pruebas para esta suposición [5].

II.1.2 Mucolíticos:

Varios fármacos pueden reducir la viscosidad del esputo (mucosidad, flema) *in vitro*, los cuales son denominados con el término farmacológico mucolítico. Los mucolíticos modifican las propiedades fisicoquímicas de la secreción traqueo bronquial, para que la expectoración sea más eficaz y cómoda. Estos fármacos también actúan como antioxidantes, por tanto pueden reducir la inflamación de las vías respiratorias [5].

Dentro de las alternativas terapéuticas aceptadas mundialmente como parte del tratamiento de la EPOC, se encuentran los β_2 agonistas, que son medicamentos catalogados por excelencia como broncodilatadores, por su efecto sobre los receptores β_2 del músculo liso bronquial, que dan como resultado un antagonismo funcional del músculo liso, bloqueando la posibilidad de su contracción y favoreciendo por ende la dilatación [4].

II.1.3 Broncodilatadores:

Los broncodilatadores son medicamentos que relajan los músculos bronquiales y, como resultado, los tubos bronquiales se ensanchan o dilatan. Cuando estos

músculos se relajan, los tubos bronquiales se abren nuevamente y generalmente la respiración vuelve a la normalidad [6].

Los broncodilatadores se clasifican en acción prolongada y acción corta, usados para el rápido alivio de crisis por broncoconstricción. Los broncodilatadores de acción prolongada ayudan a controlar y prevenir la aparición de síntomas. Existen tres grupos de fármacos usados como broncodilatadores, los agonistas de los receptores adrenérgicos β -2, entre los cuales existen de acción corta y prolongada, los anticolinérgicos de acción corta y la teofilina de acción prolongada.

Agonistas β -2 de corta duración:

Proporcionan un alivio rápido y temporal de los síntomas del asma y otros trastornos broncos obstructivos. Estos medicamentos suelen tener efectos aproximadamente a los 20 minutos o incluso en menos tiempo. Su efecto puede durar hasta 6 horas. Estos medicamentos son los mejores para el tratamiento de los síntomas del asma repentinos. Administrados 20 minutos antes pueden prevenir los síntomas de broncoconstricción causados por el ejercicio o la exposición al aire frío [6].

Agonistas β -2 de larga duración:

Son medicamentos que se administran a largo plazo para controlar o prevenir la broncoconstricción. Se usan desde 1990 en pacientes con EPOC, mejorando la disnea, la función pulmonar, la calidad de vida, reduciendo también las exacerbaciones de la enfermedad. Estos medicamentos tardan más tiempo en actuar, pero son capaces de aliviar la constricción de las vías respiratorias durante un máximo de 12 horas [7].

Este tipo de medicamentos se suele tomar dos veces al día junto a un medicamento anti inflamatorio que ayuda a mantener abiertas las vías respiratorias y previene los síntomas del asma.

II.2. Clorhidrato de Ambroxol

Clorhidrato de Ambroxol, Clorhidrato de 4-[(2-amino-3,5-dibromofenil)metilamino]ciclohexan-1-ol [6] derivado sintético de la vasicina, el principio activo extraído de la especie de plantas *Adhatodavasica*[6]. Es un mucolítico con acción expectorante utilizado en el manejo de los procesos bronquiales donde se requiere la movilización de las flemas. En la figura 1 se muestra la estructura química de clorhidrato de ambroxol.

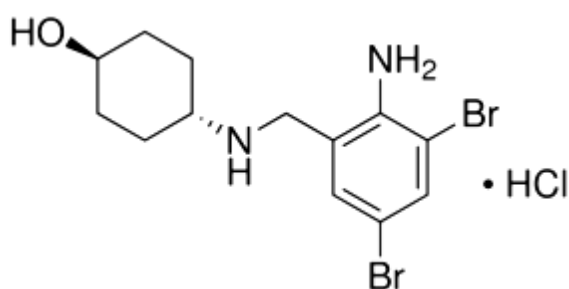


Figura 1. Fórmula estructural del Clorhidrato de Ambroxol [8].

II.2.1. Propiedades físicas y químicas del Clorhidrato de Ambroxol.

En la tabla 1 se presentan algunas de las propiedades físicas y químicas de Clorhidrato de Ambroxol más importantes.

Tabla 1. Propiedades químicas y físicas de Clorhidrato de Ambroxol [5].

Fórmula química	C ₁₃ H ₁₈ Br ₂ N ₂ O.HCl
Peso molecular	416,6 g/mol
Estado físico	Cristales blancos o amarillentos
Punto de fusión	(233-234,5) °C
Solubilidad	Soluble en metanol, insoluble en cloruro de metileno, ligeramente soluble en agua.
pKa (temperatura 25°C)	8,69

II.2.2. Características farmacocinéticas.

El ambroxol se absorbe rápidamente por vía oral a nivel del intestino. Cuando se toma en ayunas, la concentración máxima en el plasma sanguíneo ocurre a las dos horas y media, alcanzando una eficacia terapéutica de 30 ng/mL. Su biodisponibilidad es del 60%. Tiene una vida media de 10 horas aproximadamente. Se une extensamente a las proteínas plasmáticas (90%) y no se acumula en plasma tras dosis repetidas. Se distribuye rápidamente en los tejidos a partir de la sangre, aproximadamente en dos horas y media después de la administración. Se metaboliza en el organismo humano formando varios metabolitos que carecen de efecto tóxico y que se eliminan vía renal. Un 10% de la sustancia activa es eliminado por las heces [9].

II.2.3 Contraindicaciones.

El ambroxol está contraindicado en pacientes con hipersensibilidad al medicamento o a cualquier componente de su formulación. Se han descrito caso de lesiones graves en piel como el síndrome de Stevens-Johnson y necrólisis epidérmica tóxica. Se debe administrar con precaución en pacientes con deficiencia broncomotriz. Evitar uso prolongado en pacientes con intolerancia a la histamina [9].

Este fármaco puede atravesar la barrera placentaria, acelerando la maduración de neumocitos granulosos en el feto, y producir un efecto preventivo en la enfermedad de membrana hialina, lo cual es útil en los casos de parto pre término inminente para ayudar a la maduración pulmonar fetal del neonato.

Los estudios realizados en animales no han demostrado efectos adversos sobre el feto, sin embargo, no es recomendable la administración de Ambroxol durante el primer trimestre del embarazo. También se desconoce si el Ambroxol se excreta en la leche materna, por lo que no se recomienda suministrar durante la lactancia [9].

II.2.4 Reacciones adversas.

No se han reportado síntomas graves debido a sobredosis. Los síntomas que con mayor frecuencia se observan después de administración de dosis elevadas incluyen alteraciones gastrointestinales, diarrea, vómito, erupciones cutáneas y fatiga [9].

II.3. Clorhidrato de Clenbuterol.

Clorhidrato de Clenbuterol o Clorhidrato de (1-(4-amino-3,5-dicloro-fenil)- 2-(*tert*-butilamino)etanol. (Figura 2), es considerado como un potente broncodilatador, anabólico y agente lipolítico en muchas especies. También se le denomina agente de repartición en virtud de que fomenta la producción de proteína y reduce la grasa [10].

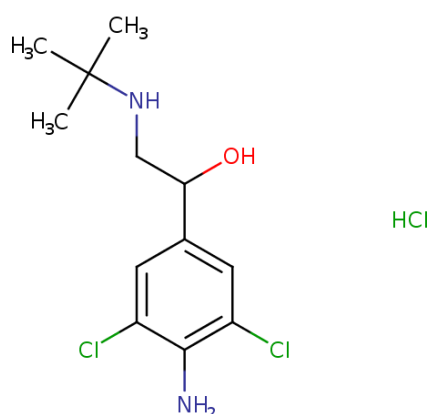


Figura 2. Fórmula estructural del Clorhidrato de Clenbuterol [10].

El clenbuterol constituye un miembro de las denominadas fenetanolaminas, medicamentos que, como grupo, requieren la presencia de un anillo aromático con un grupo hidroxilo en la posición β del grupo alifático para mostrar actividad. La presencia del grupo nitrogenado y la sustitución de R por un grupo voluminoso, a menudo cíclico, no alifático, hace más específica a la molécula por los receptores β -adrenérgicos [11].

En humanos tiene uso limitado, ya que su vida media es demasiado prolongada, y en muchos países está prohibido hasta para uso clínico, pero en diferentes disciplinas deportivas es utilizado como sustancia dopante. Tiene ciertos efectos anabolizantes aunque no es un esteroide.

También se ha utilizado en España y otros países para el engorde del ganado vacuno hasta la década de los 90, de manera que la carne podía ser comercializada en menor tiempo reduciendo el coste a los productores, pero esta práctica ya no está permitida, solo se puede usar en animales en determinados casos de enfermedad y después de esto debe transcurrir un período mínimo de tiempo hasta que la carne puede ser consumida, de esta manera se eliminan del organismo del animal los restos que hubieran podido quedar.

II.3.1 Propiedades físicas y químicas del Clorhidrato de Clenbuterol.

En la tabla 2 se destacan algunas de las propiedades físicas y químicas del Clorhidrato de Clenbuterol.

Tabla 2. Propiedades químicas y físicas del Clorhidrato de Clenbuterol [12].

Fórmula química	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ Cl ₂ O.HCl
Peso molecular	313,66 g/mol
Estado físico	Polvo cristalino blanco a amarillo pálido.
Punto de fusión	173 °C
Solubilidad	Soluble en agua, metanol y en etanol 96%, ligeramente soluble en cloroformo, poco soluble en acetona e insoluble en benceno.
pKa (ácido más fuerte)	14,06
pKa (Básico más fuerte)	9,63

II.3.2 Características farmacocinéticas.

El clenbuterol, es un broncodilatador selectivo, rápido y potente, cuya acción se manifiesta de 5 a 10 minutos después de ser administrado y persiste durante 10 a 14 horas. Mediante estudios realizados se ha demostrado que después de la administración oral de una dosis de 0,02 mg de clenbuterol hay una completa absorción del fármaco; los niveles plasmáticos se alcanzan entre las 2 y 3 horas siguientes. Se fija en un 50% a las proteínas plasmáticas y en lo que respecta a su eliminación, el 87% de la dosis se excreta por vía urinaria en un periodo superior a las 86 horas siguientes a la administración. Extrapolando el tiempo de eliminación puede considerarse que prácticamente el 100% se elimina por vía urinaria. Mediante la administración de dosis múltiples se determinó que el 75% de la sustancia original

permanece inalterada y que sólo una pequeña parte se metaboliza. Los metabolitos conocidos carecen de toxicidad y se eliminan por vía renal [13].

II.3.3 Contraindicaciones.

Está contraindicada para pacientes hipersusceptibles, hipertiroidismo, diabetes, trastornos cardiovasculares graves e hipersensibilidad a las aminas simpatomiméticas [13].

II.3.4 Reacciones adversas.

Los efectos secundarios adversos de Clenbuterol incluyen aquellos familiarizados con otros fármacos agonistas β_2 : temblor muscular, palpitaciones, calambres musculares, taquicardia leve, tensión, dolores de cabeza y vasodilatación periférica [13].

II.4. Combinación de ambroxol-clenbuterol.

La combinación de ambroxol y clenbuterol, como principios activos, presentan una acción complementaria al combinar un broncodilatador (clenbuterol) y un expectorante y mucolítico (ambroxol). Esta combinación está diseñada para facilitar la eliminación de exceso de moco y flema, ayudando a abrir las vías respiratorias en aquellas enfermedades agudas y crónicas de las vías respiratorias que van acompañadas de broncoespasmo y alteración patológica de la formación y el transporte de la secreción en especial bronquitis espasmódicas, EPOC y asma bronquial [14].

Actualmente, en el mercado nacional existen varios medicamentos de diferentes marcas comerciales en donde se encuentran combinados los fármacos ambroxol y

clenbuterol. Es importante destacar que ambos principios activos están contenidos dentro de la forma farmacéutica como sales de clorhidrato.

El Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (INHRR) es el ente regulador de medicamentos en Venezuela. En la tabla 3 se presentan las especialidades farmacéuticas registradas para la combinación ambroxol-clenbuterol ante este organismo.

Tabla 3. Especialidades farmacéuticas registradas de la combinación ambroxol y clenbuterol en el INHRR.

Nombre del producto	Representante
AMBROMUCO COMPOSITUM 7,5 mg-0,005 mg/5mL JARABE.	CAFAR COMPAÑIA ANONIMA FARMACEUTICA.
AMBROXOL -CLENBUTEROL 15 mg - 0,01 mg/5mL JARABE	LABORATORIOS SPEFAR VENEZOLANOS , S.A
AMBROXOL -CLENBUTEROL 7,5 mg-0,005 mg/5mL JARABE.	FARMACOS VENEZOLANOS, C.A.
AMBROXOL CLORHIDRATO - CLENBUTEROL CLORHIDRATO 15 mg - 0,01 mg JARABE	NEW PHARMA, C.A.
AMBROXOL CLORHIDRATO - CLENBUTEROL CLORHIDRATO 7,5 mg – 0,01 mg. JARABE INFANTIL.	NEW PHARMA, C.A.
AMBROXOL-CLENBUTEROL 15 mg- 0,01 mg/5mL ELIXIR.	GENERICO DE CALIDAD GC,C.A.
AMBROXOL-CLENBUTEROL 15 mg-0,01 mg/5mL JARABE.	LABORATORIOS KIMICEG C.A.
AMBROXOL-CLENBUTEROL 7,5 mg-0,005 mg/5mL JARABE.	CALOX INTERNATIONAL, C.A.
AMBROXOL-CLENBUTEROL 7,5 mg-0,005 mg/5mL JARABE.	LABORATORIOS KIMICEG C.A.
AMBROXOL-CLENBUTEROL 7,5 mg-0,005 mg/ mL JARABE.	LABORATORIOS SPEFAR VENEZOLANOS , S.A.
AMBROXOL-CLENBUTEROL 7,5 mg-5 µg/5mL JARABE.	MEYER PRODUCTOS

	TERAPEUTICOS S.A
AMBROXOL-CLENBUTEROL 7,5 mg-0,005 mg/1mL SOLUCION GOTAS PEDIATRICAS.	LABORATORIOS KIMICEG C.A
ARBIXIL 15 mg-5 µg/5mL JARABE.	MEYER PRODUCTOS TERAPEUTICOS S.A.
ARBIXIL 7,5 mg-5 µg/mL SOLUCION GOTAS USO PEDIATRICO.	MEYER PRODUCTOS TERAPEUTICOS S.A.
ARBIXIL 7,5 mg-5 µg/5mL JARABE INFANTIL.	MEYER PRODUCTOS TERAPEUTICOS S.A.
CLEMBROXIL 5 mcg-7,5 mg/1mL SOLUCION ORAL EN GOTAS.	REGIFARM, S.R.L.
CLEMBROXIL 5 mcg-7,5 mg/5mL SOLUCIÓN ORAL.	REGIFARM, S.R.L.
CLENBUXOL 7,5 mg-0,005 mg/mL SOLUCION GOTAS PEDIATRICAS.	LABORATORIOS KLINOS C.A.
MISULVAN COMPOSITUM 7,5 mg-0,005 mg/5mL JARABE PEDIATRICO.	LABORATORIO PLUSANDEX DE FARMACEUTICOS UNIDOS, PLUSANDEX C.
MISULVAN 15 mg -0,01 mg/5mL COMPOSITUM JARABE ADULTO	LABORATORIO PLUSANDEX DE FARMACEUTICOS UNIDOS, PLUSANDEX C.
MUCOMAX COMPOSITUM 15 mg-0,01 mg/5mL SOLUCIÓN USO ORAL.	LABORATORIOS KIMICEG C.A.
MUCOMAX COMPOSITUM 7,5 mg-0,005 mg/5mL SOLUCIÓN ORAL USO PEDIÁTRICO.	LABORATORIOS KIMICEG C.A.
MUCOMAX COMPOSITUM 7,5 mg-0,005 mg/mL SOLUCIÓN ORAL GOTAS USO PEDIATRICO.	LABORATORIOS KIMICEG C.A.
XOLCLEN 15 mg-0,01 mg/5mL JARABE.	PRODUCTOS GACHE ,S.A.
MUCOSOLVAN COMPOSITUM 15 mg-0,01 mg/5mL JARABE.	BOEHRINGER INGELHEIM C.A.

II.5. Métodos Cromatográficos.

La cromatografía (del griego *chroma* que significa “color”, y *graphein* que significa “escribir”) [15]. Es un método muy utilizado en todas las ramas de la ciencia y que permite la separación, identificación y determinación de los componentes químicos en mezclas complejas. Ningún otro método de separación es tan potente y de aplicación tan general como la cromatografía. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible, y que se fija a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente [16].

La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido absorbido sobre un sólido o un gel. La fase estacionaria puede estar empacada en una columna extendida como una capa, distribuida como película o aplicada mediante otras técnicas [17].

Los métodos cromatográficos poseen una clasificación fundamental basándose en el tipo de fase móvil y estacionaria utilizada y en la clase de equilibrios implicados en la transferencia de los solutos entre las fases. Las tres clases generales de cromatografía son: cromatografía de líquidos, cromatografía de gases y cromatografía de fluidos supercríticos.

II.5.1 Cromatografía de líquidos.

La cromatografía de líquidos es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada. Las razones de la popularidad de esta técnica son: sensibilidad, fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria y en muchos campos de la ciencia, tales como: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, plaguicidas, antibióticos, especies órgano metálicas y una variedad de sustancias inorgánicas [17].

La fase móvil en cromatografía de líquidos se mueve a través de la columna por gravedad o con flujo presurizado diferenciándose estas técnicas con las siglas LC y HPLC, respectivamente.

La denominación de cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC (por sus siglas en inglés "High Performance Liquid Chromatography"), se utiliza para la cromatografía líquida que utiliza empaques con tamaños de partícula de 3 a 10 μm , por ello requiriendo de un sistema de bombeo a presión de la fase móvil. HPLC tiene ventajas distintivas sobre la cromatografía de gases para el análisis de compuestos orgánicos. Los compuestos que se van a analizar se disuelven en un disolvente adecuado y la mayoría de las separaciones tienen lugar a temperatura ambiente. Por lo tanto, la mayoría de los fármacos, aun siendo compuestos no volátiles o térmicamente inestables, pueden analizarse por esta cromatografía sin descomposición o sin necesidad de hacer derivados volátiles [18].

II.5.2 Cromatografía de reparto.

La cromatografía de reparto ha sido el tipo de cromatografía de líquidos de uso más amplio de las cuatro modalidades de cromatografía de líquidos, se subdivide en:

- líquido-líquido: la fase estacionaria líquida se retiene sobre la superficie del soporte por adsorción física.
- cromatografía de fase unida químicamente: la fase estacionaria se une químicamente a la superficie del soporte.

Las diferencias entre estas técnicas radican en la forma en que se retiene la fase estacionaria sobre las partículas de soporte del relleno [15].

En la actualidad, los métodos de fase unida químicamente son los que predominan debido a las desventajas de los sistemas líquidos-líquidos. Una de ellas es la pérdida de fase estacionaria por disolución en la fase móvil, por otro lado, existe un problema de solubilidad de la fase estacionaria que imposibilita el uso de los rellenos de fase líquida en la elución con gradiente [15].

En cromatografía de reparto, los soportes para casi todos los rellenos de fases unidas químicamente se preparan con sílice rígida, o composiciones constituidas básicamente por sílice. Estos sólidos están formados por partículas mecánicamente resistentes, porosas y uniformes, con diámetros de 3, 5 o 10 μm . La superficie de la sílice totalmente hidrolizada por calentamiento con HCl 0,1M durante uno o dos días, está constituida por grupos silanoles químicamente reactivos (ver figura 3) [15].

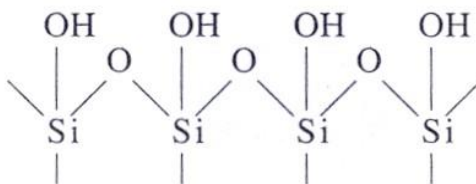


Figura 3. Superficie de la sílice hidrolizada [15].

Los recubrimientos de fase unida químicamente más utilizados son los siloxanos que se forman por reacción de la superficie hidrolizada con un órgano clorosilano, donde R es un grupo alquilo o alquilo sustituido (ver figura 4).

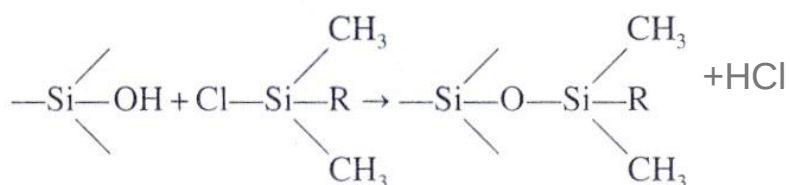


Figura 4. Reacción de formación de los siloxanos [15].

Para obtener separaciones de calidad en este tipo de cromatografía es indispensable que las polaridades del soluto, de la fase móvil y de la fase estacionaria sean lo más afines posible y así lograr la elución de la muestra en un tiempo acorde al análisis.

Existen dos tipos de cromatografía de reparto, de acuerdo a las polaridades relativas de la fase móvil y estacionaria:

- 1) **Fase normal:** Por razones históricas, a este método se le conoce como cromatografía en fase normal, ya que utilizaban fases estacionaras de alta polaridad (como por ejemplo: agua o trietilenglicol) y como fase móvil se empleaba un disolvente relativamente apolar (por ejemplo: hexano o isopropiléter). En donde el componente menos polar eluye primero debido a que es más soluble en la fase móvil, y un aumento de polaridad de dicha fase aumenta el tiempo de elución [15].

Los rellenos comerciales utilizados de fase normal unida químicamente, el R en la estructura del siloxano (figura 2) es un grupo funcional polar, como es el caso de los grupos ciano ($-\text{C}_2\text{H}_4\text{CN}$), diol ($-\text{C}_3\text{H}_6\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$), amino ($-\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_2$) y los dimetilaminopropil ($\text{C}_3\text{H}_6\text{N}(\text{CH}_3)_2$). Las polaridades de estos

materiales de relleno varían en un gran intervalo, siendo el tipo ciano el menos polar y el tipo amino el más polar [15].

- 2) **Fase inversa:** Es la técnica cromatográfica de mayor uso a nivel mundial posee una gran versatilidad y aplicabilidad en los trabajos analíticos rutinarios de carácter industrial y académico. En este tipo de cromatografía la fase estacionaria es no polar, con frecuencia se trata de un hidrocarburo, en donde el grupo R del siloxano (figura 2) es una cadena C_8 (n-octilo), o una cadena C_{18} (n-octadecilo) y la fase móvil es relativamente polar como: agua, metanol o acetonitrilo [15]. En este caso, los componentes más polares eluyen primero y un aumento de la polaridad de la fase móvil aumentan el tiempo de elución.

II.5.2 Cromatografía de par iónico.

La cromatografía de par iónico es un subconjunto de la cromatografía de fase inversa en la que se separan especies fácilmente ionizables. La fase inversa se recubre dinámicamente por grupos iónicos, los cuales son añadidos a través de la fase móvil. Este tipo de cromatografía posee una fase móvil constituida por un buffer (o solución amortiguadora) y un reactivo iónico. El contraión es de una cadena orgánica relativamente larga y de carga opuesta al ión del analito que se desea determinar. En su área de aplicación compite con la cromatografía de intercambio iónico [15].

II.6 Parámetros fundamentales de la cromatografía.

El proceso de la cromatografía, es una compleja unión de fenómenos, como la cinética y la termodinámica. Todo esto se optimiza variando las condiciones experimentales, hasta que los compuestos de la mezcla se separen completamente en el menor tiempo posible. Los experimentos de optimización tienen como objetivo reducir el ensanchamiento de banda, o cambiar las velocidades relativas de

migración de los componentes, las cuales son modificadas a su vez por aquellas variables que afectan a los factores de retención y selectividad de los analitos en la disolución.

- **Factores termodinámicos:** Son los que rigen el equilibrio de distribución o reparto de los solutos (analitos) entre las dos fases (móvil y estacionaria), por lo tanto, son responsables de la retención y selectividad.
- **Constante de distribución (K):** describe la relación del equilibrio de distribución y transferencia del analito entre la fase estacionaria y la fase móvil. Se define como:

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad \text{Ecuación 1.}$$

Donde, C_s es la concentración molar del soluto en la fase estacionaria y C_m es la concentración molar en la fase móvil [17].

- **Factor de retención (k') [17,19]:** describe la velocidad de migración de los analitos en la columna. Para un soluto determinado se define como:

$$k' = \frac{K_a V_s}{V_m} \quad \text{Ecuación 2.}$$

Donde, K_a es el coeficiente de distribución de la especie, V_s es el volumen de la fase estacionaria y V_m es el volumen de la fase móvil.

El factor de retención de un componente se puede determinar a partir del cromatograma:

$$k' = \frac{(t_r - t_m)}{t_m} \quad \text{Ecuación 3.}$$

Cuando:

$k' \leq 1$ El soluto emerge de la columna en un tiempo cercano al tiempo muerto (t_m).

$k' = 0$ En ningún momento el soluto estuvo en contacto con la fase estacionaria.

$k' = 1$ Implica $t_r = 2t_m$.

$k' \geq 20$ Los tiempos de elución son excesivamente largos.

Las separaciones se realizan en unas condiciones en las que los factores de retención para las especies de una mezcla oscilan entre 2 y 10 [19].

- **Factor de selectividad (α)** [15]: El factor de selectividad α de una columna, como su nombre lo indica, es un término que define que tan selectiva es una columna para diferenciar dos bandas. Es de hacer notar, que la columna puede ser selectiva a una separación, que se identifica por un valor alto de este factor, pero si no se considera la mejora de los parámetros que pueden afectar el ancho de una banda, aun así no se lograría la diferenciación de los mismos. Entonces el factor de selectividad de una columna para dos especies A y B se define como:

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} \quad \text{Ecuación 4.}$$

Donde k_B es el factor de capacidad del compuesto B, que es el más retenido y k_A es el factor de capacidad del compuesto A, que es el menos retenido.

En términos tomados a partir de un cromatograma α se puede calcular como sigue:

$$\alpha = \frac{t_{r2} - t_m}{t_{r1} - t_m} \quad \text{Ecuación 5.}$$

Cuando:

$\alpha = 1$; Los t_r son iguales y no hubo separación.

$\alpha > 1$; Mayor es la separación.

- **Factores cinéticos:** en el movimiento de las partículas a través de la columna cromatográfica, ciertas partículas se desplazarán más rápido que otras, es decir, presentarán diferentes velocidades de migración. La diferencia de los tiempos de elución de las mismas conlleva a tener una mayor dispersión de las mismas en el tiempo, esto se ve reflejado en una campana de Gauss, la cual se hace más ancha y pequeña con el pasar del tiempo.
- **Resolución cromatográfica (R_s) [17,19]:** La resolución es la medida cuantitativa de la capacidad de una columna de separar dos componentes en una mezcla, calculada por:

$$R_s = 2 \cdot \frac{tr_2 - tr_1}{w_1 + w_2} \quad \text{Ecuación 6.}$$

Donde tr_2 y tr_1 son los tiempos de retención de los dos componentes; w_2 y w_1 son los anchos correspondientes en las bases de las señales cromatográficas obtenidas extrapolando los lados relativamente rectos de los picos hasta la línea base [17].

Cuando se usan integradores electrónicos, puede ser conveniente determinar la resolución, mediante la ecuación:

$$R_s = 1,18 \cdot \frac{tr_2 - tr_1}{w_{1, \frac{h}{2}} + w_{2, \frac{h}{2}}} \quad \text{Ecuación 7.}$$

La resolución puede observarse directamente sobre el cromatograma. Se tendrá una buena resolución si las señales no se solapan, y está perfectamente delimitada cada señal, sin que coincida el final de uno con el principio del siguiente.

Para una fase estacionaria dada, la resolución puede mejorarse alargando la columna, aumentando así el número de platos (N). Una consecuencia del

aumento del número de platos es el incremento del tiempo requerido para la separación [19]

Como se observa en la figura 5, la resolución de 1,5 indica una separación eficiente de los dos componentes, mientras que no es así con una resolución de 0,75. Con una resolución de 1,0; la zona A contiene aproximadamente un 4% de B y la zona B contiene una cantidad similar de A. Con una resolución de 1,5 el solapamiento es del orden de un 0,3%. Para una fase estacionaria dada, la resolución puede mejorarse alargando la columna, aumentando así el número de platos (N) [19].

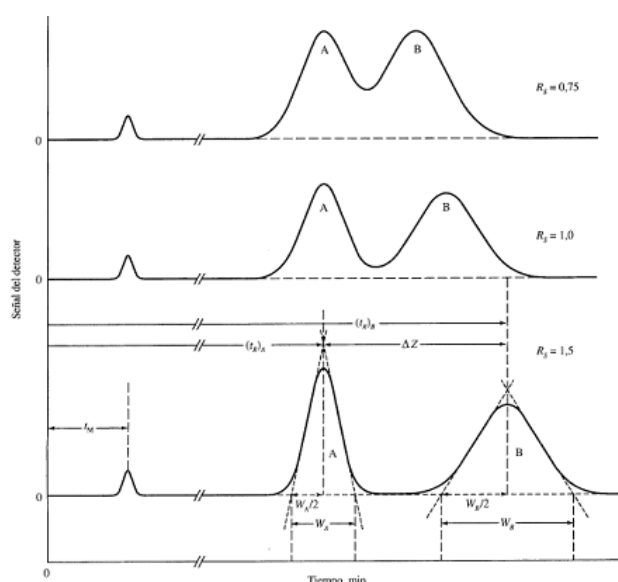


Figura 5. Separaciones correspondientes a tres valores de resolución (R_s) distintos [19].

- **Número de platos teóricos (N) [19]:** el número de platos teóricos es una medida de la eficiencia de la columna. Para los picos gaussianos, se calcula de la siguiente manera:

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{W} \right)^2 \text{ Ecuación 8.}$$

Donde t_r el tiempo de retención de la sustancia y W es el ancho de la banda en su base, que se obtiene extrapolando los lados relativamente rectos de la banda hasta la línea base. El valor de N depende de la sustancia cromatografiada, así como de las condiciones operativas, tales como el flujo de fase móvil, la calidad del relleno, la uniformidad del relleno dentro de la columna, y, para columnas capilares, el espesor de la película de fase estacionaria, el diámetro interno y la longitud de la columna.

Cuando se usan integradores electrónicos, puede ser conveniente determinar el número de platos teóricos por la ecuación

$$N = 5,54 \left(\frac{t_r}{W_{1/2}} \right)^2 \quad \text{Ecuación 9.}$$

Donde $W_{1/2}$ es el ancho del pico a la mitad de la altura.

La altura del plato y el número de platos están relacionados entre sí:

$$N = \frac{L}{H} \quad \text{Ecuación 10.}$$

Donde N es el número de platos teóricos, L es la longitud de la columna, H es la altura de cada plato.

La eficacia de la columna cromatográfica aumenta cuanto mayor es el número de platos, si H tiene un valor pequeño, la distancia entre platos es menor y por tanto la eficiencia será mayor. Por el contrario, si H es grande la columna es poco eficiente para separar ese componente ya que sus moléculas estarán muy difundidas.

II.7 Métodos analíticos.

Para el desarrollo químico-farmacéutico de un nuevo medicamento es imprescindible la utilización de metodologías analíticas que permitan cuantificar el producto mayoritario en forma de materia prima o como ingrediente activo de una formulación [21].

II.7.1 Clasificación.

Según su normalización y estado de desarrollo, los métodos analíticos pueden clasificarse en:

- **Métodos Estándar o Normalizados:** Son aquellos publicados por distintas organizaciones, a nivel nacional, regional o nacional. Entre estos métodos se encuentran los documentos oficiales: Farmacopea de los Estados Unidos (conocida por sus siglas en inglés USP), la Farmacopea Europea (EP), entre otras.

Generalmente los métodos estándar son los más usados, sin embargo es necesario realizar evaluaciones de los mismos, para ser adaptados a los requerimientos del laboratorio. Por ejemplo, un producto terminado de un laboratorio en particular no necesariamente tiene los mismos requerimientos que ofrece una técnica analítica de la USP, debido a la fórmula maestra del producto, disposición de reactivos, excipientes, entre otros. Pero, se pueden realizar evaluaciones del método analítico consultado, para así ajustarlo a las necesidades del laboratorio [21].

- **Métodos desarrollados por el laboratorio:** En algunas ocasiones, el laboratorio procede a desarrollar técnicas analíticas por sí mismo, ya que requieren de parámetros muy específicos o por restricciones de nivel comercial que impiden el uso de métodos análogos a los de otras compañías.

Estos métodos deben encontrarse debidamente documentados, implementados, validados y autorizados para poder usarse [21].

- **Métodos no Normalizados:** Estos métodos son aquellos que no han sido autorizados por las fuentes competentes. Por lo general, se requiere de una validación completa de los mismos [21].

En los laboratorios analíticos se aplican diversas técnicas de análisis para productos terminados y materias primas. Entre las más usadas destacan las siguientes: Volumetría, Espectrofotometría y HPLC.

II.8. Validación de método analítico.

La validación de los métodos analíticos es un requisito de aseguramiento para la autoridad reguladora por el cual producen resultados válidos y coherentes, asegurando un medicamento seguro, eficaz y de calidad. Las normas para la validación están regidas tanto por la USP como por la ICH (Conferencia Internacional de Armonización).

En Venezuela la autoridad reguladora es el INHRR, instituto autónomo de referencia nacional para el control sanitario de productos de uso y consumo humano, para el cumplimiento de las normativas nacionales e internacionales de gestión de la calidad, de acuerdo a las políticas de salud del estado venezolano [5].

Para análisis de medicamentos la validación de los procedimientos analíticos están regidos bajo el apartado <1225> de la USP, correspondiente al compendio de validación de procedimientos el cual comprende las características analíticas de alto rendimiento de exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, rango de linealidad, robustez y adecuación del sistema; así como los datos elementales para la validación del análisis basado en una categoría dada.

Tabla 4. Datos requeridos para la validación [22].

Carácter requerido de Desempeño Analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis cuantitativos	Prueba de límite		
Exactitud	Si	Si	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Si	*	Si
Límite de detección	No	No	Si	*	No
Límite de cuantificación	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No
Intervalo	Si	Si	*	*	No

*Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

Categoría I: Procedimientos analíticos para la cuantificación de componentes mayoritarios de fármacos o componentes activos, incluyendo conservantes, en productos farmacéuticos terminados. Comprende las características analíticas de alto rendimiento de exactitud, precisión, especificidad, linealidad y rango [22].

Categoría II: Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en las sustancias farmacológicas granel o compuestos de degradación productos farmacéuticos acabados. Estos procedimientos incluyen ensayos cuantitativos y pruebas de límites [23].

Categoría III: Procedimientos analíticos para la determinación de las características de rendimiento (por ejemplo, disolución y liberación del fármaco) [22].

Categoría IV: Prueba de identificación. Para esta categoría sólo se requiere la prueba de especificidad. Una de las pruebas de identificación puede ser el HPLC, usualmente consiste en la comparación del tiempo de retención o el tiempo de retención relativo de una muestra comparada con un estándar bajo las mismas condiciones cromatográficas y el mismo día [23].

El incremento en el uso de detectores de arreglos de diodos (PDA) acoplados a HPLC permiten adicionalmente la comparación de espectros UV de estándares y muestras.

II.8.1 Parámetros de validación.

II.8.1.1 Exactitud [22]:

Es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero.

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, o como la diferencia entre la media de la valoración y el valor verdadero aceptado, considerando los intervalos de confianza.

$$\text{Porcentaje de recuperación} = \frac{(\text{Conc. muestra fortificada} - \text{Conc. muestra sin fortificar})}{\text{Conc. estándar}} \times 100$$

Ecuación 11.

También puede determinarse mediante la aplicación del procedimiento analítico a mezclas sintéticas de los componentes del producto farmacéutico al que se hayan añadido cantidades conocidas de analito dentro del intervalo del procedimiento. Si

no resulta posible obtener muestras de todos los componentes del producto farmacéutico, se puede aceptar tanto el agregado de cantidades conocidas del analito al producto farmacéutico.

En la valoración de un fármaco, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del procedimiento analítico con respecto a un analito de pureza conocida, o comparando los resultados del procedimiento con los de un segundo procedimiento bien caracterizado, cuya exactitud se haya comprobado o definido.

II.8.1.2 Precisión:

La precisión de un procedimiento analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea [22].

Se evalúa determinando la repetibilidad, reproducibilidad y la precisión intermedia. Generalmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa de una serie de mediciones.

La repetibilidad se refiere a la utilización de procedimiento analítico en un laboratorio durante un periodo corto por el mismo analista con el mismo equipo. La reproducibilidad se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios; y La precisión intermedia (conocida como tolerancia) estudia las variaciones típicas, por ejemplo diferentes días, analistas, equipos, etc. dentro de un mismo laboratorio.

Para comparar la tolerancia correspondiente a esta precisión intermedia se puede usar la conocida como Trompeta de Horwitz [24].

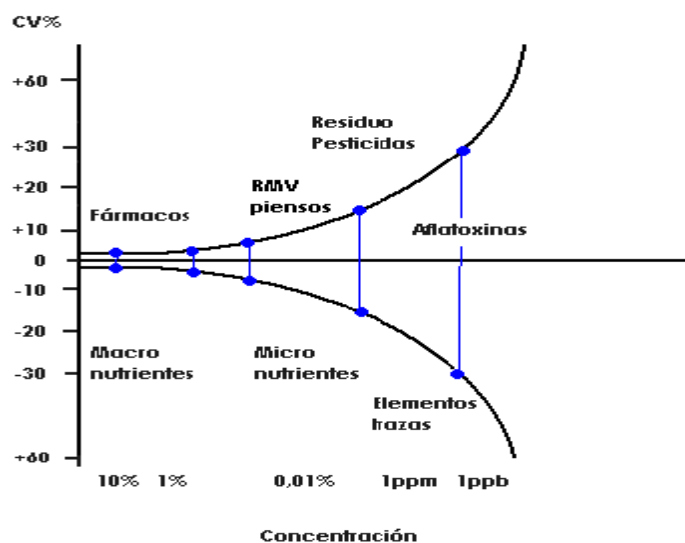


Figura 6. Trompeta de Horwitz.

La ecuación de Horwitz, está definida como:

$$CV_h = 2(1-0.5.\log c) \quad \text{Ecuación 12.}$$

Dónde: CV_h = Coeficiente de variación de Horwitz.

C= concentración del analito expresado en potencia de 10 (Ver tabla N° 5).

Tabla 5. CV de Horwitz para diferentes concentraciones [24].

Concentración del analito	CV de Horwitz
10%	2,8%
1%	4,0%
0,1%	5,6%
0,01%	8,0%
1 ppm	16%
1ppb	45%

Este coeficiente de variación (CV_h) está expresado en potencia de 2, y la concentración media del analito expresado como potencia de 10, de esta forma independientemente del analito y del método utilizado se puede estimar el CV esperado para la precisión.

Si el valor del parámetro CV_h es igual o menor a 2 se puede decir que el método tiene valores aceptables de precisión intermedia.

II.8.1.3 Especificidad:

Es la capacidad de un método de discriminar de manera inequívoca el analito de interés y de otros componentes presentes en la muestra. Las pruebas se diseñan a fin de evaluar el grado de interferencia de impurezas, productos de degradación, excipientes u otros analitos [22].

Debido a la presencia del detector arreglo de diodos se puede realizar el análisis de pureza máxima, ya que este por su rapidez es capaz de registrar la totalidad del espectro.

La especificidad podría ser evaluada continuamente durante el proceso de desarrollo del medicamento y posterior validación del método analítico. El nivel de las pruebas de especificidad dependerá de la fase en la cual se encuentre el método. Las pruebas más comunes aplicadas para evaluar la especificidad son:

No interferencia del placebo: Los excipientes presentes en una formulación podrían ser evaluados, a fin de conocer si interfieren en la detección del analito, para ellos se prepara una solución con placebo bajo las mismas condiciones de la muestra, de la misma forma se prepara una solución de referencia (patrón), ambas soluciones se analizan según el método. La ausencia del pico en la región donde aparece la señal

correspondiente al analito en estudio es una prueba suficiente para demostrar que los excipientes no interferirán en la lectura de la señal del analito [23].

Desafío del método: Consiste en inyectar soluciones conocidas de impurezas, productos de degradación, intermediarios, homólogos, dímeros, etc., que podrían dar información acerca de la presencia de este tipo de sustancias en la muestra, al igual que en el caso anterior se preparan las soluciones con los patrones de las sustancias mencionadas y paralelamente se prepara una solución patrón, se comparan ambos resultados a fin de reconocer si existe la presencia de alguna de estas sustancias en la muestra [23].

Estudios de degradación forzada: Consisten en la exposición de la muestra a una variedad de condiciones de estrés con el propósito de evaluar la presencia de productos de degradación. Es particularmente útil cuando no se cuenta con patrones de sustancias relacionadas. Las condiciones de estrés más evaluadas son el sometimiento de la muestra al calor, luz, medio ácido, medio básico y ambientes oxidativos. Otras condiciones podrían evaluarse, dependiendo de la naturaleza de la muestra [23].

II.8.1.4 Límite de detección (LD) [22].

Es la cantidad mínima de analito que puede detectarse en una muestra, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas.

Las pruebas de límites comprueban que la cantidad de analito se encuentra por encima o por debajo de un nivel determinado.

El límite de detección se expresa habitualmente en forma de concentración de analito (por ejemplo, porcentaje, partes por millón) en la muestra.

Puede determinarse a través de una estimación estadística con la siguiente expresión:

$$LD = \frac{3,3 S_{y/x}}{S} \quad \text{Ecuación 13.}$$

Dónde:

$S_{y/x}$ = desviación estándar de la respuesta.

S = pendiente de la curva de calibración.

II.8.1.5 Límite de cuantificación (LC):

Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas. El límite de cuantificación se expresa también en forma de concentración de analito (por ejemplo, porcentaje, partes por millón) en la muestra [22].

Puede determinarse a través de una estimación estadística y se expresa como:

$$LC = \frac{10 S_{y/x}}{S} \quad \text{Ecuación 14.}$$

Dónde:

$S_{y/x}$ = desviación estándar de la respuesta.

S = pendiente de la curva de calibración.

II.8.1.6 Linealidad:

Es la capacidad de un procedimiento analítico para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación

matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras dentro de un intervalo dado [22].

Los resultados deben ser evaluados por métodos estadísticos apropiados, por ejemplo, mediante el cálculo de una línea de regresión por el método de los mínimos cuadrados. En algunos casos, para obtener linealidad entre ensayos y concentraciones de la muestra, los datos de prueba podrán requerir una transformación matemática antes del análisis de regresión. Los datos de la línea de regresión en sí pueden ser útiles para proporcionar estimaciones matemáticas del grado de linealidad [22].

La ICH recomienda que se debe preparar en forma independiente soluciones de estándar de al menos 5 niveles de concentración, las cuales deben encontrarse en un intervalo mínimo de 80 % a 120 % de la concentración de referencia; este procedimiento deberá repetirse en forma independiente al menos en tres días diferentes, para evaluar estadísticamente la regresión lineal del sistema [22, 23].

II.8.1.7 Intervalo:

Es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito (incluyendo estos niveles) en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad [22].

II.8.1.8 Robustez:

Es una medida de su capacidad para no ser afectada por variaciones pequeñas, aunque deliberadas, en los parámetros del procedimiento indicados en la documentación, y provee una indicación de su aptitud durante condiciones normales de uso [22].

En el caso de métodos analíticos realizados por cromatografía líquida, algunos de los factores de estudio más comunes son, influencia de las variaciones de pH en la fase móvil, influencia de las variaciones en la composición de la fase móvil, temperatura, velocidad de flujo [25].

Para la selección de variables a considerar debe utilizarse todo el conocimiento ya adquirido durante el desarrollo analítico de esta manera se minimizan el número de ensayos a realizar. Cuando los factores a evaluar en el estudio de la robustez son muchos, se recurre a un diseño global que permite agruparlos, reduciendo el número de ensayos a efectuar [25].

Un diseño muy utilizado es el de Plackett y Burman, que permite estudiar el efecto de n variables en $n+1$ ensayos. El primer paso consiste en construir la matriz de diseño. La matriz de diseño es la relación que define el valor que deben tomar los factores en cada uno de los experimentos a realizar [22]. En la tabla 6 se ejemplifica el estudio de 3 variables en 8 ensayos. Las variables seleccionadas se indican con letras: las mayúsculas (A, B, C) corresponden al nivel alto y las letras minúsculas (a, b, c) al nivel bajo de la variable en cuestión, donde A, a es el flujo de la fase móvil en mL/min, B, b es pH de la fase móvil y C, c es concentración del solvente orgánico en la fase móvil en mg/mL. Luego se selecciona uno o más parámetros a medir y se obtienen los resultados indicados con las letras s, t, u, v, w, x, y, z [25].

Tabla 6. Diseño para 3 variables en un estudio de robustez según Plackett y Burman.

Experimento	A, a	B, b	C, c	Resultados
1	A	B	C	S
2	A	B	C	T
3	A	B	C	U
4	A	B	C	V
5	A	B	C	W
6	A	B	C	X
7	A	B	C	Y
8	A	B	C	Z

Una vez efectuado el experimento, se procede a calcular la diferencias de medias para cada parámetro en forma individual (ver tabla 7) [25].

Tabla 7. Calculo de la diferencia de respuesta para cada parámetro.

Parámetros	Diferencia
A-a	$V_A = \frac{1}{4} (s+t+u+w) - \frac{1}{4} (w+x+y+z)$
B-b	$V_B = \frac{1}{4} (s+t+u+w) - \frac{1}{4} (w+x+y+z)$
C-c	$V_C = \frac{1}{4} (s+t+u+w) - \frac{1}{4} (w+x+y+z)$

Para decidir si un parámetro tiene influencia significativa sobre el resultado, se compara la diferencia obtenida para el cambio efectuado sobre ese parámetro y el producto de s (desviación estándar del estudio de precisión) y raíz de 2 [25].

$$\text{Si } |V_B| > s \sqrt{2} \Rightarrow \text{diferencia significativa}$$

III. ANTECEDENTES

III.1 Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 38 NF 33). Clorhidrato de clenbuterol. (2015) [26].

La USP 38 NF 33 describe el análisis de impurezas orgánicas para clorhidrato de clenbuterol.

Se plantea la preparación de una solución amortiguadora, para lo cual se disuelven 3,0 g de 1-decanosulfonato de sodio y 5,0 g de fosfato monobásico de potasio en 900 mL de agua, ajustando pH con ácido fosfórico diluido (1 en 10) a un valor de 3,0; y finalmente se diluye con agua hasta alcanzar 1000 mL.

Se establecen las siguientes condiciones cromatográficas: uso de la columna cromatográfica L1 (4,0 cm x 12,5 mm, 5 μ m), empaque de columna correspondiente a octadecilsilano unidos químicamente a micropartículas de sílice o cerámica porosas o no porosas de 1, 5 μ m a 10 μ m de diámetro una varilla silíceo monolítica, volumen de inyección de 5 μ L, fase móvil mezcla de acetonitrilo, metanol y solución amortiguadora (20:20:60), Flujo de la fase móvil 0,5 mL/min, Detector UV a una longitud de onda de trabajo 215 nm. Temperatura columna 40 °C.

Los parámetros de aceptación sugeridos en esta metodología, son un 0,1% de impurezas individuales y no más de 0,2% de impurezas totales. Además se establece para la aptitud del sistema una desviación estándar no mayor a 2,0% para la señal cromatográfica del clenbuterol.

III.2 Desarrollo y validación de un método analítico por HPLC para la determinación simultánea de clorhidrato de ambroxol y loratadina en jarabes.

Parra Z., Bor M. y Gómez L. (2014) [5].

El objetivo de este trabajo fue desarrollar y validar un procedimiento analítico por HPLC para la determinación simultánea del clorhidrato de ambroxol y loratadina en jarabes, dando lugar a una metodología analítica que permita determinar ambos componentes en una sola corrida cromatográfica, disminuir el tiempo trabajo y economizar en el uso de reactivos.

El método fue desarrollado y posteriormente validado de acuerdo a los requerimientos establecidos en el apartado <1225> de la USP categoría I, para la cuantificación de componentes mayoritarios de fármacos, incluyendo preservantes, en productos farmacéuticos terminados.

Las muestras farmacéuticas fueron analizadas en su forma de jarabe de 60 mL, contemplan la mezcla de los componentes activos clorhidrato de ambroxol y loratadina. Los mismos declaran que cada 5 mL de jarabe, contiene 5 mg de loratadina y 30 mg de clorhidrato de ambroxol.

Para evaluar las condiciones cromatográficas se prepararon disoluciones estándar de clorhidrato de ambroxol de 0,6 mg/mL; loratadina de 0,1 mg/mL y combinada de clorhidrato de ambroxol 0,6 mg/mL y loratadina 0,1 mg/mL, empleando como disolvente una mezcla acetonitrilo y agua en relación 30:70% v/v.

Las condiciones cromatográficas establecidas para el análisis fueron las siguientes: columna RP 18 (3,9 mm x 150 mm, 5µm) a temperatura ambiente, fase móvil compuesta por la mezcla de buffer fosfato monobásico de amonio (0,05 M, pH 4) y metanol en proporción 50:50 % v/v, a pH de 3,40 ajustado con ácido ortofosfórico al

85%, flujo de la fase móvil 0,8mL/min. Detección UV-Visible a una longitud de onda de 248 nm y un volumen de inyección de 10 µL.

Las mediciones se realizaron en un HPLC, Waters conformado por: Bomba, modelo 600E. Automuestreador, modelo 717 Plus. Detector UV- Visible de arreglo de diodos, modelo 996 PDA. Programa para la adquisición y procesamiento de datos del sistema cromatográfico, Millennium32.

Previo al análisis cromatográfico los analitos de interés deben ser extraídos de los jarabes hacia un eluente más acorde para poder ser inyectados al sistema de HPLC. El proceso consistió en la disolución de los analitos por agitación mecánica con vórtex por cinco minutos, en contacto directo con el disolvente acetonitrilo y agua en relación 30:70% v/v. Para ello se pesaron 5,0 mL de solución oral, se añadió un volumen de 10 mL de disolvente acetonitrilo y agua en relación 30:70% v/v, seguido de agitación mecánica por 5 minutos. Luego se llevó a un volumen final de 50 mL con el disolvente. Posteriormente, se realizó la filtración de la solución empleando filtro provisto de una membrana de filtración (0,2 µm; poliamida).

Los tiempos de retención de clorhidrato de ambroxol y loratadina bajo estas condiciones fueron de 3,80 minutos y 16,60 minutos. El método propuesto para la determinación de los principios activos fue robusto y confiable bajo las condiciones de análisis. Dando lugar a un método preciso, exacto y selectivo, ya que permite reconocer inequívocamente la presencia del clorhidrato de ambroxol y loratadina y discriminar la presencia de sustancias contaminantes.

El método analítico desarrollado y validado fue aplicado como un indicador de estabilidad y un método rutinario para pruebas de control de calidad.

III.3 Desarrollo y validación de un método de cromatografía líquida de alta resolución para la determinación y cuantificación de clenbuterol en hígado de bovino. Morales-Trejo F; Vega y León S; Escobar-Medina A; Pérez-González J; Urbán-Carrillo G; Gutiérrez-Tolentino R. (2013) [27].

Se desarrolló una metodología para la determinación de clenbuterol en hígado de bovino por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Se recolectaron 17 muestras de hígado de bovino en mercados públicos de la Ciudad de México, Se pesaron ($5,0 \pm 0,1$) g de hígado homogeneizado. Se agregaron 4 mL de acetonitrilo y 2 mL de isopropanol y se licuaron por 30 segundos. La mezcla se colocó en un tubo de centrifuga de 50 mL y se agregaron 1,2 g de NaCl, mezclándose en vórtex por 2 minutos; luego se agregaron 4 g de Na_2SO_4 y 0,5 g de MgSO_4 y mezclaron en vórtex durante otros 2 minutos. Las muestras fueron centrifugadas durante 15 minutos a 2000 G. Se transfirió la totalidad del extracto a un matraz de fondo redondo de 50 mL y se rotoevaporó hasta sequedad. El residuo se disolvió en 1 mL de fase móvil, se llevó a ultrasonido por 2 minutos y filtrado usando filtros de nylon de 0.45 μm . Se tomaron 50 μL de esta solución y se inyectaron al equipo de HPLC.

Se preparó una solución madre de clorhidrato de clenbuterol disolviendo una cantidad apropiada del reactivo en agua ultra pura, para obtener una concentración de 1 mg/mL (aproximadamente), se guardó en oscuridad a 4 °C. La concentración de clorhidrato de clenbuterol fue corregida por su pureza y contenido de sal, ya que el clenbuterol es el analito de interés y no el clorhidrato de Clenbuterol, por lo tanto, la concentración real en la solución madre fue de 839.56 $\mu\text{g/mL}$. Las soluciones de trabajo (0,006 – 0,419 $\mu\text{g/mL}$) se prepararon el mismo día mediante diluciones graduales con fase móvil.

Se empleó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Hitachi Elite La Chrom equipado con un detector UV-VIS (L-2420), horno de columna (L-2300), automuestreador (L-2200) y una bomba cuaternaria (L-2130); limpiador ultrasónico Branson 2510R-MTH (Connecticut, EUA); rotavapor Büchi R-114 (Flawil, Suiza); vórtex mezclador Velp Scientifica (Usmate, Italia); centrífuga IEC Centra-7 (Massachusetts, EUA); balanza analítica Shimadzu AUX 120 (Kyoto, Japón).

El análisis mediante HPLC se llevó a cabo usando el sistema Hitachi Elite La Chrom. Se usó el software EZ Chrom Elite 3.3.2 SP2 como sistema de adquisición de los datos. La separación cromatográfica se ejecutó en una columna analítica Restek Ultra C₁₈ (250 mm x 4,6 mm I.D., 5 µm) (Pennsylvania, EUA). La fase móvil fue NaH₂PO₄ 0,05 M (pH 3,0)/acetonitrilo (85:15, v/v) y su tasa de flujo fue establecido a 1,0 mL/min. La longitud de onda del detector se estableció a 214 nm. La temperatura de la columna se mantuvo a 25 °C.

Bajo estas condiciones cromatográficas el tiempo de retención para el Clenbuterol fue de 24,82 minutos.

Para la validación del procedimiento se evaluaron los indicadores de: selectividad o especificidad, linealidad de la curva de calibración, límite de detección (LD) y de cuantificación (LC), exactitud y precisión.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la validación de este método, es posible establecer que es exacto y confiable en la determinación y cuantificación de clenbuterol, debido al bajo límite de detección, buen grado de separación cromatográfica, precisión, exactitud y sensibilidad.

Los autores indican que con la simplicidad de este método en el pretratamiento de las muestras, es posible determinar y cuantificar de manera práctica los niveles de clenbuterol en hígado de bovino mediante HPLC con detector UV. También permite

el ahorro de muchos de los reactivos usados respecto a otros métodos de extracción.

III.4 Desarrollo y validación de un método de cromatografía líquida de alto rendimiento para la estimación simultánea de ambroxol y doxofilina en forma de dosificación combinada en tabletas. Singhal N., Gaur K., Singh A. (2013) [28].

En este estudio se describió un nuevo método por HPLC, simple y preciso para la determinación simultánea de ambroxol y doxofilina en forma de dosificación combinada de comprimidos.

La separación cromatográfica se realizó con Shimadzu Prominence System (SPD-20AT, Shimadzu) con los siguientes componentes: Bomba LC-20AT, SPD-20^a Detector, BDS hypersil C18, 250 mm × 4,6 mm, 5 μ (tamaño de partícula), Thermo Scientific, Inyector manual Rheodyne (capacidad 20 μL), Hamilton Syringe (25 μL), y los datos se registraron mediante Spinchrom CFR Software.

Las mediciones se llevaron a cabo con un volumen de inyección de 20 μL, el flujo de fase móvil se ajustó a 1,0 mL/min y la detección UV se llevó a cabo a 254 nm. La fase móvil consistió en un buffer fosfato de dihidrógeno potásico (KH₂PO₄) pH 4,5-acetonitrilo (60:40). Con un pH aparente ajustado a 4,5 usando ácido o-fosfórico diluido se seleccionó como la composición óptima de la fase móvil, porque se encontró que este sistema de disolvente logro la resolución ideal de ambos componentes. La fase móvil y las muestras se desgasificaron mediante ultrasonido por 20 minutos y se filtraron a través de papel de filtro de membrana de Nylon 66 (N66) de 47 mm de 0,45 μm, Todas las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente de la columna (27 °C).

Se preparó una solución madre de patrón estándar de ambroxol que contenía 75 µg/mL en un matraz aforado de 100 mL disolviendo 7,5 mg de Ambroxol en un pequeño volumen de fase móvil; y se llevó a un volumen final de 100 mL con fase móvil. Esta solución se somete durante 10 minutos a ultrasonido.

Para la solución madre de patrón estándar de doxofilina que contenía 1000 µg/mL en un matraz aforado de 100 mL disolviendo 100 mg de doxofilina en un pequeño volumen de fase móvil; y se completó hasta el volumen final de 100 mL con la fase móvil. Esta solución es sometida a ultrasonido por 10 minutos.

Preparación de patrones Se midió 1 mL de solución madre de Ambroxol y 1 mL de solución madre de doxofilina y se diluyó con fase móvil hasta 10 mL. La solución se filtró a través de un filtro de jeringa de nylon de 0,45 µm. La concentración obtenida fue de 7,5 µg/mL de ambroxol y 100 µg/mL de doxofilina (ver figura 7).

Para la muestra se pesaron 20 comprimidos y se calculó el peso promedio y luego se trituraron. Se pesó con precisión una porción de polvo equivalente al peso de un comprimido; luego se transfirieron a un matraz volumétrico de 100 mL, se diluyó con fase móvil y se sometió a ultrasonido durante 30 minutos; se filtró esta solución a través de un filtro de jeringa de nylon de 0,45 µm. La concentración obtenida fue de 7,5 µg/mL de ambroxol y 100 µg/mL de doxofilina. El cromatograma de la solución preparada de ambroxol y doxofilina se registró en las condiciones cromatográficas optimizadas anteriores.

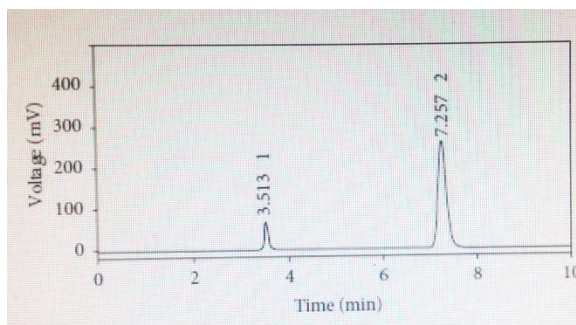


Figura 7. Cromatograma de un patrón ambroxol y doxofilina [25].

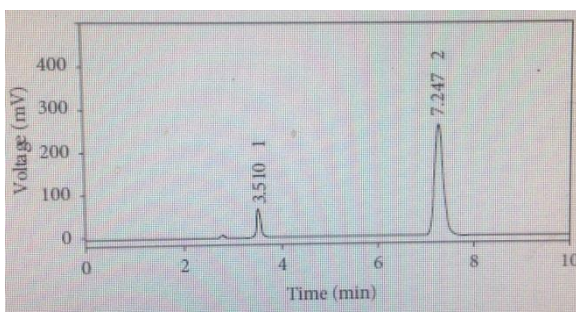


Figura 8. Cromatograma de una muestra ambroxol y doxofilina[25].

Bajo las condiciones experimentales descritas anteriormente, se observó que todas las bandas estaban bien definidas y libres de colas. Los tiempos de retención de ambroxol y doxofilina fueron 3,510 y 7,247 minutos, respectivamente.

El método analítico desarrollado fue sometido a validación con respecto a varios parámetros como la linealidad, el límite de cuantificación (LC), el límite de detección (LD), la precisión, los estudios de recuperación, la especificidad y la reproducibilidad y la robustez.

El método cumplió con los criterios de aceptación según lo establecido en los documentos de la ICH. Como todos los resultados están dentro del límite, el método analítico desarrollado se considera validado y adecuado.

III.5 Desarrollo y validación de un método analítico de producto clenbuterol jarabe, por HPLC. Arteaga R. (2012) [21].

En esta investigación se procedió a desarrollar una nueva metodología analítica para clenbuterol jarabe 0,005 mg/5 mL (pediátrico) y para clenbuterol jarabe 0,01 mg/5 mL (adulto), la misma surgió a raíz de la imposibilidad de eliminar las interferencias cuando se aplican métodos colorimétricos, este tipo de interferencias se ven eliminadas cuando se implementan métodos de análisis por HPLC, que por lo general son usados en la mayoría de las técnicas analíticas de laboratorios farmacéuticos.

Los parámetros cromatográficos para ambas técnicas implican longitud de onda de 215 nm, velocidad de flujo de 1 mL/min, temperatura de la columna cromatográfica de 40 °C, volumen de inyección de 100 µL y una fase móvil conformada por solución amortiguadora de 1-hexanosulfonato de sodio ($C_6H_{13}SO_3Na$) de pH 3,0; acetonitrilo y metanol en composiciones (68:11:21) respectivamente, la separación se logró en una columna analítica XTerra RP18 (3,9 mm x 15 cm x 5 µm).

Los HPLC usados son de marca Waters modelo 2690 y 2695, el detector del equipo de HPLC es de marca Waters, modelo 2996 PDA.

Con el patrón de clenbuterol se prepararon 4 disoluciones de distintas concentraciones que van desde 2 mg/mL hasta 0,002 mg/mL.

Las muestras de clenbuterol pediátrico y adulto se prepararon midiendo 10,0 mL de cada jarabe, y luego se transfirieron a balones de 20 mL, se llevó a volumen con fase móvil.

El tiempo de retención para el clenbuterol en este ensayo fue de 15 minutos aproximadamente.

Los parámetros que se tomaron en cuenta para la validación de la técnica analítica fueron: exactitud, precisión, linealidad, selectividad, límite de cuantificación, límite de detección y robustez. Se obtuvieron resultados favorables de estos parámetros, para ambos métodos, que permiten afirmar la fiabilidad de la respuesta del analito proporcionada por el método.

III.6 Determinación del clorhidrato de ambroxol por HPLC. Zarzuelo A, Sayalero M, López F, y. Lanao J. (2001) [29].

En este trabajo se validó una técnica por HPLC a partir de parámetros de confiabilidad (selectividad y especificidad, linealidad, exactitud, precisión) para el análisis del clorhidrato de ambroxol en solución por áreas y alturas de las señales cromatográficas.

El cromatógrafo utilizado por estos autores consistió en una bomba Varian (modelo 420) acoplada a un detector ultravioleta Varian (modelo 2050). La recopilación de datos se realizó con un integrador Varian (modelo 4270). Se usaron columnas Nucleosil Li Chrospher RP-18 de fase inversa (12,5 x 0,4 cm i.d.) (Merck, Darmstadt, Alemania) de tamaño de partícula de 5µm. La fase móvil consistió en una mezcla (70:30 v/v) de acetonitrilo y buffer fosfato de diamonio 0,01 M, ajustado a pH=6 con H₃PO₄ de pureza del 85%, en un pHmetro modelo Crison. Esta fase móvil se preparó diariamente, se filtró en un sistema de vacío Supelco (modelo 5-8068) con filtros de nylon de 0,45 µm (Whatman Malstone, U.K.) y se desgasificó en un baño de ultrasonido P-Selecta (M-515). El flujo de fase móvil durante los ensayos fue de 1,5 mL/min y la detección a 247 nm. El procedimiento se llevó a cabo a temperatura ambiente (20 ± 5 °C).

Para este ensayo se preparó un jarabe simple con los excipientes normalmente utilizados con clorhidrato de ambroxol en preparaciones comerciales: sorbitol (18 mg/mL), ácido cítrico (60 μ g/mL), metilparabeno (40 μ g/mL), propilparabeno (8 μ g/mL), sacarina sódica (10 μ g/mL), bisulfito de sodio (10 μ g/mL) e hidroxietilcelulosa (80 μ g/mL). Se pudo observar la buena selectividad y especificidad de la técnica analítica utilizada para la determinación del clorhidrato de ambroxol, sin interferencia con ningún otro compuesto que pudiera estar presente en las muestras analizadas.

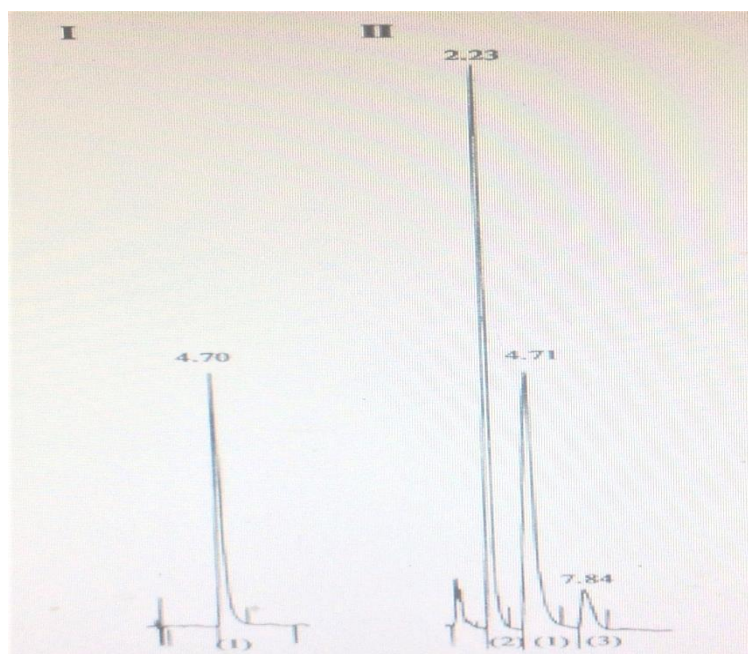


Figura 9. Cromatograma de clorhidrato de ambroxol (120 μ g/ μ L) en solución acuosa (I), y en un simple jarabe (II). (1) Clorhidrato de Ambroxol; (2) metilparabeno; (3) propilparabeno.

Los autores concluyeron que el método desarrollado y validado para la cuantificación de clorhidrato de Ambroxol en solución fue satisfactorio. La ventaja de este ensayo reside en su simplicidad. Los resultados muestran la excelente linealidad, precisión y exactitud de la técnica analítica, lo que debería permitir su implementación como método de cuantificación estándar del principio activo en la industria farmacéutica.

En la tabla 8 se presenta un resumen de las condiciones analíticas empleadas en cada uno de los antecedentes consultados:

Tabla 8. Resumen de los antecedentes consultados.

N°	Autores y año de publicación	Titulo	Tipo de Columna	Condiciones		Compuestos separados	Tiempo de retención (min)
				Composición y flujo de la fase móvil	Longitud de onda (nm)		
1	USP 38 (2015)	Describe el análisis de impurezas orgánicas para clorhidrato de clenbuterol.	C ₁₈ de 4,0 cm x 12,5 mm; 5 µm	Acetonitrilo: metanol: solución amortiguadora pH=3,0 (20:20:60); 0,5mL/min	215	Clorhidrato de clenbuterol	—
2	Z. Parra; M. Bor y L. Gómez (2014)	Desarrollo y validación de un método analítico por HPLC para la determinación simultánea de clorhidrato de ambroxol y loratadina en jarabes	Rp ₁₈ de 3,9 mm x 150 mm, 5 µm	Solución amortiguadora (NH ₄ H ₂ PO ₄ ; 0,05 M; pH=4) : Metanol (50:50 %v/v); 0,8 mL/min	248	Clorhidrato de ambroxol ----- Loratadina	3,80 ----- 16,60
3	F. Morales-Trejo et.al (2013)	Desarrollo y validación de un método de cromatografía líquida de alta resolución para la determinación y cuantificación de clenbuterol en hígado de bovino.	C ₁₈ de 250 mm x 4,6 mm, 5 µm	NaH ₂ PO ₄ 0,05 M (pH 3,0): acetonitrilo (85:15 %v/v); 1,0 mL/min	214	Clenbuterol	24,82

4	N. Singhal et.al (2013)	Desarrollo y validación de un método de cromatografía líquida de alto rendimiento para la estimación simultánea de ambroxol y doxofilina en forma de dosificación combinada en tabletas.	C ₁₈ de 250 mm x 4,6 mm, 5µm	Solución amortiguadora de KH ₂ PO ₄ pH=4,5 : Acetonitrilo, (60:40), 1,0 mL/min	254	Ambroxol ----- Doxofilina	3,510 ----- 7,247
5	R. Arteaga (2012)	Desarrollo y validación de un método analítico de producto clenbuterol jarabe, por HPLC.	RP ₁₈ de 3,9 mm x 15 cm, 5µm	Solución amortiguadora de C ₆ H ₁₃ SO ₃ Na: Acetonitrilo: Metanol (68:11:21) 1mL/min	215	Clenbuterol	15
6	A. Zarzuelo et.al (2001)	Determinación del clorhidrato de ambroxol por HPLC.	RP ₁₈ de 12,5 cm x 0,4 cm, 5µm	Acetonitrilo : solución amortiguadora fosfato de diamonio 0,01 M, pH=6 (70:30%v/v) 1,5 mL/min	247	Ambroxol	4,70

IV. JUSTIFICACIÓN

Actualmente no existe ninguna metodología analítica para el análisis simultáneo de ambroxol y clenbuterol. Este medicamento es ampliamente utilizado en el país y se adquiere sin receta médica. Por lo tanto, se justifica el desarrollo y validación de un método analítico por HPLC para la determinación simultánea de ambroxol y clenbuterol en jarabe. Esta metodología permitirá garantizar que el medicamento cumple con las exigencias de calidad necesarias para el consumo en Venezuela.

En los últimos tiempos se ha estado empleando más de un principio activo en la formulación y fabricación de medicamentos, con el fin de mejorar la eficacia del mismo sobre un tratamiento específico. Dado que los principios activos que se utilizan en los medicamentos presentan una gran variedad de actividades farmacológicas y propiedades toxicológicas, es necesario un riguroso control de calidad para garantizar la composición exacta de los componentes presentes en los mismos, lo que implica técnicas y métodos que permitan identificar, clasificar y analizar las propiedades que contribuyen a la adecuación del uso de un producto, proceso o servicio, para la mejora y el aseguramiento de la calidad.

Hoy en día los laboratorios farmacéuticos deben demostrar que sus métodos analíticos permiten la determinación simultánea de los principios activos de medicamentos de interés proporcionando resultados fiables, tiempo de análisis cortos, disminución de costos y que son adecuados para la finalidad y propósito perseguido.

V. OBJETIVOS.

V.1. Objetivo general:

Desarrollar y validar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación simultánea de ambroxol y clenbuterol en jarabes.

V.2. Objetivos específicos:

- Seleccionar las condiciones cromatográficas preliminares.
- Evaluar las condiciones cromatográficas preliminares.
- Determinar las condiciones cromatográficas de trabajo.
- Optimizar las condiciones cromatográficas encontradas para la determinación simultánea de ambroxol y clenbuterol en jarabes.
- Determinar los parámetros de validación de los procedimientos analíticos para el método desarrollado de ambroxol y clenbuterol combinados en jarabe.
- Validar el método desarrollado.
- Aplicar la metodología validada para el análisis de medicamentos que contengan ambroxol y clenbuterol en jarabes.

VI. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La metodología analítica para la determinación de ambroxol y clenbuterol en jarabe mediante HPLC, fue desarrollada y validada empleando los equipos, reactivos y solventes que se mencionan a continuación:

VI.1. Instrumentación.

- Cromatógrafo líquido de alta eficiencia Waters, conformado por:
 - 1- Bomba, modelo 600E Millipore.
 - 2- Automuestreador, modelo 717 plus Autosampler.
 - 3- Detector de UV-visible con arreglo de diodos, modelo 996 PDA.
 - 4- Programa para la adquisición y procesamiento de datos del sistema cromatográfico, *Millennium32*. Incorpora el comando de análisis de pureza de pico para permitir la detección de las impurezas que estén coeluyendo con las bandas cromatográficas de interés.
- Columna X Terra RP₁₈ (3,5µm, 4,6x 100 mm) Lote= 3481.
- Balanzas microanalíticas, Mettler-Toledo, modelo AG245 de capacidad máxima (210,0000 ± 0,0001) g y Adventurer OHAUS, modelo AR3130 de capacidad máxima (310,000 ± 0,001) g.
- Purificador de agua Nanopure, sistema de agua ultrapura.
- pHmetro Thermo Electron Corporation Orion, modelo 420 At.
- Bomba de vacío Gast, modelo DQA-P104-AA.
- Plancha de calentamiento con agitación magnética. Barnstead Thermolyne, modelo sp131325.
- Ultrasonido Branson, modelo 5200.
- Agitador mecánico Vortex, modelo Genie 2 Daigger.

VI.2. Materiales y equipos para filtración.

- Equipo de filtración de vidrio Millipore.
- Equipo de filtración de acero inoxidable para muestras.
- Membranas filtrantes EM Nylon 0,45 μm .

VI.3. Reactivos y solventes.

- Acetonitrilo (CH_3CN) grado HPLC, 100% de pureza. Mallin ckrodt ChromAR HPLC.
- Metanol (CH_3OH) grado HPLC, 99,9 % de pureza. Merck KgaA.
- Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), 99,5-100,5 % de pureza. Riedel-de Haën.
- Hidróxido de sodio (NaOH), 99 % de pureza. Merck KgaA.
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2), 35 % en peso. Riedel-de Haën.
- Ácido clorhídrico (HCl), 37 % de pureza. Merck KGaA.
- Ácido fosfórico (H_3PO_4), 85 % de pureza. Fisher Scientific.
- Ácido 1-octano sulfónico, 98% de pureza. Sigma.
- Ácido 1-hexano sulfónico, 98% de pureza. Kodak.
- Ácido pentano sulfónico. 99% de pureza. Merck.
- Acetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) 99,5 % de pureza. Riedel-de Haën
- Agua 18 $\text{M}\Omega$, obtenida por una combinación de un sistema de pre-tratamiento y desionización. Cascada RO MK2 –Pall Corporation. Barnstead, Nanopure.

VI.4. Patrones.

Se trabajó con los siguientes patrones secundarios de referencia:

- Clorhidrato de Ambroxol. Lote: 511600574001. Fabricante: Baselux S.A. Fecha de expiración: 02-2021. Pureza= 99,5%.

- Clorhidrato de Clenbuterol. Lote: CBH-0050915. Fabricante: Planehill LTD. Fecha de expiración: 08-2020. Pureza=100,91%.

VI.5. Muestra.

Se analizaron dos medicamentos, vigentes para la fecha de estudio, en actual comercialización y expendio en Venezuela, que declara como principios activos clenbuterol y ambroxol, en su forma farmacéutica jarabe de 120mL. Cada 5mL de jarabe contenía 10 µg de clenbuterol y 15 mg de ambroxol.

Tabla 9. Características organolépticas de las muestras utilizadas.

Medicamento	Envase	Color	Olor	pH $\pm$ 0,01	Densidad (g $\pm$ 0,0003) g/mL	Fecha de vencimiento
A	Frasco de vidrio color ámbar de 120 mL	Amarillento	Dulce	2,98	1,2268	05-2019
B	Frasco de vidrio color ámbar de 120 mL	Amarillento	Dulce	3,08	1,2100	02-2020

*El valor de la densidad fue determinado a $(25,0 \pm 0,2)$ °C de temperatura.

El medicamento A fue empleado para el desarrollo y validación de la metodología. Para trabajar con esta muestra se procedió a preparar un material de referencia interno (MRI), mezclando y homogeneizando el contenido de cinco frascos de este lote, que luego fue transferido a un recipiente de vidrio actínico. El mismo fue almacenado bajo condiciones de refrigeración.

El MRI es un material en el que uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneos y están bien definidos para permitir utilizarlos en la

evaluación de un método de medición, o la asignación de valores a los materiales, y es preparado por un laboratorio para su propio uso [30].

VI.6. Desarrollo de la metodología experimental.

Se realizaron distintas pruebas preliminares, con la finalidad de evaluar si con los insumos y materiales disponibles en el laboratorio era posible el desarrollo de una metodología por HPLC, para la determinación simultánea de ambroxol y clenbuterol.

Una vez establecidas las condiciones preliminares se procedió a optimizar las condiciones del método cromatográfico, hasta obtener la mejor separación en el menor tiempo posible.

VI.6.1. Condiciones cromatográficas preliminares para la determinación simultánea de ambroxol y clenbuterol.

De acuerdo a la información obtenida en la literatura y en función a los insumos existentes en el laboratorio, se procedió a evaluar diferentes condiciones preliminares para el desarrollo de la metodología analítica.

VI.6.1.1. Preparación de solución amortiguadora /par iónico

Se pesaron aproximadamente 3,00 g de ácido 1-octano sulfónico y 5,00 g de KH_2PO_4 en 900 mL de agua, ajustando pH con ácido fosfórico diluido (1 en 10) a un valor de 3,0; y finalmente se diluyó con agua hasta alcanzar 1000 mL.

VI.6.1.2. Preparación de fase móvil.

Se preparó una mezcla de acetonitrilo, metanol, y solución amortiguadora/par iónico en proporción 20:20:60 %v/v.

VI.6.1.3. Pruebas de solubilidad de los patrones

Previo al análisis cromatográfico se realizaron pruebas de solubilidad a los patrones, ya que se debe garantizar la completa solubilidad de los analitos de interés antes de ser inyectados al sistema de HPLC. Esta prueba se realizó tomando una pequeña porción de los patrones por separados y se añadió en los siguientes solventes: acetonitrilo, metanol, agua y fase móvil. Resultando soluble en los distintos solventes antes mencionados.

VI.6.1.4. Preparación de patrones.

- Clenbuterol: Se preparó un patrón de clenbuterol de 2,0 mg/mL; pesando 10 g de patrón secundario de clenbuterol, en un balón de 5 mL, se adicionó aproximadamente 2 mL de la fase móvil y se agitó mecánicamente por un minuto, se llevó a volumen con la fase móvil.
- Ambroxol: Se preparó un patrón de ambroxol de 2,0 mg/mL; pesando 10 g de patrón secundario de ambroxol, en un balón de 5 mL, se adicionó aproximadamente 2 mL de la fase móvil y se agitó mecánicamente por un minuto, se llevó a volumen con la fase móvil.
- Preparación del patrón combinado de ambroxol y clenbuterol: Se preparó un patrón combinado de ambroxol 0,9 mg/mL y clenbuterol 6×10^{-4} mg/mL, empleando como disolvente la fase móvil

Seguidamente, se procedió a realizar los cromatogramas de los patrones de manera individual, a fin de estudiar las señales cromatográficas de cada patrón. En las figuras 10 y 11 se muestran los cromatogramas de los patrones de ambroxol y clenbuterol realizados bajo las condiciones cromatográficas preliminares.

VI.6.1.5. Tratamiento del material de referencia interno previo al análisis.

Se pesaron 3,0 mL del MRI, se añadió un volumen de 5 mL de fase móvil, seguido de agitación mecánica por un minuto. Luego se llevó a un volumen final de 10 mL con fase móvil.

Todas las soluciones fueron filtradas por membrana de 0,45 μm antes de ser inyectadas en el cromatógrafo.

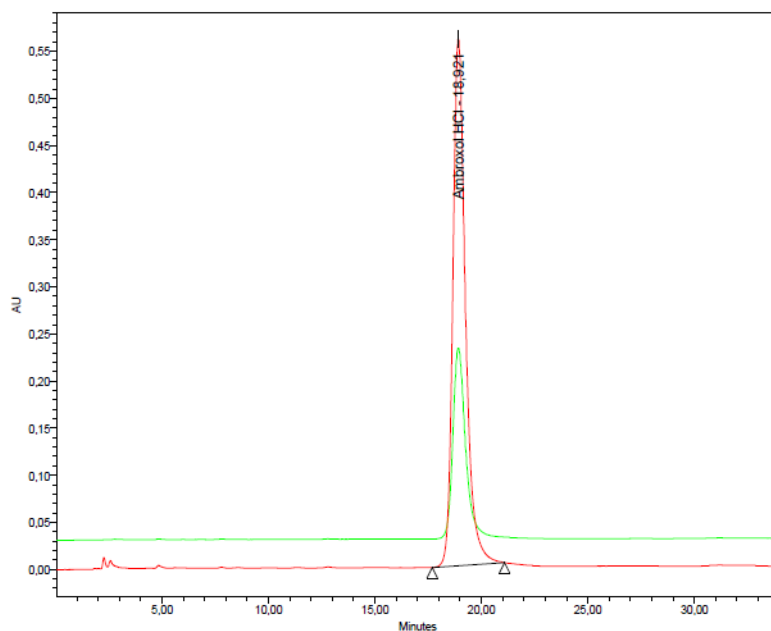


Figura 10. Cromatograma de ambroxol a 211 nm (rojo) y 245 nm (verde).

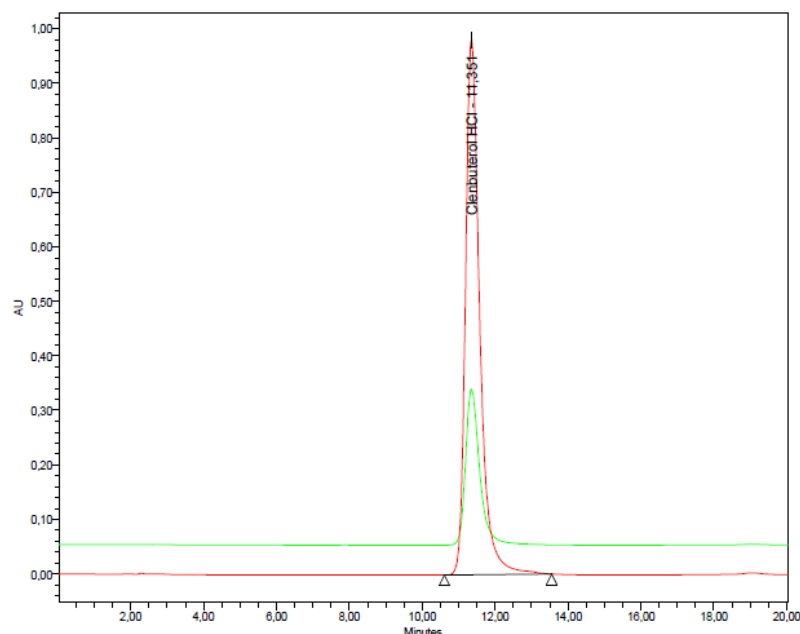


Figura 11. Cromatograma de clenbuterol a 211 nm (rojo) y 245 nm (verde).

VI.6.1.6 Determinación de la longitud de onda de trabajo.

En la determinación de longitud de onda de trabajo se utilizaron los patrones anteriormente descrito en la sección VI.6.1.4. El uso de arreglos de diodos (PDA) acoplado al HPLC, permitió realizar el estudio espectral de ambas moléculas. El barrido de longitudes de onda fue realizado en el rango UV de 200 a 400 nm. En la figura 12 se presentan los espectros de absorción molecular correspondientes a los patrones de ambroxol y clenbuterol.

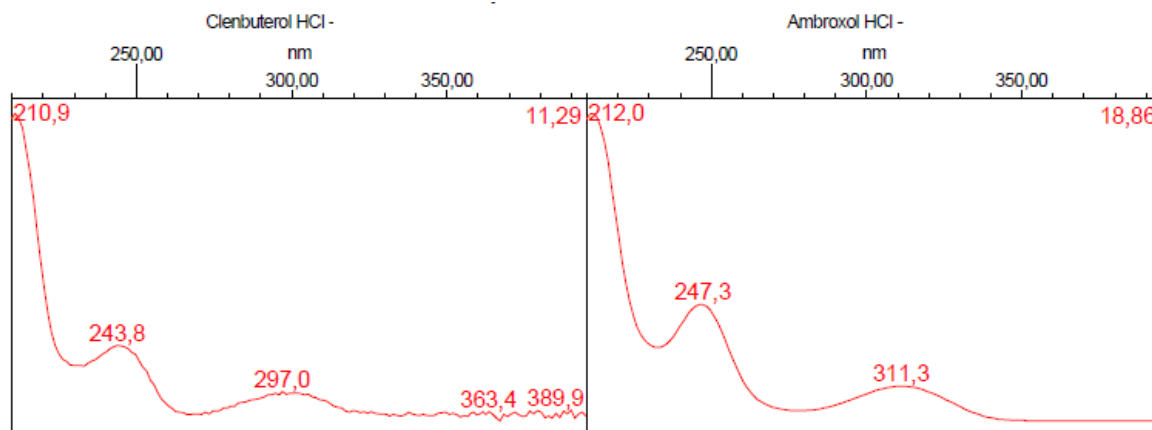


Figura 12. Espectros UV-Visible de ambroxol y clenbuterol en un rango de 200 a 400 nm.

En la figura 12 se puede observar el espectro de absorción molecular correspondiente al clenbuterol la presencia de tres bandas: a 210,9nm y otras dos de menor intensidad a 243,8 nm y 297,0 nm. Para el espectro de absorción molecular correspondiente al ambroxol se observó la presencia de tres bandas: una banda a 212,0 nm y otras dos de menor intensidad a 247,3nm y 311,3nm, respectivamente.

Los máximos de absorción de ambas especies están muy próximos (210,9 y 212,0) nm y (243,8 y 247,3) nm, lo que hace posible establecer una longitud de onda de trabajo correspondiente a los 211 nm ó 245 nm. (Ver figura 10 y 11). Sin embargo, se decidió trabajar a 245 nm porque el corte de longitud de onda de los solventes (acetonitrilo =190 nm y metanol=205 nm) son muy cercanos a 211 nm haciéndola más susceptible a interferencias espectrales.

VI.6.1.7 Condiciones cromatográficas.

Se utilizó una elución isocrática a temperatura ambiente y una longitud de onda de 245nm y un volumen de inyección de 15 μ L.

VI.6.1.8 Selección de la fase móvil.

En función a la revisión bibliográfica, se evaluaron diferentes fases móviles, realizando cambios en los formadores de par iónico, esto con el propósito de encontrar cuál de ellas es la óptima. Con este propósito se evaluaron los parámetros : factor de simetría (As), resolución (Rs) que es una medida cuantitativa de la capacidad para separar dos analitos y factor de capacidad (k'), este último nos describe el grado de retención de los analitos dentro de la columna que también afecta la resolución cromatográfica.

La prueba 1 (USP 38) [23], está basada en la determinación de la mezcla clenbuterol-ambroxol empleando una solución amortiguadora con un formador de par iónico constituido de un compuesto orgánico con grupo sulfónico. Este compuesto está cargado negativamente y puede interactuar con los grupos aminos de los compuestos de interés para mejorar su retención en columnas C18. Es así que la primera fase móvil ensayada contiene entonces ácido 1-octano sulfónico y fosfato monobásico de potasio (este último formando buffer con H_3PO_4 para control de pH), obteniendo los siguientes tiempos de retención: 11,28 minutos para el clenbuterol y 18,92 minutos para el ambroxol, para un tiempo total de corrida de 22 minutos aproximadamente. El cromatograma obtenido se presenta en la figura 13.

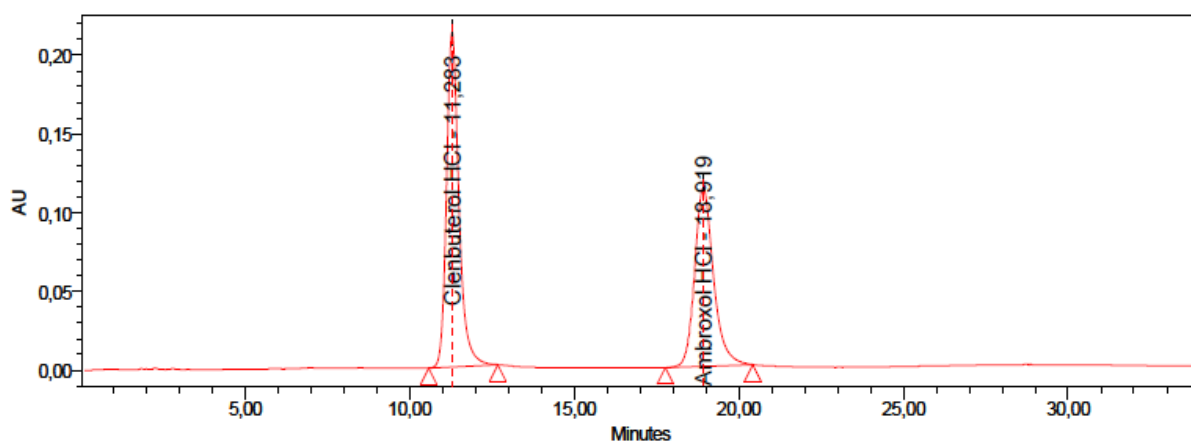


Figura 13. Cromatograma de patrones de clenbuterol y ambroxol (prueba 1).

Se calculó el factor de capacidad (k'), siendo de 2,5 para clenbuterol y 5,0 para ambroxol. Estos valores se consideran aceptables, ya que k' debe ser mayor a 1 y menor a 10 para garantizar una retención óptima de los analitos en la fase estacionaria. Y se obtuvo una R_s de 7,63; y se dice que si es mayor a 1, se obtiene una resolución aceptable con bajo grado de solapamiento ($< 4\%$). Se observa que el factor de asimetría fue de 1,0 para el clenbuterol y 1,2 para el ambroxol, indicando que las bandas cromatográficas son simétricas, ya que el valor óptimo es 1,00 y el máximo de aceptación es de 1,50 [17].

La prueba 2 se realizó partiendo del hecho que la mejor corrida cromatográfica es aquella que realiza una conveniente separación en el menor tiempo posible, pero sin sacrificar figuras de mérito cromatográficas de k' y R_s . Se procedió a cambiar el formador de par iónico disminuyendo la longitud de cadena orgánica de este compuesto, esto con el propósito disminuir la retención de los analitos en la fase estacionaria y por lo tanto disminuir el tiempo de retención. Tomando como referencia el método reportado por Arteaga [19], utilizando como formador de par iónico al ácido 1-hexanosulfonato de sodio. En la figura 14, se puede observar una banda correspondiente al clenbuterol en 6,7 minutos, mientras que el ambroxol presenta una banda en 9,8 minutos. Se calculó el factor de capacidad (k') siendo de 1,2 para el clenbuterol y 2,2 para el ambroxol respecto al tiempo muerto lo que es aceptable, se obtuvo una buena resolución cromatográfica (R_s) de 5,1 y se observa en el caso de ambroxol que el factor de simetría se encuentra muy cercano al valor superior de aceptación para este parámetro. Se considera una fase móvil adecuada, logrando una buena separación en el menor tiempo posible.

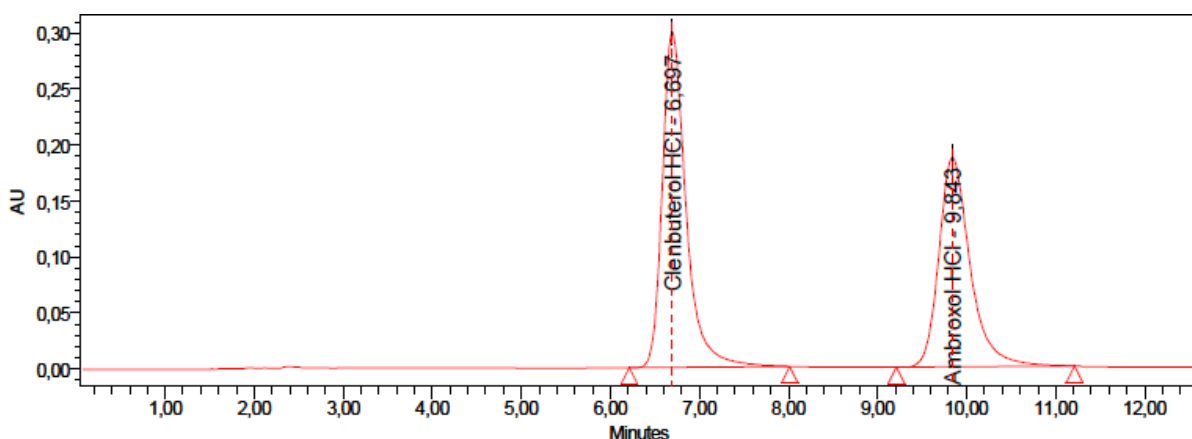


Figura 14. Cromatograma de patrones de clenbuterol y ambroxol (prueba 2).

La prueba 3 se realizó con el objetivo de evaluar nuevamente la posibilidad de separar los analitos en el menor tiempo sin afectar los parámetros cromatográficos, utilizando esta vez ácido 1-pentanosulfonato de sodio. Se observa que con este formador de par iónico los tiempos de retención se desplazan a valores menores, específicamente 5,5 minutos para clenbuterol y 7,6 minutos para ambroxol, para un tiempo total de corrida de 10 minutos aproximadamente, pero al calcular el factor de capacidad (k') se obtuvo un valor de 0,8 para el clenbuterol y 2,3 para el ambroxol ; este resultado se encuentra por debajo del intervalo óptimo esperado (de 1 a 10) para el clenbuterol, y se obtuvo una R_s de 4,21, y un factor de simetría dentro del límite superior de aceptación. Por tal motivo se decidió continuar con las pruebas empleando las fases móviles de las pruebas 1 y 2.

En la figura 15 se observa el cromatograma correspondiente al clenbuterol y ambroxol para la prueba 3.

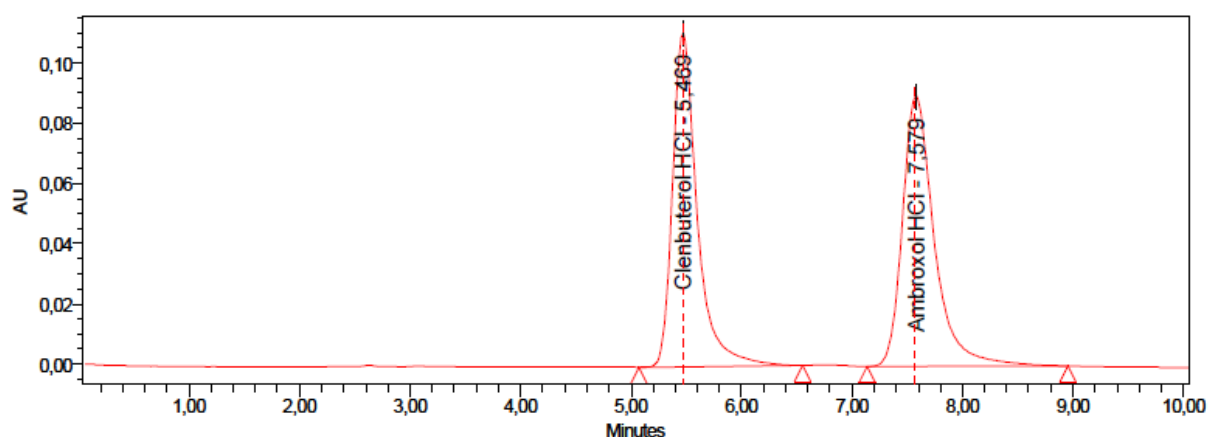


Figura 15. Cromatograma de patrones de clenbuterol y ambroxol (prueba 3).

En la tabla 10 se muestran las distintas fases móviles utilizadas. Es importante destacar que se incluye la inyección de acetona, ya que la misma fue utilizada para determinar el tiempo muerto (t_m), este dato es necesario para poder evaluar el factor de capacidad k' .

Tabla 10. Pruebas para la selección de la fase móvil para la separación cromatográfica del ambroxol y clenbuterol.

Prueba	Fase móvil	Flujo (mL/min)	Volumen de inyección (μ L)	Tiempo de retención (min)			k'		R _s	A _s	
				Clen	Amb	Acet	Clen	Amb		Clen	Amb
1	Acetonitrilo, metanol, solución amortiguadora (KH ₂ PO ₄ y ácido 1-octano sulfónico, pH 3,01 ajustado con H ₃ PO ₄). (20:20:60 %V/V) pH 3,77	0,5	15	11,28	18,92	3,1	2,5	5,0	7,6	1,0	1,2
2	Acetonitrilo, metanol, solución amortiguadora (KH ₂ PO ₄ y ácido 1- hexano sulfónico, pH 3,00 ajustado con H ₃ PO ₄). (20:20:60 %V/V) pH 3,84			6,697	9,843	3,0	1,2	2,2	5,0	1,1	1,4
3	Acetonitrilo, metanol, solución amortiguadora (KH ₂ PO ₄ y ácido 1-pentano sulfónico, pH 3,00 ajustado con H ₃ PO ₄). (20:20:60 %V/V) pH= 3,77			5,469	7,579	3,0	0,8	2,3	4,2	1,4	1,5

Clen: Clenbuterol; Amb: Ambroxol; Acet: Acetona.

Se continuó la evaluación de las condiciones cromatográficas, esta vez realizando las inyecciones del MRI, a fin de estudiar las posibles interferencias de los excipientes de la formulación y establecer con cuál de las fases móviles se logra una mejor separación de los componentes de la matriz de la muestra.

La cuarta prueba se realizó empleando la fase móvil utilizada en la prueba 2, pero inyectando muestra. El resultado de esta prueba puede observarse en la figura 16, en ella se aprecian las señales correspondientes a clenbuterol (6,72 minutos) y ambroxol (10,07 minutos) y a los 8 minutos se observa una señal intensa entre las bandas de ambroxol y clenbuterol, esta puede ser atribuida a los excipientes y conservantes que presenta el jarabe. Esta señal está muy cercana a la de clenbuterol. Se procedió a calcular el factor de capacidad (k') siendo para el clenbuterol de 1,3 y para el ambroxol de 2,3 y una resolución con respecto a la banda de gran intensidad para cada uno de los analitos obteniendo para el clenbuterol una R_s de 2,1 y para el ambroxol una R_s de 3,8. Al evaluar el factor de simetría se observa que la banda de ambroxol es simétrica ya que se obtuvo un valor de 1,1.

A pesar de encontrar resultados adecuados en la evaluación de condiciones cromatográficas, esta fase móvil no logra alejar la señal de clenbuterol del excipiente, por tal motivo se considera hacer otra prueba aumentando el peso molecular del formador iónico con la finalidad de lograr una mejor separación.

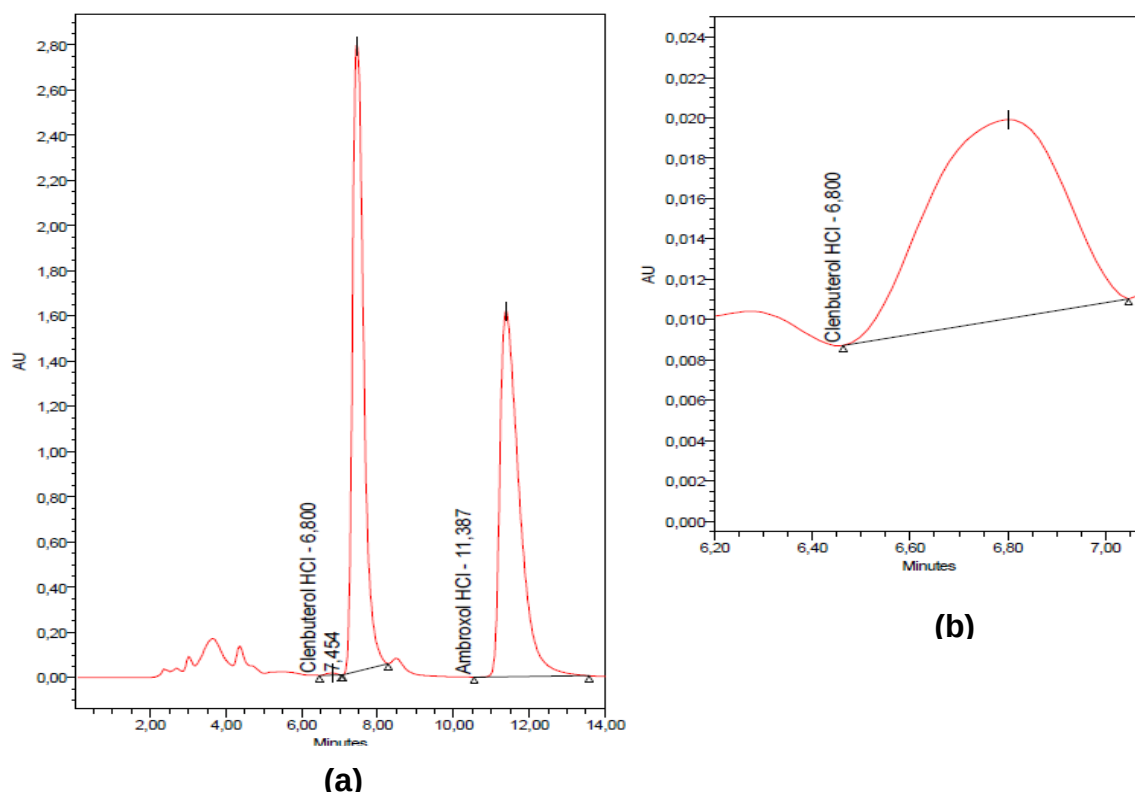


Figura 16. (a) Cromatograma del MRI (b) ampliación de la señal cromatográfica correspondiente a clenbuterol (prueba 4).

La prueba 5 se realizó utilizando como formador de par iónico el ácido 1-octanosulfónico (fase móvil de la prueba 1), se obtuvo el cromatograma de la figura 17 en el que se observan las bandas de clenbuterol y ambroxol en 11,7 minutos y 20,0 minutos, respectivamente. Como se aprecia en este cromatograma el excipiente que interfería con el clenbuterol en el cromatograma anterior, mantiene su tiempo de retención, por lo que este cambio permitió mejorar la separación de los componentes de interés con respecto a los componentes de la matriz de la muestra de una manera más eficiente. Así mismo, a pesar de tener una banda de baja intensidad próxima a la banda del ambroxol, esta muestra una resolución de 1,71; por lo que las condiciones cromatográficas se pueden considerar satisfactorias, obteniendo un factor de capacidad de 2,9 para clenbuterol y 5,6 para el ambroxol; una resolución entre la señal del excipiente y la del clenbuterol de 3,9 y factor de

simetría para la señal de ambroxol de 1,0. Por estas razones se decidió continuar el desarrollo del método con esta fase móvil.

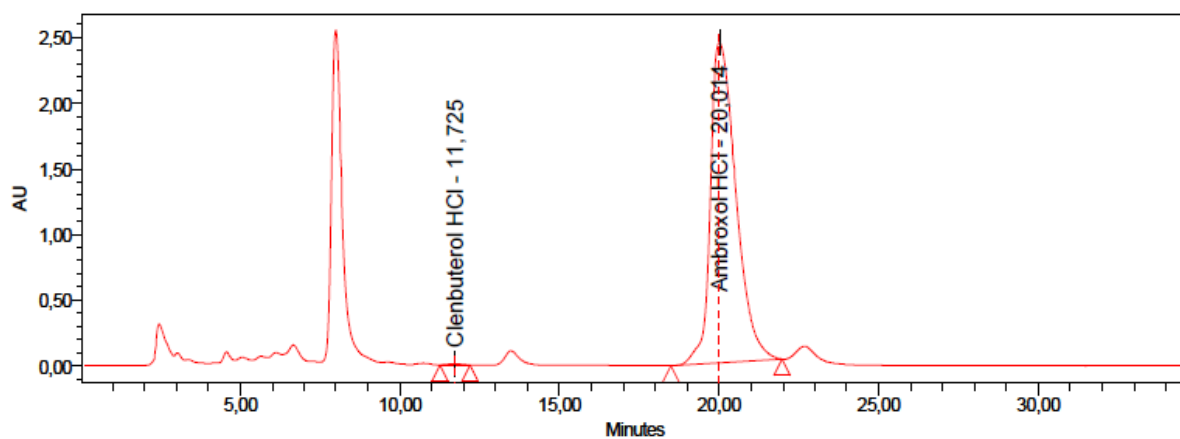


Figura 17. Cromatograma correspondiente al clenbuterol y ambroxol utilizando la prueba 5.

En la tabla 11 se presentan los resultados obtenidos en las pruebas 4 y 5

Tabla 11. Continuación de las pruebas para la selección de la fase móvil para la separación cromatográfica del ambroxol y clenbuterol.

Prueba	Fase móvil	Flujo (mL/min)	Volumen de inyección (μ L)	Tiempo de retención (min)		k'		Rs	As
				Clen	Amb	Clen	Amb		
4	acetonitrilo, metanol, Solución amortiguadora(KH_2PO_4 y ácido 1-hexano sulfónico ajustado con H_3PO_4) a pH $3,95 \pm 0,05$.(20:20:60 %V/V)	0,5	15	6,72	10,07	1,3	2,3	Clen con respecto al excipiente=2,1 Amb con respecto al excipiente = 3,8	1,1
5	acetonitrilo, metanol, Solución amortiguadora (KH_2PO_4 y ácido 1-octano sulfónico ajustado con H_3PO_4) a pH $3,95 \pm 0,05$.(20:20:60 %V/V)			11,72	20,01	2,9	3,9	Clen con respecto al excipiente=3,9 Amb con respecto al pico más cercano = 1,71	1,0

VI.6.1.9 Optimización de las Condiciones Cromatográficas.

Una vez seleccionada la fase móvil, se procedió a optimizar las condiciones cromatográficas para el análisis. A pesar de obtener resultados relativamente aceptables con las pruebas anteriores, se decidió continuar en la búsqueda de disminuir el tiempo de análisis, para ello se decidió cambiar el flujo de 0,5 a 1,5 mL/min, observándose que la presión en el sistema cromatográfico era aceptable y no representaba un daño para la columna (1500 psi). Finalmente se procedió a aumentar la proporción de la solución acuosa amortiguadora, y disminuir la proporción de metanol, esto con la finalidad de disminuir la afinidad de los analitos de interés a la fase estacionaria.

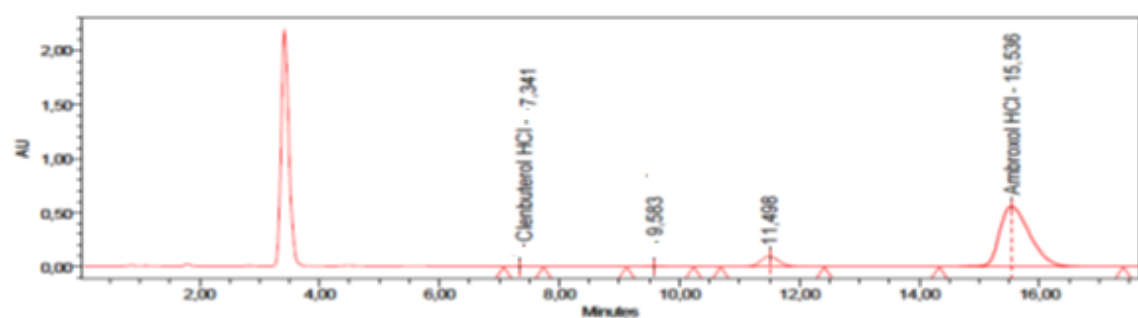


Figura 18. Cromatograma con las condiciones cromatográficas establecidas.

En la figura 18 se observan las dos bandas correspondientes a ambroxol y clenbuterol. Adicionalmente presenta dos bandas minoritarias con tiempo de retención de 9,58 minutos y 11,50 minutos; y una banda de gran intensidad a aproximadamente 3 minutos que no interfieren con los analitos de interés, lo que indica que las condiciones cromatográficas establecidas pueden ser empleadas para la determinación de los principios activos objeto de estudio. Calculando nuevamente los parámetros cromatográficos se obtuvo un factor de capacidad de 1,4 para clenbuterol y 4,2 para ambroxol y una resolución cromatográfica de 5,6. Ambos resultados se consideran idóneos para continuar con la validación de la metodología.

Las condiciones cromatográficas definidas para la metodología analítica se presentan en la tabla 12.

Tabla 12. Condiciones cromatográficas definidas.

Fase móvil	Acetonitrilo, metanol, solución amortiguadora (ácido 1-octano sulfónico y KH_2PO_4 pH 3,70 ajustado con H_3PO_4). (15:20:65 %V/V).
pH de la fase móvil	(3,70 $\pm$ 0,05)
Flujo de la fase móvil	1,5mL/min
Volumen de inyección	15,0 μL
Temperatura	Ambiente
Columna	X Terra RP18 (3,5 μm , 4,5x 100 mm)
Detector	Detector UV-Visible de arreglo de diodos, PDA
Longitud de onda	245nm

VI.6.2 Evaluación de la aptitud del sistema cromatográfico.

Antes de comenzar cualquier trabajo cromatográfico, es importante garantizar que el equipo se encuentra en condiciones óptimas para ser utilizado, para ello se realizan las pruebas de adecuación o aptitud del sistema. Esta prueba consistió en estudiar la dispersión de los valores de tiempo de retención y área de señal cromatográfica de los analitos de interés. Para ello se realizaron 5 inyecciones consecutivas de un patrón combinado que contenía 1,2 mg/mL de ambroxol y 0,8 mg/mL de clenbuterol bajo las condiciones de análisis presentadas en la tabla 12. Se determinaron los valores de promedio, desviaciones estándar y coeficientes de variación de cada parámetro. En la tabla 13 se presentan los resultados estadísticos obtenidos, el conjunto de datos individuales son exhibidos en el apéndice A.

Los resultados obtenidos para ambos parámetros indican una dispersión poco significativa del conjunto de datos, al presentar coeficientes de variación alrededor del 1 %, valores que se encuentran dentro de los límites establecidos para métodos cromatográficos, la USP establece valores menores al 2 %. [22]

Se evaluó la aptitud de sistema cromatográfico a través del estudio de las figuras de mérito: factor de capacidad (k), resolución cromatográfica (Rs) y factor de asimetría (As).

Se obtuvo un factor de capacidad de 1,3 para clenbuterol y 3,8 para ambroxol; una resolución de 5,76 y un factor de asimetría de 1,0 para el clenbuterol y 0,8 para el ambroxol. Los valores obtenidos en los cálculos de los factores cromatográficos son adecuados, ya que se encuentran dentro de los límites de aceptación.

Tabla 13. Pruebas de aptitud del sistema cromatográfico.

Analito	Clenbuterol		Ambroxol	
Parámetro	Tiempo de retención (min)	Área	Tiempo de retención (min)	Área
Promedio	7,44	26136	15,77	29643799
D.E	0,01	91	0,02	250289
C.V	0,12	0,4	0,12	0,8

D.E.= desviación estándar; C.V= coeficiente de variación.

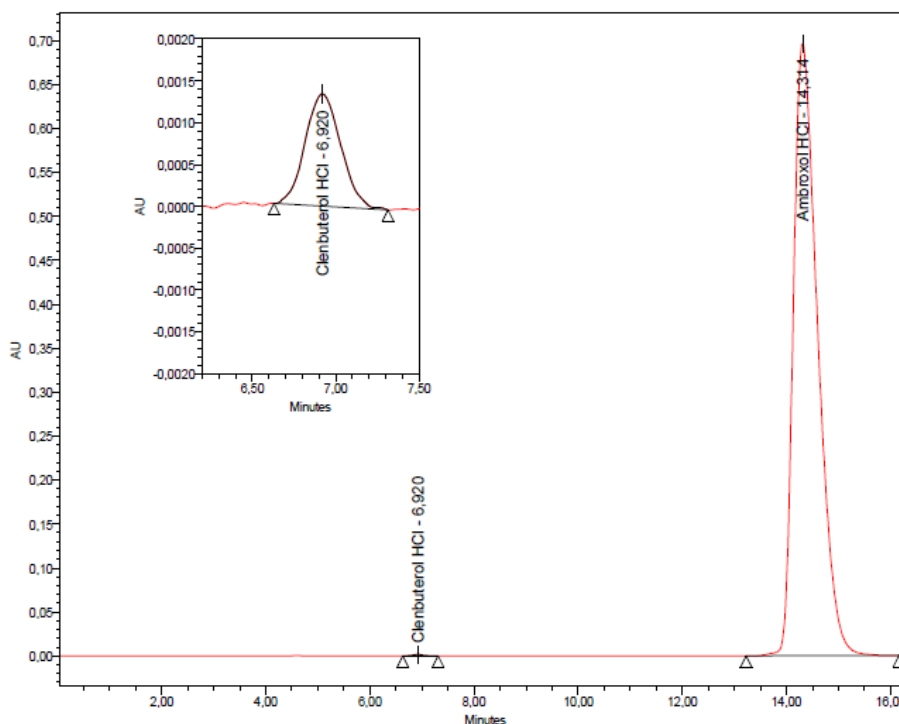


Figura 19. Cromatograma de patrón combinado de clenbuterol y ambroxol.

Una vez desarrollada la metodología analítica se procedió a determinar y evaluar los parámetros de calidad requeridos por la categoría I del apartado <1225> de la USP para la cuantificación de principios activos en productos farmacéuticos terminados [22].

VI.7.1 Linealidad.

La evaluación de la linealidad se realizó durante tres días seguidos, a fin de evaluar la relación existente entre las concentraciones y las señales cromatográficas obtenidas en un rango previamente establecido.

Para la selección de los rangos de concentración se tomó en cuenta los valores de referencia reportados para los fármacos en estudio, los cuales declaran que cada 5 mL de jarabe (dosis recomendada), contiene 10 µg de clenbuterol y 15 mg de

ambroxol. Se realizaron las diluciones para obtener concentraciones de 1,56 mg/mL para ambroxol y 1,152 µg/mL para clenbuterol. Estos valores se establecieron como el nivel de 100 %.

El estudio de la linealidad del método se basó en la construcción de curvas de calibración, las cuales fueron realizadas en días diferentes a partir de cinco niveles de concentración correspondientes a 50, 80, 100, 120 y 130 % del valor de referencia de acuerdo a la concentración del fármaco, tanto para el ambroxol como para el clenbuterol. Los cinco niveles de concentración antes mencionados, contemplan un rango de concentración entre 0,78 mg/mL a 1,95 mg/mL para el ambroxol y 0,576 µg/mL a 1,4976 µg/mL para el clenbuterol. Finalmente, se inyectó en el cromatógrafo cada patrón por duplicado y se construyó cada curva de calibración.

Tabla 14 Concentración de los analitos a partir de diferentes niveles del patrón.

Patrón (%)	Concentración	
	Ambroxol (mg/mL)	Clenbuterol (µg/mL)
50	0,78	0,58
80	1,20	0,92
100	1,56	1,15
120	1,82	1,38
130	1,95	1,50

La ecuación de la regresión lineal fue calculada para cada analito y sus respectivas curvas de calibración fueron construidas trazando el área de la señal cromatográfica en función de la concentración del analito correspondiente. Los datos detallados son exhibidos en el apéndice B. Las curvas de calibración de las tres regresiones

lineales desarrolladas son presentadas a continuación, en los gráficos 1, 2 y 3, para el ambroxol y en los gráficos 4, 5 y 6, para el clenbuterol.

Gráfico 1. Linealidad día 1 para el ambroxol.

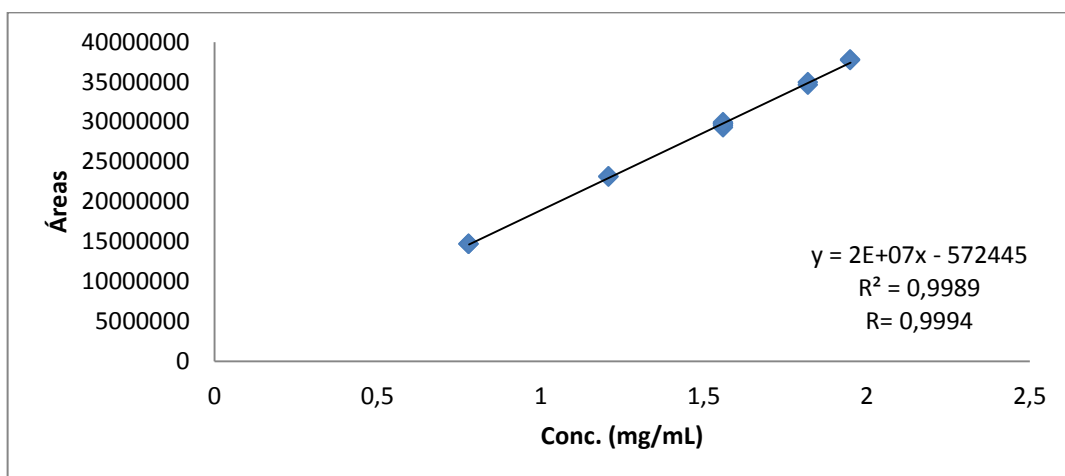


Gráfico 2. Linealidad día 2 para el ambroxol.

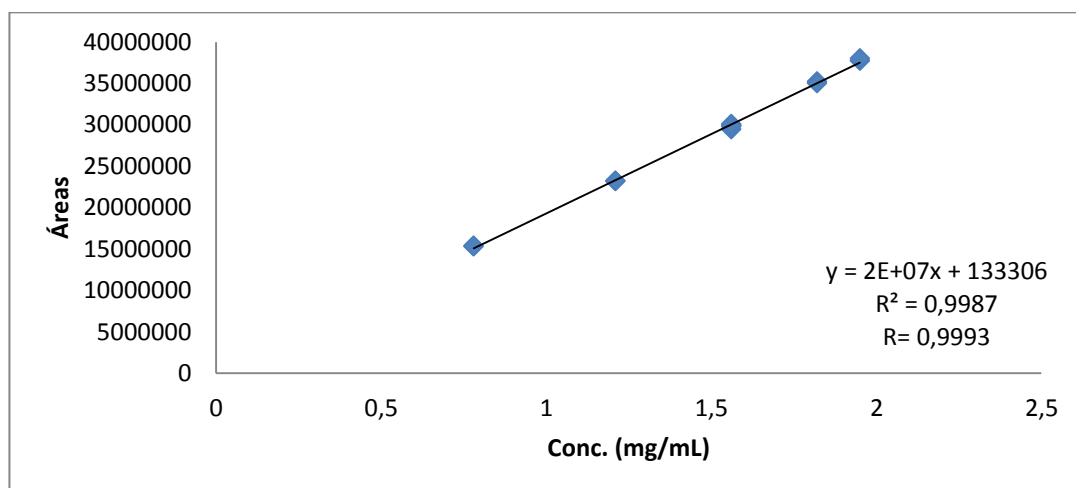


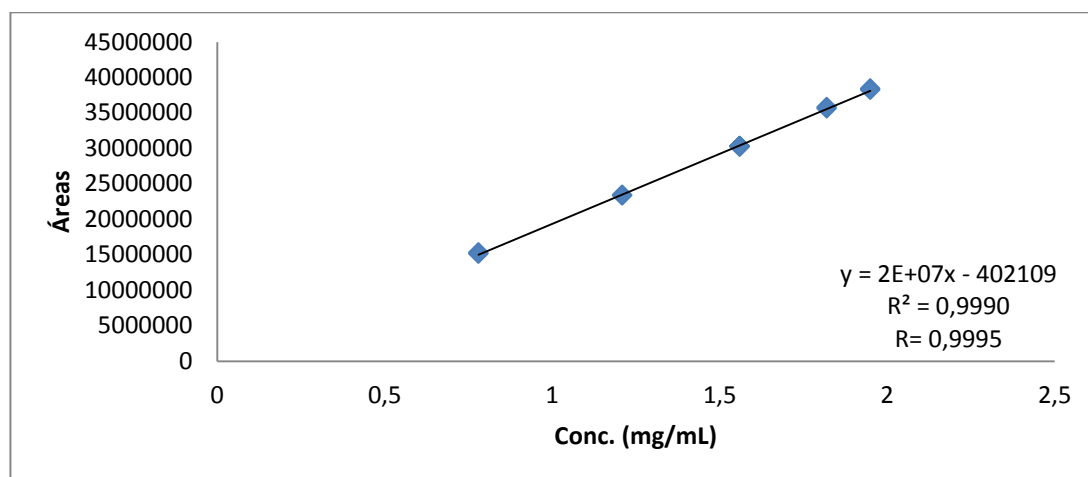
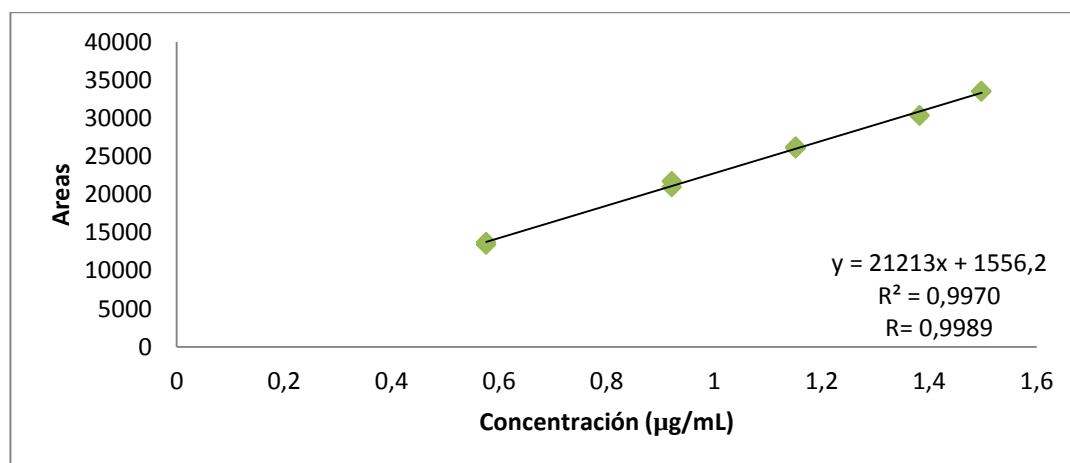
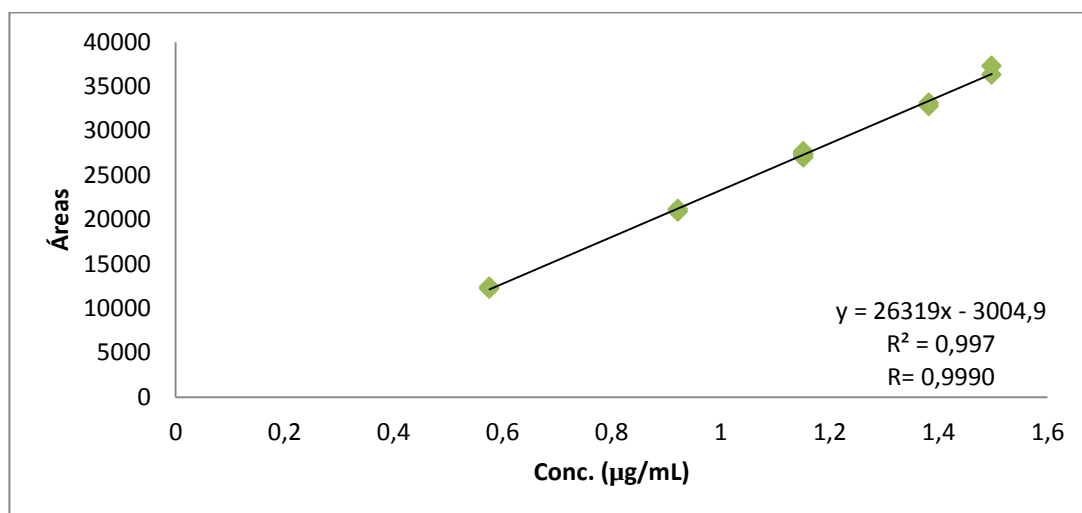
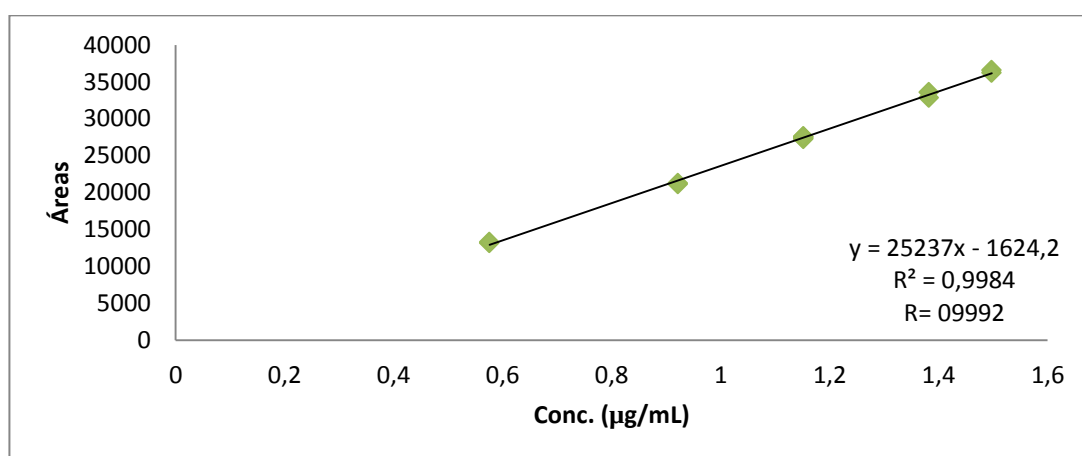
Gráfico 3. Linealidad día 3 para el ambroxol.**Gráfico 4.** Linealidad día 1 para el clenbuterol.

Gráfico 5. Linealidad día 2 para el clenbuterol.**Gráfico 6.** Linealidad día 3 para el clenbuterol.

Las curvas de calibración obtenidas demuestran que el método es lineal, ya que existe proporcionalidad entre las áreas y la concentración de ambos analitos en diferentes días de estudio, presentando valores de $R \geq 0,999$ que cumplen con los criterios de aceptación establecidos en la USP e ICH, adicionalmente el coeficiente de determinación (R^2) aporta una mayor significación estadística, por ser R^2 un parámetro de mejor ajuste.

La información obtenida con el cálculo de los coeficientes de correlación y determinación es limitada, y no justifica por sí sola la linealidad, es por ello que es importante sustentar este resultado con pruebas que permitan evaluar la pendiente, esto se realizó a través de la *determinación del coeficiente de variación de los factores de respuestas*, siendo el factor de respuesta (f) la relación entre la lectura o respuesta y la concentración y puede tomarse como una expresión aproximada de la sensibilidad de calibración, (área obtenida del patrón/ concentración de analito) cuyo porcentaje del coeficientes de variación de los factores de respuesta $\%CV_f$ no debe ser mayor del 5%[31]. Estos coeficientes se calcularon para cada curva.

En la tabla 15 se muestran los criterios de aceptación para el ambroxol y en la tabla 16 se muestran los criterios de aceptación para el clenbuterol. Los datos detallados se presentan en el apéndice C.

Tabla 15 Criterios de aceptación para la linealidad del Ambroxol.

Parámetros de la linealidad	Curva de calibración		
	Día 1	Día 2	Día 3
Ecuación de la recta	$y = 2E+07x-572445$	$y = 2E+07x-133306$	$y = 2E+07x-402109$
Coeficiente de correlación (R)	0,9994	0,9993	0,9995
Coeficiente de determinación (R^2)	0,9989	0,9987	0,9990
$\% CV_f$	1,01	1,12	0,66

Tabla 16 Criterios de aceptación para la linealidad del Clenbuterol.

Parámetros de la linealidad	Curva de calibración		
	Día 1	Día 2	Día 3
Ecuación de la recta	$y = 21213x + 1556,2$	$y = 26319x - 3004,9$	$y = 25237x - 1624,2$
Coefficiente de correlación (R)	0,9990	0,999	0,9992
Coefficiente de determinación (R^2)	0,9970	0,998	0,998
% CV _f	2,47	4,46	2,25

La linealidad no se vio afectada por la variabilidad de las condiciones operativas y ambientales del estudio en diferentes días. Ya que en las curvas de calibración en los distintos días, tanto para el ambroxol como para clenbuterol, se obtuvo un %CVf menor al 5 %, indicando que existe una correlación lineal significativa entre las áreas obtenidas y la concentración de los analitos [32].

VI.7.2. Especificidad.

La especificidad requiere demostrar que el procedimiento no es afectado por la presencia de impurezas o excipientes. En la práctica, esto se puede hacer enriqueciendo la sustancia de fármaco o producto con niveles apropiados de impurezas o excipientes, demostrando que el resultado del ensayo no se ve afectado por la presencia de estos materiales extraños [22].

Al no contar con estándares de impurezas para llevar a cabo dicho procedimiento, se evaluó la especificidad mediante la comparación de los resultados obtenidos en pruebas con MRI, sometidas a condiciones de estrés, a fin de estudiar la presencia de posibles sustancias degradadas que contuvieran posibles productos de degradación. Estas comparaciones incluyen muestras almacenadas durante siete

días, en condiciones extremas de luz, calor, hidrólisis ácida, hidrólisis básica y oxidación [33].

El procedimiento realizado para la evaluación de la especificidad del método consistió en pesar aproximadamente 5g de MRI, en un matraz aforado de 10,0mL; este procedimiento se realizó para cada una de las condiciones. Seguidamente las muestras fueron sometidas a cada una de las siguientes condiciones de degradación forzada:

- **Fotólisis:** se expuso a un sistema con exposición directa a la luz proveniente de una lámpara provista de un bombillo de 15 W/ 120 V/ 60 Hz, durante siete días.
- **Hidrólisis ácida:** se añadió 1,00mL de ácido clorhídrico (HCl) 0,1N. Se dejó en reposo por 7 días.
- **Hidrólisis básica:** se añadió 1,00mL de hidróxido de sodio (NaOH) 0,1N. Se dejó en reposo por 7 días, durante este procedimiento se observó que la solución se tornó de color blanco.
- **Oxidación:** se le añadió 1,00mL de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3%. Se dejó en reposo por 7 días.
- **Termólisis:** se sometió la muestra a calentamiento en un baño de vapor durante 3 horas a una temperatura controlada en 60°C. procedimiento realizado el mismo día del análisis cromatográfico.

Una vez concluido el tiempo de exposición se procedió a realizar el procedimiento tal como se especifica en el apartado VI.6.1.5. Adicionalmente se preparó un patrón combinado al 100% en concentración 1,56 mg/mL de ambroxol y 1,152 µg/mL de clenbuterol, y la muestra control, que fue preparada, analizada y luego se dejó en reposo durante 7 días, para ser de nuevo analizada a fin de evaluar la degradación de la solución de análisis del medicamento con el tiempo. Posteriormente fueron analizadas bajo las condiciones cromatográficas establecidas para el método

cromatográfico, el software del sistema incorpora el comando de análisis de pureza de la señal cromatográfica, a partir del cual fue posible la evaluación de pureza de las bandas mediante la detección de las impurezas que coeluyeran con el ambroxol y clenbuterol en las diferentes soluciones bajo las condiciones de análisis establecidas.

La determinación de la pureza de pico pudo ser realizada gracias al detector de arreglo de diodos, este es una herramienta poderosa a la hora de verificar la pureza espectral de las señales cromatográficas. Este análisis de pureza máxima puede basarse en la comparación de los diversos espectros registrados durante la elución del pico. Si el pico es puro, entonces la correlación entre el ángulo de pureza (PA) es menor al ángulo del umbral (TH). Si se encuentran desviaciones significativas, esto puede verse como una indicación de impureza.

A continuación se presentan los cromatogramas correspondientes a las pruebas de degradación llevadas a cabo para la evaluación de la especificidad bajo las diferentes condiciones extremas de análisis, así como las representaciones gráficas del nivel de pureza de las señales cromatográficas.

Patrón control.

A partir de un patrón combinado de 1,56 mg/mL de ambroxol y 1,152 µg/mL de clenbuterol, se obtuvo el cromatograma y gráfico de pureza mostrado en la figura 20, donde se pueden apreciar las señales cromatográficas de clenbuterol y ambroxol en 7,8 y 16,8 minutos, respectivamente. En el cromatograma no se evidencia la presencia de especies interferentes, esto se pudo confirmar por la correlación entre el ángulo de pureza (PA) menor al ángulo del umbral (TH), ya que en el gráfico de pureza del primer paso para el ambroxol el valor de $PA = 0,519$ es menor que $TH = 0,993$ y para el clenbuterol el valor de $PA = 6,163$ es menor que $TH = 8,754$. Los valores obtenidos indican que ambas señales cromatográficas corresponden específicamente a los principios activos estudiados.

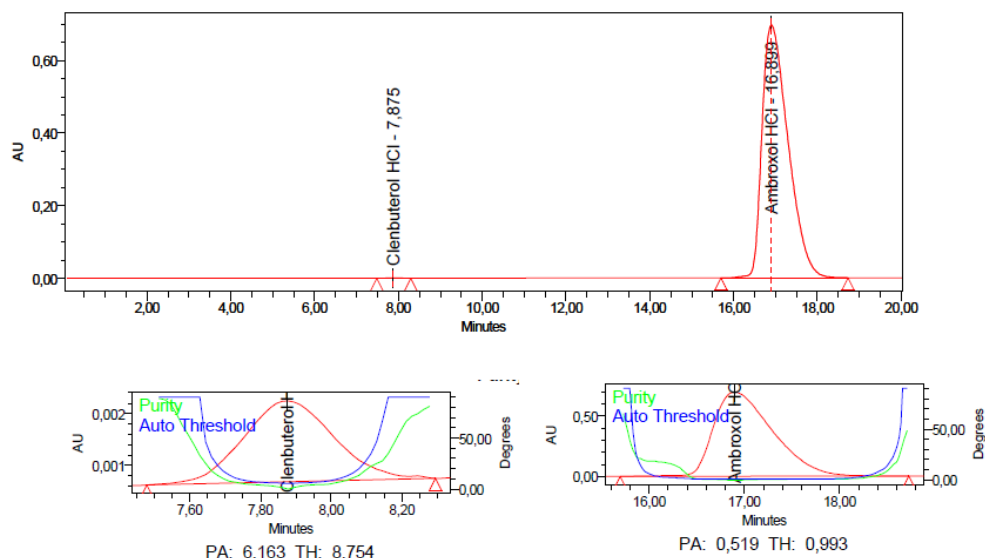


Figura 20. Cromatograma y gráficos de pureza de patrón control.

Muestra control.

La muestra control se preparó el día de la evaluación de especificidad, se obtuvo el cromatograma y gráfico de pureza mostrado en la figura 21, donde se puede apreciar que la banda de clenbuterol eluye a 7,8 minutos y el ambroxol eluye a 16,8 minutos, y ninguno de los dos analitos tienen especies interferentes, lo cual se pudo confirmar por la correlación entre el ángulo de pureza (PA) menor al ángulo del umbral (TH), ya que en el gráfico de pureza del primer paso para el clenbuterol el valor de $PA = 29,555$ es menor que $TH = 90,00$ y para el ambroxol el valor de $PA = 0,935$ es menor que $TH = 1,337$. Cabe destacar que los excipientes presentes en el jarabe no interfieren con las señales de los analitos de interés.

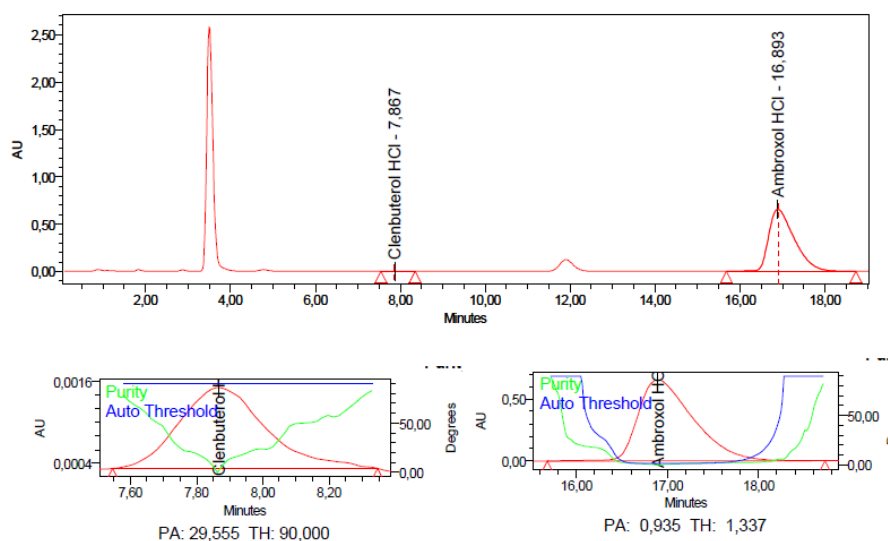


Figura 21. Cromatograma y gráficos de pureza de muestra control.

Las soluciones correspondientes al estándar y muestra control, presentan comportamiento similar tanto en los tiempos de retención como en el área de las bandas cromatográficas del ambroxol y clenbuterol.

Muestra en reposo por 7 días.

La muestra control mencionada anteriormente fue analizada 7 días después, obteniéndose el cromatograma y gráfico de pureza mostrado en la figura 22, donde se puede apreciar que la señal de clenbuterol eluye a 7,47 minutos y el ambroxol eluye a 15,58 minutos, y ninguno de los dos analitos tienen especies que interfieren con su señal, lo cual se pudo confirmar porque la correlación entre el ángulo de pureza (PA) es menor al ángulo del umbral (TH) para ambos analitos.

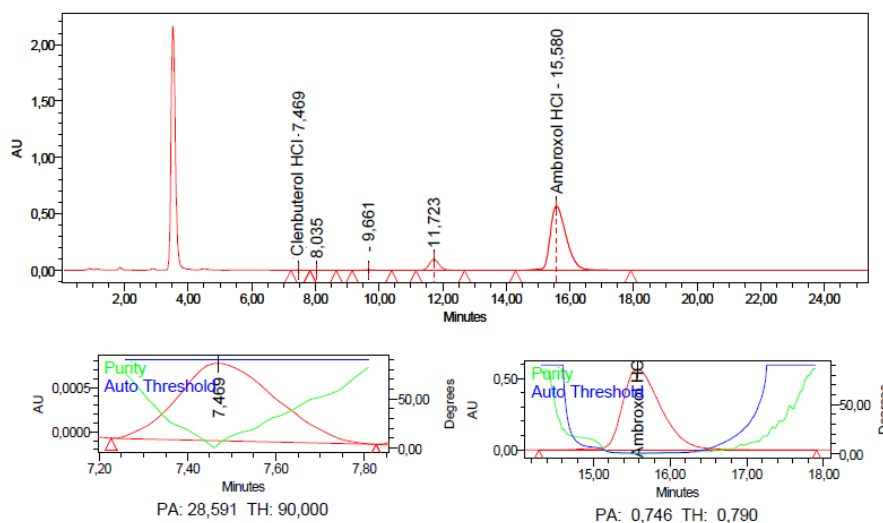


Figura 22. Cromatograma y gráficos de pureza de muestra a los 7 días de su preparación.

Al comparar el área de las señales cromatográficas del ambroxol y clenbuterol en la muestra control el día de preparación y siete días después de su preparación, se observa un cambio en el área de la señal cromatográfica de ambos analitos que puede deberse tanto a la evaporación de los analitos de interés como a una descomposición de los mismos, dado que se observa pequeños picos adicionales en el cromatograma.

Fotólisis.

Después de 7 días de haber expuesto la muestra a la luz, se obtuvo el cromatograma y gráfico de pureza mostrado en la figura 23. Nuevamente se observa que clenbuterol y ambroxol aparecen en 7,538 minutos y 15,791 minutos, respectivamente. Se observa para el ambroxol una coelución de una pequeña banda muy cercana a la banda correspondiente de este analito, esto podría ser atribuido a posible sensibilidad de esta molécula a la radiación, posiblemente esa sea la razón por la cual este jarabe viene en un frasco color ámbar, ya que el mismo posee la capacidad de proteger la formulación de la presencia de luz. Sin embargo, aun

cuando puede existir descomposición de estos componentes, la evaluación de pureza del pico de ambroxol y clenbuterol, indican que estos productos de degradación no interfieren significativamente con la señal de ambos compuestos, ya que en el gráfico de pureza del primer paso para el clenbuterol el valor de $PA=61,804$ es menor que $TH=90,000$ y para ambroxol el valor de $PA=0,451$ está muy cercano al $TH=0,581$, pero por debajo del mismo.

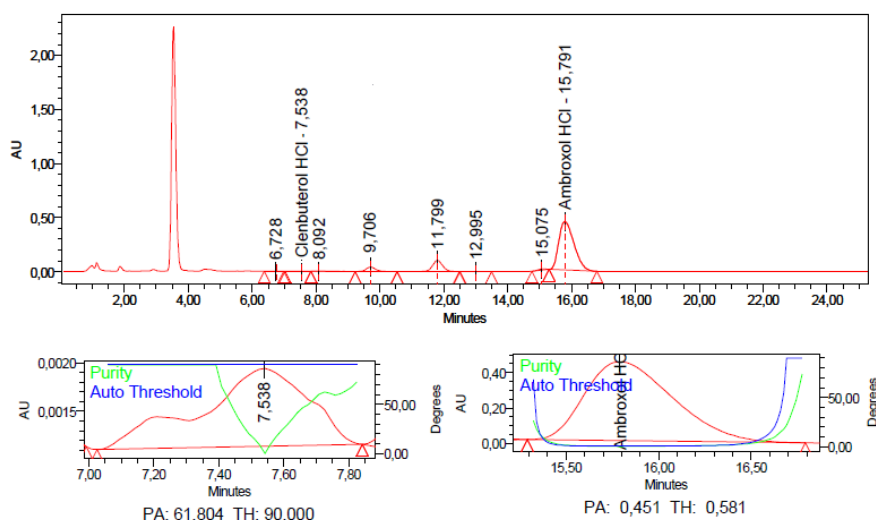


Figura 23. Cromatograma y gráficos de pureza de muestra expuesta a fotólisis.

Estrés oxidativo.

Con la muestra en presencia de peróxido de hidrogeno al 3% por 7 días, se obtuvo el cromatograma y gráfico de pureza mostrado en la figura 24, donde se puede apreciar una señal en 15,086 correspondiente al ambroxol. Las señales de pureza de la banda del ambroxol muestran para la primera derivada un $PA=0,975$ mayor que $TH=0,654$; resultados que podrían ser atribuidos a la presencia de producto(s) de degradación coeluyendo con ambroxol lo cual se nota también en el cromatograma.

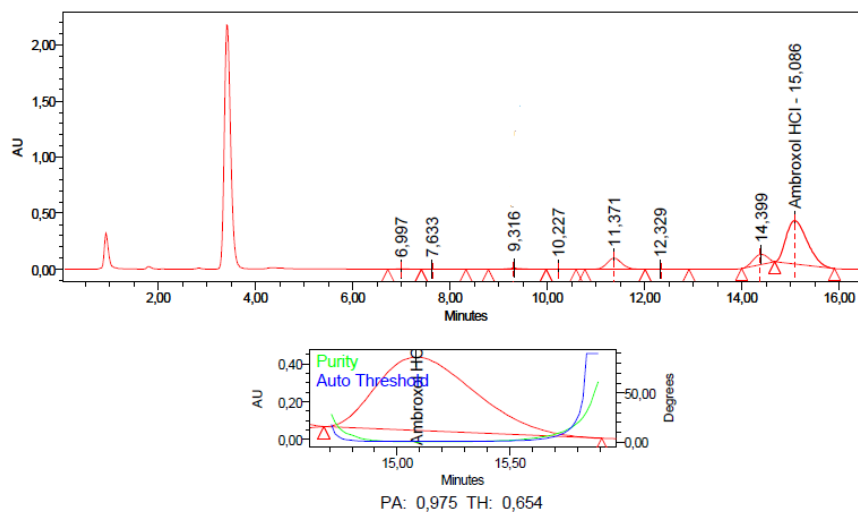


Figura 24. Cromatograma y gráficos de pureza de muestra expuesta a estrés oxidativo.

En el cromatograma no se observa la presencia de la señal de clenbuterol (con t_r aproximado de 7,5 min). Se aprecian dos señales cercanas al tiempo de retención del clenbuterol, pero al estudiar los espectros de absorción molecular de estas señales se puede observar que no pertenecen al clenbuterol, sin embargo pueden ser productos de degradación de este principio activo. En la figura 25 se muestra los correspondientes espectros de absorción molecular para las dos señales observadas, concluyendo que al añadir peróxido de hidrógeno el clenbuterol también sufre proceso de oxidación a través del tiempo.

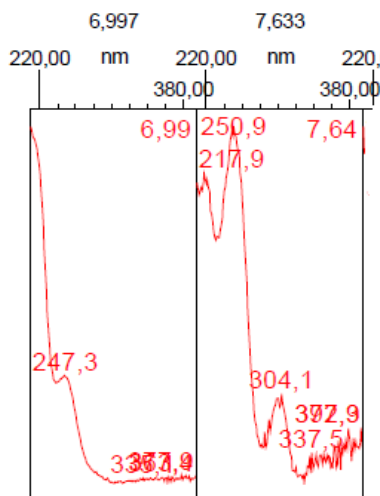


Figura 25. Espectro de absorción molecular correspondiente a la muestra en presencia de peróxido de hidrógeno por 3 días.

Hidrólisis ácida.

La muestra en presencia de ácido clorhídrico 0,1 N por 7 días, presentó cromatograma y gráfico de pureza mostrado en la figura 26, donde se puede apreciar que el clenbuterol eluye a 7,20 minutos y el ambroxol eluye a 15,03 minutos. La evaluación de pureza espectral del ambroxol y clenbuterol evidenciado por la correlación entre el PA menor al ángulo del umbral (TH), siendo PA de 36,571 y TH 90,000 para el clenbuterol y PA 0,749 y TH 0,899 para el ambroxol, lo que indica que de existir degradación de estos ingredientes activos los productos de degradación no afectan la señal de los analitos de interés.

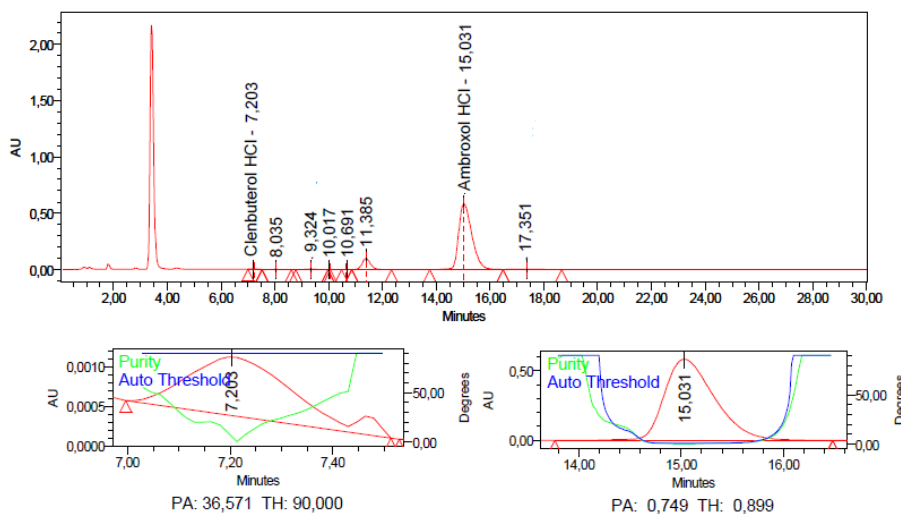


Figura 26. Cromatograma y gráficos de pureza de muestra expuesta a hidrólisis ácida.

Hidrólisis básica.

Con la muestra en presencia de hidróxido de sodio 0,1N por 7 días, se obtuvo el cromatograma y gráfico de pureza mostrado en la figura 27, se observa que el clenbuterol eluye a 7,14 minutos y el ambroxol a 15,07 minutos. Se evidencia productos de degradación, en la banda correspondiente al ambroxol, exhibiendo asimetría con un desdoblamiento en el frente de la banda de elución, y disminución significativa del área esperada con respecto a la muestra control. Es posible evidenciar que la molécula de ambroxol sufrió cambios en el medio básico que alteraron su composición química, generando producto de degradación, disminuyendo significativamente el área de la señal de este analito en el análisis cromatográfico. La evaluación de pureza de los picos del ambroxol y clenbuterol, no confirma la presencia de producto de degradación que interfieran con el ambroxol, lo cual se evidencia por la relación entre el PA= 0,391 menor al TH= 1,318. Mientras que el clenbuterol presenta una relación de PA= 24,301 menor al TH= 90,000.

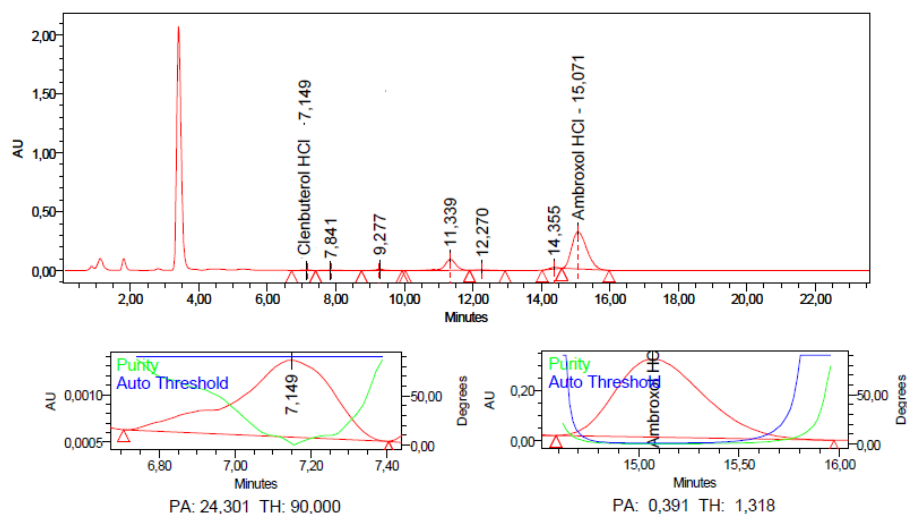


Figura 27. Cromatograma y gráficos de pureza de muestra expuesta a hidrólisis básica.

Termólisis.

El cromatograma y gráfico de pureza (figura 28) correspondiente al MRI sometida a condiciones de exposición al calor no evidenció productos de degradación que afecten la señal de los analitos de interés, observando que la banda de clenbuterol eluye a 7,56 minutos y el ambroxol eluye a 16,072. La pureza de las bandas cromatográficas del ambroxol y clenbuterol, indican no interferencia de otros compuestos que pudieron generarse frente a las condiciones de exposición al calor, evidenciado por la relación entre el ángulo de pureza (PA) menor al ángulo del umbral (TH).

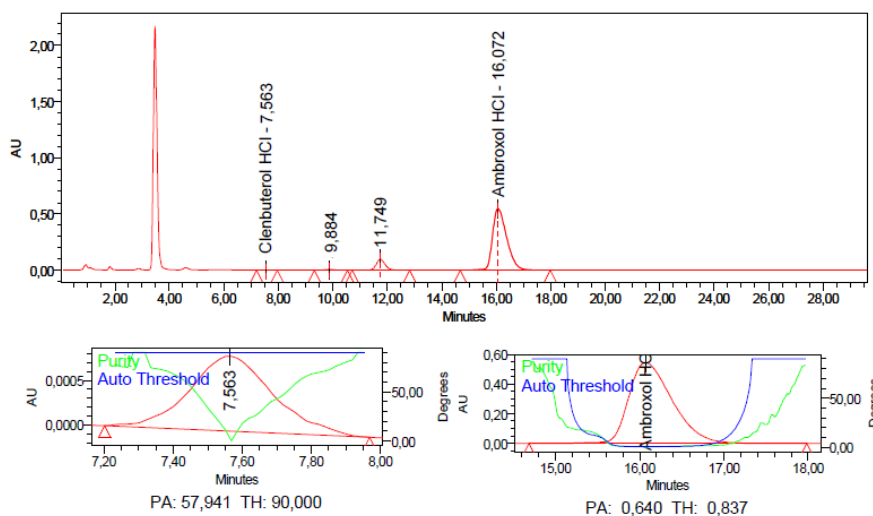


Figura 28. Cromatograma y gráficos de pureza de muestra expuesta a termólisis.

Los resultados obtenidos en las diferentes pruebas de degradación bajo condiciones de estrés, llevadas a cabo para la evaluación de la especificidad del método, se emplearon también para la determinación del porcentaje de degradación que sufrieron las disoluciones de material de referencia interno bajo las diferentes condiciones de análisis. Estos resultados dan información sobre el grado de degradación que se da a lugar en la muestra bajo condiciones de fotólisis, termólisis, oxidación, hidrólisis ácida e hidrólisis básica. En la tabla 17 y 18 se presentan los resultados obtenidos para la especificidad de cada principio activo.

Tabla 17. Especificidad del método para clenbuterol.

Condición	PA	TH	Área	Concentración (µg/5mL)	%respecto a lo declarado	% de degradación
Muestra control	29,56	90	21662	9,74	97,37	-
Muestra envejecida	28,59	90	13439	5,77	57,66	37,84
Hidrólisis básica	24,30	90	14261	6,10	61,00	34,73
Hidrólisis ácida	36,58	90	10772	4,47	44,70	50,20
Luz	61,80	90	18566	8,20	81,96	14,73
Termólisis	57,94	90	14145	6,11	61,05	34,61
Oxidación	-	-	-	-	-	-

* Angulo de pureza (PA); Angulo umbral (TH).

Tabla 18. Especificidad del método para ambroxol.

Condición	PA	TH	Área	Concentración (mg/5mL)	%respecto a lo declarado	% de degradado
Muestra control	0,94	1,34	27357512	14,73	98,17	-
Muestra envejecida	0,75	0,79	19827455	10,78	71,84	27,39
Hidrólisis básica	0,41	0,58	9549614	5,29	35,27	65,39
Hidrólisis ácida	0,75	0,90	19775976	10,75	71,63	27,60
Luz	0,45	0,58	14756482	8,04	53,61	46,33
Termólisis	0,64	0,84	19704919	10,71	71,37	27,87
Oxidación	0,98	0,65	11689539	6,44	42,90	57,47

* Angulo de pureza (PA); Angulo umbral (TH).

Los resultados presentados en las tablas 17 y 18, obtenido bajo las condiciones de oxidación, termólisis, luz, hidrólisis ácida, hidrólisis básica y muestra envejecida (7 días) presentan una degradación mayor al 20 % concentración inicial, que es lo recomendado por la AEFI (Asociación Española de Farmacéuticos de La Industrial) para estudiar la estabilidad de las muestras [33]. Este tipo de estudios adquiere especial importancia para los métodos que serán aplicados en la evaluación la estabilidad de un principio activo o forma farmacéutica. Se debe comprobar, a ser posible, la identidad del analito y que la señal proviene solo de él [33].

VI.7.3 Precisión.

La precisión del método analítico se evaluó mediante las determinaciones de precisión del sistema cromatográfico, repetibilidad y precisión intermedia. La precisión debe ser determinada analizando un número suficiente de alícuotas, que permitan calcular estadísticamente la desviación estándar y la desviación estándar relativa (coeficiente de variación).

VI.7.3.1 Precisión del sistema cromatográfico.

La precisión del sistema cromatográfico se realizó evaluando la dispersión de los valores obtenidos en la variación del tiempo de retención y área de ambos analitos. En la tabla 19 se muestra el número de inyecciones realizadas del patrón combinado que contenía 1,56 mg/mL de ambroxol y 1,152 µg/mL de clenbuterol.

Tabla 19. Precisión del sistema cromatográfico.

Número de inyecciones	Clenbuterol		Ambroxol	
	Tiempo de retención (min)	Áreas	Tiempo de retención (min)	Áreas
1	7,21	27321	14,98	30254865
2	7,22	27584	14,99	30236479
3	7,16	27255	14,83	30302957
4	7,13	27534	14,77	30274066
5	7,18	27460	14,88	30271303
Promedio	7,18	27431	14,89	30267934
D.E.	0,04	140	0,09	24676
C.V.	0,56	0,5	0,60	0,08

Se obtuvo un tiempo de retención de 7,18 minutos y un CV de 0,55% para el clenbuterol, mientras que para el ambroxol un tiempo de retención de 14,89 minutos y un CV de 0,64%. Estos resultados muestran que el método es preciso, ya que el criterio de aceptación de la USP es un valor de coeficiente de variación del sistema no mayor al 2 %, lo que presenta una conformidad en este parámetro [22].

VI.7.3.2 Repetibilidad.

La repetibilidad del método se determinó preparando 6 muestras del MRI tratadas como lo indica el apartado VI.5 al 100% de la concentración, realizando inyecciones por duplicado. A partir de las áreas obtenidas con estas muestras y una curva de calibración preparada ese día se determinó el valor promedio y el coeficiente de variación de la cantidad de ambroxol y clenbuterol en el jarabe (mg/mL).

Tabla 20. Precisión del método para el clenbuterol.

Muestr a	(mx± 0,001) g	Cantidad de Clenbuterol (µg/5 mL)	Promedio (µg/5 mL)	D.E.	C.V.
1	5,869	9,66	9,70	0,06	0,63
		9,75			
2	5,853	9,43	9,40	0,04	0,45
		9,38			
3	5,864	9,28	9,27	0,01	0,13
		9,27			
4	5,887	9,25	9,31	0,09	1,06
		9,39			
5	5,889	9,36	9,52	0,22	2,33
		9,67			
6	5,886	9,37	9,36	0,01	0,09
		9,35			
		Promedio	9,43	mx= masa de muestra	
		D.E.	0,16		
		C.V.	1,68		

Tabla 21. Precisión del método para el ambroxol.

Muestra	(mx ± 0,001) g	Cantidad de ambroxol (mg/5 mL)	Promedio (mg/5 mL)	D.E.	C.V.
1	5,869	14,63	14,69	0,07	0,50
		14,74			
2	5,853	14,68	14,71	0,04	0,29
		14,74			
3	5,864	14,68	14,68	0,01	0,07
		14,67			
4	5,887	14,60	14,61	0,02	0,15
		14,63			
5	5,889	14,65	14,72	0,11	0,74
		14,80			
6	5,886	14,51	14,54	0,05	0,32
		14,58			
		Promedio	14,66	mx= masa de muestra	
		D.E.	0,07		
		C.V.	0,47		

Los resultados de coeficientes de variación fueron menores al 2 %, lo que indica que la precisión evaluada a través de la repetibilidad del método se encuentra dentro de los límites establecidos para métodos cromatográficos [22].

VI.7.3.3 Precisión intermedia.

La precisión intermedia puede ser evaluada realizando las pruebas en diferentes días, analistas y equipos [22]. En este caso se realizaron las determinaciones en diferentes días.

Para cada día de la evaluación se prepararon 3 muestras según lo descrito en el apartado VI.5. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 22.

Tabla 22. Precisión intermedia para el ambroxol y clenbuterol.

Réplica de muestra	Réplica de inyección	Ambroxol (mg/5 mL)			Clenbuterol (µg/5 mL)		
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3
1	1	14,20	14,37	14,00	9,90	9,70	10,35
	2	14,29	14,27	13,92	10,20	9,50	10,27
2	1	14,09	14,03	13,93	10,10	9,81	10,33
	2	14,14	14,08	14,06	10,17	9,67	10,30
3	1	14,26	14,09	13,85	10,17	9,56	10,17
	2	14,21	14,09	13,86	10,23	9,71	10,44
Promedio		14,20	14,15	13,94	10,13	9,66	10,31
% Declarado		94,66	94,14	92,90	102,28	96,56	103,06
D.E.		0,07	0,14	0,07	0,08	0,07	0,01
C.V.		0,49	1,01	0,53	0,75	0,76	0,05

En la tabla 22, se puede observar que en los diferentes días de análisis se obtienen distintos valores de concentración, tanto para el clenbuterol como para el ambroxol, pero se evidencia una concentración porcentual en base a lo declarado (Cada 5mL

de jarabe contenía 10 µg de clenbuterol y 15 mg de ambroxol, en 120 mL de jarabe) de 94,66%; 94,14%; 92,90% para los días 1, 2, 3, en el ambroxol, y para el clenbuterol se obtuvo 102,28%; 96,56%; 103,06% para los días 1, 2, 3, respectivamente. Estos porcentajes se encuentran dentro del criterio de aceptación de 90 – 110 %, por lo tanto, el método es aceptable [20]. También se puede observar que los coeficientes de variación son menores al 2 %, para ambos analitos y diferentes días, lo que indica que la precisión evaluada a través de la precisión intermedia se encuentra dentro de los límites establecidos para métodos cromatográficos.

Para comparar la tolerancia correspondiente a la precisión intermedia se puede usar la conocida como Trompeta de Horwitz. El coeficiente de variación obtenido en el análisis es comparado con el coeficiente de variación Horwitz.

Se determinó el coeficiente de variación (CV_H) propuesto por Horwitz:

$$CV_H = 2^{(1-0.5) \log C} \quad \text{Ecuación 12.}$$

Dónde: C = fracción del analito en la muestra (C= mg analito/ mL muestra).

Se obtiene un promedio para el clenbuterol de 10,03 mg/mL y un coeficiente de variación de 3,37%; y para el ambroxol un promedio de 14,10 mg/mL y un coeficiente de variación de 1,00%. Se obtuvo para ambroxol un $CV_H = 1,63$ y para clenbuterol un $CV_H = 1,42$. Por lo tanto, el método tiene valores aceptables de precisión intermedia, ya que el valor obtenido en el parámetro CV_H para ambos analitos es menor a CV del análisis; demostrando así que el método es preciso [32].

Se obtuvo para el ambroxol un $CV_H = 1,63$ y para el clenbuterol un $CV_H = 1,42$. Por lo tanto, el método tiene valores aceptables de precisión intermedia, ya que el valor obtenido en el parámetro CV_H para ambos analitos es menor a 2; demostrando así que el método es preciso [32].

VI.7.4 Exactitud

La exactitud del método fue determinada por la aplicación del procedimiento analítico, en el cual se determina por replicado el contenido promedio de los analitos en la muestra con el método a validar; una vez conocido el contenido promedio se procede a enriquecer las muestras con estándar. Para preparar las soluciones, se mantiene constante la cantidad de muestra tomada y se agregan cantidades variables del estándar.

Para la determinación de la exactitud la literatura recomienda preparar soluciones de muestras enriquecidas a tres niveles de concentración diferentes (50%-80%; 100%; 120%-150%) de la concentración normal de trabajo del método. La USP recomienda preparar muestras independientes por triplicado a cada nivel de concentración [19]. Finalmente se calcula el porcentaje de recuperación como medida de la exactitud:

$$\text{Porcentaje de recuperación} = \frac{(\text{Conc. muestra fortificada} - \text{Conc. muestra sin fortificar})}{\text{Conc. estándar}} \times 100$$

Ecuación 15.

La exactitud fue evaluada preparando muestras por triplicado (9 muestras) en un rango de concentración del 70%, 100% y 130%, para cada rango de concentración se pesó aproximadamente 11,80 g de MRI en un balón aforado de 20 mL; y se agregó una pequeña cantidad de fase móvil y se agitó mecánicamente durante un minuto. Para cada nivel se tomaron dos alícuotas de 5mL y fueron transferidas a dos balones aforados de 10,00 mL, a uno de ellos se le añadió patrón que fue preparado de la siguiente manera: se pesó aproximadamente 7,20 g de clenbuterol en un balón aforado de 50 mL, se adicionó aproximadamente 25 mL de la fase móvil y se agitó mecánicamente por un minuto, se llevó a volumen con la fase móvil (Solución A). Posteriormente se pesó 190 mg de ambroxol en un balón aforado de 50 mL, se añadió 1 mL de la Solución A y se adicionó aproximadamente 25 mL de la fase móvil y se agitó mecánicamente por un minuto, se llevó a volumen con la fase móvil (Solución B con una concentración de 2,88 µg de clenbuterol y 3,80 mg de

ambroxol). Se añadió 1,00 mL, 2,00 mL y 3,00 mL de este patrón para fortificarla (muestra fortificada) en los niveles de concentración 70% 100% y 130% respectivamente, y el otro sería la muestra sin fortificar, ambas se llevaron a volumen con fase móvil.

Se preparó una curva de calibración para determinar la concentración de las muestras. En la tabla 23 y 24 se muestran las concentraciones fortificadas y sin fortificar para el ambroxol y clenbuterol.

Tabla 23.Concentraciones fortificadas y sin fortificar para ambroxol.

Nivel de concentración	Réplica	Concentración (mg/mL)			
		Sin fortificar	Fortificadas		
70	1	0,7241	1,0941		
	2	0,7189	1,0927		
	3	0,7180	1,0908		
100	1	0,7216		1,4894	
	2	0,7421		1,4887	
	3	0,5887		1,3351	
130	1	0,7224			1,8409
	2	0,7191			1,8433
	3	0,7088			1,8257

Tabla 24.Concentraciones fortificadas y sin fortificar para clenbuterol.

Nivel de concentración	Réplica	Concentración (mg/mL)			
		Sin fortificar	Fortificadas		
70	1	0,4249	0,7094		
	2	0,4259	0,7107		
	3	0,4257	0,7123		
100	1	0,4322		1,0098	
	2	0,4322		1,0168	
	3	0,3760		0,9564	
130	1	0,4939			1,3128
	2	0,4903			1,3536
	3	0,5030			1,3635

Los porcentajes de recuperación para el clorhidrato de Clenbuterol y Ambroxol se muestran en la tabla 25 y 26.

Tabla 25.Recuperación del contenido de ambroxol.

Nivel de concentración	Recuperación (%)	Promedio	CV (%)	% encontrado
70	98,36	98,23	0,20	68,76
	98,09			
100	101,03	99,16	1,63	99,16
	98,24			
	98,21			
130	98,11	98,24	0,35	127,71
	98,62			
	97,97			

Tabla 26.Recuperación del contenido de clenbuterol.

Nivel de concentración	Recuperación (%)	Promedio	CV (%)	% encontrado
70	98,78	99,06	0,38	69,34
	98,90			
	99,49			
100	100,29	100,86	0,61	100,86
	101,51			
	100,78			
130	99,93	99,76	0,24	129,69
	99,59			

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 cada nivel, según lo establecido en la ICH [23].

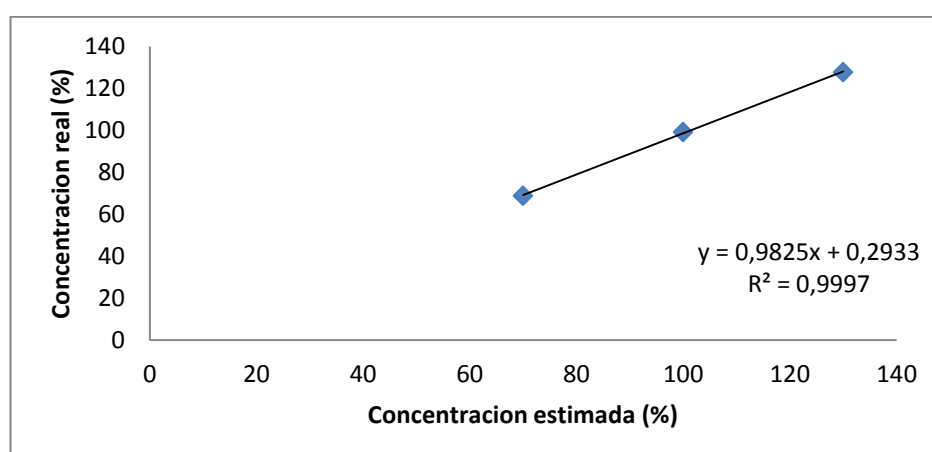
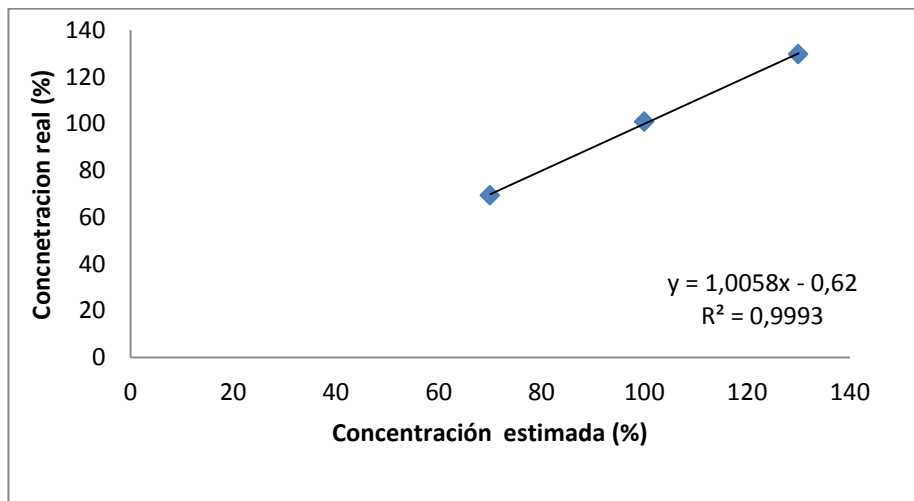
Gráfico 7. Relación entre las concentraciones estimadas y las concentraciones reales (70, 100 y 130 %). Ambroxol.

Gráfico 8. Relación entre las concentraciones estimadas y las concentraciones reales (70, 100 y 130 %). Clenbuterol.



Las curvas de calibración entre los niveles de concentración estimados y reales para el ambroxol y clenbuterol a través de las representaciones gráficas 7 y 8, muestran pendientes y coeficientes de determinación cercanos a la unidad, resultados que indican que los niveles de concentraciones estimadas y reales son iguales.

VI.7.5 Robustez.

La robustez de un procedimiento analítico, es una medida de su capacidad de no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas de los parámetros del procedimiento y proporciona una indicación de su idoneidad durante su aplicación [22].

Para la evaluación de la robustez del método se establece una serie de parámetros de idoneidad del sistema, con la finalidad de asegurar que se mantiene la validez del procedimiento analítico utilizado [22]. Los parámetros establecidos experimentalmente para la evaluación de la robustez del método fueron el flujo de la fase móvil, pH de la fase móvil y composición de la fase móvil. Parámetros propuestos en la tabla 27, presentada a continuación:

Tabla 27.Parámetros en la evaluación de la robustez.

Variable		Valor utilizado en el método	Valor inferior	Valor superior
A	%Metanol	20	15	25
B	pH	3,7	3,6	3,8
C	Flujo (mL/min)	1,5	1,4	1,6

Para la estimación de la robustez del método se empleó el diseño experimental descrito por Plackett y Burman, donde los parámetros de validación se evalúan utilizando un enfoque de dos niveles para cada variable que sea puesta a prueba [21]. Según lo antes expuesto se estableció un nivel por encima y por debajo del valor establecido por el método, modificaciones de ± 1 en flujo y pH de la fase móvil, ± 5 en la composición de la fase móvil. En la tabla 28 se muestra la matriz de Plackett y Burman utilizada.

Tabla 28.Matriz de Plackett y Burman empleada para la evaluación de la robustez del método.

Experimento	% Metanol	pH	Flujo (mL/min)
1	25	3,8	1,6
2	25	3,8	1,4
3	25	3,6	1,6
4	15	3,8	1,6
5	15	3,6	1,6
6	15	3,8	1,4
7	25	3,6	1,4
8	15	3,6	1,4

Se realizó un patrón combinado de concentración de 1,152 µg/mL de clenbuterol y 1,56 mg/mL de ambroxol respectivamente y una muestra realizada pesando 5,916g de MRI tratada según apartado VI.5. El patrón y la muestra fueron inyectados por triplicado en cada experimento. Los resultados se muestran en el apéndice D, tabla 1 y 2 para clenbuterol y ambroxol.

Los datos presentados en la tabla 29 y 30 permiten confirmar si la variable tiene influencia significativa sobre el resultado, esto se hace comparando la diferencia obtenida para el cambio efectuado sobre ese parámetro y el producto de S y raíz de 2 [25].

$$\text{Si } |V_B| > s \sqrt{2} \Rightarrow \text{diferencia significativa}$$

Tabla 29. Interpretación de los resultados de la robustez de clenbuterol.

	S*√2=19,98	
	Influencia	Resultado
A	-5,13	Conforme
B	12,68	Conforme
C	-5,05	Conforme
AB	17,25	Conforme
AC	3,70	Conforme
BC	-1,86	Conforme
ABC	3,97	Conforme

Tabla 30. Interpretación de los resultados de la robustez de ambroxol.

	$S^*\sqrt{2}=5,48$	
	Influencia	Resultado
A	-0,26	Conforme
B	-0,52	Conforme
C	-0,75	Conforme
AB	4,07	Conforme
AC	0,8	Conforme
BC	0,08	Conforme
ABC	0,76	Conforme

La influencia de las variables estudiadas presentan valores por debajo de $s\sqrt{2}$, lo que permite concluir que el método es robusto bajo las tres condiciones de análisis estudiadas (pH de la fase móvil, composición de metanol y flujo), resultado que establece que el método es capaz de soportar diferentes alteraciones experimentales sin afectar la determinación del contenido, tanto para el clenbuterol y ambroxol.

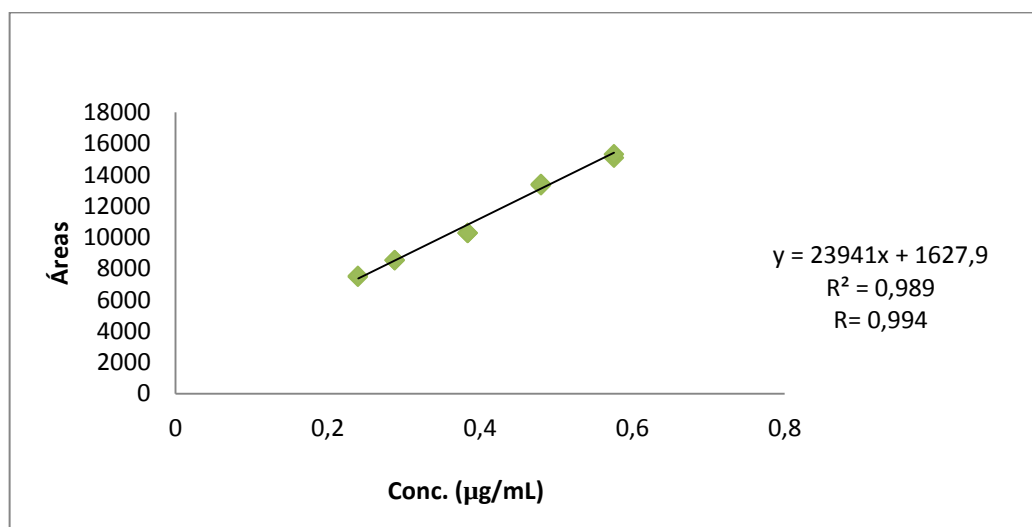
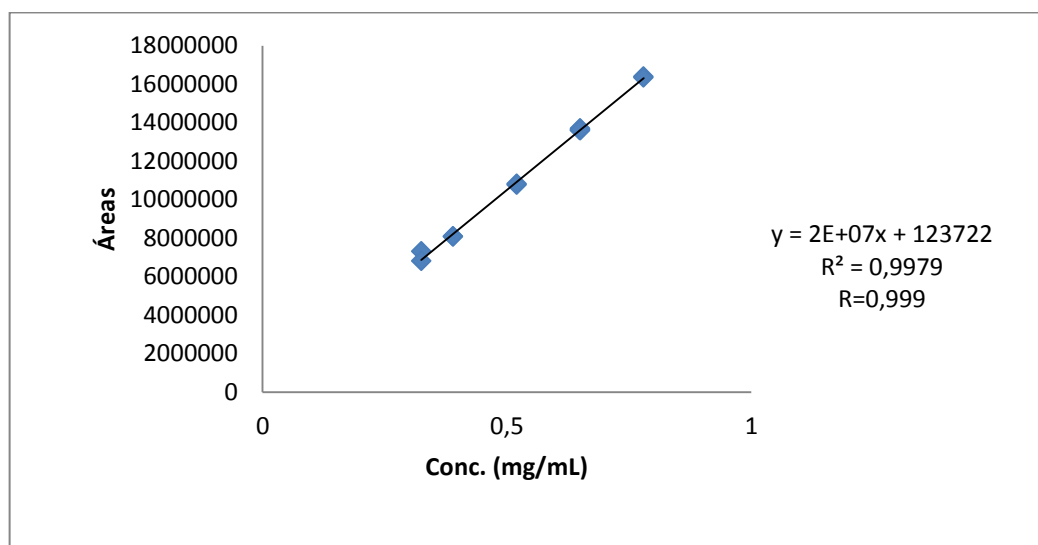
VI.7.6 Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).

Aunque las especificaciones para validación de métodos analíticos establecidas en la USP no requieren de la evaluación de las figuras de mérito límite de detección y límite de cuantificación, se decidió realizar esta evaluación para darle a la metodología propuesta un valor adicional, indicando que el método es capaz de detectar la concentración límite y superiores. En este caso específico uno de los principios activos, clenbuterol, se encuentra en pequeñas cantidades y si se desea realizar estudios de indicadores de estabilidad aplicando esta metodología, se tendrá la garantía que el método es capaz de proporcionar resultados confiables en los límites inferiores.

El procedimiento realizado para determinar LD y LC del método se basó estudiando una curva de calibración específica utilizando una muestra que contenga la concentración mínima a la cual el analito se puede detectar de manera confiable y la desviación estándar residual de una línea regresión[34].

Las curvas de calibración para la determinación del LD y LC, fueron realizadas a partir de cinco niveles de concentración que se estiman que estén cerca al límite de detección, correspondientes a 50, 60, 80, 100 y 120 % del valor de referencia en la cual se puede detectar la mínima concentración del analito, tanto para el ambroxol como para el clenbuterol. Los cinco niveles de concentración antes mencionados, contemplan un rango de concentración entre 0,24 $\mu\text{g/mL}$ a 0,576 $\mu\text{g/mL}$ para el clenbuterol y 0,325 mg/mL a 0,78mg/mL para el ambroxol. Finalmente, se inyectó en el cromatógrafo cada patrón por duplicado y se construyó cada curva de calibración.

La ecuación de la regresión lineal fue calculada para cada analito y sus respectivas curvas de calibración fueron construidas trazando el área de la señal cromatográfica en función de la concentración del analito correspondiente. Así como también la determinación del coeficiente de variación de los factores de respuestas. En los gráficos 9 y 10 se presentan las curvas de calibración realizadas. Los datos detallados se muestran en el apéndice E.

Gráfico 9. Curva de calibración para el clenbuterol.**Gráfico 10.** Curva de calibración para el ambroxol.

Se procedió a realizar los cálculos de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC), utilizando los valores de la regresión lineal y la desviación estándar de los factores de respuesta obtenidas de la curva de calibración realizada. Se calculó a través de las ecuaciones 13 y 14 antes mencionadas. Los resultados se pueden observar en la tabla 31.

Tabla 31. Límite de detección y cuantificación.

	Clenbuterol	Ambroxol
Límite de detección	0,23	0,07
Límite de cuantificación	0,70	0,22

VI.8 Determinación del contenido de clorhidrato de Clenbuterol y Ambroxol en jarabe.

Una vez validada la metodología analítica para la determinación simultánea del ambroxol y clenbuterol, se procedió a analizar dos medicamentos, de la misma marca comercial, pero diferentes lotes y vigentes para el momento de la investigación (medicamentos A y B). Los medicamentos fueron analizados bajo las condiciones cromatográficas expuestas en la tabla 12 y fueron tratadas como el MRI, descrito en VI.6.1.5. Se prepararon 3 réplicas para cada muestra.

Las características organolépticas de cada uno de los medicamentos analizados se encuentran en la tabla 9.

A continuación se presentan los cromatogramas correspondiente a la cuantificación de clenbuterol y ambroxol presente en las muestras analizadas.

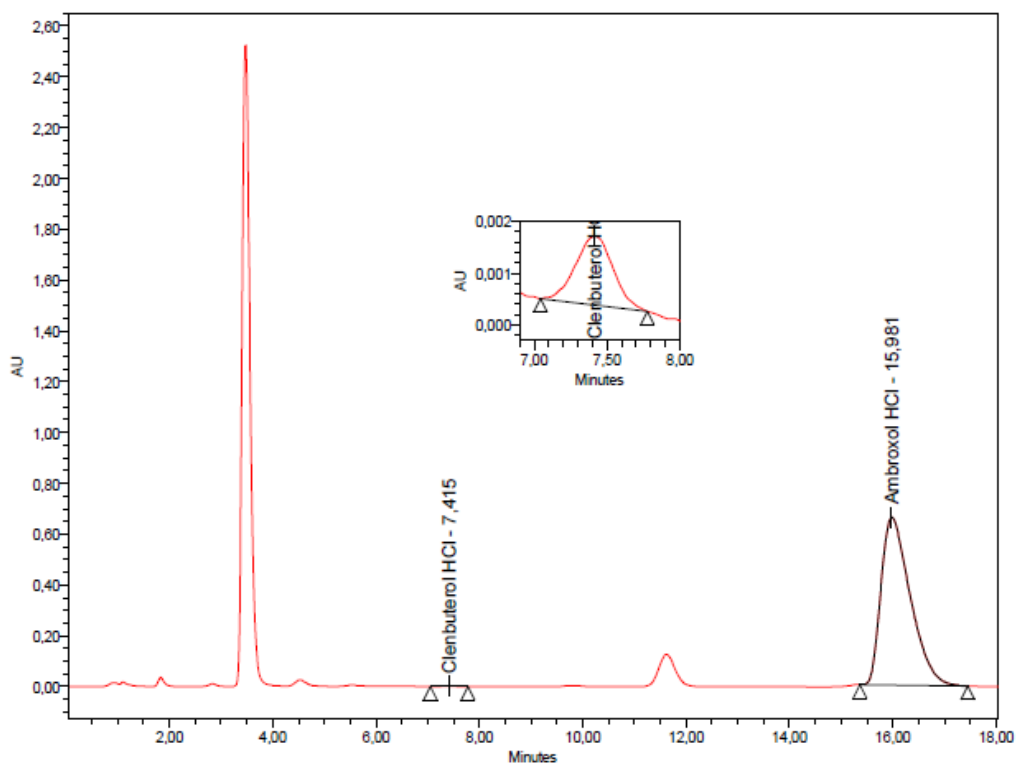


Figura 29. Cromatograma correspondiente al medicamento A.

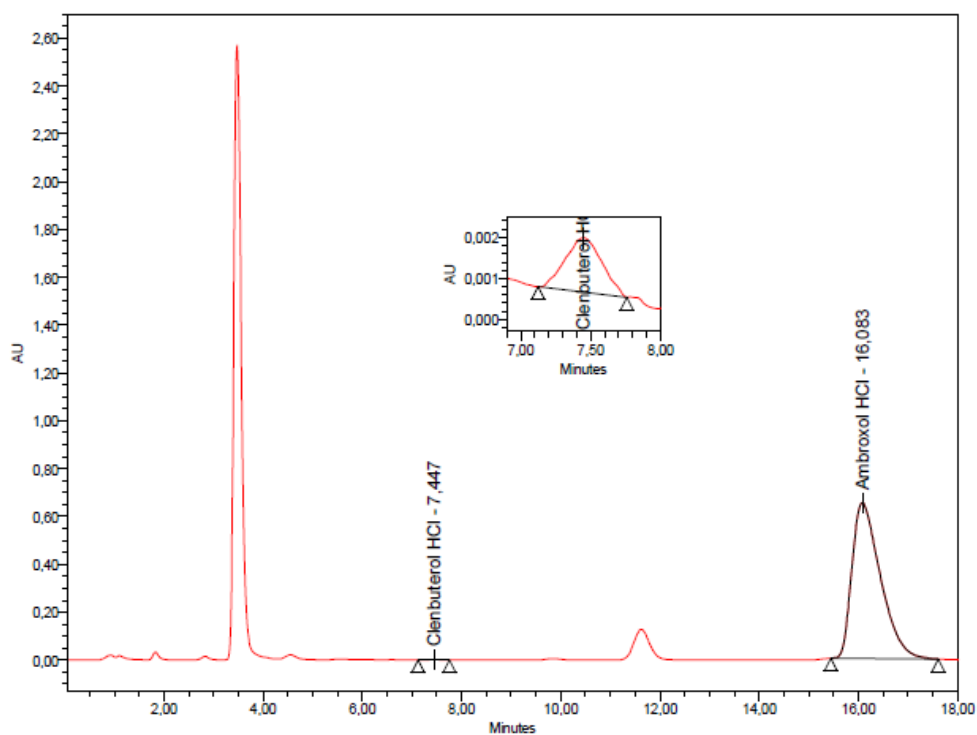


Figura 30. Cromatograma correspondiente al medicamento B.

Tabla 32. Determinación del contenido de clenbuterol en diferentes muestras de jarabe.

Muestra	Réplica de muestra	Concentración (µg/mL)	Promedio (µg/mL)	% respecto a lo declarado	D.E	C.V (%)
A	1	9,22	9,19	91,98	0,04	0,40
		9,13				
	2	9,21				
		9,23				
	3	9,19				
		9,22				
B	1	8,97	9,20	92,01	0,14	1,57
		9,19				
	2	9,20				
		9,42				
	3	9,21				
		9,22				

Tabla 33. Determinación del contenido de ambroxol en diferentes muestras de jarabe.

Muestra	Réplica de muestra	Concentración (µg/mL)	Promedio (µg/mL)	% respecto a lo declarado	D.E.	C.V (%)
A	1	14,42	14,36	95,76	0,82	0,86
		14,46				
	2	14,48				
		14,40				
	3	14,21				
		14,21				
B	1	14,23	14,24	94,96	0,37	0,39
		14,27				
	2	14,28				
		14,32				
	3	14,20				
		14,17				

Para la determinación simultánea de ambroxol y clenbuterol, se estableció como criterio de aceptación un porcentaje respecto a lo declarado entre 90 - 110 %, obtenida a partir de la relación entre la cantidad del analito encontrada y lo declarado por el fabricante del medicamento por 100[20]. Por lo que ambos medicamentos cumplen con este criterio de aceptación obteniendo un coeficiente de variación menor al 2%.

Los resultados obtenidos permiten confirmar que la metodología propuesta es apropiada para la cuantificación de ambroxol y clenbuterol en jarabes, proporcionando resultados confiables.

VII. CONCLUSIONES.

- Se desarrolló un método analítico por HPLC para la determinación simultánea del contenido de ambroxol y clenbuterol en jarabes. Se encontró como condiciones cromatográficas óptimas para el análisis las siguientes: Columna X Terra RP18 (3,5µm, 4,5 x 100 mm), a temperatura ambiente y de forma isocrática, con una fase móvil constituida por acetonitrilo, metanol, solución amortiguadora/par iónico (KH₂PO₄ y ácido 1-octano sulfónico, pH 3,0 ajustado con H₃PO₄) en proporción (15:20:65)%v/v a pH de 3,70, flujo de fase móvil de 1,5mL/min, volumen de inyección de 15 µL y a una longitud de onda de 245nm.
- Se validó el método analítico desarrollado de acuerdo con la categoría I del apartado <1225> de la USP 38 NF 33.
- Se estableció que las respuestas de las áreas por variación de la concentración para el ambroxol presentan alta tendencia a la linealidad en un rango de concentración entre 0,78 mg/mL a 1,95 mg/mL con valores de R en un rango de (0,9993-0,9995).
- Se encontró una alta tendencia a la linealidad entre las respuestas de las áreas por variación de la concentración para el clenbuterol en un rango de concentración entre 0,576 µg/mL a 1,4976 µg/mL. con valores de R en un rango de (0,9989-0,9992).
- La evaluación de la linealidad en diferentes días demostró que existe una correlación lineal significativa sin variación entre días, ya que los coeficientes de variación de los factores de respuesta fueron menores al 5% lo cual permite comprobar la poca variabilidad en la sensibilidad del método, tanto para ambroxol como para clenbuterol.
- El método cromatográfico desarrollado es selectivo al permitir reconocer inequívocamente la presencia de ambroxol y clenbuterol discriminando la presencia de sustancias contaminantes.

- El método cromatográfico desarrollado es preciso, al presentar coeficientes de variación menor al 2% para la precisión del sistema cromatográfico (tanto en los tiempos de retención como en las áreas) y repetibilidad.
- Al evaluar la repetibilidad y la precisión intermedia se encontró que el coeficiente de variación de Horwitz es CV del análisis, demostrando que el método es preciso para la cuantificación de ambos principio activos.
- La exactitud medida como porcentaje de recuperación para el ambroxol se encontró entre 68,76% y 127,71% y para el clenbuterol entre 69,34% y 129,69% para niveles de concentración fortificados entre el 70% y 130%, resultados que se encuentran dentro de los límites del criterio de aceptación comprendido entre 98,0 % a 102,0 % para cada nivel, según lo establecido en la ICH.
- El método de análisis cromatográfico propuesto es robusto para la determinación de ambroxol y clenbuterol bajo cambios simultáneos de las condiciones de análisis, $\text{pH} = 3,70 \pm 0,1$, flujo de la fase móvil = $1,5 \pm 0,1$ mL/min y un porcentaje de metanol en la fase móvil = 20 ± 5 .
- De acuerdo a los cálculos, los valores correspondientes al límite de detección y límite de cuantificación fueron para el clenbuterol de 0,23 mg/mL y 0,7 mg/mL, y para el ambroxol de 0,07 mg/mL y 0,2 mg/mL, respectivamente.
- El método analítico desarrollado para el análisis simultáneo de ambroxol y clenbuterol resultó ser selectivo, preciso, exacto, robusto y lineal en el rango de concentración establecido.
- El método desarrollado y validado puede ser empleado en análisis de rutina y control de calidad para la determinación de clenbuterol y ambroxol en jarabes, ya que proporciona resultados confiables y cumple con las especificaciones establecidas en los parámetros de validación.

VIII. RECOMENDACIONES.

- Realizar el análisis de medicamentos que contengan clenbuterol y ambroxol en formulaciones pediátricas, realizando los ajustes necesarios para comprobar si es posible aplicarlo a este tipo de medicamentos.
- Realizar la cuantificación de los conservantes presentes en la formulación, ya que se evidencia en los cromatogramas la presencia de los mismos y que pueden ser cuantificados sin problema.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Díaz A, Uría R. Buenas Prácticas de Manufactura: Una guía para pequeños y medianos agro empresarios. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, IICA. (2009). Costa Rica (monografía publicada en internet) (citado el 18 de abril de 2019). Disponible en: <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A5294e/A5294e.pdf>
- [2] Lareau S, Fahy B, Meek P. Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). Artículo de revista de internet: Serie de información al paciente de la ATS. Vol. 171. Pág. 3-4. American Thoracic Society. 2013 (citado 22 de abril de 2019). Disponible en: <https://www.thoracic.org/patients/patient-resources/resources/spanish/chronic-obstructive-pulmonary-disease-copd.pdf>
- [3] Malerbat M, Ragnoli B. Ambroxol en el siglo XXI: actualización clínica y farmacológica. Universidad de Brescia. (2012) (consultado el 1 de febrero de 2017). Disponible en: http://www.pedia-gess.com/archivos_pdf/Ambroxol%20siglo%2021.pdf
- [4] Duran R. Efectos benéficos de los beta 2 en EPOC. Revista colombiana de neumología. Volumen 16 N°2. Bogotá. (2012).
- [5] Parra Z, Bor M, Gómez L. Desarrollo y validación de un método analítico por HPLC para la determinación simultánea de clorhidrato de ambroxol y loratadina en jarabes: Revista. Facultad de Farmacia. Vol. 80. N° 1 y 2. Universidad Central de Venezuela. (2017).
- [6] Partners health care (página de internet). Asthma center. 2010 (citado 8 de febrero de 2017). Disponible en: <http://www.asthma.partners.org/NewFiles/Broncodilatadores.html>
- [7] Figueroa J; Schiavi E; Mazzei J; López A; Rhodius E; Ciruzzi J; Sívori M. Recomendaciones para la prevención, diagnóstico y tratamiento de LA EPOC en la Argentina. Medicina (Buenos Aires) Vol.72 N°4. Argentina. 2012. (citado 8 de febrero de 2017). Disponible en:

<http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sciarttext&pid=S002576802012000500001>

[8] Pubchem (página de internet). Clorhidrato de Ambroxol. (citado 16 de marzo de 2017). Disponible en:

https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ambroxol_hydrochloride#section=Names-and-Identifiers

[9] Raju V. Isolation, Identification, and Characterization of One Degradation Product in Ambroxol by HPLC-Hyphenated Techniques. Research article Sci Pharm. 82: 247-263 (2014).

[10] Drugbank (página de internet). Clorhidrato de Clenbuterol. (citado 16 de marzo de 2017). Disponible en: <https://www.drugbank.ca/salts/DBSALT001621>

[11] Sumano H; Ocampo L; Gutiérrez L. Clenbuterol y otros β -agonistas, ¿una opción para la producción pecuaria o un riesgo para la salud pública? Revista Veterinaria México. Vol. 33 N°2. México. (2002).

[12] Leyva E; Pérez F. Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación por HPLC de clenbuterol clorhidrato en solución oral-gotas, y análisis comparativo de productos comercializados en el Perú. Trabajo especial de grado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Peru. (2009).

[13] Prather I; Brown D; North P; Wilson J. Clenbuterol: a substitute for anabolic steroids. Artículo de revista Medicine & Science in Sports & Exercise Vol. 27, N°8:1118-21. (1995).

[14] Laboratorio Boehringer Ingelheim S.A. Proyecto de prospecto para el producto mucosolvan. Proyecto de aprobación. Argentina. (2013).

[15] Skoog D, Holler J, Nieman T. "Principios de Análisis Instrumental". Quinta edición. Editorial McGraw Hill, España. Capítulo 28, páginas: 785-828. (2001).

[16] Español C. Determinación de fenoles en agua por cromatografía de líquidos con pre-concentración en fase sólida: Trabajo especial de grado. Universidad central de Venezuela. (2009).

[17] Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP). <621> USP 38. Estados Unidos (2015).

- [18] González M. Desarrollo y validación de método analítico por HPLC para la determinación simultánea de ibuprofeno y tiocolchicosido en tabletas: Trabajo especial de grado. Universidad Central de Venezuela. (2016).
- [19] Skoog D, Holler J, Nieman T. "Principios de Análisis Instrumental". Quinta edición. Editorial McGraw Hill, España. Capítulo 26, páginas: 730-754. (2001).
- [20] Báez E. Desarrollo de un método para la determinación de acetaminofén, fenilefrina y sus productos de degradación en formulaciones farmacéuticas para el resfriado común: Trabajo especial de grado. Universidad Central de Venezuela. (2010).
- [21] Arteaga R. Desarrollo y validación de un método analítico del producto clenbuterol jarabe, por HPLC. Informe de pasantías. Universidad Simón Bolívar. Venezuela. (2012).
- [22] Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP). <1225> USP 38.EstadosUnidos (2015).
- [23] Lister A. Validation of HPLC Methods in Pharmaceutical Analysis. Analytical Sciences, Word Reseach & Development, Purdue Pharma. Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC. 2005.
- [24] Instituto de salud pública chile. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "aspectos generales sobre la validación de métodos". Guía técnica. Santiago, diciembre 2010.
- [25] Quattrocchi O, Abelaira S, Laba R. Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Buenos Aires (1992).
- [26] Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP). USP 38 Clorhidrato de Clenbuterol. Estados Unidos (2015).
- [27] Morales-Trejo F; Vega y León S; Escobar-Medina A; Pérez-González J; Urbán-Carrillo G; Gutiérrez-Tolentino R. Desarrollo y validación de un método de cromatografía líquida de alta resolución para la determinación y cuantificación de clenbuterol en hígado de bovino. Artículo de revista de Salud Animal. Vol.35 N°1

México. (2013). (Citado 7 de febrero de 2017). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2013000100006

[28] Singhal N, Gaur K, Singh A. Development and validation of high performance liquid chromatography method for simultaneous estimation of ambroxol and doxofylline in their combined tablet dosage form. Artículo de revista Hindawi Publishing Corporation. ISRN Analytical Chemistry. Vol. 2013, article ID834240, 7 pages (2013).

[29] Zarzuelo A, Sayalero M, López F, Lanao J. Determination of Ambroxol Hydrochloride by HPLC. J. LIQ. CHROM. & REL. TECHNOL. Vol.24 N°7:1007–1014. (2001).

[30] Acebal-Ibarra A, Arada-Pérez M. Preparación y evaluación de un material de referencia interno para la determinación de Fe, Si y Ni en el mineral laterítico del norte oriental de Cuba. Artículo de revista cubana química. vol.27 no.1. Santiago de Cuba ene.-abr. 2015. (Citado 22 de abril de 2019). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212015000100002

[31] Aguirre L, García F, García T, Illera M, Juncadilla M, Lizondo M, et al. Validación de Métodos de Análisis en Materias Primas y Especialidades Farmacéuticas. En: Pérez J, Pujol M. Validación de Métodos Analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, AEFI: Barcelona, 2001.

[32] Instituto de salud pública Chile. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “aspectos generales sobre la validación de métodos”. Guíatécnica. Santiago, diciembre 2010.

[33]Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (A.E.F.I). Validación de métodos analíticos. Página 54. 2001.

[34]The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH).

Apéndices

Apéndice A. Evaluación de la adecuación del sistema cromatográfico.

Tabla 34. Adecuación del sistema cromatográfico.

N° de inyección	Ambroxol		Clenbuterol	
	Tiempo de retención (min)	Área	Tiempo de retención (min)	Área
1	15,75	29762632	7,43	26214
2	15,76	29930116	7,43	26089
3	15,78	29541846	7,45	26033
4	15,78	29713696	7,45	26097
5	15,79	29270704	7,44	26248
Promedio	15,77	29643799	7,44	26136
D.E.	0,018	250289	0,009	90,9
C.V	0,12	0,84	0,12	0,35

*D.E.: desviación estándar, C.V: coeficiente de variación.

Apéndice B. Linealidad. Curva de calibración.

Tabla 35. Curva de calibración. Linealidad Ambroxol.

Patrón (%)	Conc (mg/mL)	Áreas		
		Día 1	Día 2	Día 3
50	0,78	14704471	15282988	15284000
50	0,78	14667147	15375464	15104472
80	1,21	23157141	23187512	23408517
80	1,21	23130220	23231266	23357141
100	1,56	29762632	29455455	30254865
100	1,56	29930115	29797608	30236478
100	1,56	29270704	29877077	30271303
100	1,56	29541846	30062263	30302956
100	1,56	29713696	29960975	30274066
120	1,82	34634077	35222440	35594242
120	1,82	34950752	35026246	35803817
130	1,95	37781718	37705144	38410863
130	1,95	37720710	37987449	38211305

Tabla 36. Curva de calibración. Linealidad Clenbuterol.

Patrón (%)	Conc (µg/mL)	Áreas		
		Día 1	Día 2	Día 3
50	0,576	13376	12436	13153
50	0,576	13742	12206	13276
80	0,922	21726	21176	21242
80	0,922	20966	20883	21130
100	1,152	26214	26978	27321
100	1,152	26088	27373	27584
100	1,152	26248	27425	27460
100	1,152	26032	27254	27255
100	1,152	26097	27662	27533
120	1,382	30321	32788	32849
120	1,382	30331	33133	33567
130	1,498	33525	36334	36586
130	1,498	33466	37303	36239

Apéndice C. Linealidad. Criterios de aceptación.

Tabla 37. Criterios de aceptación para la linealidad de Ambroxol. Día 1.

Áreas	Concentración (mg/mL)	Factor de respuesta
14704471	0,78	18851887
14667147	0,78	18804036
23157141	1,21	19153963
23130220	1,21	19131696
29762632	1,56	19078610
29930115	1,56	19185972
29270704	1,56	18763272
29541846	1,56	18937081
29713696	1,56	19047241
34634077	1,82	19029713
34950752	1,82	19203710
37781718	1,95	19375240
37720710	1,95	19343954
	Promedio	19069721
	D.E.	192068
	C.V	1

Tabla 38. Criterios de aceptación para la linealidad de ambroxol. Día 2.

Concentración (mg/mL)	Áreas	Factor de respuesta
0,78	15282988	19593575
0,78	15375464	19712134
1,21	23187512	19179084
1,21	23231266	19215274
1,56	29455455	18881702
1,56	29797608	19101031
1,56	29877077	19151973
1,56	30062263	19270682
1,56	29960975	19205753
1,82	35222440	19352989
1,82	35026246	19245191
1,95	37705144	19335971
1,95	37987449	19480743
	Promedio	19286623
	D.E.	216315
	C.V	1

Tabla 39. Criterios de aceptación para la linealidad de ambroxol. Día 3.

Concentración (mg/mL)	Áreas	Factor de respuesta
0,78	15284000	19594872
0,78	15104472	19364709
1,21	23408517	19361884
1,21	23357141	19319389
1,56	30254865	19394144
1,56	30236478	19382358
1,56	30271303	19404682
1,56	30302956	19424972
1,56	30274066	19406453
1,82	35594242	19557276
1,82	35803817	19672427
1,95	38410863	19697879
1,95	38211305	19595541
	Promedio	19475122
	D.E.	129345
	CV	1

Tabla 40. Criterios de aceptación para la linealidad de clenbuterol. Día 1.

Concentración (µg/mL)	Áreas	factor de respuesta
0,576	13376	23223
0,576	13742	23859
0,922	21726	23574
0,922	20966	22750
1,152	26214	22755
1,152	26088	22647
1,152	26248	22785
1,152	26032	22598
1,152	26097	22654
1,382	30321	21934
1,382	30331	21941
1,498	33525	22386
1,498	33466	22347
	Promedio	22727
	D.E.	562
	C.V	2

Tabla 41. Criterios de aceptación para la linealidad de clenbuterol. Día 2.

Concentración (µg/mL)	Áreas	factor de respuesta
0,576	12436	21591
0,576	12206	21192
0,922	21176	22978
0,922	20883	22660
1,152	26978	23419
1,152	27373	23762
1,152	27425	23807
1,152	27254	23658
1,152	27662	24013
1,382	32788	23718
1,382	33133	23968
1,498	36334	24262
1,498	37303	24909
	Promedio	22727
	D.E.	562
	C.V	3

Tabla 42. Criterios de aceptación para la linealidad de clenbuterol. Día 3.

Concentración (µg/mL)	Áreas	factor de respuesta
0,576	13153	22837
0,576	13276	23049
0,922	21242	23050
0,922	21130	22928
1,152	27321	23716
1,152	27584	23945
1,152	27460	23837
1,152	27255	23659
1,152	27533	23901
1,382	32849	23763
1,382	33567	24282
1,498	36586	24430
1,498	36239	24198
	Promedio	23661
	D.E.	533
	C.V	2

Apéndice D. Robustez.

Tabla 43. Evaluación de la robustez del clenbuterol.

Experimento	Áreas			Promedio	% CV	Conc. (µg/mL)	% declarado
	Replica 1	Replica 2	Replica 3				
1	24741	24282	24576	24533	0,95	10,91	109,09
2	28351	28383	27989	28241	0,77	10,83	108,33
3	19067	19091	18925	19028	0,47	7,29	72,87
4	23277	24191	23923	23797	1,97	9,35	93,48
5	22240	21054	20457	21250	4,27	9,13	91,34
6	28069	28629		28349	1,40	10,81	108,07
7	21759	22565	21387	21904	2,75	7,63	76,33
8	24891	24439	24498	24609	1,00	9,43	94,26
Promedio						9,42	94,22
D.E.						1,41	14,13
C.V (%)						14,99	14,99
S*√2						19,98	

Valor eliminado

Tabla 44. Evaluación de la robustez del ambroxol.

Experimento	Áreas			Promedio	% CV	Conc. (mg/mL)	% declarado
	Replica 1	Replica 2	Replica 3				
1	23929823	23825299	24093152	23949425	0,56	13,95	93,02
2	27726218	27563367	27629686	27639757	0,30	13,82	92,12
3	24708157	24818874	24820322	24782451	0,26	12,84	85,60
4	25083240	24988880	25054360	25042160	0,19	12,69	84,60
5	24898182	24840480	24897327	24878663	0,13	13,94	92,91
6	28724231	28636474		28680353	0,22	13,03	86,86
7	27991493	28374201	28473953	28279882	0,90	12,96	86,38
8	28364851	28418577	28396188	28393205	0,10	14,07	93,80
Promedio						13,41	89,41
D.E						0,58	3,88
C.V (%)						4,34	4,34
S*√2						5,48	

Valor eliminado

Apéndice E. Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC).

Tabla 45. Curva de calibración y determinación del coeficiente de variación de los factores de respuestas para el Clenbuterol.

Patrón (%)	Conc (µg/mL)	Áreas	Factor respuesta
50	0,24	7463	31096
50	0,24	7520	31334
60	0,29	8541	29658
60	0,29	8540	29654
80	0,38	10278	26766
80	0,38	10268	26742
100	0,48	13402	27922
100	0,48	13370	27856
100	0,48	13374	27863
100	0,48	13327	27766
100	0,48	13380	27877
120	0,58	15083	26186
120	0,58	15318	26594
		Promedio	28255
		D.E.	1679
		C.V	6

Tabla 46. Curva de calibración y determinación del coeficiente de variación de los factores de respuestas para el ambroxol.

Patrón (%)	Conc (mg/mL)	Áreas	Factor respuesta
50	0,33	7307834	22485644
50	0,33	6803179	20932859
60	0,39	8072906	20699761
60	0,39	8084254	20728858
80	0,52	10763875	20699761
80	0,52	10816905	20801741
100	0,65	13612284	20941977
100	0,65	13697639	21073291
100	0,65	13652540	21003908
100	0,65	13585967	20901489
100	0,65	13616235	20948055
120	0,78	16386581	21008438
120	0,78	16345501	20955771
Promedio			21013966
D.E.			458749
C.V			2