

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS

PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



“Validación de una Técnica Analítica por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) y Cálculo de la Incertidumbre para los ensayos de Ambroxol clorhidrato y Clenbuterol clorhidrato en un Jarabe, Arequipa – 2013”

Tesis Presentado por las Bachilleres:

Acosta Neira, María Antonieta

Nina Flores, Sugeidy del Rosario

**Para optar el Título Profesional de Químico
Farmacéutico**

Asesor:

Dr. Jaime Cárdenas García Ph.D

AREQUIPA – PERÚ

2014

Dedicatoria

Con todo mi amor esta tesis está dedicada a mi familia completa por el apoyo incondicional, a mis hijas maravillosas Kahori y Doménica, a quienes les dedico especialmente este trabajo y todo lo bueno que pueda hacer acá en más y les agradezco su alegría la cual me motiva a seguir adelante contra cualquier obstáculo.

María Acosta Neira

A Dios, verdadera fuente de amor y sabiduría.
A mi padre, porque gracias a él sé que la responsabilidad se la debe vivir como un compromiso de dedicación y esfuerzo.
A mi madre, cuyo vivir me ha mostrado que en el camino hacia la meta se necesita de la dulce fortaleza para aceptar las derrotas y del sutil coraje para derribar miedos.
A mi hermano, el incondicional abrazo que me motiva y recuerda que detrás de cada detalle existe el suficiente alivio para empezar nuevas búsquedas.
A mi hija Anghely quien ha sido y es mi motivación, inspiración y felicidad.

Sugeidy Nina Flores

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a Dios, por sus tantas bendiciones y misericordias que me ha ofrecido. Y por eso te doy gracias por tus dones y el milagro de tu amor para iluminar mi camino y llegar al final con perseverancia..

A mi madre, por todo su apoyo y colaboración, pero sobretodo por su infinito e incondicional cariño y preocupación brindados a lo largo de toda mi vida.

Al Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica de Santa María por la formación profesional recibida.

Al Dr. Jaime Cárdenas García, por su valiosa guía y asesoría prestadas durante el transcurso de este proyecto.

A Laboratorios Portugal S.R.L. por permitirnos desarrollar este trabajo en sus instalaciones y en especial al área de Control de Calidad.

A Dios, verdadera fuente de amor y sabiduría.

A mi padre, porque gracias a él sé que la responsabilidad se la debe vivir como un compromiso de dedicación y esfuerzo.

A mi madre, cuyo vivir me ha mostrado que en el camino hacia la meta se necesita de la dulce fortaleza para aceptar las derrotas y del sutil coraje para derribar miedos.

A mi hermano, el incondicional abrazo que me motiva y recuerda que detrás de cada detalle existe el suficiente alivio para empezar nuevas búsquedas.

A mi hija Anghely quien ha sido y es mi motivación, inspiración y felicidad.

Sugeidy Nina Flores

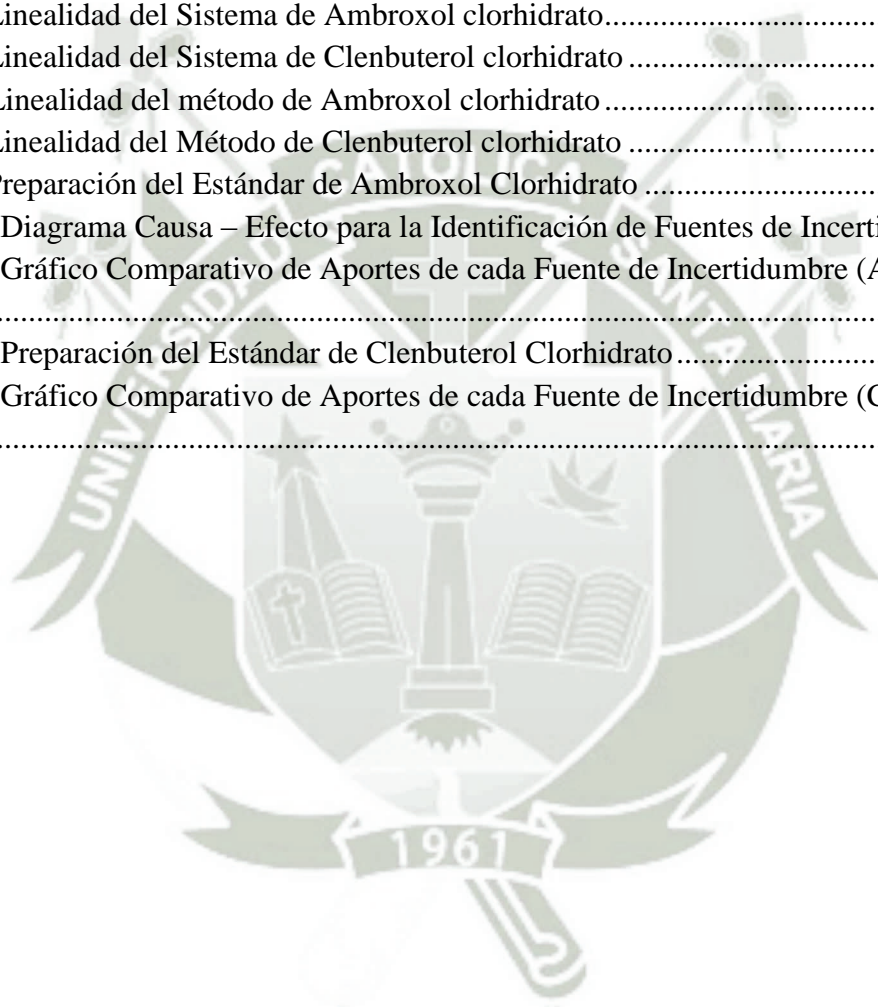
INDICE

Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
Hipotesis.....	7
Objetivos	8
Capitulo I: Marco Teórico.....	9
1. Ambroxol Clorhidrato.....	9
1.1. Nombre Y Estructura Química.....	9
1.2. Propiedades Físicas Y Químicas.....	9
1.3. Accion Farmacológica.....	10
1.4. Mecanismo De Acción.....	10
1.5. Farmacocinética.....	10
2. Clenbuterol Clorhidrato.....	10
2.1. Nombre Y Estructura Quimica.....	10
2.2. Propiedades Físicas Y Químicas.....	11
2.3. Acción Farmacológica.....	11
2.4. Mecanismo De Acción.....	11
2.5. Farmacocinética.....	12
3. Farmacocinética Y Farmacodinamia De La Asociación De Ambroxol Clorhidrato Y Clenbuterol Clorhidrato.....	12
4. Analisis Por Cromatografía Líquida De Alta Performance (Hplc).....	13
4.1. Concepto.....	13
4.2. Partes.....	13
5. Validación De Método Analíticos.....	16
5.1. Definición Analítica.....	16
5.2. Otros Terminos Relacionados Con La Validacion.....	16
5.3. Razones Que Justifican La Validacion De Metodos Analíticos.....	17
5.4. Metodos Susceptibles De Ser Validados.....	18
5.5. Entorno Legal.....	18
5.6. Organización: Buenas Practicas De Laboratorio.....	19
5.7. Fases En El Desarrollo De Un Metodo Analítico.....	20
5.8. Parametros De Validacion De Metodos Analíticos.....	20
5.9. Categorías De La Validación.....	23

5.10. Tipos De Validación	25
6. Incertidumbre De Medición.....	25
6.1. Parametros De Estimación De Incertidumbre	26
6.2. Estrategias Para El Cálculo De La Incertidumbre Analítica.....	27
6.2.1. Aproximación Iso (“Bottom-Up”).....	27
6.2.2. Estrategia Que Utiliza La Información De La Validación Del Método	32
 Capítulo II: Materiales y Métodos	 33
1. Material	33
1.1. Muestras.....	33
1.2. Material De Laboratorio	34
1.3. Reactivos.....	36
2. Desarrollo Del Método Analítico	36
3. Métodos Analíticos Desarrollado	37
3.1. Cuantificación De Ambroxol Clorhidrato	37
3.2. Cuantificación De Clenbuterol Clorhidrato	39
4. Desarrollo De Los Parametros De Validación.....	40
4.1. Criterios De Aceptación.....	41
4.2. Desarrollo De La Validación Para Ambroxol Clorhidrato	44
4.3. Desarrollo De La Validación Para Clenbuterol Clorhidrato.....	51
4.4. Tratamiento Estadístico Del Método De Validación.....	60
4.5. Parametros Para La Estimación De La Incertidumbre.....	66
 Capítulo III: Resultados	 69
1. Desarrollo Del Método Analítico	69
2. Parametros De Validación	72
3. Calculo De La Incertidumbre	108
 Capítulo IV: Discusión De Los Resultados.....	 123
 Conclusiones	 129
 Recomendaciones.....	 131
 Anexos.....	 132
 Referencias Bibliograficas	 138

INDICE DE FIGURAS

Fig. N° 1. 1: Etapas del cálculo de incertidumbre según ISO.....	28
Fig. N° 1. 2: Diagrama causa-efecto básico para identificación de fuentes de incertidumbre.....	29
Fig. N° 3. 1: Spectro tridimensional de Ambroxol clorhidrato 248 nm.....	70
Fig. N° 3. 2: Cromatograma de Estándar de Ambroxol clorhidrato	70
Fig. N° 3. 3: Espectro tridimensional de Clenbuterol clorhidrato 296 nm.....	71
Fig. N° 3. 4: Cromatograma de estándar de Clenbuterol clorhidrato.....	72
Fig. N° 3. 5: Linealidad del Sistema de Ambroxol clorhidrato.....	75
Fig. N° 3. 6: Linealidad del Sistema de Clenbuterol clorhidrato	77
Fig. N° 3. 7: Linealidad del método de Ambroxol clorhidrato	85
Fig. N° 3. 8: Linealidad del Método de Clenbuterol clorhidrato	87
Fig. N° 3. 9: Preparación del Estándar de Ambroxol Clorhidrato	109
Fig. N° 3. 10: Diagrama Causa – Efecto para la Identificación de Fuentes de Incertidumbre	110
Fig. N° 3. 11: Gráfico Comparativo de Aportes de cada Fuente de Incertidumbre (Ambroxol HCl)	115
Fig. N° 3. 12: Preparación del Estándar de Clenbuterol Clorhidrato.....	117
Fig. N° 3. 13: Gráfico Comparativo de Aportes de cada Fuente de Incertidumbre (Clenbuterol HCl)	122



INDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. 1: Datos Requeridos Para La Validación De Métodos Analíticos	24
Tabla N° 1. 2: Distribuciones estadísticas e incertidumbre asociadas	30
Tabla N° 1. 3: Tabla – t de Student para un 95% de confianza	32
Tabla N° 2. 1: Parámetros de Validación	41
Tabla N° 2. 2: Criterios de Aceptación para los Parámetros de Validación	41
Tabla N° 2. 3: Métodos de Degradación para Ambroxol clorhidrato	45
Tabla N° 2. 4: Pesos de Estándar para Linealidad del Sistema.....	47
Tabla N° 2. 5: Volumen de Muestra para Linealidad del Método.....	48
Tabla N° 2. 6: Métodos de Degradación para Clenbuterol clorhidrato	53
Tabla N° 2. 7: Pesos de Estándar para Linealidad del Sistema de Clenbuterol HCl.	55
Tabla N° 2. 8: Volumen de Muestra para Linealidad del Método para Clenbuterol HCl.	56
Tabla N° 3. 1: Evaluación de Interferencia para Ambroxol Clorhidrato	72
Tabla N° 3. 2: Evaluación de Interferencia para Clenbuterol clorhidrato.....	73
Tabla N° 3. 3: Interferencia de Productos por Degradación para Ambroxol clorhidrato	73
Tabla N° 3. 4: Interferencia de Productos por Degradación para Clenbuterol clorhidrato.....	73
Tabla N° 3. 5: Resultados de la linealidad del sistema de Ambroxol clorhidrato.....	74
Tabla N° 3. 6: Resultados de la Linealidad del Sistema de Clenbuterol clorhidrato	76
Tabla N° 3. 7: Intercepto, pendiente y ecuación de la recta.....	77
Tabla N° 3. 8: Parámetros calculados para la determinación de la linealidad del sistema de Ambroxol clorhidrato y Clenbuterol clorhidrato	84
Tabla N° 3. 9: Resultados de Linealidad del Método de Ambroxol clorhidrato	85
Tabla N° 3. 10: Resultados de Linealidad del Método de Clenbuterol clorhidrato	86
Tabla N° 3. 11: Parámetros Calculados para la Determinación de la Linealidad Del Método.....	88
Tabla N° 3. 12: Ensayo de Precisión Instrumental de Ambroxol clorhidrato.....	90
Tabla N° 3. 13: Tabla Resumen de las Áreas Obtenidas tanto para el Estándar como para las Muestras en la Repetibilidad del Método de Ambroxol clorhidrato	91
Tabla N° 3. 14: Variabilidad de la Concentración Promedio para el Ensayo de Precisión – Repetibilidad de Ambroxol clorhidrato Jarabe	92
Tabla N° 3. 15: Tabla Resumen de las Áreas Obtenidas tanto Para el Estándar como para las Muestras en la Repetibilidad del Método de Clenbuterol clorhidrato	93
Tabla N° 3. 16: Variabilidad de la Concentración Promedio para el Ensayo de Precisión – Repetibilidad de Clenbuterol clorhidrato Jarabe	94
Tabla N° 3. 17: Áreas del Estándar y Muestras Obtenidos por el Analista A y por el Analista B, en diferentes equipos y días para Ambroxol clorhidrato	95
Tabla N° 3. 18: Parámetros de Precisión Intermedia de Valoración de Ambroxol Clorhidrato Jarabe Realizado Por Dos Analistas, Análisis T – Pareado.....	95
Tabla N° 3. 19: Áreas del Estándar y Muestras Obtenidos por el Analista A y por el Analista B, en diferentes equipos y días para Clenbuterol clorhidrato	97

Tabla N° 3. 20: Parámetros de Precisión Intermedia de Valoracion de Clenbuterol clorhidrato Jarabe realizado por dos Analistas, Análisis T – Pareado	98
Tabla N° 3. 21: Datos y Áreas de los Estándares de Ambroxol clorhidrato y Clenbuterol clorhidrato	99
Tabla N° 3. 22: Determinación de la Exactitud del Método para Ambroxol clorhidrato	99
Tabla N° 3. 23: Determinación de la Exactitud del Método para Clenbuterol clorhidrato	101
Tabla N° 3. 24: Resultados de la Pruebas de Robustez para Ambroxol clorhidrato	103
Tabla N° 3. 25: Resultados de la Pruebas de Robustez para Clenbuterol clorhidrato	104
Tabla N° 3. 26: Rango del Método de Ambroxol clorhidrato y Clenbuterol Clorhidrato	104
Tabla N° 3. 27: Resumen de Resultados de los Parámetros de Validación, según la USP y la ICH	105
Tabla N° 3. 28: Resultados Obtenidos en Diferentes Días y en Diferentes Equipos para Ambroxol clorhidrato (Amb. HCl) y Clenbuterol clorhidrato (Clen. HCl).....	108
Tabla N° 3. 29: Repetibilidad de la Pesada con Intervalo de 10 Segundos	112
Tabla N° 3. 30: Resumen de Cálculo de Incertidumbre (Ambroxol Clorhidrato)	115
Tabla N° 3. 31: Repetibilidad de la Pesada con Intervalo de 10 Segundos	119
Tabla N° 3. 32: Resumen de Cálculo de Incertidumbre (Clenbuterol clorhidrato).....	121





RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se desarrolló con el objetivo primordial de validar la metodología analítica por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) y el cálculo de incertidumbre para la cuantificación de los principios activos Ambroxol clorhidrato y Clenbuterol clorhidrato en un jarabe, debido a que la técnica de análisis para este medicamento compuesto no se encuentra en libros oficiales. Esto teniendo en cuenta que la validación es un requisito imprescindible para el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL). Según el informe N° 957, 2010 de la OMS, se pueden requerir en ensayos de investigación la determinación de la concentración pudiendo proporcionarse también la incertidumbre estimada. Se llevó a cabo en el Laboratorios Portugal S.R.L. área de Control de Calidad.

Para la validación del método de un jarabe que contiene Ambroxol clorhidrato y Clenbuterol clorhidrato como principios activos, se desarrolló dos métodos de análisis respectivamente por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC); las condiciones cromatográficas se establecieron con un sistema isocrático en fase reversa: para ambroxol clorhidrato, Columna Eclipse XDB – (L1) C18, de 100 mm x 4,6 mm x 5,0 μ m, la fase móvil compuesta por acetonitrilo:buffer fosfato de amonio pH 7.0 (60:40), con un flujo de 1.0 mL/minuto, temperatura de 25 °C, la longitud de onda fijada en el detector UV fue de 248 nm y el volumen de inyección de 10 μ L, el tiempo de retención fue de aproximadamente 2.35, estableciéndose un tiempo de corrida de 5

minutos y Columna Purospher Star RP8e (L7), de 75 mmx 4.6 mm x 3.0 μ m, fase móvil compuesta por acetonitrilo:buffer formato de amonio pH 2.7 (10:90), flujo de 1.0 mL/minuto, temperatura de 40 °C, longitud de onda de 296 nm, volumen de inyección de 80 μ L, el tiempo de retención 10.5 minutos, tiempo de corrida de 40 minutos para clenbuterol clorhidrato. Se evaluaron los parámetros como linealidad, precisión, exactitud, especificidad y rango, obteniéndose resultados adecuados lo que se demostró mediante el diseño experimental que las metodologías analíticas son lineales dado que se obtuvo un coeficiente de correlación $r_{\text{Amb. HCl}}=0.9992$, $r_{\text{Clenb. HCl}}= 0.9998$, son lineales en el rango de 0.09 mg/ml a 0.21 mg/mL para Ambroxol clorhidrato y de 0.00030 mg/mL a 0.00057 mg/mL para clenbuterol clorhidrato; es precisa ya que el coeficiente de variación (CV) de la precisión instrumental para las áreas y los tiempos fue de $\leq 2\%$, la repetibilidad tuvo un $CV_{\text{Amb. HCl}}= 0.80\%$ $CV_{\text{Clenb. HCl}}= 1.38\%$, es exacta con una recuperación de media de Amb. HCl = 99.86% y Clenb. HCl = 99.87%, es específica dado que no se evidenció interferencia de productos de degradación o de los excipientes en el análisis del principio activo, estos parámetros están dentro del rango establecido.

En el cálculo de incertidumbre de medida para las metodologías antes validadas, se aprecia que la evaluación Tipo A de la incertidumbre, por ser de cuatro y cinco magnitudes mayor que la evaluación Tipo B respectivamente, refleja el valor final de la incertidumbre combinada $u_c = 0.35\%$ (Amb HCl) $u_c = 0.28\%$ (Clenb. HCl) y una incertidumbre Expandida $U = 0.71\%$ (Amb HCl) $U = 0.57\%$ (Clenb. HCl) con un nivel de confianza de 95%.

Los resultados de estos parámetros se sometieron a pruebas estadísticas demostrando que los métodos analíticos propuestos para la cuantificación de los principios activos son selectivos, exactos, precisos y lineales, así mismo la confiabilidad de los métodos, garantizando de esta forma la calidad del medicamento.

Palabras claves: Ambroxol Clorhidrato, Clenbuterol Clorhidrato, Jarabe, Cromatografía Líquida de Alta Performance, Especificidad, Linealidad, Precisión, Exactitud, Rango, Incertidumbre Estándar, Incertidumbre Combinada, Incertidumbre Expandida

ABSTRACT

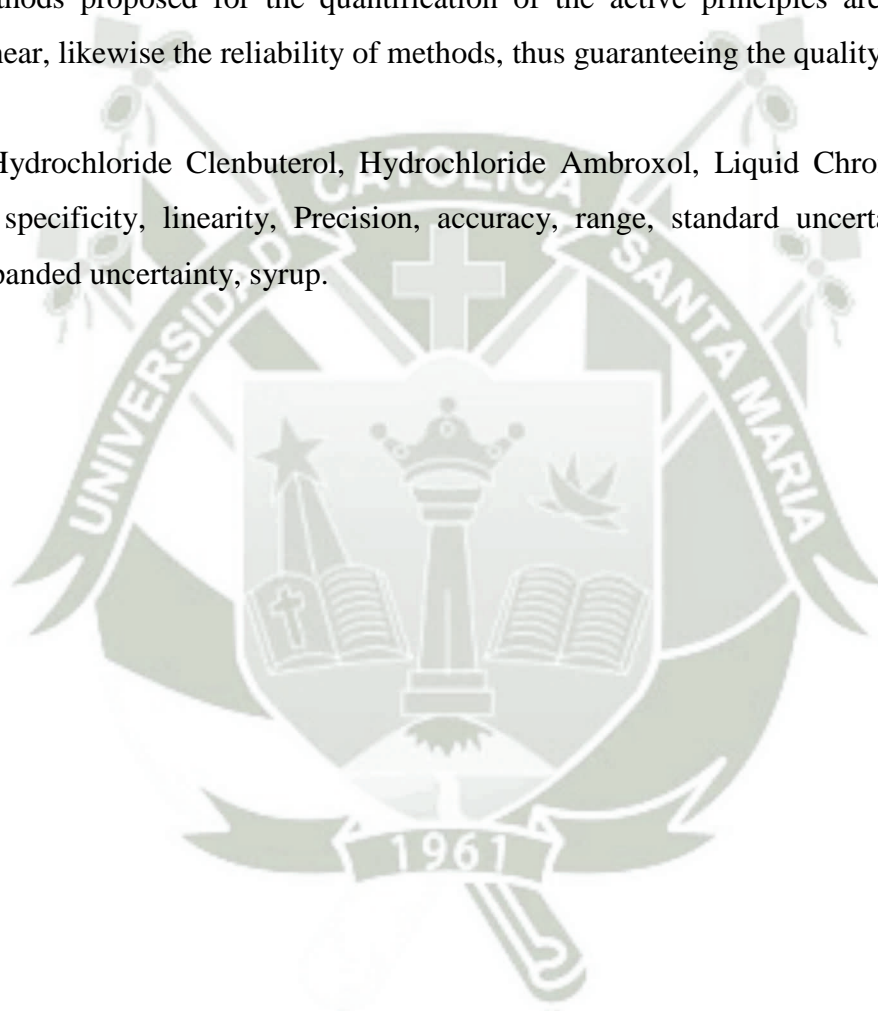
In this research work was developed with the objective of validating the analytical method by Liquid Chromatography High Performance (HPLC) and calculation of the uncertainty for the quantification of active ingredients, Ambroxol hydrochloride and Clenbuterol hydrochloride in syrup, due to which the technique of analysis for this compound medication is not in official books. This taking into account that the validation is a prerequisite for the good laboratory practices (GLP) N°.957,2010 of the who, the report may be required in research trials the determination of the concentration and can also provide the estimated uncertainty. Was carried out in the laboratories Portugal S.R.L. Calidad Control area.

For the validation of the method of a syrup containing Ambroxol hydrochloride and Clenbuterol hydrochloride as active principles, developed two methods of analysis by liquid chromatography High Performance (HPLC) respectively; the chromatographic conditions were established with an isocratic system in reversed phase: to ambroxol hydrochloride, column Eclipse XDB - C18 (L1), 100 mm x 4,6 mm x 5,0 μm , the mobile phase composed of acetonitrilo:buffer ammonium phosphate pH 7.0 (60:40), with a flow of 1.0 mL/min, temperature 25 ° C, fixed in the UV detector wavelength was 248 nm and the injection of 10 μL volume, the retention time was approximately 2.35, establishing a time of run of 5 minutes and column Purospher Star RP8e (L7) of 75 mmx 4.6 mm x 3.0 μm , mobile phase composed of ammonium format acetonitrilo:buffer pH 2.7 (10:90), flow of 1.0 mL/min, temperature of 40 ° C, 80 μL injection volume 296 nm wavelength, the retention time of 10.5 minutes, time of 40 minutes for clenbuterol hydrochloride Bullfight. Evaluated parameters such as linearity, precision, accuracy, specificity and range, obtaining adequate results demonstrated by the experimental design that analytical methodologies are linear since a correlation coefficient was obtained $r_{\text{Amb. HCl}} = 0.9992$, $r_{\text{Clenb. HCl}} = 0.9998$, they are linear in the range of 0.09 mg/ml to 0.21 mg/mL for Ambroxol hydrochloride and 0,00030 mg/mL to 0.00057 mg/mL for clenbuterol hydrochloride; It is accurate because the coefficient of variation (CV) of you instrumental precision for the areas and times was $\leq 2\%$, repeatability had a $CV_{\text{Amb. HCl}} = 0.80\%$ $CV_{\text{Clenb. HCl}} = 1.38\%$, is accurate with a recovery of average of Amb. HCl = 99.86% and Clenb. HCl = 99.87%, is specified since not evidenced interference from degradation products of the excipients in the analysis of the active ingredient, these parameters are within the established range.

In the calculation of uncertainty of measurement for previously validated methodologies, it can be seen that evaluation A type of uncertainty, being four and five magnitudes more type B evaluation respectively, reflecting the final value of the combined uncertainty $u_c = 0.35\%$ (Amb HCl) and $u_c = 0.28\%$ (Clenb. HCl) and an uncertainty expanded $U = 0.71\%$ (Amb HCl) $U = 0.57\%$ (Clenb. HCl) with a confidence level of 95%.

Confidence level the results of these parameters were subjected to statistical tests showing that the analytical methods proposed for the quantification of the active principles are selective, exact, precise and linear, likewise the reliability of methods, thus guaranteeing the quality of the drug

Keywords: Hydrochloride Clenbuterol, Hydrochloride Ambroxol, Liquid Chromatography High Performance, specificity, linearity, Precision, accuracy, range, standard uncertainty, uncertainty combined, expanded uncertainty, syrup.



INTRODUCCIÓN

En el mercado farmacéutico actual existen varios medicamentos de gran demanda por la población, cuyos métodos de análisis no se encuentran publicadas en las obras oficiales que generalmente se consultan, a saber: farmacopea americana, británica, europea y japonesa. Esto hace necesario desarrollar nuevas técnicas de análisis en el laboratorio con el fin de separar y cuantificar los principios activos de dichos medicamentos.

Por lo tanto, la industria farmacéutica, después de una etapa de discusión, ha convertido a las validaciones en un mecanismo de control retroactivo de los medios de calidad. Las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) vigentes no estarían completas sin lo que llamamos validación de procesos de producción, la cual incluye la validación de los métodos de análisis para el control de calidad de los medicamentos.

Los procedimientos para la evaluación de los niveles de calidad de los productos farmacéuticos en el país están dados por la Dirección general de Insumos, Medicamentos y Drogas (DIGEMID) a través del Manual de Buenas Prácticas de Productos Farmacéuticos, como instrumento normativo necesario para cautelar la calidad en la fabricación de los productos farmacéuticos. Este organismo gubernamental se rige, a su vez, de reglamentaciones dadas por organismos internacionales reconocidos oficialmente como la Food and Drug Administration (FDA), Organización Mundial de la salud (OMS), Asociación Oficial Analytical Chemists (AOAC), Conferencia Internacional Tripartita Sobre Armonización (ICH), Farmacopea Europea (BP) y Americana (USP).

En el presente trabajo de investigación se ha desarrollado dos métodos analíticos para la cuantificación de ambroxol clorhidrato 7.5 mg y clenbuterol clorhidrato 0.005 mg en 5 mL presentes en un jarabe, por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC), la asociación de estos principios activos se indican en enfermedades agudas y crónicas de las vías respiratorias que van acompañadas de espasmo bronquial. La metodología analítica fue validada según lo recomendado en la USP 36, realizando la aptitud del sistema y evaluando el método con los parámetros de desempeño en cuanto a selectividad, exactitud, precisión, precisión intermedia, linealidad y rango.

Es aquí donde la evaluación de la incertidumbre de medición en química analítica ha despertado en los últimos años un marcado interés. Se acepta en general que, para evaluar si un resultado de análisis es apto para el propósito al cual se destinará, es indispensable realizar una estimación de la incertidumbre de medición. Son conocidos los documentos de referencias en cuanto a la metodología de evaluación de incertidumbre en química analítica.

Esta metodología requiere que se identifiquen todas las posibles fuentes de incertidumbre asociadas con el proceso de medición y que se estime su valor, ya sea por medios estadísticos (evaluación tipo A) o por medios documentados (evaluación tipo B). Posteriormente se combinan estos componentes individuales para obtener las incertidumbres estándar y expandida para el proceso total.

En conjunto, tanto la validación de la metodología por HPLC como el cálculo de la incertidumbre, proporcionan un alto grado de confianza y seguridad en el método analítico, y en la calidad de los resultados. Permite un conocimiento profundo de sus características de funcionamiento, disminución del número de fallas y repeticiones, con el consiguiente ahorro de los costos asociados.

HIPOTESIS

Puesto que se hace necesario la cuantificación de Ambroxol clorhidrato y Clenbuterol clorhidrato en un jarabe, siguiendo las pautas establecidas por la USP (*United States Pharmacopeia*) es probable que se pueda cuantificar estos principios activos por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) y según los resultados obtenidos calcular la incertidumbre del método.



OBJETIVOS

GENERALES

- Validar y estimar la incertidumbre de los métodos analíticos por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para cuantificar Ambroxol clorhidrato y Clenbuterol clorhidrato en un jarabe.

ESPECIFICOS

- Establecer las condiciones cromatográficas óptimas para la validación de los métodos analíticos por HPLC.
- Determinar y demostrar que las metodologías propuestas cumplen con los parámetros de linealidad, exactitud, repetibilidad, precisión intermedia y selectividad según lo establece la USP y la ICH
- Estimar la incertidumbre de medición asociada a los métodos analíticos validados.

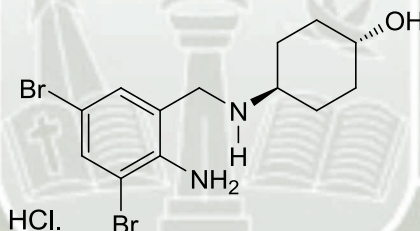
CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1. AMBROXOL CLORHIDRATO

1.1. NOMBRE Y ESTRUCTURA QUÍMICA

La denominación química del ambroxol clorhidrato según la IUPAC es *trans*-4-(2-amino-3,5-dibromobencilamino)-ciclohexanol clorhidrato y su peso molecular es 414.6 g/mol.



Según la *British Pharmacopea* 2013, el ambroxol clorhidrato contiene no menos de 99.0% no más de 101.0% de $C_{13}H_{18}Br_2N_2O$, HCl, calculado con respecto a la sustancia seca. ⁽¹⁾

1.2. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

Aspecto físico: Polvo cristalino, blanco prácticamente inodoro.

Solubilidad: Moderadamente soluble en agua, soluble en metanol e insoluble en cloruro de metileno.

Pérdida por secado: No más de 0.5% de su peso. ⁽¹⁾

1.3. ACCION FARMACOLÓGICA

El ambroxol, en su forma de clorhidrato, es un fármaco que cae en la categoría de los medicamentos mucolíticos.

Aumenta la secreción de vías respiratorias, potencia la producción de surfactante pulmonar y mejora el aclaramiento mucociliar, como consecuencia: facilita la expectoración, alivia la tos y reduce reagudizaciones de bronquitis crónica y EPOC. ⁽²⁾

1.4. MECANISMO DE ACCIÓN

El ambroxol actúa sobre los neumocitos tipo II del epitelio pulmonar estimulando la síntesis y la secreción de la sustancia surfactante. El ambroxol aumenta el volumen del esputo, disminuye la viscosidad, fluidifica y favorece la expectoración de las secreciones, la permeabilidad de la luz alveolar y bronquial y la penetración de los antibióticos en las secreciones bronquiales. Es bien absorbido en el tracto gastrointestinal. ^(3,4)

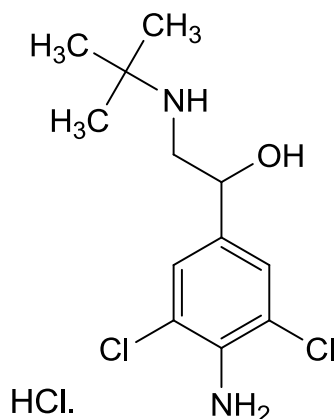
1.5. FARMACOCINÉTICA

El fármaco se absorbe rápidamente por vía oral a nivel del intestino. Tiene una vida media de 10 horas aproximadamente. Cuando se toma en ayunas, la concentración máxima en el plasma sanguíneo ocurre a las 2 1/2 horas. El ambroxol se une de manera reversible a las proteínas plasmáticas y un 10% de la sustancia activa es desechada por las heces fecales. ⁽⁴⁾

2. CLENBUTEROL CLORHIDRATO

2.1. NOMBRE Y ESTRUCTURA QUIMICA

La denominación química del clenbuterol clorhidrato según la IUPAC es 1-(4-amino-3,5-diclorofenil)-2-(tert-butilamino) etan-1-ol hidrocloreuro y su peso molecular es 313.65 g/mol.



Según la *United States Pharmacopeia 36*, el clenbuterol clorhidrato contiene no menos de 98.0% y no más de 102.0% de $C_{12}H_{18}Cl_2N_2O$, HCl, calculado con respecto a la sustancia anhidra. ⁽⁵⁾

2.2. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

Aspecto físico: Polvo cristalino, blanco o casi blanco.

Solubilidad: Soluble en agua y etanol (96 %), poco soluble en acetona..

Pérdida por secado: No más de 1.0% de su peso. ⁽¹⁾

2.3. ACCIÓN FARMACOLÓGICA

El Clenbuterol clorhidrato es un bronco dilatador selectivo, rápido y potente, cuya acción se manifiesta de 5 a 10 minutos después de ser administrado y persiste durante 10 a 14 horas. ⁽⁶⁾

2.4. MECANISMO DE ACCIÓN

Mediante estudios realizados se ha demostrado que después de la administración oral de una dosis de 0.02 mg de clorhidrato de clenbuterol hay una completa absorción del fármaco; los niveles plasmáticos se alcanzan entre las 2 y 3 horas siguientes. ⁽⁶⁾

2.5. FARMACOCINÉTICA

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. ⁽⁶⁾

3. FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA DE LA ASOCIACIÓN DE AMBROXOL CLORHIDRATO Y CLENBUTEROL CLORHIDRATO

Las enfermedades bronquiales espásticas se manifiestan por contracción de la musculatura bronquial, producción de moco viscoso y dificultad en el transporte de la secreción.

La asociación de ambroxol clorhidrato y clenbuterol clorhidrato dilata los bronquios constreñidos y favorece la limpieza bronquial.

Mientras que el clenbuterol resuelve la contracción del músculo bronquial, ambroxol, en acción conjunta con clenbuterol, facilita el transporte de la secreción fuera de las vías respiratorias, normaliza la formación de secreción e impide acumulación de moco viscoso, permitiendo nuevamente espirar e inspirar el aire con facilidad.

La farmacocinética de ambroxol es dosis-lineal los niveles plasmáticos se alcanzan a las 2 ½ horas el pulmón es uno de los órganos con concentraciones máximas de sustancia activa. La vida media plasmática es de 9-10 horas con una afinidad por proteínas plasmáticas del 90% se elimina preferentemente por vía renal (85%).

Los clorhidratos de ambroxol y de clenbuterol al ser administrados en asociación en una misma forma farmacéutica (en solución) no modifican su biodisponibilidad y por lo tanto pueden usarse asociados en terapéutica.

4. ANALISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)

La selección del método de análisis depende de factores como costos, facilidad de implementación, experiencia previa obtenida y de la existencia de una técnica seguir.

4.1. CONCEPTO

La cromatografía de líquidos de alta performance (HPLC, por sus siglas en inglés), también llamada cromatografía de líquidos de alta resolución, es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. Las separaciones se logran por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada. ⁽⁵⁾

4.2. PARTES

4.2.1. FASE ESTACIONARIA Y FASE MÓVIL

Para la mayoría de los análisis farmacéuticos, la separación se logra por la partición de los compuestos en la solución de prueba entre la fase móvil y la estacionaria.

Los sistemas que constan de fase estacionarias polares y fases móviles no polares se describen como de fase normal, mientras que, por el contrario, cuando se emplean fases móviles polares y fases estacionarias no polares se denomina cromatografía en fase reversa.

La difusión de fase reversa se debe a un factor calve: la silicagel (como también la alúmina), es un material fuertemente higroscópico. El agua adsorbida, que forma capas simples o múltiples alrededor de la película y llega a tapar poros, es responsable de la pérdida de actividad de la fase estacionaria en fase normal.

La afinidad de un compuesto por la fase estacionaria, y por consiguiente su tiempo de retención en la columna se controla mediante una fase móvil más o menos polar. La polaridad de la fase móvil puede variar mediante el agregado de un segundo y, a veces, un tercer o hasta cuarto componente. ⁽⁵⁾

Las columnas para cromatografía de líquidos se construyen normalmente con tubos de acero inoxidable de diámetro interno uniforme, tienen una longitud entre 10 y 30 cm. Por lo común, las columnas son rectas y se pueden alargar, si es necesario, acoplando dos o más columnas. El diámetro interno de las columnas es a menudo de 4 a 10 mm; y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son de 3.5 a 10 μm de formas irregulares o esféricas. ⁽⁷⁾

Las fases estacionarias para la moderna cromatografía de líquidos de fase reversa constan normalmente de una fase orgánica químicamente unida a sílice u otros materiales. La sílice o también llamado silicagel es un sólido amorfo y poroso de gran área superficial (30 a 500 m^2) y alto volumen de poro (0.4 a 1.2 ml/g), de diámetro de poro entre 60 a 300 Å , químicamente en un óxido de silicio hidratado ($\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), sus átomos internos ligados por O_2 y los superficiales por OH. ⁽⁸⁾

Las columnas pueden calentarse para proporcionar separaciones más eficaces pero rara vez se las utiliza a temperaturas por encima de los 60 $^\circ\text{C}$, debido a la potencial degradación de la fase estacionaria o la volatilidad de la fase móvil. ⁽⁵⁾

4.2.2. BOMBA

Los sistemas de bombeo de HPLC administran cantidades exactas de fase móvil desde los Recipientes hasta la columna mediante una tubería y uniones adecuadas para altas presiones. ⁽⁵⁾

Existen 3 tipos de bombas, cada una con sus propias ventajas y desventajas: bombas recíprocas, bombas de jeringa o desplazamiento y bombas neumáticas o de presión constante.

4.2.3. INYECTORES

Después de ser disueltos en la fase móvil u otra solución apropiada, los compuestos que se van a cromatografiar se inyectan en la fase móvil, ya sean manualmente usando jeringas o inyectores de espiral o bien automáticamente mediante el uso de inyectores automáticos. Estos últimos constan de un carrusel o una gradilla para sostener los viales de muestra cuya parte superior se encuentra tapada con un septo o un perforable y un dispositivo de inyección para transferir las muestras desde los

viales a un espiral conectado al cromatógrafo. Los inyectores automáticos pueden programarse para controlar el volumen de muestreo, el número de inyecciones, y los ciclos de enjuague del espiral, el intervalo entre las inyecciones y otras variables operativas. ⁽⁸⁾

4.2.4. DETECTORES

La mayoría de métodos de HPLC usados actualmente requieren del uso de detectores espectrofotométricos. Este tipo de detector consta de una celda de flujo colocada en el extremo de la columna. Un haz de radiación UV pasa a través de la celda de flujo y se introduce en el detector. A medida que los compuestos eluyen de la columna, pasan a través de la celda y absorben la radiación lo que da lugar a cambios cuantificables en el nivel de energía.

Los detectores de longitud de onda variable contienen una fuente de luz continua, como una lámpara de deuterio o de xenón de alta presión y un monocromador o un filtro de interferencia para generar radiación monocromática a una longitud de onda seleccionada por el operador.

Los detectores nos permiten ver y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica. ⁽⁵⁾

4.2.5. SISTEMAS DE TOMA Y PROCESAMIENTO DE DATOS

Las estaciones de datos modernas reciben y almacenan la señal de los detectores e imprimen el cromatograma completo con las alturas y las áreas de los picos, la identificación de la muestra y las variables del método. Se emplean también para programar la cromatografía de líquidos, controlando la mayoría de las variables y proporcionando periodos largos de operación sin necesidad de supervisión. ⁽⁵⁾

El resultado del ensayo cromatográfico es la obtención de fracciones separadas de un gráfico o cromatograma de cuya interpretación pueden extraerse conclusiones cualitativas y cuantitativas. ⁽⁸⁾

4.2.6. APTITUD DEL SISTEMA

Las pruebas de aptitud del sistema son una parte integral de los métodos de cromatografía de líquidos. Se emplean para verificar que la sensibilidad de detección, la resolución y la reproducibilidad del sistema cromatográfico, son adecuadas para el análisis que se va a realizar. Las pruebas se basan en el concepto de que el equipo, los componentes electrónicos, las operaciones analíticas y las muestras que deben analizarse constituyen un sistema integral que pueden evaluarse como tal. ⁽⁵⁾

5. VALIDACIÓN DE MÉTODO ANALÍTICOS

5.1. DEFINICION ANALITICA

La validación de técnicas analíticas es el establecimiento de evidencia documental de que el procedimiento analítico conducirá con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos. La validación es la confirmación a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para uso específico. ⁽¹⁰⁾

5.2. OTROS TERMINOS RELACIONADOS CON LA VALIDACION

5.5.1. CALIFICACION

La operación por la que se comprueba que un equipo funciona correctamente y produce en realidad el resultado previsto. ⁽¹⁰⁾

5.5.2. CALIBRACION

Conjunto de operaciones que determinan, bajo condiciones previamente definidas, la relación entre los valores indicados por el sistema de medición y los valores conocidos cada uno correspondientes a un patrón de referencia. ⁽¹⁰⁾

Por lo tanto validar es verificar documentalmete que un método o proceso hace lo que tiene que hacer. CALIFICAR es dotar o verificar las cualidades o características inherentes a un aparato o calibración es una parte de la cualificación. Es por ello que los métodos deben ser validados y los equipos calificados. ⁽¹¹⁾

El tema documentario es muy importante también porque nos permite obtener la información y los parámetros necesarios para evaluar nuestra validación, por lo tanto existen directivas como ⁽¹¹⁾⁽¹²⁾

- Informes 34 de la OMS ⁽²³⁾
- Informe 37 de la OMS ⁽²⁴⁾
- RESOLUCION N° 0008-2003 / INDECOPI – CRT ⁽²⁵⁾
- GUIA DE LA AOAC ⁽²⁶⁾
- GUIA DE LA FAO ⁽²⁷⁾
- GUIA DE EURACHEM ⁽²⁸⁾
- ICH Q2A: Validation of Analytical Procedures: methodology ⁽²⁹⁾
- ICH Q2B: Text on Validation of Analytical Procedures ⁽¹¹⁾

5.3. RAZONES QUE JUSTIFICAN LA VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

Las razones que justifican la validación de técnica analíticas son:

- a) Demostrar que los métodos son adecuados a los análisis propuestos en las condiciones descritas, la validación es la herramienta que permite obtener las pruebas documentadas al respecto.
- b) Trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados, lo cual a su vez minimizara el número de fallos y repeticiones permitiendo un ahorro de costos.
- c) Trabajar con métodos validados permite no solo el conocimiento del método analítico sino también cumplir con las exigencias legales tanto del registro de especialidades farmacéuticas como las buenas prácticas de laboratorio con el fin de asegurar la calidad, eficacia del producto y cumplir con la recuperación del país. ⁽¹¹⁾⁽¹²⁾

5.4. METODOS SUSCEPTIBLES DE SER VALIDADOS

- Ensayos de identificación.
- Ensayos para la determinación del analito de una materia de interés de una materia prima o de una especialidad farmacéutica.
- Ensayo para la determinación de características farmacéuticas inherentes.
- Ensayos de límite de impurezas y cuantificación de impurezas.
- Ensayo para la determinación de analitos en fluidos biológicos.
- Ensayos microbiológicos.

5.5. ENTORNO LEGAL

5.5.1. REQUERIMIENTO PARA EL REGISTRO

Además de la FDA requiere para el registro de nuevos productos que los métodos analíticos sean validados y documentados.

5.5.2. NORMAS DE CORRECTA FABRICACION DE MEDICAMENTOS

Las normas de correcta fabricación de medicamentos de la CEE indica que los métodos de análisis deben ser validados, de igual forma las *Good Manufacturing Practice* de los EEUU indican que deben establecerse y documentarse la exactitud, sensibilidad, especificidad, y reproducibilidad de los métodos analíticos utilizados.⁽¹⁰⁾

5.5.3. FARMACOPEAS

Validación Frente A Los Métodos Oficiales y/o Farmacopeas

Se puede diferenciar entre validación de métodos de análisis de principios activos y especialidades farmacéuticas:

- a) Principio activo de síntesis: los métodos oficiales o de farmacopea se consideran validos siempre y cuando se apliquen a principios activos con la misma ruta de síntesis. ⁽¹⁰⁾
- b) Especialidades: no es recomendable considerar ningún método oficial o de farmacopea totalmente validado para una especialidad puesto que difícilmente tendrá los mismos componentes ni la misma proporción. ⁽¹⁰⁾

5.6. ORGANIZACIÓN: BUENAS PRACTICAS DE LABORATORIO

Para validar un método analítico se requiere en primer lugar un entorno de trabajo que garantice la seguridad de los resultados que obtengan la consecución de esta garantía de calidad requiere trabajar de acuerdo con unas pautas correctas.

Las BPL surgieron para evitar deficiencias tales como experimentos sin protocolos previos, datos y resultados no supervisados o trazables, instrumentos o reactivos en condiciones inaceptables, muestras no representativas, personal no calificado, etc. ⁽¹⁰⁾

Frente a estas deficiencias las BPL preconizaban un sistema unificado de trabajo y de gestión.

Las áreas de trabajo bajo normas BPL son:

- a) Organización y personal de laboratorio.
- b) Instalaciones.
- c) Cuidado, alojamiento y confinamiento de los elementos utilizados en los sistemas experimentales biológicos.
- d) Aparatos, materiales, reactivos.
- e) Sistemas experimentales.
- f) Productos de referencia.
- g) Documentación.
- h) Archivos: almacenamiento y conservación de registros.
- i) Verificación de estudios.
- j) Inspecciones.

5.7. FASES EN EL DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO

El desarrollo lógico del método analítico transcurre en tres fases:

a. Definición de las características y requerimiento que debe satisfacer el método analítico: Se evalúan los parámetros de practicabilidad del método analítico como: precisión exigible, sensibilidad deseable, grado de selectividad, tiempo, costo, tamaño de la muestra, cualificación del personal, tipo de equipo e instrumentación, condiciones de seguridad, etc. ⁽¹⁰⁾

b. Puesta a punto (idoneidad) del método analítico: Incluye desde los primeros estudios de tanteo con patrones, hasta la utilización del método en muestras reales que garanticen el buen funcionamiento del sistema en el momento del análisis. ⁽¹⁰⁾

c. Validación del Método Analítico: Esta etapa permitirá conocer las características de fiabilidad del método para su aplicación rutinaria y, en combinación con las etapas anteriores, sus características de funcionamiento con consecuencia positivas para su rendimiento. ⁽¹⁰⁾

5.8. PARAMETROS DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

Las características de desempeño de un método analítico se expresan en función de los parámetros analíticos. Estos parámetros analíticos considerados en validación son:

5.8.1. ESPECIFICIDAD

Expresa la capacidad del método para medir y/o identificar simultáneamente o de una forma separada los analitos de interés, en forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que puedan estar presentes en la muestra. ⁽⁵⁾⁽¹⁰⁾

Otra posible aproximación se puede realizar mediante el estudio de muestras sometidas al estrés para generar los compuestos potencialmente interferentes. Este tipo de estudios adquiere especial importancia para los métodos en que se desea evaluar la estabilidad de un principio activo o forma

farmacéutica. Se debe comprobar hacer posible, la identidad del analito y que la señal proviene solo de él. La presencia de interferencias puede tener distintos efectos en la determinación del analito como: Imposibilitar su inequívoca identificación (aparición de falsos positivos).

Distorsionar la respuesta del analito (afecta normalmente la pendiente y ordenada en el origen de la recta de calibrado). Este efecto puede delatar la presencia de interferencias desconocidas. La selectividad de un método analítico debería determinar antes de iniciar el estudio de cualquier otro parámetro de validación, dado que debe conocerse en qué grado la respuesta del método es únicamente proporcionada por el analito; sin interferencias de otras sustancias relacionadas con el de una u otra forma.

Ámbito de aplicación

Determinación cuantitativa de un compuesto o riqueza de un principio activo: el método debe evitar la interferencia de excipientes, por productos de degradación y/o respuesta proporcionada por el compuesto o principio activo objeto de la evaluación analítica.

5.8.2. LINEALIDAD

Expresa la cantidad del método para brindar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un rango establecido.

Dentro del rango establecido se recomienda estudiar al menos 5 niveles de concentración al 50%, 75%, 100%, 125%, 150% del contenido teórico y analizarlas por triplicado con un total de quince determinaciones, se establece como criterio practico analizarlas en sentido creciente de la concentración y se recomiendan hacer pesadas individuales. ⁽⁵⁾⁽¹⁰⁾

5.8.3. PRECISIÓN

Refleja la medida en que los valores de una serie repetida de ensayos analíticos que se realizan sobre una muestra homogénea son semejantes entre sí. ⁽⁵⁾⁽¹⁰⁾

El objetivo de estudio de precisión es conocer la variabilidad del método de ensayo. La precisión engloba diferente tipo de estudios según:

- Repetibilidad: Repetibilidad instrumental y repetibilidad del método.
- Precisión intermedia.
- Reproducibilidad.

5.8.3.1. Repetibilidad

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, mismo equipo, aparatos, reactivos, etc.) en un mismo laboratorio y en un periodo de corto tiempo. ^{(5) (10) (11)}

5.8.3.2. Precisión Intermedia

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis de la misma muestra pero en condiciones operativas diferentes (diferentes días, diferentes analistas, etc.) y en un mismo laboratorio.

5.8.3.3. Reproducibilidad

Estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios. La precisión de un método analítico se expresa generalmente como el coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas.

5.8.4. EXACTITUD

Expresa la proximidad de un valor de referencia y el valor experimentalmente encontrado.

No debe confundirse exactitud con precisión. La precisión está relacionada con la dispersión de una serie de mediciones, pero da una indicación de lo cerca que esta del valor verdadero. Se puede tener mediciones muy precisas pero poco exactas; sin embargo, para que un método sea exacto requiere un cierto grado de precisión. ^{(5) (10)}

¿Cuál es el Valor Verdadero del Analito en la Muestra?

Cuando se dispone de patrones de referencia certificados, el valor de dicho patrón es el que se acepta como valor verdadero. La exactitud puede evaluarse aplicando el método sobre dicho patrón o bien analizando muestras de placebo o de problema a las que se añadió una cantidad conocida de dicho patrón o mediante comparación de dicho método con un método de referencia validado del que ya se demostró su exactitud; entonces el valor verdadero es el que se obtiene con dicho método de referencia y se compara con el valor hallado con el método nuevo que se quiere validar.

Los documentos de la ICH recomiendan que se evalúe la exactitud un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración. Según la guía ICH, Q2A debe ensayarse la exactitud en métodos de análisis para la valoración en materia prima, en producto acabado y en métodos de análisis de cuantificación de impureza. ^{(5) (10) (11)}

5.8.5. ROBUSTEZ

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para no ser afectado 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. La robustez puede determinarse durante la etapa de desarrollo del procedimiento analítico. ^{(5) (10) (11)}

5.8.6. RANGO

Es el intervalo entre la concentración superior e inferior del analito Para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito. ^{(5) (10) (11)}

5.9. CATEGORIAS DE LA VALIDACIÓN

Los parámetros a validar varían según las exigencias legales de diferentes organizaciones, fundamentalmente del método analítico seleccionado y el uso para el cual está previsto. Por tanto, los requisitos de validación necesarios se establecen dependiendo de la categoría de ensayo.

Debido a la variedad de ensayos analíticos existentes, se hace necesario establecer categorías que faciliten el estudio y reconozcan el tipo de información que se requiere para la validación de un método analítico, según la clasificación de la USP 36 estos métodos se dividen en cuatro categorías según tabla 1.1. ⁽⁵⁾

Tabla N° 1. 1: Datos Requeridos Para La Validación De Métodos Analíticos

CARACTERISTICAS DE DESEMPEÑO ANALITICO	CATEGORIA I	CATEGORIA II Análisis cuantitativos	CATEGORIA II Pruebas de límite	CATEGORIA III	CATEGORIA IV
1. Exactitud	Si	Si	*	*	No
2. Precisión	Si	Si	No	Si	No
3. Especificidad	Si	Si	Si	*	Si
4. Límite de detección	No	No	Si	*	No
5. Límite de cuantificación	No	Si	No	*	No
6. Linealidad	Si	Si	No	*	No
7. Intervalo	Si	Si	*	*	No

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

Fuente: USP 36

- **Categoría I:** Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.
- **Categoría II:** Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos procedimientos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.
- **Categoría III:** Procedimientos analíticos para la determinación de las, características de desempeño (por ejemplo, disolución, liberación de fármacos).
- **Categoría IV:** Pruebas de identificación de un analito en una muestra.

5.10. TIPOS DE VALIDACIÓN

5.10.1. VALIDACION RETROSPECTIVA

Establecer una evidencia documentada del producto o proceso basándose en la evaluación de datos históricos acumulados existentes del mismo siempre y cuando no se hayan modificado los procedimientos, maquinarias, tamaño de lote características de las sustancias empleadas. ⁽¹⁰⁾

5.10.2. VALIDACION PROSPECTIVA

Se realiza cuando la verificación del cumplimiento de las condiciones establecidas para un método analítico, se llevan a cabo antes de la comercialización del producto. ⁽¹⁰⁾

5.10.3. REVALIDACION

La introducción de un cambio que puede afectar la idoneidad del método analítico establecido por la validación, es decir una revalidación total o parcial de dicho método analítico. Entre los motivos que exigen una nueva validación tenemos ⁽¹⁰⁾:

- Cuando ha pasado varios años se tiene que seguir demostrando que el método sigue siendo válido.
- Con el cambio de muestra.
- Cuando se produzcan cambios sustanciales en los instrumentos o materiales utilizados
- Al aplicar la técnica analítica en diferentes laboratorios.
- Modificaciones de parámetros analíticos como el tiempo de agitación, proceso de extracción, etc.

6. INCERTIDUMBRE DE MEDICIÓN

Formalmente la Incertidumbre de medición u se define como: El parámetro no negativo asociado al resultado de medición que caracteriza la dispersión de los valores que razonablemente se puede atribuir al mensurando, a partir de la información que se utiliza.

La incertidumbre es un parámetro que, en general, comprende varios componentes. Los componentes pueden ser evaluados de distintas maneras. Las formas de evaluar la incertidumbre estándar son: tipo A y tipo B. ⁽¹³⁾

TIPO A: La incertidumbre tipo A, se relaciona con fuentes de error aleatorios, y pueden ser evaluados a partir de distribuciones estadísticas de series de resultados, que pueden caracterizarse por desviaciones estándar. ⁽¹³⁾

TIPO B: La incertidumbre tipo B, no se determina por medios estadísticos, están asociadas a los errores de tipo sistemático; esto es, se estiman a partir de datos del fabricante del instrumento, especificaciones, certificados de calibración, y en general de datos subjetivos.

La incertidumbre representa el intervalo en él que se puede encontrar el valor verdadero con mayor probabilidad.

Los parámetros para la estimación de incertidumbre son: incertidumbre estándar, incertidumbre estándar combinada e incertidumbre expandida. ⁽¹³⁾

6.1. PARAMETROS DE ESTIMACIÓN DE INCERTIDUMBRE

a. Incertidumbre Estándar (u): Incertidumbre del resultado de medición expresado como una desviación estándar.

b. Incertidumbre Estándar Combinada (u_c): Incertidumbre estándar del resultado de una medición evaluada a través de la Ley de Propagación de Incertidumbre.

Esta ley combina apropiadamente todas las incertidumbres aportadas por las magnitudes que influyen sobre el resultado de la medición.

c. Incertidumbre Expandida (U): Incertidumbre que define un intervalo alrededor del resultado de medición que abarca una fracción suficientemente grande de la dispersión de los valores que “razonablemente” pueden atribuirse al mensurando.

Esta fracción puede interpretarse como la probabilidad o nivel de confianza p del intervalo.

U es obtenida de la multiplicación de la incertidumbre combinada estándar u_c , por un factor de cobertura k . La elección del valor de k es basado en el nivel de confianza decidido. Para una aproximación del nivel de confianza del 95%, k es 2.

6.2. ESTRATEGIAS PARA EL CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE ANALÍTICA

No hay una estrategia absoluta e ideal para la totalidad de determinaciones; cada uno de los métodos existentes será el más acertado dependiendo del objetivo del análisis y de la información recopilada; pero siempre se debe demostrar que el criterio elegido es estadísticamente válido y relevante para la disciplina.

6.2.1. APROXIMACIÓN ISO (“bottom-up”)

Se conoce de esta manera a la estrategia para el cálculo de la incertidumbre propuesta por la ISO, presentada en la guía ISO GUM: 1995, la cual se aplicó inicialmente a las medidas físicas, y con el tiempo, viendo la flexibilidad del método, fue adaptada por EURACHEM para las mediciones químicas. En la actualidad es la más utilizada, y por las razones que se detallan más adelante, será la estrategia de cálculo de incertidumbre que se adopta, ya que será más sencillo trabajar sobre los distintos factores involucrados para minimizarla, en comparación con los demás métodos. Está conformado por los siguientes pasos según la figura nro. 1.1. ⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾

En la etapa de **planificación** se deben definir claramente las variables en su fase óptimas a tener en cuenta para que nuestra medición tenga un rango de incertidumbre adecuado a efectos de cumplir los objetivos, definiendo factores como ser: tipo de materiales, instrumentos de medición, procedimientos analíticos del sistema de calidad, nivel de capacitación, condiciones ambientales del laboratorio, elección y método de seguimiento de proveedores, herramientas estadísticas, criterios de aceptación etc. Luego del cálculo de la incertidumbre (5 pasos), se verificará mediante herramientas estadísticas definidas en la etapa de planificación, si la incertidumbre obtenida es válida para efectos de nuestra medición. De ser así, se documentará detalladamente cada uno de los movimientos realizados e instrumentos y materiales utilizados en los procedimientos analíticos del

sistema de la calidad, estandarizando el método de cálculo de incertidumbre óptimo que satisfizo nuestra necesidad analítica.

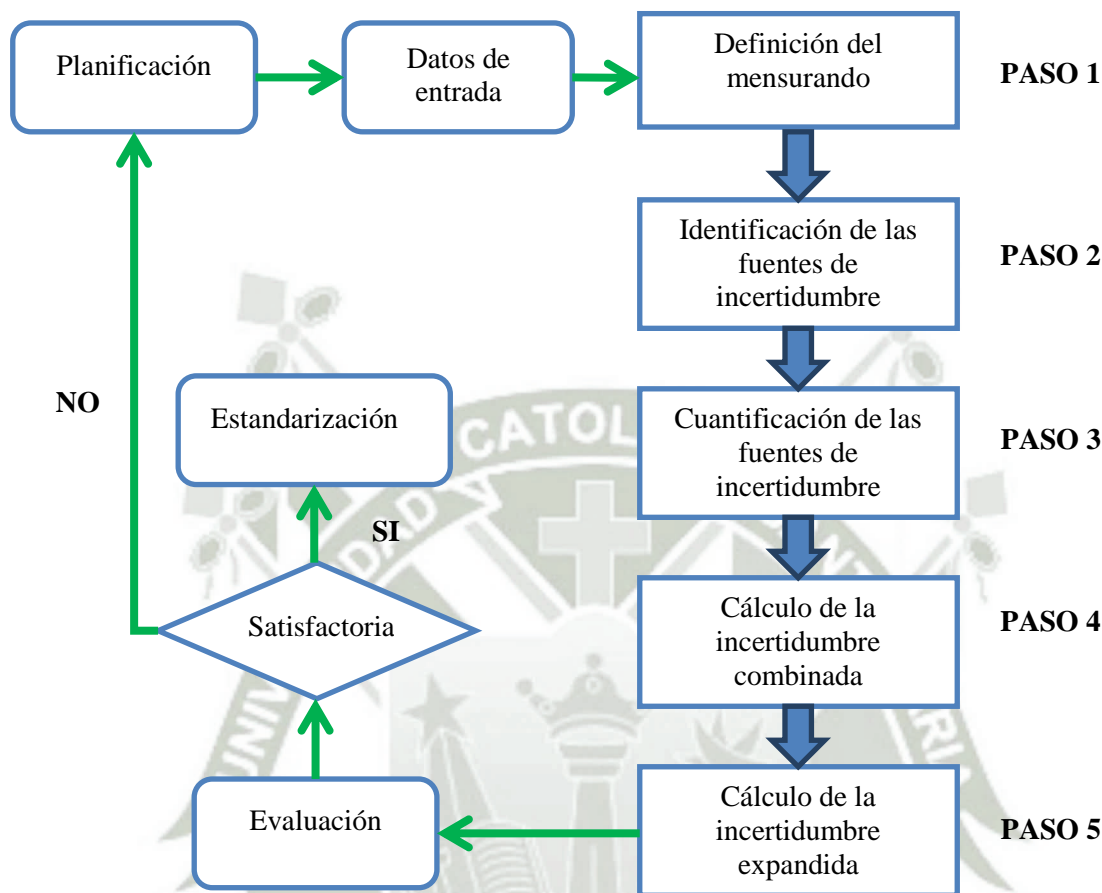


Fig. N° 1. 1: Etapas del cálculo de incertidumbre según ISO

- a) **Definición del mensurando (Paso 1):** Citar de manera clara y lo más detallada posible qué se está midiendo y, una expresión cuantitativa que relacione el valor del mensurando con los parámetros de los que depende.
- b) **Identificación de las fuentes de incertidumbre (Paso 2):** Se debe confeccionar una lista completa de las fuentes relevantes de incertidumbre, mencionándose entre otras: metodologías asumidas, herramientas estadísticas, muestreo y/o submuestreo, condiciones de almacenamiento, efectos atribuibles a los instrumentos de medición (incluyendo función de calibrado, preparación de soluciones patrones, número de cifras significativas), pureza de los reactivos, niveles de concentración, estequiometría asumida, condiciones de medición, matrices, corrección por

blanco, efectos atribuibles al operador, efectos aleatorios, condiciones del sistema de calidad, regulaciones, etc.

Una de las formas de identificar las fuentes es utilizando un diagrama causa-efecto de Ishikawa (espina de pescado) (Figura 1.2). Para establecerlo se consideran como base los grupos presentados a continuación, que a su vez se dividirán en tantos subgrupos de incertidumbre se identifiquen.

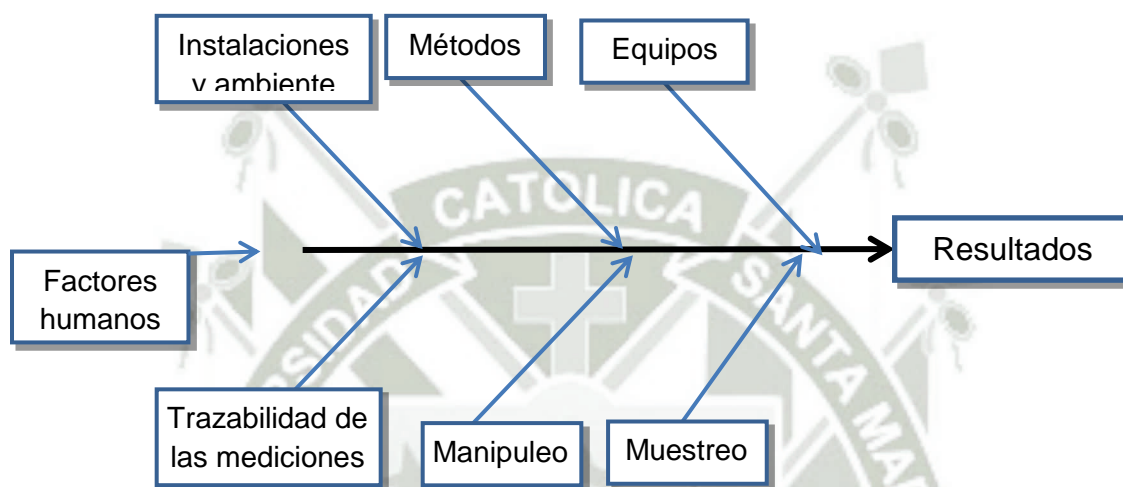


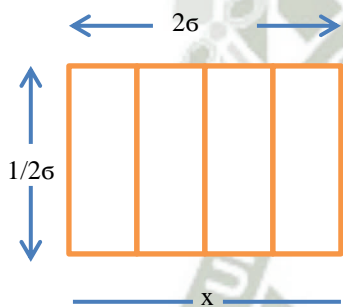
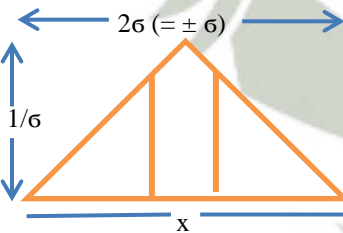
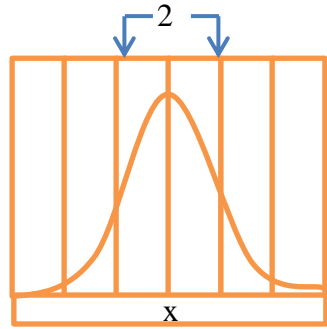
Fig. N° 1. 2: Diagrama causa-efecto básico para identificación de fuentes de incertidumbre

c) Cuantificación de la incertidumbre de cada fuente (Paso 3): Para estimar la incertidumbre total, se consideran todas las fuentes de incertidumbre que puedan ser significativas y obtener la contribución individual de cada una de ellas. Se debe realizar una estimación y evaluación de la incertidumbre por cuantificación de sus componentes individuales derivadas del trabajo experimental realizado en el laboratorio, o basadas en algún dato particular, como ser: datos obtenidos en mediciones previas, especificaciones del fabricante, provenientes de certificados de calibración, tomados de manuales, registros, experiencia o conocimiento general del comportamiento y propiedades relevantes de los materiales e instrumentos.

Generalmente la incertidumbre se expresa como un intervalo de confianza, por lo que es necesario convertir estas incertidumbres en incertidumbres estándares, para ello es necesario conocer la distribución que asume cada magnitud, así como su nivel de confianza. En los casos que se sabe que el tipo de distribución es gaussiana, la incertidumbre estándar se calcula dividiendo el valor de incertidumbre obtenido, por el factor $k = 2$. Cuando no se tiene

información de las distribución que asume la magnitud, como en el caso de las tolerancias de material volumétrico, se asume que el valor verdadero tiene igual probabilidad de ser cualquier valor dentro del intervalo de indeterminación, esta información hace suponer una distribución rectangular, y por lo tanto, la incertidumbre estándar se obtiene dividiendo el valor de tolerancia por $k = \sqrt{3}$. Si es más probable que el valor verdadero tienda a ser el valor representativo (o sea el centro de intervalo) se asume una distribución triangular, entonces la incertidumbre estándar se obtiene dividiendo el valor de tolerancia obtenido por $k = \sqrt{6}$. Se detallarán algunos casos generales en lo que se utilizan cada una de las magnitudes en la tabla 1.2.

Tabla N° 1. 2: Distribuciones estadísticas e incertidumbre asociadas

Distribución	Utilización	Incertidumbre
	<ul style="list-style-type: none"> • Cuando no hay datos del tipo de la distribución, se asume que existe la misma probabilidad que el valor verdadero sea cualquiera dentro del intervalo de indeterminación. • Cuando un certificado o especificación presenta un intervalo sin detallar el nivel de confianza. 	$u(x) = \delta/\sqrt{3}$
	<ul style="list-style-type: none"> • Cuando los valores cercanos al valor representativo, tienen más posibilidad de ocurrencia que a los extremos. • Cuando la estimación fue hecha por el método de rango máximo con una distribución simétrica. 	$u(x) = \delta/\sqrt{6}$
	<ul style="list-style-type: none"> • Cuando la incertidumbre se presenta para un intervalo de confianza del 95% • Cuando se expresa la desviación estándar, la desviación estándar relativa o la desviación relativa porcentual, sin especificar la distribución. • Cuando la estimación se realiza en un proceso de variabilidad aleatoria. • Cuando se aplica el teorema central del límite, o sea se trabaja con valores promedios. 	$u(x) = c/2$ (95%) $u(x) = c/3$ (99.7%) $u(x) = s$ $u(x) = x \cdot (s/x)$ $u(x) = x \cdot (s/x) \cdot 100$ $u(x) = s$ $u(x) = s$

d) Cálculo de la incertidumbre combinada (Paso 4): Considerando las fuentes de variación antes descritas, la incertidumbre combinada está dada por la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de todas ellas (o sea las fuentes de incertidumbre se propagan cuadráticamente).

$$u(x) = \sqrt{u_a^2 + u_b^2 + u_c^2 + \dots} \quad (\text{Ec. 1. 1})$$

$$u(x) = \sqrt{\sum U_i^2} \quad (\text{Ec. 1. 2})$$

e) Cálculo de la incertidumbre expandida (Paso 5): Finalmente, el cálculo de la incertidumbre expandida, proporciona un intervalo de confianza donde se encuentra el verdadero valor con una determinada probabilidad; se obtiene multiplicando la incertidumbre por un factor de cobertura K , el cual depende de la probabilidad de contener al valor verdadero y de la distribución asumida.

$$U(X) = k u(x) \quad (\text{Ec. 1. 3})$$

La elección del factor de cobertura k , depende de los siguientes factores:

- i. El nivel de confianza requerido,
- ii. Datos de las distribuciones de las magnitudes involucradas,
- iii. Grados de libertad de la estimación

Se recomienda asumir el $k = 2$ para la mayoría de los casos; este valor representa una distribución normal y un intervalo de confianza del 95% de contener al valor verdadero. La elección de k también depende de los grados de libertad (6 o menos), y se considera adecuado utilizar el valor de t de Student de dos colas tabulado para el nivel de significación escogido (generalmente 95%) y grados de libertad efectivos, según la tabla 1.3.

Tabla N° 1. 3: Tabla – t de Student para un 95% de confianza

<i>Grados de libertad</i> <i>N</i>	<i>t</i>
1	12.706
2	4.303
3	3.182
4	2.776
5	2.571
6	2.447

Fuente: Daniel C. Harris, Análisis Químico Cuantitativo

6.2.2. ESTRATEGIA QUE UTILIZA LA INFORMACIÓN DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Este método tiene como fundamento aprovechar la información generada en el proceso de verificación de la trazabilidad del método analítico, la cual se verifica mediante una muestra representativa de manera excluyente, para ello debe asegurarse que la muestra de referencia también lo sea. Además la muestra de referencia debe analizarse en condiciones intermedias de precisión, es decir, variando todos los factores que puedan influir en la variabilidad de los resultados, lo que significa que la muestra debe ser analizada en distintos momentos, por diferentes personas y variando demás factores que influyan en dicha variabilidad.

Una vez verificada la trazabilidad, se está en condiciones de calcular la incertidumbre. El laboratorio debe demostrar que la trazabilidad es sostenible en el tiempo, y por ende que la incertidumbre sigue siendo válida, para ello el laboratorio analítico debe trabajar en condiciones sólidas de aseguramiento de calidad. ^{(15) (16) (17)}

A continuación se presenta la ecuación para calcular la incertidumbre expandida por este método:

$$u(x) = k\sqrt{u^2_{\text{proced.}} + u^2_{\text{trazab.}} + u^2_{\text{pretratam.}} + u^2_{\text{otrositem s}}} \quad (\text{Ec. 1. 4})$$

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1. MUESTRAS

Las muestras a analizar serán:

a. Producto terminado contenido en su envase definitivo:

Nombre: Jarabe (Ambroxol clorhidrato 7.5 mg + Clenbuterol clorhidrato 0.005 mg/5mL)

b. Placebo del producto: Es un blanco de la muestra problema que contenga todos los ingredientes de la muestra problema excepto los analitos.

c. Principio activo más el placebo en las concentraciones requeridas para el análisis de los parámetros a estudiar: Es un blanco de la muestra problema que contenga todos los ingredientes de la muestra problema excepto los analitos, los cuales serán incorporados en el momento que se requiera.

Preparación: Se obtiene al mezclar todos los excipientes de la formulación de Ambroxol clorhidrato 7.5 mg + Clenbuterol clorhidrato 0.005 mg/5mL, Jarabe; excluyendo al principio activo, en las mismas proporciones que en la fórmula de fabricación:

- i. En un beaker de 500 mL , adicionar el sorbitol, el propilenglicol,
- ii. En el alcohol de 96° disolvemos el propilparabeno y el saborizante; para agregarlo a la mezcla anterior y homogenizar.
- iii. Finalmente completar a volumen de 500 mL con agua purificada y homogenizar.

d. Estándar Secundario

	Estándar Secundario	
Nombre del estándar	Ambroxol clorhidrato	Clenbuterol clorhidrato
Tipo de estándar	Secundario	Secundario
Código	SSTD -27-01-13	SSTD - 64 - 01 - 13
Lote	20120905	CBT/BC00300
Fecha de vencimiento	2014-01-31	2014-02-28
Potencia	100.54%	99.78%
Nº de Análisis	M7227 - 12	M0529-13

1.2. MATERIAL DE LABORATORIO

a. Materiales de Vidrio

- Pipeta graduadas de 1mL
- Vaso de precipitados de 250 mL
- Probeta de 1000 mL y de 500 mL.
- Frascos vidrio con tapa azul (frascos ISO) de 2000 mL
- Fiolas de 200 mL.
- Fiolas de 5 mL.
- Fiolas de 25 mL.
- Fiolas de 20 mL.
- Fiolas de 50 mL.
- Pipeta volumétrica de 10 mL y de 5 mL
- Viales para HPLC de color ámbar

b. Equipos y Aparatos

BALANZA ANALITICA			
MARCA	METTLER TOLEDO	METTLER TOLEDO	METTLER TOLEDO
MODELO	XP105DR	ML204	ML204
SERIE	B107112658	B207711002	B229124486
CALIBRACION	CONFORME	CONFORME	CONFORME
CODIGO	BAL - 006	BAL - 008	BAL - 010

	LAMPARA ULTRAVIOLETA
MARCA	PHILIPS
MODELO	TUV-15W/G15T8
SERIE	N.A.
CALIBRACION	CONFORME
CODIGO	LAM – 007

	BAÑO TERMOSTATICO
	ZHICHENG
	ZSBB-726
	E00E5619
	CONFORME
	BAÑ – 002

	ULTRASONIDO
MARCA	BRANSON
MODELO	3510R DTH
SERIE	EMC080271723E
CALIBRACION	CONFORME
CODIGO	BUS – 001

	BOMBA AL VACIO
	GAST
	DOA – P704 – AA

	N.A.
	COM – 001

HPLC – 002	MARCA:	HITACHI
	MODELO:	LaChrom Elite
Se encuentra Equipado con:		
• Autosampler	SERIE:	18E30-009
• Detector DAD	SERIE:	1506-021
• Bomba	SERIE:	18E10-014
• Horno	SERIE:	1716-005
• Inyector	SERIE:	18E30-009
• Calibración	CONFORME	
HPLC – 005	MARCA:	HITACHI
	MODELO:	Chromaster
Se encuentra Equipado con:		
• Autosampler	SERIE:	1102-023
• Detector RI	SERIE:	1104-007
• Detector UV – VIS	SERIE:	1101-003
• Bomba	SERIE:	1102-014
• Horno	SERIE:	1102-043
• Calibración	CONFORME	

c. Otros

- Jeringas de 10 mL, marca Qualimaxx ®
- Filtros de jeringa PVDF con tamaño de poro de 0.45 µm.
- Micropipeta 1000 µL

COLUMNAS	Octadecil silano ligado químicamente a partículas de sílice porosa (L1). Eclipse XDB – C18, de 100 mm x 4.6 mm x 2.6 µm	Purospher Star RP – 8e de 75 mm x 4.0mm rellena de material L7 (3.0 µm)
CARACTERÍSTICAS		
• CODIGO:	V-51	18
• MARCA:	Agilent	LichroCart
• DIMENSIONES:	100mm x 4.6 mm x 2.6µm	75 mm x 4.0 mm x 3.0 µm.
• LOTE:	5569-146	FC090018
• SERIE:	535623-27	203999

1.3. REACTIVOS

Reactivo	Marca	Lote
✓ Acetonitrilo, grado gradiente HPLC	MERCK	I659830
✓ Ácido Orto fosfórico 85% para análisis	MERCK	K40180573
✓ Fosfato di básico de Amonio	MERCK	A0059807
✓ Formiato de amonio	MERCK	MKBJ4478V
✓ Ácido fórmico	MERCK	K40313664
✓ Hidróxido de sodio en pellets GR para análisis	MERCK	B0805498
✓ Ácido Clorhídrico al 37% para análisis, marca	MERCK.	K43804717
✓ Peróxido de Hidrógeno al 30% para análisis	MERCK.	K40128210 94
✓ Agua grado HPLC.	-	-

2. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

- Debido a la diferencia de concentración de ambos principios activos en el jarabe (ambroxol clorhidrato 7.5 mg + clenbuterol clorhidrato 0.005 mg/5mL) se ha desarrollado una metodología analítica por Cromatografía Líquida de Alta Performance para cada uno de los principios activos.
- Para la elección del método por Cromatografía Líquida de Alta Performance se tuvo en cuenta el peso molecular, la estructura de la molécula y la solubilidad de los principios activos. Para moléculas con peso molecular menor a 2000 daltons el método más usado es el de fase reversa.
- Para determinar la longitud de onda con la cual se debe realizar la medición de los principios activos, se utilizó un cromatografo líquido de alta resolución con arreglo de Diodos (DAD). El rango de prueba de las longitudes de onda es de 200 a 400 nm. Se determinó que la longitud de onda ideal para la lectura de ambroxol clorhidrato es de 248 nm y para clenbuterol clorhidrato es de 296 nm.
- Debido a la naturaleza de ambos componentes, se toma en cuenta la solubilidad de ellos en diferentes sustancias. El ambroxol clorhidrato es moderadamente soluble en agua, mientras que el

clenbuterol clorhidrato es soluble. En base a estas características se preparó una fase móvil en base a solución buffer pH 7.0 y acetonitrilo en la proporción (40:60) para el ambroxol clorhidrato; y en base de una solución buffer pH 2.7 y acetonitrilo en la proporción (90:10) para clenbuterol clorhidrato.

- Las columnas cromatográficas utilizadas tienen una naturaleza no polar para ambos principios activos, para ambroxol clorhidrato un RP – 18 que se encuentra compuesta de octadecilsilano unido químicamente a sílice porosa y una columna RP – 8 compuesta de octilsilano unido químicamente a sílice porosa. La naturaleza de la fase móvil permite que los analitos sean separados con facilidad por estos tipos de columnas y la separación de los picos dentro de cada uno de los cromatogramas sea adecuada.

3. MÉTODOS ANALÍTICOS DESARROLLADO

3.1. CUANTIFICACIÓN DE AMBROXOL CLORHIDRATO

i. Tipo de Método Analítico: Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC).

ii. Especificaciones del producto:

- Presentación : Jarabe
- Contiene Ambroxol clorhidrato : Cantidad declarada 7.5 mg/5mL,
- Límites : 7.125 mg/5mL – 7.875 mg/5mL (95.0% - 105.0%)

iii. Solución Buffer pH 7.0: Disolver 1.32 g de fosfato de amonio dibásico en 900 mL de agua, ajustar a pH 7.0 ± 0.1 con ácido fosfórico y diluir a 1000 mL con agua.

iv. Fase Móvil: Solución buffer pH 7.0 y acetonitrilo en la proporción (40:60), respectivamente, filtrar y desgasificar con filtro de membrana de PVDF de 0.45 μm

v. Preparación de la Solución Estándar: Transferir aproximadamente 30.0 mg de Estándar de Referencia de Ambroxol clorhidrato, exactamente pesado, en un matraz volumétrico de 200 mL, disolver y completar a volumen con solución buffer pH 7.0, y mezclar. Concentración de Ambroxol clorhidrato: 0.15 mg/mL

vi. Preparación de la Muestra: Transferir 5.0 mL de jarabe (equivalente a ± 7.5 mg de Ambroxol clorhidrato), exactamente medidos, a un matraz volumétrico de 50 mL, diluir a volumen con solución buffer pH 7.0 y mezclar. Concentración de Ambroxol clorhidrato: 0.15 mg/mL

Filtrar una porción de la Solución Estándar y de la Muestra a través de membrana de PVDF de 0.45 μ m descartando los primeros mililitros del filtrado.

vii. Sistema Cromatográfico

Columna	: Columna Eclipse XDB – (L1) C18, de 100 mm x 4.6 mm x 2.6 μ m.
Velocidad de flujo	: 1.0 mL/minuto
Temperatura	: 25 °C
Detector	: UV, 248 nm
Volumen de inyección	: 10 μ L
%DSR	: No es más de 2 %
Tiempo de retención	: Aproximadamente 3 minutos
Tiempo de corrida	: Aproximadamente 5 minutos

viii. Fórmula: Los cálculos para la valoración de ambroxol clorhidrato obedecieron a la siguiente fórmula:

$$(\text{mg/5mL}) \text{ Ambroxol clorhidrato} = \frac{Amp}{Ast} \times Fst \times Fmp \times Ve \quad (\text{Ec. 2. 1})$$

Factor Estándar (Fst):
$$Fst = \frac{Wst}{200} \times \frac{Pot\ st}{100}$$

Factor Muestra (Fmp):
$$Fmp = \frac{50}{Vmp}$$

Donde:

Amp : Área del pico de Ambroxol clorhidrato obtenida de la solución prueba.

Ast : Área del pico de Ambroxol clorhidrato obtenida de la solución estándar.

Wst : Peso del estándar de referencia de Ambroxol clorhidrato, en miligramos.

Vmp : Volumen de la muestra tomada, en mililitros.

Pot st : Potencia del estándar de referencia de Ambroxol clorhidrato, expresado como potencia tal cual.

Ve : Volumen en la que se expresa el producto.

3.2. CUANTIFICACIÓN DE CLENBUTEROL CLORHIDRATO

i. Tipo de Método Analítico: Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC).

ii. Especificaciones del producto:

- Presentación : Jarabe
- Contiene : Clenbuterol clorhidrato, cantidad declarada 0.005 mg/5mL,
- Límites : 0.00475 mg/5mL – 0.00525 mg/5mL (95.0% - 105.0%)

iii. Solución Buffer 2.7: Disolver 0.6306 g de formiato de amonio en 1000 mL de agua, ajustar a pH 2.7 ± 0.02 con ácido fórmico químicamente puro.

iv. Fase Móvil: Preparar una mezcla de solución buffer pH 2.7 y Acetonitrilo en la proporción (90:10), filtrar y desgasificar con filtro de membrana de PVDF de 0.45 μ m.

v. Preparación de la Solución Estándar: Disolver aproximadamente 50.0 mg de Clenbuterol clorhidrato con aproximadamente 30 mL de agua en un matraz volumétrico ámbar de 100 mL y sonicar por 5 minutos, llevar a volumen con agua y mezclar, transferir 100 μ L de la solución anterior a un matraz volumétrico ámbar de 100 mL, disolver y llevar a volumen con Fase Móvil, mezclar.

Concentración de Clenbuterol clorhidrato: 0.0005 mg/mL.

vi. Preparación de la Muestra: Tomar 5 mL de jarabe (± 0.005 mg de Clenbuterol clorhidrato), llevar a un matraz volumétrico de 10 mL diluir a volumen con fase móvil y mezclar.

Concentración de Clenbuterol clorhidrato: 0.0005 mg/mL.

Filtrar una porción de la Solución Estándar y de la Solución Prueba (muestra) a través de membrana de PVDF (polietersulfonato con polipropileno) de 0.45 μ m descartando los primeros mililitros del filtrado.

vii. Sistema Cromatográfico

Columna	: Columna Purospher Star RP8e (L7), de 75 mmx 4.6 mm x 3.0 μm
Velocidad de flujo	: 1.0 mL/minuto
Temperatura	: 40 °C
Detector	: UV, 296 nm
Volumen de inyección	: 80 μL
%DSR	: No es más de 2 %
Tiempo de retención	: Aproximadamente 10 minutos
Tiempo de corrida	: Aproximadamente 30 minutos para el estándar y 40 minutos para la muestra

viii. Cálculos: Los cálculos para la valoración de Clenbuterol clorhidrato obedecieron a la siguiente fórmula:

$$(\text{mg/ 5mL}) \text{ Clenbuterol clorhidrato} = \frac{\text{Amp}}{\text{Ast}} \times \text{Fst} \times \text{Fmp} \times \text{Ve} \quad (\text{Ec. 2. 2})$$

$$\text{Factor Estándar (Fst):} \quad Fst = \frac{Wst}{100} \times \frac{0.1}{100} \times \frac{Pot\ st}{100}$$

$$\text{Factor Muestra (Fmp):} \quad Fmp = \frac{10}{Vmp}$$

Donde:

Amp : Área del pico de Clenbuterol clorhidrato obtenida de la Solución Prueba.

Ast : Área del pico de Clenbuterol clorhidrato obtenida de la Solución Estándar.

Wst : Peso del Estándar de Referencia de Clenbuterol clorhidrato, en miligramos.

Pot st: Potencia del estándar de referencia de Clenbuterol clorhidrato, expresado como potencia tal cual.

Vmp : Volumen de muestra tomados, en mL.

Ve : Volumen en la que se expresa el producto.

4. DESARROLLO DE LOS PARAMETROS DE VALIDACIÓN

Considerando la validación de la técnica analítica del tipo de Determinación Cuantitativa de un componente en un producto terminado por HPLC (Categoría I <1225> USP 36 NF36), se desarrollarán los parámetros que se encuentran en la tabla N° 2.1:

Tabla N° 2. 1: Parámetros de Validación

PARAMETROS DE VALIDACION	
• Especificidad (Selectividad)	✓
• Linealidad:	
Linealidad del sistema	✓
Linealidad del método	✓
• Intervalo	✓
• Exactitud	✓
• Precisión:	
Repetibilidad Instrumental	✓
Repetibilidad del método	✓
Precisión Intermedia	✓
• Robustez	✓

4.1. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Se consideran los siguientes criterios de aceptación para la cuantificación de los analitos Ambroxol clorhidrato y Clenbuterol clorhidrato (ver tabla 2.2.) ⁽⁵⁾

Tabla N° 2. 2: Criterios de Aceptación para los Parámetros de Validación

PARÁMETROS	LÍMITES
1. APTITUD DEL SISTEMA	
Tiempo de retención (rt)	rt < 1 %
Resolución (R)	-----
Factor de asimetría (T)	0.8 < T < 1.5
Coefficiente de variación (%RSD)	RSD < 2 %
2. SELECTIVIDAD	
2.1. INTERFERENCIA DEL MÉTODO	
Porcentaje de interferencia en relación con el SSTD	
• Placebo	Interferencia < 2 %
• Diluyente	Interferencia < 2 %
• Fase móvil	Interferencia < 2 %
2.2 DEGRADACIÓN FORZADA DE LA MUESTRA	
• Condiciones normales	
• Estresamiento térmico	
• Estresamiento alcalino	
• Estresamiento Ácido	
• Estresamiento oxidativo	
• Estresamiento luz UV	
	$\frac{\% \text{ degradacion (informativo)}}{\text{Sustancia de interferencia (i)}}$

PARÁMETROS	LÍMITES
3. PRECISIÓN	
3.1 REPETIBILIDAD DEL SISTEMA:	
Promedio de áreas (\bar{X})	\bar{X}
Coefficiente de variación de áreas.	RSD < 2 %
Promedio de tiempo de retención (\bar{X})	\bar{X}
Coefficiente de variación de tiempos	RSD < 1 %
3.2 REPETIBILIDAD DEL MÉTODO	
Promedio (\bar{X})	\bar{X}
Desviación estándar (s)	s
Coefficiente de variación (%RSD)	RSD < 2%
Intervalo (\pm)	
3.3 PRECISIÓN INTERMEDIA	
PRECISIÓN INTERMEDIA ANALISTA 1	
Promedio (\bar{X})	\bar{X}
Coefficiente de variación (% RSD)	RSD < 2%
PRECISIÓN INTERMEDIA ANALISTA 2	
Promedio (\bar{X})	\bar{X}
Coefficiente de variación (% RSD)	RSD < 2%
PRECISIÓN INTERMEDIA GLOBAL	
Coefficiente de variación global (% RSD)	RSD < 3 %
4. LINEALIDAD DEL SISTEMA	
Ecuación de la recta	$y = bx + a$
Coefficiente de correlación (r)	$r > 0.997$
Coefficiente de determinación (r^2)	$r^2 > 0.995$
Test de linealidad	
Coefficiente de variación de los factores de respuesta (f)	RSD < 5 %
Variación del error experimental total	S^2_{xy}
Varianza de la pendiente	S^2_b
D.S. de la pendiente (b)	Sb
RSD (%) pendiente	Sb rel %
Prueba de T-Student	$t_{exp} > t_{tabla}$
Test de proporcionalidad	
Varianza del intercepto (a)	S^2_a
D.S. del intercepto (a)	Sa
Intervalo de confianza del intercepto (a)	$a \pm t_{tabla} * Sa$
Prueba de T-Student	$t_{exp} < t_{tabla}$

PARÁMETROS	LÍMITES
5. LINEALIDAD DEL MÉTODO	
Ecuación de la recta	$y = bx + a$
Coefficiente de correlación (r)	$r > 0.997$
Coefficiente de determinación (r^2)	$r^2 > 0.995$
Test de linealidad	
Coefficiente de variación de los factores de respuesta (f)	RSD < 5%
Variación del error experimental total	S^2_{xy}
Varianza de la pendiente	S^2_b
D.S. de la pendiente (b)	Sb
RSD (%) pendiente	Sb rel %
Prueba de T-Student	$t_{exp} > t_{tabla}$
Test de proporcionalidad	
Varianza del intercepto (a)	S^2_a
D.S. del intercepto (a)	Sa
Intervalo de confianza del intercepto (a)	$a \pm t_{tabla} * Sa$
Prueba de T-Student	$t_{exp} < t_{tabla}$
6. EXACTITUD DEL MÉTODO	
Porcentaje de recuperación total (%)	97 % - 103%
Prueba de homogeneidad de varianzas	$G_{exp} < G_{tabla}$
Prueba de "t" de student	$t_{exp} < t_{tabla}$
7. RANGO O INTERVALO	
En linealidad	(70% - 130%)
En precisión	100%
En exactitud	(70% - 130%)
8. ROBUSTEZ	
<ul style="list-style-type: none"> • A condiciones normales • Modificando la temperatura • Modificando el volumen de inyección • Modificando el pH de la fase Móvil. • Modificando el tamaño de la columna 	No hay cambios en la variable concentración
Coefficiente de variación global (%)	% RSD < 2 %

Fuente: Elaboración propia

4.2. DESARROLLO DE LA VALIDACIÓN PARA AMBROXOL CLORHIDRATO

4.2.1. Ensayo de Aptitud del Sistema

Preparar una solución de estándar como se indica en el punto 3.1.

Procedimiento: Filtrar e inyectar 5 veces como mínimo la solución de estándar en el equipo correspondiente, obtener las áreas así como los cromatogramas respectivos.

Datos y resultados: Calcular la desviación relativa estándar.

4.2.2. Selectividad

a) **Determinación de Interferencia del Diluyente y Excipientes:** Preparar las siguientes muestras:

- **Muestra 1: (Fase Móvil):** Proceder según el procedimiento de preparación de fase móvil (3.1.) y filtrar por membrana PVDF en un vial de HPLC.
- **Muestra 2: (Placebo):** Transferir 5.0 mL de placebo. Proceder según el procedimiento de preparación de muestra (3.1.)
- **Muestra 3: (Estándar de Ambroxol Clorhidrato):** Proceder según el procedimiento de preparación de estándar (3.1.)
- **Muestra 4: (Muestra):** Proceder según el procedimiento de preparación de muestra (3.1.)

Procedimiento: Filtrar e inyectar todas las muestras preparadas por duplicado en el HPLC, obtener las áreas y los cromatogramas respectivos.

Datos y resultados: Calcular el porcentaje de interferencia del placebo y de la fase móvil.

b) **Determinación de Interferencias de Productos de Degradación:** Todas las muestras se procederán a preparar de acuerdo al punto (3.1.). Luego proceder a someter las muestras a los métodos de degradación que se muestran en la tabla 2.3.:

Tabla N° 2. 3: Métodos de Degradación para Ambroxol clorhidrato

Métodos de Degradación	Muestra
1. Termólisis	Someter a las muestras a una temperatura mayor del estudio de estabilidad ($T_{prom} = 70\text{ °C} \times 1\text{ hora}$)
2. Hidrólisis Alcalina	Atacar a las muestras con solución de NaOH 2N.
3. Hidrólisis Ácida	Atacar a las muestras con solución de HCl 2N.
4. Oxidación	Atacar a las muestras con solución de H_2O_2 3%.
5. Fotólisis	Someter a las muestras a exposición de luz UV x 5h

Fuente: Elaboración propia

i. Procedimiento: Preparar estándar de acuerdo al punto (3.1.), filtrar e inyectar al sistema por quintuplicado como mínimo.

ii. Preparación de las muestras:

1. **Muestra A (según método):** Transferir 5.0 mL de jarabe (± 7.5 mg de Ambroxol clorhidrato), exactamente medidos, a un matraz volumétrico de 50 mL, diluir a volumen con Solución Buffer pH 7.0 y mezclar.

Concentración de Ambroxol clorhidrato: 0.15 mg/mL.

2. **Termólisis:** Transferir 5.0 mL de jarabe (± 7.5 mg de Ambroxol clorhidrato), exactamente medidos, a un matraz volumétrico de 50 mL, diluir a volumen con Solución Buffer pH 7.0, mezclar. Luego llevar a Baño María a una temperatura de 70 °C por una hora, dejar enfriar a temperatura ambiente y mezclar.

Concentración de Ambroxol clorhidrato: 0.15 mg/mL.

3. **Hidrólisis Alcalina:** Transferir 5.0 mL de jarabe (± 7.5 mg de Ambroxol clorhidrato), exactamente medidos, a un matraz volumétrico de 50 mL, adicionar 1 mL de NaOH 2N disolver y llevar a volumen con Solución Buffer pH 7.0, mezclar.

Concentración de Ambroxol clorhidrato: 0.15 mg/mL.

4. **Hidrólisis Ácida:** Transferir 5.0 mL de jarabe (± 7.5 mg de Ambroxol clorhidrato), exactamente medidos, a un matraz volumétrico de 50 mL, adicionar 1 mL de HCl 2N, disolver y llevar a volumen con Solución Buffer pH 7.0, mezclar.

Concentración de Ambroxol clorhidrato: 0.15 mg/mL.

5. **Oxidación:** Transferir 5.0 mL de jarabe (± 7.5 mg de Ambroxol clorhidrato), exactamente medidos, a un matraz volumétrico de 50 mL, adicionar 1 mL de H_2O_2 3%, disolver y llevar a volumen con Solución Buffer pH 7.0, mezclar.

Concentración de Ambroxol clorhidrato: 0.15 mg/mL.

6. **Fotólisis:** Transferir 5.0 mL de jarabe (± 7.5 mg de Ambroxol clorhidrato), exactamente medidos, a un matraz volumétrico de 50 mL, diluir a volumen con Solución Buffer pH 7.0 y mezclar. Exponer a la luz UV 254 nm por 5 horas.

Concentración de Ambroxol clorhidrato: 0.15 mg/mL.

Filtrar e inyectar todas las muestras por duplicado en el HPLC, obtener las áreas respectivas.

iii. **Datos y resultados:** Calcular los porcentajes de degradación respectivos.

4.2.3. Linealidad

Este ensayo se realiza con la finalidad de determinar la proporcionalidad entre la concentración del principio activo y su respuesta (áreas) y nos demuestra la capacidad que tiene el método de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración del principio activo en la muestra.

Determinación de Intervalos de Trabajo: Por ser un ensayo de valoración de un producto terminado cuya especificación es de 95% a 105%, el intervalo de trabajo será: 70% - 130% de la concentración de trabajo.

4.2.3.1. Linealidad Del Sistema

Se preparan 3 curvas de calibración correspondientes a 5 concentraciones que cubran el intervalo del analito (70%, 85%, 100%, 115% y 130%)

i. Preparación:

- Tomar como referencia el peso del estándar al 100% y calcular el peso a las diferentes concentraciones que formarán la curva de calibración.

- Proceder según el procedimiento de preparación de estándar de manera independiente. Pesar el estándar según la tabla 2.4, transferir a un matraz volumétrico de 200 mL, disolver y llevar a volumen con Solución Buffer.

Tabla N° 2. 4: Pesos de Estándar para Linealidad del Sistema

Estándar		Volumen (mL)	Concentración final de Ambroxol clorhidrato (mg/mL)
Porcentaje	Peso aprox. (mg)		
70%	21.0	200	0.105
85%	25.5	200	0.1275
100%	30.0	200	0.15
115%	34.5	200	0.1725
130%	39.0	200	0.195

Fuente: Elaboración propia

ii. Procedimiento:

- Filtrar e inyectar los 15 estándares preparados por triplicado en el HPLC, de preferencia colocarlos en sentido creciente a la concentración.
- Obtener las áreas de cada inyección.

4.2.3.2. Linealidad Del Método

Se preparan 3 curvas de calibración correspondientes a 5 concentraciones que cubran el intervalo del analito en la muestra (60%, 80%, 100%, 120% y 140%).

i. Preparación:

- Tomar como referencia el peso de la muestra a tomar descrito en el punto 3.1. (Preparación de la muestra); el cual será el 100%. Sobre este valor calcular los volúmenes a tomar para las diferentes concentraciones que formarán la curva de calibración, tal como se observa en la tabla 2.5.

Tabla N° 2. 5: Volumen de Muestra para Linealidad del Método

Porcentaje	Muestra		Volumen (mL)	Concentración Final de Ambroxol clorhidrato (mg/mL)
	Volumen de jarabe (mL)	mg aprox.		
60%	3.0	4.5	50	0.09
80%	4.0	6.0	50	0.12
100%	5.0	7.5	50	0.15
120%	6.0	9.0	50	0.18
140%	7.0	10.5	50	0.21

Fuente: Elaboración propia

- El volumen tomado de jarabe, llevar a un matraz volumétrico de 50 mL diluir a volumen con Solución Buffer y mezclar.

ii. Procedimiento:

- Filtrar e inyectar el estándar por triplicado en el HPLC.
- Filtrar e inyectar las 15 muestras preparados por triplicado en el HPLC, de preferencia colocarlos en sentido creciente a la concentración.
- Obtener las áreas de cada inyección y los cromatogramas respectivos.

a) Datos y resultados para ambas linealidades

- Con los resultados se prepara una tabla relacionando las concentraciones (variable x) y la respuesta (variable y), utilizando el método de mínimos cuadrados.
- Se debe determinar lo siguiente: Ver si visualmente presenta linealidad los resultados, calcular la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación, el coeficiente de determinación y finalmente evaluar los resultados estadísticamente.

4.2.4. Exactitud

Preparar 3 curvas de calibración correspondientes a 3 concentraciones que cubran el intervalo del analito (70%, 100% y 130%)

i. Preparación de los estándares: Preparar una solución estándar al 100%, tal cual se indica en el punto 3.1.

ii. Preparación de las 9 muestras: Se trabaja a la concentración nominal de trabajo del método analítico. Preparar por triplicado las muestras, para lo cual se pesa cantidades conocidas de analito que cubran los tres niveles de la curva (70%, 100% y 130%).

1. **Estándar al 70%:** Transferir aproximadamente 21.0 mg de Estándar de Referencia de Ambroxol Clorhidrato a un matraz volumétrico de 50 mL y 5.0 mL de placebo, disolver y llevar a volumen con Solución Buffer.

2. **Estándar al 100%:** Transferir aproximadamente 30.0 mg de Estándar de Referencia de Ambroxol clorhidrato a un matraz volumétrico de 50 mL y 5.0 mL de placebo, disolver y llevar a volumen con Solución Buffer

3. **Estándar al 130%:** Transferir aproximadamente 39.0 mg de Estándar de Referencia de Ambroxol Clorhidrato a un matraz volumétrico de 50 mL y 5.0 mL de placebo, disolver y llevar a volumen con Solución Buffer

Mezclar el analito con el placebo y proceder tal como se indica en el punto 3.1. (Preparación de la muestra). Finalmente se deben obtener las 9 muestras con placebo; es decir 3 muestras al 70%; 3 muestras al 100% y finalmente 3 muestras al 130%.

iii. Procedimiento:

- Filtrar e inyectar el estándar por quintuplicado en el HPLC.
- Filtrar e inyectar las 9 muestras preparadas por triplicado en el HPLC, de preferencia colocarlos en sentido creciente a la concentración.
- Obtener las áreas de cada inyección tanto del estándar y de las muestras.

iv. Datos y resultados:

- Se debe determinar el porcentaje de recuperación e intervalos de confianza, así como su evaluación estadística.

4.2.5. Precisión

Grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea.

a) **Repetibilidad Del Sistema:** Preparar una Solución Estándar como se indica en el punto 3.1. (Preparación del estándar).

i. Procedimiento:

- Filtrar e inyectar 6 veces la Solución Estándar. Obtener las áreas respectivas.

ii. Datos y resultados

- Se debe determinar lo siguiente: coeficiente de variación de los resultados.

b) **Repetibilidad Del Método:** Realizar los análisis de contenido de Ambroxol Clorhidrato en el producto a evaluar, preparar estándar y 6 muestras de manera independiente según la técnica analítica establecida en el punto 3.1.

i. Procedimiento:

- Filtrar e inyectar 6 veces como mínimo la solución estándar y las muestras por duplicado en el HPLC.
- Obtener las áreas y los cromatogramas respectivos.

ii. Datos y resultados para ambas linealidades

- Se debe determinar lo siguiente: coeficiente de variación para las 6 muestras.

c) **Precisión Intermedia:** Un primer analista debe realizar el análisis de contenido de Ambroxol clorhidrato en el producto a evaluar. Preparar un estándar y seis muestras de acuerdo a la técnica analítica del punto 3.1.

Un segundo analista debe realizar el análisis de contenido de Ambroxol clorhidrato en el mismo producto a evaluar. Preparar un estándar y seis muestras de acuerdo a la técnica analítica del punto 3.1. El ensayo del segundo analista se realiza en diferentes días.

i. Procedimiento para cada analista:

- Filtrar e inyectar la solución estándar 6 veces como mínimo y las 6 muestras por duplicado en el HPLC.

ii. Datos y resultados

- Comparar los análisis de manera independiente y en forma global.
- Calcular el coeficiente de variación de manera independiente y de manera global.

4.2.6. Robustez

Realizar los análisis de contenido de Ambroxol Clorhidrato en el producto a evaluar, preparar estándar y una muestra según la técnica analítica establecida en el punto 3.1.

Se evaluará una muestra a condiciones normales vs con muestra cuantificada modificando:

- Velocidad de flujo de 1.00 mL/min a 0.5 mL/min
- Volumen de Inyección de 10 μ L a 5 μ L
- Temperatura de la columna de 25 °C a 30 °C
- Cambio de la longitud de columna de Kinetex XDB C18 de 100 mm x 4.6 mm x 2.6 μ m a Zorbax Eclipse XDB C18 150 mm x 4.6 mm x 5 μ m.
- Cambio en el pH de la Fase Móvil de 7.0 a 7.2

i. Procedimiento:

- Filtrar e inyectar 5 veces la solución estándar y las muestras por duplicado en el HPLC.

ii. Datos y resultados para ambas condiciones

- Se debe determinar lo siguiente: coeficiente de variación para las muestras y comparar con la muestra a condiciones normales.

4.3. DESARROLLO DE LA VALIDACIÓN PARA CLENBUTEROL CLORHIDRATO**4.3.1. Ensayo de Aptitud del Sistema**

Preparar una solución estándar como se indica en el punto 3.2.

Procedimiento: Filtrar e inyectar 5 veces como mínimo la solución de estándar en el equipo correspondiente, obtener las áreas respectivas.

Datos y resultados

- Calcular el Coeficiente de Variación (áreas y tiempo de retención), Asimetría, Factor de Capacidad, Platos Teóricos.

4.3.2. Selectividad

a) Determinación de Interferencia del Diluyente y Excipientes:

Preparar las siguientes muestras:

- **Muestra 1: (Fase Móvil):** Proceder según el procedimiento de preparación de fase móvil (3.2.) y filtrar por membrana PDF en un vial de HPLC.
- **Muestra 2: (Placebo + Ambroxol clorhidrato):** Transferir 5.0 mL de placebo. Proceder según el procedimiento de preparación de muestra (3.2.)
- **Muestra 3: (Estándar de Clenbuterol Clorhidrato):** Proceder según el procedimiento de preparación de estándar (3.2.)
- **Muestra 4: (Muestra):** Proceder según el procedimiento de preparación de muestra (3.2.)

Procedimiento: Filtrar e inyectar todas las muestras preparadas por duplicado en el HPLC, obtener las áreas y los cromatogramas respectivos.

Datos y resultados: Calcular el porcentaje de interferencia del placebo y de la fase móvil.

b) Determinación de Interferencias de Productos de Degradación

Todas las muestras se procederán a preparar de acuerdo al punto (3.2.). Luego proceder a someter las muestras a los métodos de degradación que se muestran en la tabla 2.6.

- Procedimiento:** Preparar estándar de acuerdo al punto (3.2.), filtrar e inyectar al sistema por quintuplicado como mínimo.

Tabla N° 2. 6: Métodos de Degradación para Clenbuterol clorhidrato

Métodos de Degradación	Muestra
1. Termólisis	Someter a las muestras a una temperatura mayor del estudio de estabilidad ($T_{prom} = 70\text{ °C} \times 1\text{ hora}$)
2. Hidrólisis Alcalina	Atacar a las muestras con solución de NaOH 2N.
3. Hidrólisis Ácida	Atacar a las muestras con solución de HCl 2N.
4. Oxidación	Atacar a las muestras con solución de H ₂ O ₂ al 3%.
5. Fotólisis	Someter a las muestras a exposición de luz UV x 5h

Fuente: Elaboración propia

ii. Preparación de las muestras:

- Muestra A (según método):** Transferir 5.0 mL de esta solución (equivalente a 0.005 mg de Clenbuterol Clorhidrato) a un matraz volumétrico ámbar de 10 mL, disolver y llevar a volumen con fase móvil.

Concentración de Clenbuterol Clorhidrato final: 0.0005 mg/mL.
- Termólisis:** Transferir 5.0 mL de esta solución (equivalente a 0.005 mg de Clenbuterol Clorhidrato) a un matraz volumétrico ámbar de 10 mL, disolver y llevar a volumen con fase móvil y llevar a Baño María a una temperatura de 70°C por una hora, dejar enfriar a temperatura ambiente y mezclar.

Concentración de Clenbuterol Clorhidrato final: 0.0005 mg/mL.
- Hidrólisis alcalina:** Transferir 5.0 mL de esta solución (equivalente a 0.005 mg de Clenbuterol Clorhidrato) a un matraz volumétrico ámbar de 10 mL, adicionar 1 mL de NaOH 2N, disolver y llevar a volumen con fase móvil.

Concentración de Clenbuterol Clorhidrato final: 0.0005 mg/mL.
- Hidrólisis ácida:** Transferir 5.0 mL de esta solución (equivalente a 0.005 mg de Clenbuterol Clorhidrato) a un matraz volumétrico ámbar de 10 mL, adicionar 1 mL de HCl 2N, disolver y llevar a volumen con fase móvil, mezclar.

Concentración de Clenbuterol Clorhidrato final: 0.0005 mg/mL.
- Oxidación:** Transferir 5.0 mL de esta solución (equivalente a 0.005 mg de Clenbuterol Clorhidrato) a un matraz volumétrico ámbar de 10 mL, adicionar 1 mL de H₂O₂ 3%, disolver y llevar a volumen con fase móvil, mezclar.

Concentración de Clenbuterol Clorhidrato final: 0.0005 mg/mL.

6. **Fotólisis:** Transferir 5.0 mL de esta solución (equivalente a 0.005 mg de Clenbuterol Clorhidrato) a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y llevar a volumen con fase móvil. Exponer a la luz UV 254 nm por 5 horas.

Concentración de Clenbuterol Clorhidrato final: 0.0005 mg/mL.

Filtrar e inyectar todas las muestras por duplicado en el HPLC, obtener las áreas respectivas.

iii. Datos y resultados

- Calcular los porcentajes de degradación respectivos.

4.3.3. Linealidad

Este ensayo se realiza con la finalidad de determinar la proporcionalidad entre la concentración del principio activo y su respuesta (áreas) y nos demuestra la capacidad que tiene el método de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración del principio activo en la muestra.

Determinación de Intervalos de Trabajo: Por ser un ensayo de valoración de un producto terminado cuya especificación es de 95% a 105%, el intervalo de trabajo será: 70% - 130% de la concentración de trabajo.

4.3.3.1. Linealidad Del Sistema

Se preparan 3 curvas de calibración correspondientes a 5 concentraciones que cubran el intervalo del analito (70%, 85%, 100%, 115% y 130%)

i. Preparación:

- Tomar como referencia el peso del estándar al 100% y calcular el peso a las diferentes concentraciones que formarán la curva de calibración.
- Proceder según el procedimiento de preparación de estándar de manera independiente (Ver punto 3.2.1.) Pesar el estándar según la tabla 2.7, transferir a un matraz volumétrico de color ámbar de 100 mL, diluir y llevar a volumen con fase móvil.

ii. Procedimiento:

- Filtrar e inyectar el estándar por triplicado en el HPLC.
- Filtrar e inyectar las 15 muestras preparados por triplicado en el HPLC, de preferencia colocarlos en sentido creciente a la concentración.
- Obtener las áreas de cada inyección.

Tabla N° 2. 7: Pesos de Estándar para Linealidad del Sistema de Clenbuterol HCl.

Estándar		Volumen (mL)			Concentración Final de Clenbuterol clorhidrato (mg/mL)
Porcentaje	Peso aprox. (mg)	V ₁	alícuota	V ₂	
70%	35.0	100	0.1	100	0.000350
85%	42.5	100	0.1	100	0.000425
100%	50.0	100	0.1	100	0.000500
115%	57.5	100	0.1	100	0.000575
130%	65.0	100	0.1	100	0.000650

Fuente: Elaboración propia

4.3.3.2. Linealidad Del Método: Se preparan 3 curvas de calibración correspondientes a 5 concentraciones que cubran el intervalo del analito en la muestra (70%, 85%, 100%, 115% y 130%).

i. Preparación:

- Tomar como referencia el volumen de la muestra a tomar descrito en el punto 3.2. (Preparación de la muestra); el cual será el 100%. Sobre este valor calcular los volúmenes a tomar para las diferentes concentraciones que formarán la curva de calibración, tal como se observa en la tabla 2.8.
- El volumen tomado de jarabe llevar a un matraz volumétrico de 10 mL, diluir a volumen con fase móvil y mezclar.

ii. Procedimiento:

- Filtrar e inyectar el estándar por triplicado en el HPLC.
- Filtrar e inyectar las 15 muestras preparados por triplicado en el HPLC, de preferencia colocarlos en sentido creciente a la concentración.
- Obtener las áreas de cada inyección.

Tabla N° 2. 8: Volumen de Muestra para Linealidad del Método para Clenbuterol HCl.

Muestra			Volumen (mL)	Concentración Final de Clenbuterol clorhidrato (mg/mL)
Porcentaje	Volumen de jarabe (mL)	Peso de Clenbuterol clorhidrato (mg)		
70%	3.5	0.0035	10	0.000350
85%	4.25	0.00425	10	0.000425
100%	5.0	0.005	10	0.000500
115%	5.75	0.00575	10	0.000575
130%	6.5	0.0065	10	0.00065

Fuente: Elaboración propia

4.3.3.3. Datos y resultados para ambas linealidades:

- Con los resultados se prepara una tabla relacionando las concentraciones (variable x) y la respuesta (variable y), utilizando el método de mínimos cuadrados.
- Se debe determinar lo siguiente: Ver si visualmente presenta linealidad los resultados, calcular la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación, el coeficiente de determinación y finalmente evaluar los resultados estadísticamente.

4.3.4. Exactitud

La exactitud de un método analítico, es la proximidad entre los resultados obtenidos y el valor verdadero. Preparar 3 curvas de calibración correspondientes a 3 concentraciones que cubran el intervalo del analito (70%, 100% y 130%)

- Preparación de los estándares:** Preparar una solución estándar al 100%, tal cual se indica en el punto 3.2.1
- Preparación de las 9 muestras:** Se trabaja a la concentración nominal de trabajo del método analítico.

Preparar por triplicado las muestras, para lo cual se pesa cantidades conocidas de analito que cubran los tres niveles de la curva (70%, 100% y 130%).

1. **Estándar al 70%:** Transferir aproximadamente 35.0 mg de Estándar de Referencia de Clenbuterol Clorhidrato a un matraz volumétrico ámbar de 100 mL y 2.5 mL de placebo, diluir a volumen con fase móvil. Transferir 0.1 mL de la solución a un matraz volumétrico ámbar de 100 mL, llevar a volumen con fase móvil y mezclar.
2. **Estándar al 100%:** Transferir aproximadamente 50.0 mg de Estándar de Referencia de Clenbuterol Clorhidrato a un matraz volumétrico ámbar de 100 mL y 5.0 mL de placebo, diluir a volumen con fase móvil. Transferir 0.1 mL de la solución a un matraz volumétrico ámbar de 100 mL, llevar a volumen con fase móvil y mezclar.
3. **Estándar al 130%:** Transferir aproximadamente 65.0 mg de Estándar de Referencia de Clenbuterol Clorhidrato a un matraz volumétrico ámbar de 100 mL y 7.5 mL de placebo, diluir a volumen con fase móvil. Transferir 0.1 mL de la solución a un matraz volumétrico ámbar de 100 mL, llevar a volumen con fase móvil y mezclar.

Mezclar el analito con el placebo y proceder tal como se indica en el punto 3.2. (Preparación de la muestra). Finalmente se deben obtener las 9 muestras con placebo; es decir 3 muestras al 70%; 3 muestras al 100% y finalmente 3 muestras al 130%.

iii. Procedimiento:

- Filtrar e inyectar el estándar por quintuplicado en el HPLC.
- Filtrar e inyectar las 9 muestras preparadas por triplicado en el HPLC, de preferencia colocarlos en sentido creciente a la concentración.
- Obtener las áreas de cada inyección.

iv. Datos y resultados

- Se debe determinar lo siguiente: Porcentaje de recuperación e intervalos de confianza, así como su evaluación estadística.

4.3.5. Precisión

Grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea.

a) Repetibilidad Del Sistema: Preparar una solución estándar como se indica en el punto 3.2. (Preparación del estándar).

i. Procedimiento:

- Filtrar e inyectar 6 veces la solución estándar.
- Obtener las áreas respectivas.

ii. Datos y resultados

- Se debe determinar lo siguiente: coeficiente de variación de los resultados.

b) Repetibilidad Del Método: Realizar los análisis de contenido de Clenbuterol Clorhidrato en el producto a evaluar, preparar estándar y 6 muestras de manera independiente según la técnica analítica establecida en el punto 3.2.

i. Procedimiento:

- Filtrar e inyectar 6 veces como mínimo la solución estándar y las muestras por duplicado en el HPLC y obtener las áreas respectivas.

ii. Datos y resultados para ambas linealidades

- Se debe determinar lo siguiente: coeficiente de variación para las 6 muestras.

c) Precisión Intermedia: Un primer analista debe realizar el análisis de contenido de Clenbuterol Clorhidrato en el producto a evaluar. Preparar un estándar y seis muestras de acuerdo a la técnica analítica del punto 3.2.

Un segundo analista debe realizar el análisis de contenido de Clenbuterol Clorhidrato en el mismo producto a evaluar. Preparar un estándar y seis muestras de acuerdo a la técnica analítica del punto 3.2. El ensayo del segundo analista se realiza en diferentes días.

i. Procedimiento para cada analista:

- Filtrar e inyectar la solución estándar 6 veces como mínimo y las 6 muestras por duplicado en el HPLC y obtener las áreas respectivas.

ii. Datos y resultados

- Comparar los análisis de manera independiente y en forma global.
- Calcular el coeficiente de variación de manera independiente y de manera global.

4.3.6. Robustez

Realizar los análisis de contenido de Clenbuterol Clorhidrato en el producto a evaluar, preparar estándar y una muestra según la técnica analítica establecida en el punto 3.2.

Se evaluará una muestra a condiciones normales vs con muestra cuantificada modificando:

- Volumen de inyección de 80 μ L a 90 μ L
- Temperatura de la columna de 40 °C a 30 °C
- Cambio de columna de Purospher star RP8e 75.0 mm x 4.6 mm x 3.0 μ m a Zorbax Eclipse XDB - C8 150 mm x 4.60 mm 3.5 μ m
- Cambio en el pH del Buffer de 2.7 \pm 0.1
- Tiempo de preparación del estándar y de la muestra después de 24 horas

i. Procedimiento:

- Filtrar e inyectar 5 veces la solución estándar y las muestras por duplicado en el HPLC.
- Obtener las áreas respectivas.

ii. Datos y resultados para ambas linealidades

- Se debe determinar lo siguiente: coeficiente de variación para las muestras y comparar con la muestra a condiciones normales.

4.4. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DEL MÉTODO DE VALIDACIÓN

Después de haber desarrollado los métodos analíticos para la determinación de Ambroxol Clorhidrato y Clenbuterol Clorhidrato, y para poder establecer la significancia de los resultados, se procedió a realizar el análisis estadístico con el propósito de documentar si los resultados obtenidos son confiables.

4.4.1. Linealidad

La linealidad es determinada por la capacidad del método para obtener respuestas de una serie de patrones de concentración conocida dentro del rango de interés proporcionales a la concentración del analito.

El estudio de la linealidad no solo implica una representación gráfica sino que es necesario realizar una comprobación estadística con los siguientes métodos:

a. Cálculo de la ecuación de la recta, pendiente y ordenada en el origen

Se parte de una relación simple entre dos variables

$$Y = f(x) \quad (\text{Ec. 2. 3})$$

Quiere decir que Y es una función o variable dependiente (respuesta, absorbancia) de la variable X (concentración).

Luego se especifica la forma como esas dos variables se relacionan, esta relación se expresa matemáticamente mediante una recta de regresión:

$$y = bx + a \quad (\text{Ec. 2. 4})$$

Donde:

x = concentración

y = respuesta

b = valor de la pendiente

a = termino independiente

Fórmula para hallar a y b

$$b = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \quad (\text{Ec. 2. 5})$$

$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n} \quad (\text{Ec. 2. 6})$$

Siendo a y b los estimadoras de la ordenada al origen y pendiente respectivamente, n el número de mediciones, x es la concentración e y el valor medido en el ensayo independiente de la apariencia de la recta, resulta conveniente evaluar los estimadores de regresión en un intervalo de confianza dado $\rho = 0.05$ (95%).

El coeficiente de correlación (r) nos indica el grado de relación entre la variable x (concentración), y la variable y (respuesta). Su valor máximo es 1. Si r es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Un valor nulo indica ausencia de relación lineal entre las variables.

En la práctica r es generalmente mayor a 0.99 y los valores menores a 0.90 son raros.

La información obtenida mediante el cálculo de r es limitada y no justifica por si sola la linealidad, siendo r^2 coeficiente de determinación el que aporta una mayor significación estadística ya que expresa la proporción de la variable total de y explicada por el modelo.

b. Test de Linealidad

Donde existen varios procedimientos para verificar la linealidad:

i. Coeficiente de variación de los factores respuesta (f); expresa la relación entre la lectura o respuesta y la concentración y puede tomarse como una expresión aproximada de la sensibilidad de calibrado. Es una calibración lineal de los factores de respuesta deben ser semejantes entre si y cercanos al valor de la pendiente.

Valores del coeficiente de variación, superiores al 5% serian indicativos de una posible falta de linealidad, siendo recomendables valores no superiores al 2%.

$$f = y_1/x_1 \quad (\text{Ec. 2. 7})$$

Procedimiento a seguir:

1. Calcula f para cada concentración
2. Determinar \bar{x}_f (promedio de los factores respuesta) S_f (desviación estándar de los factores respuesta).
3. Calcular el coeficiente de variación CV (%)

$$CV_{f\%} = \frac{S_f}{\bar{x}_f} * 100 \quad (\text{Ec. 2. 8})$$

ii. Significancia estadística de la desviación estándar de la pendiente; se trata de comprobar que existe una pendiente significativa distinta de cero mediante una prueba t de Student.

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b} \quad (\text{Ec. 2. 9})$$

S_b Se obtiene a partir del cálculo de la variancia residual $S^2_{y,x}$

La pendiente tiene que ser estadísticamente distinta de cero para un grado de significación α igual a 0.05

c. Test de Proporcionalidad

Este test permite evaluar si la recta pasa por el origen de coordenadas determinando si la variable independiente es significativamente distinta de cero. Habitualmente suele aceptarse que el valor de dicha ordenada sea como máximo el que corresponda a un 1% de la respuesta del analito a valor normal.

Para llevar a cabo este test se recurre como en el caso anterior a una prueba de significación t de student (n-2 grados de libertad, $\alpha = 0.05$):

$$t_{exp.} = \frac{|a|}{S_a} \quad (\text{Ec. 2. 10})$$

S_a se obtiene a partir del cálculo de la varianza residual $S_{y,x}^2$

La ordenada en el origen tiene que ser estadísticamente igual a cero para el grado de significación escogido.

d. Análisis de Varianza

Homogeneidad de varianza

$$G_{exp} = \frac{S_{maxima}^2}{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + S_4^2 + S_5^2} \quad (\text{Ec. 2. 11})$$

El $G_{tablas} = (\alpha = 0.05, K = 5, n = 3) = 0.68$

$G_{exp} < G_{tablas}$ Significa que las varianzas de las concentraciones son homogéneas, es decir, que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

4.4.2. 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 y esta expresada como la desviación estándar analíticamente por “S”, o más comúnmente como la desviación estándar relativa (DSR) o coeficiente de variación.

$$S = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (\text{Ec. 2. 12})$$

Donde n es el número de medidas, es el valor medido del ensayo *i* y el estándar de la medida de la población μ calculado como:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (\text{Ec. 2. 13})$$

Por su parte, la desviación estándar relativa o coeficiente de variación se calcula como:

$$DSR = \frac{s * 100}{\bar{x}} \quad (\text{Ec. 2. 14})$$

Tanto la desviación estándar y la desviación estándar relativa permiten evaluar la incertidumbre en la estimación de la medida (error aleatorio correspondiente a la dispersión de datos alrededor de la medida). La USP indica una DSR del sistema de no más de 2%, leyendo 5 veces una solución estándar, aunque pueden obtenerse en condiciones apropiadas valores inferiores al 1% e incluso menores.

La precisión de un método analítico deberá estudiarse sobre el sistema, evaluando la dispersión de al menos 6 lecturas del estándar. La precisión debe medirse en condiciones repetitivas (mismo analista, mismo día, mismo instrumento) y en condiciones reproducibles (diferente analista, diferente día, diferente instrumento).

4.4.3. Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero. En la valoración de un fármaco, la

exactitud puede determinarse mediante la aplicación del procedimiento analítico con respecto a un analito de pureza conocida (Estándar de Referencia).

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, esta debe acercarse al 100%.

$$\text{Porcentaje de recuperación (R)} = \frac{x_m}{\mu} * 100 \quad (\text{Ec. 2. 15})$$

Donde:

x_m = valor medido hallado

μ = valor aceptado como verdadero

Otra manera de calcularse es como la diferencia entre la media de la valoración y el valor verdadero aceptado, mediante un test estadístico (t-pareado) para un nivel de confianza del 0.05%.

Si $t_{exp} < t_{tablas}$ no existe diferencia significativa entre un método y otro y la exactitud es apropiada.

En el análisis de trazas (microcomponentes), no siempre se alcanzan recuperaciones tan elevadas y se consideran habituales valores de recuperación entre el 60% y 80%. Para determinarlo puede utilizarse un ensayo t de student, efectuando varias determinaciones de la muestra de concentración conocida y calculando como:

$$t_{exp} = \frac{|100 - \%R_{prom}| \sqrt{n}}{CV} \quad (\text{Ec. 2. 16})$$

Siendo R_{prom} porcentaje de recuperación promedio.

n = número de lecturas

4.4.4. Robustez

La guía ICH, Q2A define la robustez de un método analítico como la medida de su capacidad para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando idea de su fiabilidad o estabilidad durante su empleo en rutina. Es por tanto la capacidad que demuestra el procedimiento de análisis para proporcionar resultados válidos en presencia de pequeños cambios respecto de las condiciones descritas en el método, susceptibles de producirse durante su utilización.

Los estudios de robustez de un método de análisis permiten, por una parte, conocer la estabilidad de dicho método ante pequeñas modificaciones de las condiciones descritas en él y por tanto su independencia frente a estas. Por otra parte, también permiten conocer en muchos casos las condiciones de trabajo óptimas.

El mejor test para establecer si hay diferencia significativa en los resultados obtenidos en el análisis inicial y final es un TEST T. PAREADO que se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$t = \frac{\bar{d} \cdot \sqrt{n}}{s} \quad (\text{Ec. 2. 17})$$

Donde:

\bar{d} : promedio de la diferencia de las muestras iniciales menos las muestras finales.

s : Desviación estándar

n : Número de datos

4.5. PARAMETROS PARA LA ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE

4.5.1. Incertidumbre Estándar: u (y')

Cada componente de la incertidumbre (y'), expresada como desviación estándar.

4.5.2. Incertidumbre Estándar combinada: $u_c(y)$

Para el resultado y (Ley de propagación de errores)

4.5.3. Incertidumbre Expandida: U

Proporciona un intervalo dentro del cual se cree que está el valor del mensurando, cuando por razones de seguridad o salud se necesite expresar la incertidumbre con un alto nivel de confianza, se multiplica esta incertidumbre combinada por un factor de cobertura o seguridad K .

$$U = k u_c(y) \quad (\text{Ec. 2. 18})$$

k = factor de seguridad o de cobertura. Para un nivel de confianza del 95%, se considera un valor de k igual a 2.

4.5.4. Componentes de la Incertidumbre

La incertidumbre de un resultado puede originarse por diferentes causas, algunas de ellas son:

- Inadecuada definición del mensurando.
- Muestreo
- Efectos de la matriz e interferencias.
- Contaminación durante el muestreo o la preparación de la muestra.
- Incertidumbre de pesas y material volumétrico.
- Pureza de reactivos.
- Valores asignados a patrones y materiales de referencia.
- Calibración de equipos, etc.

4.5.5. Reglas Para el cálculo de la Incertidumbre Combinada

Regla 1: Sumas y restas: $y: a + b + c + \dots$

$$u(y) = \sqrt{u(a)^2 + u(b)^2 + u(c)^2 + \dots} \quad (\text{Ec. 2. 19})$$

Regla 2: Productos y cocientes: $y = abc$ o $y = a/bc$

$$\frac{u(y)}{y} = \sqrt{\left[\frac{u(a)}{a}\right]^2 + \left[\frac{u(b)}{b}\right]^2 + \left[\frac{u(c)}{c}\right]^2} \quad (\text{Ec. 2. 20})$$

Regla 3: Exponentes: $y = a^n$

$$\frac{u(y)}{y} = n \frac{u(a)}{a} \quad (\text{Ec. 2. 21})$$

4.5.6. Evaluación Tipo A de la Incertidumbre

Se desarrolla una serie de experimentos, 5 repeticiones en cada equipo HPLC en diferentes días utilizando la misma columna cromatográfica, se registra la recuperación de Ambroxol Clorhidrato y Clenbuterol Clorhidrato, se calcula el promedio tanto para el equipo 1 como para el equipo 2, se calcula el promedio final y se divide por la raíz del número de repeticiones, así de esta manera se obtiene una aproximación al valor de incertidumbre tipo A.

4.5.7. Evaluación Tipo B de la Incertidumbre del Método

Para el cálculo de incertidumbre se establece primero de forma independiente la contribución tanto de la pesada como del proceso de dilución a que fueron sometidas las muestras con Ambroxol Clorhidrato y Clenbuterol Clorhidrato, aquí se establece por medios documentados la calibración de la balanza, la especificación de las masas, la incertidumbre del estándar, la incertidumbre de las fiolas y de la pipeta. Luego se combinan estas incertidumbres y se obtiene el valor de la incertidumbre tipo B.

4.5.8. Cálculo de Incertidumbre combinada

Luego de tener los valores tanto de la incertidumbre tipo A como la de tipo B, se procede a calcular la incertidumbre combinada, a través, de las reglas N° 1 de sumas y restas de incertidumbres parciales.

CAPITULO III

RESULTADOS

1. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

1.1. ELECCIÓN DEL DETECTOR

Para elegir el tipo detector y longitud de onda adecuada se realizó un barrido espectral de 200 – 400 nm, con la ayuda de un equipo con detector de arreglo de Diodos, donde el analito de interés es detectado desde la longitud de onda de 248 nm para ambroxol clorhidrato y 296 nm para clenbuterol clorhidrato. A estas longitudes de onda los analitos presentaron su mayor absorbancia y se evidenció mejor línea de base en el cromatógrama desarrollado para cada uno de ellos.

1.2. ELECCIÓN DE LA FASE MÓVIL

La selección del disolvente se basa en la solubilidad y estabilidad del fármaco en el sistema de disolventes, así como la extracción del fármaco a partir de su formulación.

1.2.1. Ambroxol clorhidrato

Se inició el desarrollo del método usando como fase estacionaria una columna (L1) C 18 de 100 mm x 4.6 mm y de 2.6 micras.

En cromatografía de líquidos, la muestra a inyectar debe estar completamente disuelta. Es conveniente que el solvente de disolución de la muestra sea la misma fase móvil. Si esto no es

posible debe tenerse en cuenta la miscibilidad entre el solvente de disolución y la fase móvil, para evitar la precipitación de componentes de la muestra al estar en contacto con la fase móvil, también se evitará la aparición de picos extraños al cromatograma verdadero debidos a la señal de solvente, o bien a la elución de impurezas retenidas en la columna.

Las fases móviles de fase reversa están constituidas por mezclas de solventes polares, en general el agua, y un modificador orgánico (metanol, acetonitrilo, THF). Para nuestro caso el ambroxol clorhidrato es moderadamente soluble en agua, el acetonitrilo tienen una longitud de onda de máxima absorción de 190 nm; a partir de esto elegimos como fase móvil al acetonitrilo como modificador orgánico y un tampón (pH 7.0) como componente acuoso: el tampón utilizado es la sal de fosfato amónico dibásico. A este pH se pudo obtener resultados reproducibles. Con lo anteriormente mencionado se obtuvo el espectro tridimensional como se muestra en la figura 3.1 y el cromatograma de estándar de ambroxol clorhidrato es mostrado en la figura 3.2.

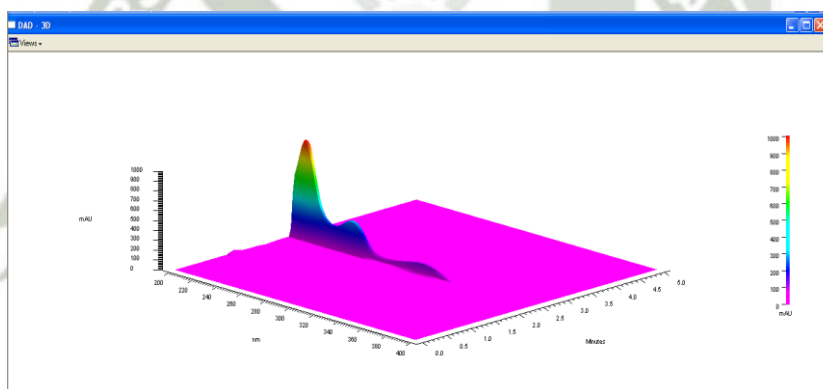


Fig. N° 3. 1: Spectro tridimensional de Ambroxol clorhidrato 248 nm

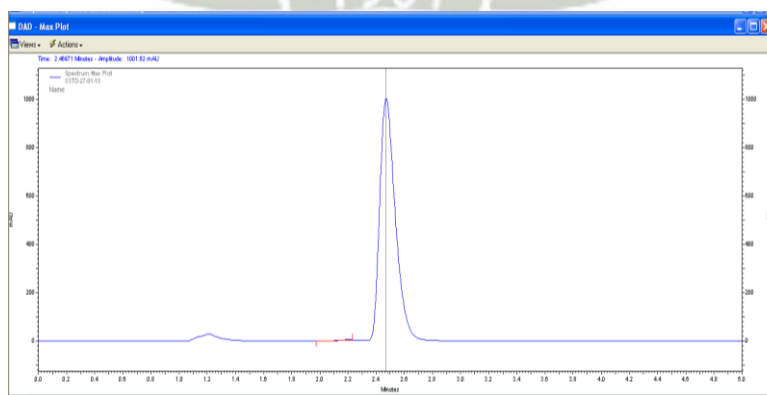


Fig. N° 3. 2: Cromatograma de Estándar de Ambroxol clorhidrato

1.2.2. Clenbuterol clorhidrato

Se inició el desarrollo del método usando como fase estacionaria una columna (L7) C 8 de 75 mm x 4.6 mm y de 3 micras y como componentes de la fase móvil se utilizó acetonitrilo como modificador orgánico y un tampón (pH 2.0 – 4.0) como componente acuoso: el tampón utilizado es la sal de formato de amonio (pH 3.0 aprox.). Se elige estas condiciones como partida de inicio debido a que en este rango de pH se obtiene análisis reproducibles de compuestos ionizables.

En el cromatograma del estándar se apreció un pico robusto en un tiempo de retención aceptable y no siendo así en el cromatograma de la muestra debido a la interferencia de la matriz lo cual nos con lleva a un problema de falta de resolución.

Para mejorar la resolución se empezó a realizar ajustes al pH, eligiendo esta opción debido a que es la menos complicada a comparación del cambio de fase estacionaria y cambios en la proporción de los componentes de la fase móvil. Ver figura 3.3. De las diversas pruebas de modificación de pH que se realizó, se determinó que en el pH 2.7 del componente acuoso de la fase móvil se obtiene una buena resolución de analito (clenbuterol clorhidrato) en la muestra problema.

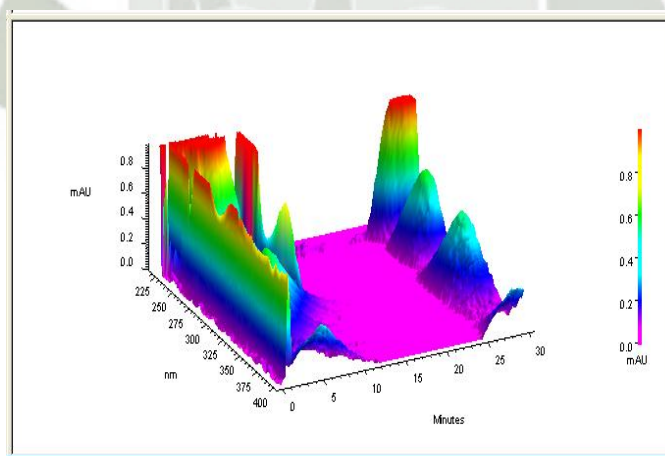


Fig. N° 3. 3: Espectro tridimensional de Clenbuterol clorhidrato 296 nm

Se procedió a optimizar el tiempo de retención modificando una característica física (longitud) y una característica química (tamaño de partícula) de la fase estacionaria con la cual se obtuvo un menor tiempo de retención de 9 minutos. Ver figura 3.4.

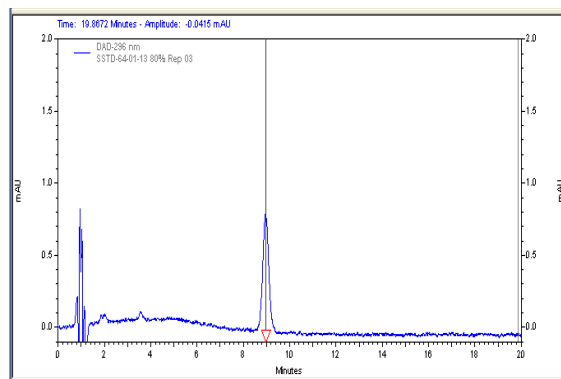


Fig. N° 3. 4: Cromatograma de estándar de Clenbuterol clorhidrato

2. PARAMETROS DE VALIDACIÓN

2.1. SELECTIVIDAD

Este parámetro se refiere a la proporcionalidad del método de producir una señal medible, debida solo a la presencia del analito, libre de interferencias de otros componentes en la matriz de la muestra, evaluamos la especificidad, según metodología descrita en el capítulo 2.

2.1.1. Determinación de Interferencia del Diluyente y Excipientes

Evaluamos la posible interferencia del diluyente, de la fase móvil y el placebo en la identificación del principio activo; el área del diluyente, de la fase móvil y del placebo es cero por lo tanto no se detecta una posible interferencia, tal como se observa en la tabla N° 3.1 para ambroxol clorhidrato y tabla N° 3.2 para clenbuterol clorhidrato.

Tabla N° 3. 1: Evaluación de Interferencia para Ambroxol Clorhidrato

Muestras	Área	% Interferencia en relación con el estándar	% Interferencia en relación con el Producto	Resultado
Diluyente	0	0	0	Conforme
Fase móvil	0	0	0	Conforme
Placebo	0	0	0	Conforme
Muestra	9506388	-	100	-
Estándar	8717386	100	-	-

Fuente: Elaboración propia

Tabla N° 3. 2: Evaluación de Interferencia para Clenbuterol clorhidrato

Muestras	Área	% Interferencia en relación con el estándar	% Interferencia en relación con el Producto	Resultado
Diluyente	0	0	0	Conforme
Fase móvil	0	0	0	Conforme
Placebo	0	0	0	Conforme
Muestra	72735	100
Estándar	69790	100

Fuente: Elaboración propia

2.1.2. Determinación de Interferencia de Productos de Degradación

Se evaluó el parámetro de selectividad (degradación) de acuerdo a las condiciones de degradación mencionadas en la tabla N° 3.3 para ambroxol clorhidrato y en la tabla N° 3.4 para clenbuterol clorhidrato. El porcentaje de degradación de todas estas condiciones se evaluó frente a las lecturas obtenidas a condiciones normales.

Tabla N° 3. 3: Interferencia de Productos por Degradación para Ambroxol clorhidrato

Condiciones	Condiciones y Tiempo	Conc. final (mg/5mL)	% Analito Cuantificado	Porcentaje de Degradación (%)
Según técnica de análisis	-	7.7190	102.92	-
Tratamiento térmico	T=70°C x t=1 hora	7.7420	103.23	-0.31
Tratamiento Alcalino NaOH 2N	T=70°C x t=1 hora	7.4606	99.47	3.45
Tratamiento ácido HCl 2N	T=70°C x t=1 hora	7.1166	94.89	8.03
Tratamiento oxidativo H2O2	T=70°C x t=1 hora	7.5854	101.14	1.78
Tratamiento Luz UV 254 nm	t=5 horas	7.7056	102.74	0.18

Fuente: Elaboración Propia

Tabla N° 3. 4: Interferencia de Productos por Degradación para Clenbuterol clorhidrato

Condiciones	Condiciones y Tiempo	Conc. final (mg/5mL)	% Analito Cuantificado	Porcentaje de Degradación (%)
Según técnica de análisis	-	0.0052	100.00	-
Tratamiento térmico	T=70°C x t=1 hora	0.0050	96.15	3.85
Tratamiento Alcalino NaOH 2N	T=70°C x t=1 hora	0.0050	96.15	3.85
Tratamiento ácido HCl 2N	T=70°C x t=1 hora	0.0051	98.08	1.92
Tratamiento oxidativo H2O2	T=70°C x t=1 hora	0.0048	92.31	7.69
Tratamiento Luz UV 254 nm	t=5 horas	0.0051	98.08	1.92

Fuente: Elaboración Propia

Las diferentes muestras analizadas cumplen con el criterio de aceptación de interferencia (<2%). Por lo que los métodos cumplen con el parámetro de Selectividad.

2.2. LINEALIDAD

2.2.1. Linealidad del Sistema

a) **Ambroxol clorhidrato:** Éste parámetro se evaluó en un rango de 70 % a 130%, preparando 5 concentraciones crecientes del principio activo; se analizaron por triplicado con un total de 15 determinaciones (ver tabla N° 3.5), según metodología descrita en el punto 4.2.3.1. del capítulo II. Se construyó la recta de regresión lineal correspondiente a los resultados de los 15 puntos experimentales (ver figura 3.5).

Tabla N° 3. 5: Resultados de la linealidad del sistema de Ambroxol clorhidrato

Conc. Teórica	M.	mg/mL (x)	Áreas (y)	xy	x ²	y ²	f (factor respuesta)	Varianza
70%	mp1	0.1051	6218423	653556.2	0.01104	38668784606929	59166727	8024314718
	mp2	0.1051	6207250	652692.3	0.01105	38529952562500	59032335	
	mp3	0.1052	6206477	652921.4	0.01106	38520356751529	58996930	
85%	mp1	0.1275	7524987	959435.8	0.01625	56625429350169	59019506	15571746083
	mp2	0.1275	7529658	960407.9	0.01626	56695749596964	59032991	
	mp3	0.1275	7556326	963809.4	0.01626	57098062618276	59242070	
100%	mp1	0.1500	8877776	1331666.4	0.02250	78814906706176	59185173	23239254059
	mp2	0.1500	8920183	1338027.4	0.02250	79569664753489	59467887	
	mp3	0.1500	8913808	1337071.2	0.02250	79455973060864	59425387	
115%	mp1	0.1725	10144271	1749886.7	0.02975	102906234121441	58807368	11622947208
	mp2	0.1726	10178463	1757311.6	0.02980	103601109042369	58954318	
	mp3	0.1727	10192321	1760213.8	0.02982	103883407367041	59017493	
130%	mp1	0.1951	11563262	2256570.6	0.03808	133709028080644	59253200	30395653457
	mp2	0.1951	11623750	2268374.8	0.03808	135111564062500	59563157	
	mp3	0.1951	11620499	2267740.4	0.03808	135035997009001	59546498	
Suma	15	2.2513	133277454	20909686.1	0.35310	1238226219689890	887711038	88853915525

Fuente: Elaboración propia

El gráfico de linealidad del sistema se puede observar en la figura N° 3.5 el cual se construyó usando un modelo lineal, con los datos de las tres muestras, resumidas en la tabla N° 3.5, para valores de área se obtuvo un promedio entre los tres datos obtenidos de cada inyección.

En la figura N° 3.5 se evidencia la linealidad del sistema, que fue construida con la concentración “x” de Ambroxol Clorhidrato en mg/mL versus “y” que son las áreas obtenidas de Ambroxol Clorhidrato correspondientes a cada concentración “x”, en la que las áreas son dependientes de la concentración.

De esta manera se pudo determinar la respuesta del analito que en este caso es lineal, es decir, hay relación directa entre la señal instrumental y la concentración del producto analizado, siendo un método lineal.

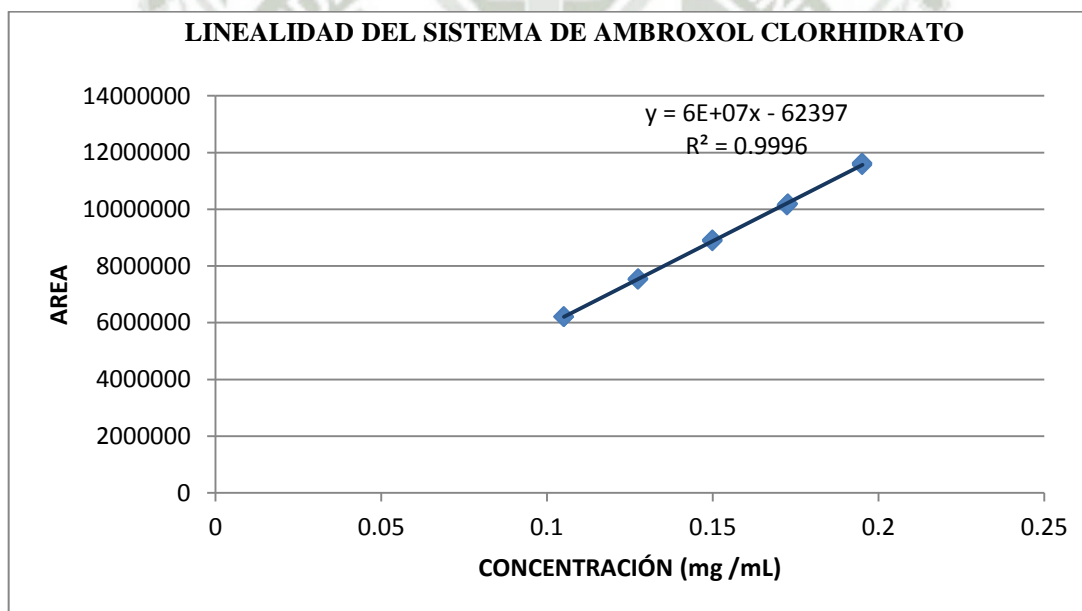


Fig. N° 3. 5: Linealidad del Sistema de Ambroxol clorhidrato

b) Clenbuterol clorhidrato: Éste parámetro se evaluó en un rango de 70 % a 130%, preparando 5 concentraciones crecientes del principio activo; se analizaron por triplicado con un total de 15 determinaciones (ver tabla N° 3.6), según metodología descrita en el punto 4.3.1.1. del

capítulo II. Se construyó la recta de regresión lineal correspondiente a los resultados de los 15 puntos experimentales (ver figura 3.6).

Tabla N° 3. 6: Resultados de la Linealidad del Sistema de Clenbuterol clorhidrato

Conc. Teórica	M.	mg/mL (x)	Área (y)	xy	x ²	y ²	f (factor respuesta)	Varianza
70%	mp1	0.000350	51112	17.8893	1.22500E-07	2612470619	1.46035E+08	6.67349E+11
	mp2	0.000350	50800	17.7800	1.22500E-07	2580640000	1.45143E+08	
	mp3	0.000350	51371	17.9798	1.22500E-07	2638979641	1.46774E+08	
85%	mp1	0.000426	62529	26.6373	1.81476E-07	3909875841	1.46782E+08	2.59783E+11
	mp2	0.000425	62812	26.6951	1.80625E-07	3945347344	1.47793E+08	
	mp3	0.000426	62697	26.7089	1.81476E-07	3930913809	1.47176E+08	
100%	mp1	0.000500	73629	36.8145	2.50000E-07	5421229641	1.47258E+08	4.29769E+11
	mp2	0.000500	73648	36.8240	2.50000E-07	5424027904	1.47296E+08	
	mp3	0.000500	73071	36.5355	2.50000E-07	5339371041	1.46142E+08	
115%	mp1	0.000576	83797	48.2671	3.31776E-07	7021937209	1.45481E+08	4.73826E+11
	mp2	0.000576	83651	48.1830	3.31776E-07	6997489801	1.45227E+08	
	mp3	0.000576	83049	47.8362	3.31776E-07	6897136401	1.44182E+08	
130%	mp1	0.000650	95126	61.8319	4.22500E-07	9048955876	1.46348E+08	3.94474E+11
	mp2	0.000650	94810	61.6265	4.22500E-07	8988936100	1.45862E+08	
	mp3	0.000650	94316	61.3054	4.22500E-07	8895507856	1.45102E+08	
Suma	15	0.007505	1096418	572.9146	0.000004	83652819083	2192600463	2.22520E+12

Fuente: Elaboración propia

c) **Cálculo de la Recta de Regresión:** Para hallar los valores que corresponden al intercepto “a” y pendiente “b”, fue necesario establecer la recta de regresión a partir de los datos de la tabla N° 3.6. donde se hallan los resultados obtenidos de la linealidad el sistema y se elabora la recta de regresión, como se observa en la figura N° 3.6.

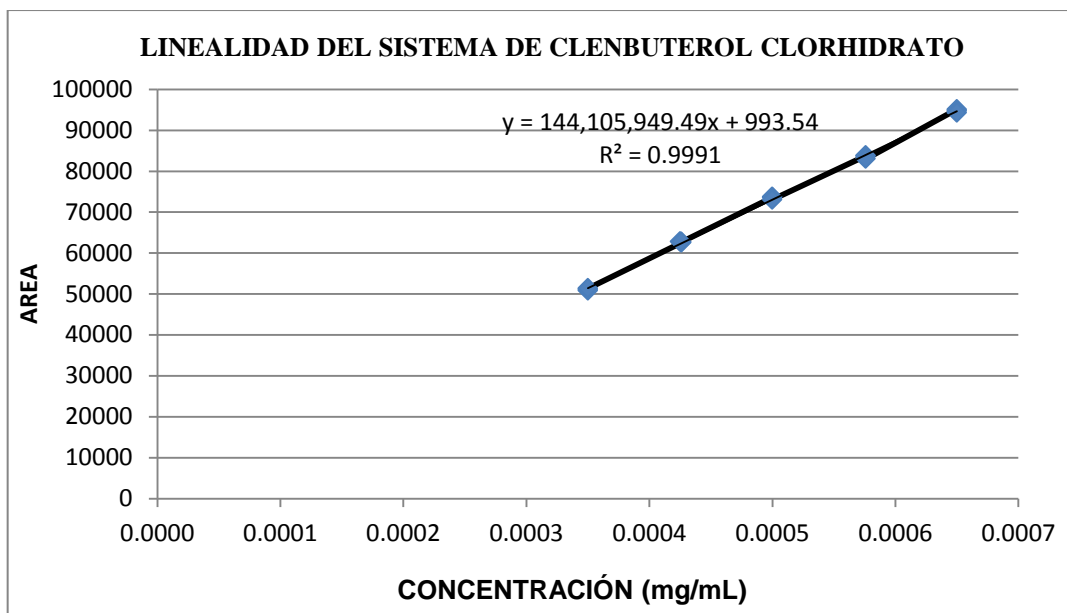


Fig. N° 3. 6: Linealidad del Sistema de Clenbuterol clorhidrato

Después de haber establecido la recta de regresión, los valores que corresponden al intercepto “a” y pendiente “b” (Ec. 2.5 y 2.6), los datos obtenidos se muestran en la Tabla N° 3.7.

Tabla N° 3. 7: Intercepto, pendiente y ecuación de la recta

	Ambroxol HCl	Clenbuterol HCl.
a (intercepto)	- 62396.85	993.54
b (pendiente)	59614634.23	144105949.49
Ecuación de la recta	$y = 59614634.23x - 62396.85$	$y = 144105949.49x + 993.54$

Fuente. Elaboración propia

d) Interpretación Estadística de la Regresión Lineal

- 1. Calculo del Coeficiente de Correlación:** Con la finalidad de poder conocer el grado de intensidad de la relación existente entre las variables “x” e “y”, se halla el valor del coeficiente de correlación lineal, mediante la siguiente fórmula:

$$r = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{\left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}\right) \left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}\right)}} \quad (\text{Ec. 3. 1})$$

El coeficiente de correlación obtenido fue de:

- Ambroxol clorhidrato: 0.9998
- Clenbuterol clorhidrato: 0.9996

Criterio de aceptación > 0.99

2. Cálculo del Coeficiente de Determinación: Indica el grado de ajuste de la ecuación y se halla elevando el coeficiente de correlación al cuadrado: r^2

El coeficiente de determinación obtenido fue de:

- Ambroxol clorhidrato: 0.9996.
- Clenbuterol clorhidrato: 0.9991

Criterio de aceptación > 0.995

En ambos casos, el valor es muy cercano a uno, estableciéndose que el modelo lineal es adecuado para describir la relación que existe entre las variables “x” e “y”. Pudiendo afirmar que el 99.96% y el 99.91% de las variaciones se debe a influencias de la variable “x”.

3. Test Estadístico del Coeficiente de Correlación

Uno de los mejores indicadores del modelo lineal no es únicamente el coeficiente de correlación “r” sino un test estadístico basado en dos hipótesis, en el que se calcula el $t_{\text{regresión}}$ (test de regresión) se compara con t_{tablas} (test tabulado) con $n-2$ grados de libertad y un intervalo de confianza del 95% ($\alpha: 0.05$) valor que es encontrado en la tabla de distribución de t de Student.

HIPOTESIS NULA (H_0): no existe correlación significativa entre “x” e “y” ($r=0$)

HIPOTESIS ALTERNATIVA (H_1): “r” no debe ser significativamente diferente de uno ($r \neq 0$).

El t regresión calculado a partir de la siguiente prueba estadística:

$$t_r = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{(1-r^2)}} \quad (\text{Ec. 3. 2})$$

- Ambroxol clorhidrato: $t_{exp} = 192.126$
 - Clenbuterol clorhidrato: $t_{exp} = 121.811$
- $t_{tablas} = 2.160$ para $(n - 2)$ grados de libertad y $p = 0.05$

Cumplen con el test de Student de la pendiente ya que $t_{exp} > t_{tablas}$. Se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, es decir si hay correlación significativa entre las concentraciones y sus áreas.

Estos valores tan altos indican que la probabilidad de ser $b \neq 0$ es muy elevada, superior al 99.5 %. Si fuera $b = 0$, significaría que la recta es paralela al eje de abscisas y no habría regresión.

4. Test de Linealidad

i. Límite de Confianza de la Pendiente “b”

Este valor se calcula en función de la desviación estándar de la pendiente “b” (S_b) se debe hallar primero la varianza del error experimental total (determinación de la varianza de x sobre y) cuya fórmula es la siguiente:

$$S_{xy}^2 = \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n - 2} \quad (\text{Ec. 3.3.})$$

- Ambroxol clorhidrato: $S_{xy}^2 = 1463332112$
- Clenbuterol clorhidrato: $S_{xy}^2 = 236389.6019$

A partir de ello se calcula la desviación estándar de la pendiente b (S_b), con la siguiente formula:

$$S_b = \sqrt{\frac{S_{xy}^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}} \quad (\text{Ec. 3. 3})$$

- Ambroxol clorhidrato: 310288.9338
- Clenbuterol clorhidrato: 1183028.138

Fórmula para hallar los límites de confianza de la pendiente b.

$$b = b \pm t_{tablas} \cdot S_b \quad (\text{Ec. 3. 4})$$

t_{tablas} = es el valor obtenido en la tabla de distribución de student, bajo las siguientes condiciones:

- $n - 2$ grados de libertad, n: número de muestras
- Grado de confianza del 95%

Resultado:

Intervalo de confianza de la pendiente “b”; t_{tablas} : 2.16

- Ambroxol clorhidrato: de 58944295.7 hasta 60284972.72
- Clenbuterol clorhidrato: de 141550172.6 hasta 146661726.4

El intervalo de confianza no incluye el 0.

ii. Test Estadístico de la Pendiente “b”

Se trata de comprobar que existe una pendiente significativamente distinta de cero mediante una prueba de t de student.

Se realiza estableciendo una comparación entre “ t_{exp} ” y “ t_{tabla} ”

HIPÓTESIS NULA (H_0): “b” es estadísticamente igual a cero ($b=0$)

HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H_1): “b” es estadísticamente diferente de cero ($b \neq 0$).

Fórmula para hallar el valor de t experimental “ t_{exp} ”

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b} \quad (\text{Ec. 3. 5})$$

Resultado:

t_{tablas} : 2.16 Para $15 - 2 = 13$ grados de libertad y 95% de confianza.

- Amboxol clorhidrato: t_{exp} : 192.126
- Clenbuterol clorhidrato: t_{exp} : 121.811

$t_{exp} > t_{tablas}$ entonces se rechaza la hipótesis nula (H_0) y “b” es significativamente diferente de cero y se corrobora que el intervalo de confianza no incluye el cero.

iii. Coeficiente de variación de los factores de Respuesta (f)

El factor de respuesta (f) expresa la relación entre la lectura o respuesta (área) y la concentración y puede tomarse como una expresión aproximada de la sensibilidad de calibrado. En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre si y cercanos al valor de la pendiente. Se calcula, mediante la siguiente fórmula:

$$CV_{f\%} = \frac{S_f}{\bar{x}_f} * 100 \quad (\text{Ec. 3. 6})$$

Donde:

S_f = desviación estandar de (f)

\bar{x}_f = Promedio de factor respuesta

Resultado:

- Ambroxol clorhidrato: $CV_{f\%} = 0.3918$
- Clenbuterol clorhidrato: $CV_{f\%} = 0.6961$

Coeficiente de variación inferior al 2%, es decir que el conjunto de datos en relación a su media, se encuentran con un grado de 0.39% y 0.70% de dispersión respectivamente.

5. Test de Proporcionalidad

i. Límite de Confianza del Intercepto “a”

Este valor se calcula en función de la desviación estándar del intercepto “a” con la siguiente formula:

$$S_a^2 = S_b^2 \cdot \frac{\sum x^2}{n} \quad (\text{Ec. 3. 7})$$

- Ambroxol clorhidrato: $S_a = 47607.080$
- Clenbuterol clorhidrato: $S_a = 605.074$

Fórmula para hallar los límites de confianza del intercepto

$$a = a \pm t_{\text{tabla}} \cdot S_a \quad (\text{Ec. 3. 8})$$

t_{tabla} = Valor obtenido en la tabla de distribución de student, bajo las siguientes condiciones:

- $n - 2$ grados de libertad, n : número de muestras
- Grado de confianza del 95%

Resultado:

Intervalo de confianza del intercepto “a”

t_{tablas} : 2.16

- Ambroxol clorhidrato: de -165245.791 hasta 40452.088
- Clenbuterol clorhidrato: de -313.638 hasta 2300.729

Este intervalo de confianza incluye el 0.

ii. Test Estadístico del intercepto “a”

El test de proporcionalidad permite evaluar si la recta pasa por el origen de coordenadas determinando si el intercepto es distinto de cero o igual a cero.

Se realiza estableciendo una comparación entre “ t_{exp} ” y “ t_{tabla} ”

HIPÓTESIS NULA (H_0): “a” es estadísticamente igual a cero ($a = 0$)

HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H_1): “a” es estadísticamente diferente de cero ($a \neq 0$).

Fórmula para hallar el valor de t experimental “ t_{exp} ”

$$t_{exp} = \frac{|a|}{s_a} \quad (\text{Ec. 3. 9})$$

Resultado:

t_{tablas} : 2.16, Para $15 - 2 = 13$ grados de libertad y 95% de confianza.

- Ambroxol clorhidrato: $t_{exp} = -1.31$
- Clenbuterol clorhidrato: $t_{exp} = 1.64$

$t_{exp} < t_{tablas}$, entonces se acepta la hipótesis nula (H_0), concluyendo que “a” es estadísticamente igual a cero su intervalo de confianza incluye el cero, el valor de “a” es aceptable y se corrobora que el intervalo de confianza incluye 0.

6. Análisis de Varianza

i. Homogeneidad de la Varianza

Para determinar la homogeneidad de varianzas se aplica el test de Cochran (G_{exp}), el cual indica si la concentración tiene alguna influencia en la variabilidad de los resultados.

Para poder determinar la homogeneidad de las varianzas necesitamos determinar las varianzas de la $f(y/x)$ para cada concentración lo cual se resume en las tablas N° 5 y N° 6; en las cuales podemos ver las varianzas calculadas a partir de la $f(y/x)$ para cada concentración con los cuales podemos calcular el G_{exp}

La homogeneidad de varianzas se realiza estableciendo una comparación entre " G_{exp} " y " G_{tabla} ", el análisis estadístico, estuvo basado en dos hipótesis detalladas a continuación.

HIPOTESIS NULA (H_0): Las varianzas son semejantes

HIPOTESIS ALTERNATIVA (H_1): Las varianzas son diferentes

El G_{exp} corresponde a la siguiente fórmula:

$$G_{exp} = \frac{s_{máxima}^2}{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2 + s_4^2 + s_5^2} \quad (\text{Ec. 3. 10})$$

Resultados:

- Ambroxol clorhidrato: $G_{exp} = 0.34$
- Clenbuterol clorhidrato: $G_{exp} = 0.30$

$G_{tablas} = 0.68$, es el valor obtenido en la tabla de homogeneidad de varianzas de Cochran con las siguientes condiciones:

- k (número de grupos) = 5 , n (número de réplicas por grupo) = 3
- Probabilidad de cometer error (p) de 0.05, es decir un grado de confianza del 95%.

$G_{exp} < G_{tablas}$, se acepta la H_0 ; las varianzas son homogéneas, las varianzas de las 5 concentraciones son equivalentes, o lo que es igual, el factor de concentración no influye en la variabilidad de los resultados y se corrobora que las varianzas no son estadísticamente diferentes entre sí.

Con los datos obtenidos se elaboró la tabla N° 3.8, donde se resumen los parámetros calculados para la determinación de la linealidad del sistema.

Tabla N° 3. 8: Parámetros calculados para la determinación de la linealidad del sistema de Ambroxol clorhidrato y Clenbuterol clorhidrato

Parámetros	Resultados Ambroxol HCl	Resultados Clenbuterol HCl
Ecuación de la Recta	$y = 6E+07x - 62397$	$y = 144105949.49x + 993.54$
Coefficiente de correlación (r)	0.9998	0.9996
Coefficiente de Determinación (r^2)	0.9996	0.9991
Test de Linealidad		
Variación del error experimental total (S_{xy}^2)	1463332112	236389.6019
Desviación estándar de la pendiente "b" (S_b)	310288.9338	1183028.138
Límites de confianza de la pendiente "b"	$58944295.7 < b < 60284972.7$	$141550172.6 < b < 146661726.4$
Test estadístico de la pendiente "b" $t_{exp} > t_{tablas}$	$192.13 > 2.16$	$121.81 > 2.16$
Coefficiente de variación de los factores de respuesta (f)	0.3918	0.6961
Test de Proporcionalidad		
Desviación estándar del intercepto "a" (S_a)	47607.1244	605.074
Límites de confianza del intercepto "a"	$-165245.791 < a < 40452.088$	$-313.638 < a < 2300.729$
Test estadístico del intercepto "a" $t_{exp} < t_{tablas}$	$-1.31 < 2.16$	$1.64 < 2.16$
Análisis de Varianza		
Homogeneidad de varianza $G_{exp} < G_{tablas}$	$0.34 < 0.68$	$0.30 < 0.68$

Fuente: Elaboración Propia

2.2.2. LINEALIDAD DEL MÉTODO

a. Ambroxol clorhidrato: Se procedió a preparar soluciones a partir del jarabe comercial a cinco niveles de concentración que cubran el intervalo de trabajo, por volúmenes independientes y por triplicado: 60%, 80%, 100%, 120% y 140% de la concentración nominal de trabajo en el rango establecido. Se analizaron por triplicado con un total de 15 determinaciones, según metodología descrita en el ítem 4.2.3.2 del capítulo II. Se construyó la recta de regresión lineal correspondiente a los resultados de los 15 puntos experimentales.

Los resultados obtenidos están plasmados en la tabla N° 3.9.

Tabla N° 3. 9: Resultados de Linealidad del Método de Ambroxol clorhidrato

Conc. Teórica	M.	mg/mL (x)	Áreas (y)	xy	x ²	y ²	f (factor respuesta)	Varianza
60%	mp1	0.0900	5354205	481878.4	0.0081	28667511182025	59491167	6.7977E+11
	mp2	0.0900	5299125	476921.2	0.0081	28080722232875	58879163	
	mp3	0.0900	5207321	468658.8	0.0081	27116188525493	57859119	
80%	mp1	0.1200	7086880	850425.6	0.0144	50223872858986	59057336	3568007801
	mp2	0.1200	7100303	852036.4	0.0144	50414307425344	59169194	
	mp3	0.1200	7097951	851754.2	0.0144	50380913130368	59149594	
100%	mp1	0.1500	8806211	1320931.7	0.0225	77549358047328	58708076	34755668326
	mp2	0.1500	8858415	1328762.3	0.0225	78471522217835	59056102	
	mp3	0.1500	8814933	1322240.0	0.0225	77703049671111	58766222	
120%	mp1	0.1800	10462651	1883277.1	0.0324	109467065947801	58125839	4.28861E+11
	mp2	0.1800	10232211	1841798.0	0.0324	104698148769995	56845619	
	mp3	0.1800	10304321	1854777.8	0.0324	106179031271041	57246228	
140%	mp1	0.2100	12263653	2575367.1	0.0441	150397176728640	58398346	33769792619
	mp2	0.2100	12196786	2561324.9	0.0441	14876180598605	58079932	
	mp3	0.2100	12196837	2561335.8	0.0441	148762840935794	58080178	
Suma		2.2500	131281804	21231489.6	0.3645	1236873289543240	1181601721187	1180724809074

Fuente: Elaboración propia

Con los resultados de la tabla N° 3.9 se graficó la figura 3.7, en la cual se evidencia la linealidad del método, que fue construida con la concentración “x” de ambroxol clorhidrato en mg/ml, versus “y”, en la que las áreas son dependientes de la concentración.

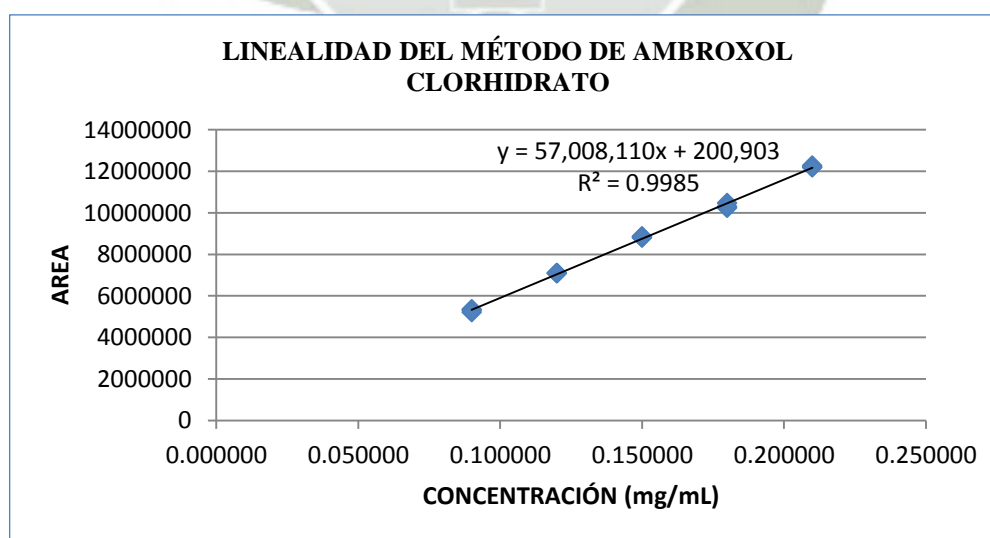


Fig. N° 3. 7: Linealidad del método de Ambroxol clorhidrato

La evaluación estadística de la linealidad del método se realizó de forma semejante a la linealidad del sistema.

Con los datos obtenidos, se elaboró la tabla N° 3.10, donde se resumen los parámetros para la determinación de la linealidad del método.

b. Clenbuterol clorhidrato: Se procedió a preparar soluciones a partir del jarabe comercial a cinco niveles de concentración que cubran el intervalo de trabajo, por volúmenes independientes y por triplicado: 70%, 85%, 100%, 115% y 130% de la concentración nominal de trabajo en rango establecido. Se analizaron por triplicado con un total de 15 determinaciones, según metodología descrita en el ítem 4.3.3.2. del capítulo II. Se construyó la recta de regresión lineal correspondiente a los resultados de los 15 puntos experimentales.

Los resultados obtenidos están plasmados en la tabla N° 3.10.

Tabla N° 3. 10: Resultados de Linealidad del Método de Clenbuterol clorhidrato

Conc. Teórica	M.	mg/mL (x)	Áreas (y)	xy	x ²	y ²	f (factor respuesta)	Varianza
70%	mp1	0.000305	45931	14.0088533	9.3025E-08	2109626140	150592350	8.4347E+11
	mp2	0.000305	46360	14.1398000	9.3025E-08	2149249600	152000000	
	mp3	0.000306	46609	14.2624560	9.3636E-08	2172429954	152318083	
85%	mp1	0.00037	55953	20.7024867	1.369E-07	3130700907	151223423	1.6935E+11
	mp2	0.00037	55660	20.5943233	1.369E-07	3098072707	150433333	
	mp3	0.000369	55582	20.509758	1.3616E-07	3089358724	150628726	
100%	mp1	0.000436	66063	28.803468	1.901E-07	4364319969	151520642	7.2213E+11
	mp2	0.000436	66370	28.9371747	1.901E-07	4404932653	152224006	
	mp3	0.000437	65783	28.7470253	1.9097E-07	4327359234	150532418	
115%	mp1	0.000501	75132	37.640965	2.51E-07	5644767336	149963407	1.5571E+11
	mp2	0.0005	75259	37.6293333	2.50E-07	5663866908	150517333	
	mp3	0.000501	75514	37.832681	2.51E-07	5702414539	150727212	
130%	mp1	0.000571	86484	49.3825543	3.2604E-07	7479539912	151461179	2.9336E+10
	mp2	0.000569	86103	48.992607	3.2376E-07	7413726609	151323374	
	mp3	0.000569	85988	48.9269823	3.2376E-07	7393878819	151120680	
Suma		0.006545	988790	451.110468	0.000003	68144244011	2266586167	1.92E+12

Fuente: Elaboración propia

Con los resultados de la tabla N° 3.10 se graficó la figura 3.8, en la cual se evidencia la linealidad del método, que fue construida con la concentración “x” de clenbuterol clorhidrato en mg/mL, versus el área “y”, en la que las áreas son dependientes de la concentración.

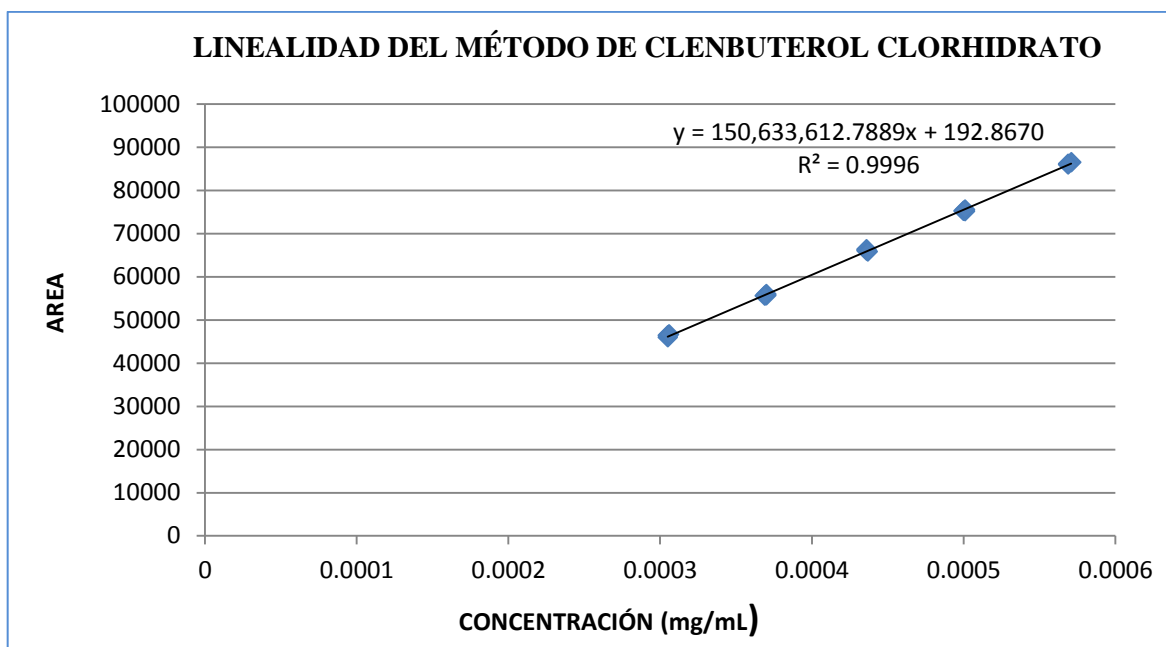


Fig. N° 3. 8: Linealidad del Método de Clenbuterol clorhidrato

La evaluación estadística de la linealidad del método se realizó de forma semejante a la linealidad del sistema.

Con los resultados obtenidos de la linealidad del método de ambroxol clorhidrato y clenbuterol clorhidrato, se elaboró la tabla N° 3.11, donde se resumen los parámetros para la determinación de la linealidad del método.

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos apreciar que el coeficiente de correlación está muy cercano a la unidad por lo que podemos afirmar que existe una buena correlación entre las variaciones de la concentración del analito y su respuesta (áreas), el coeficiente de determinación nos indica que existe una buena predictibilidad de la respuesta a distintas concentraciones del analito.

Tabla N° 3. 11: Parámetros Calculados para la Determinación de la Linealidad Del Método

Parámetros	Resultados	
Ecuación de la Recta	$y = 57008110x + 200903$	$y = 150633612.8x + 192.9$
Coefficiente de correlación (r)	0.9992	0.9998
Coefficiente de Determinación (r^2)	0.9985	0.9996
Test de Linealidad		
Coefficiente de variación de los factores de respuesta (f)	1.2874%	0.4662
Variación del error experimental total (S_{xy}^2)	10090905700	87652.7
Desviación estándar de la pendiente "b" (S_b)	611340.5	819329.7
Límites de confianza de la pendiente "b"	$55687389.0 < b < 58328830.9$	$148863558.5 < b < 152403667.1$
Test estadístico de la pendiente "b" $t_{exp} > t_{tablas}$	$93.25 > 2.16$	$188.85 > 2.16$
Test de Proporcionalidad		
Desviación estándar del intercepto "a" (S_a)	95298.6	365.6
Intervalo de confianza del intercepto "a"	$-4976.3 < a < 406783.7$	$-596.9 < a < 982.7$
Test estadístico del intercepto "a" $t_{exp} < t_{tablas}$	$2.11 < 2.16$	$0.52 < 2.16$
Análisis de Varianza		
Homogeneidad de varianza $G_{exp} < G_{tablas}$	$0.58 < 0.68$	$0.44 < 0.68$

Fuente: Elaboración Propia

Sin embargo, para que estos resultados tengan validez científica, se procedió a realizar el análisis de varianza, donde se calculó también el valor de t_r (test estadístico del coeficiente de correlación r), con $n - 2$ grados de libertad y se comparó con el valor t tabulado para un nivel de confianza de 0.05%. En este caso la hipótesis nula es la concentración entre X e Y. Si el valor observado de t_r es mayor de t de tabla, se rechaza la hipótesis nula, siendo la correlación lineal significativa con la probabilidad calculada.

- Se usó: valor de $t_{tablas} = 2.160$; para $n - 2$ grados de libertad con una $\rho = 0.05$
- t_r es mayor que la tabla.

Todos estos parámetros demuestran la linealidad del sistema y del método empleado para la cuantificación de ambroxol clorhidrato y clenbuterol clorhidrato en un jarabe.

También se aplicó el test de Cochran, donde pudimos observar que la $G_{exp} < G_{tablas}$ lo que significa que las varianzas de las concentraciones son homogéneas, es decir, que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

El test de proporcionalidad también aporta información adicional sobre el sesgo del método lo cual es muy útil a la hora de evaluar su capacidad para ser empleado en el análisis de trazas.

2.3. PRECISION

La precisión se determinó en base a la medida de repetibilidad y precisión intermedia.

2.3.1. REPETIBILIDAD

2.3.1.1. Repetibilidad del Sistema (Precisión Instrumental)

Este parámetro está relacionado al grado de concordancia (grado de dispersión) de una serie de medidas a partir de la misma muestra homogénea. Es decir que podemos obtener mediciones muy precisas pero poco exactas, sin embargo para que un método sea exacto se requiere que sea preciso; lo cual nos asegura que el equipo empleado, cumple con el parámetro en estudio.

En la prueba de precisión instrumental se prepara un estándar de ambroxol clorhidrato cuyos datos se presentan a continuación, según metodología descrita en el capítulo II.

Datos del estándar:

Estándar de referencia		
Nombre :	Ambroxol Clorhidrato	Clenbuterol clorhidrato
Potencia tal cual :	100.54%	99.78 %
Peso (mg) :	30.01	50.00

- La precisión instrumental es una prueba en la cual el estándar (ambroxol clorhidrato y clenbuterol clorhidrato) es inyectado 5 veces y por lo tanto tenemos 5 tiempos de retención (t_r) con sus respectivas áreas, se determinara el promedio y el coeficiente de variación de las áreas y tiempos de retención respectivamente, los resultados obtenidos se plasman en la tabla N° 3.12.

Tabla N° 3. 12: Ensayo de Precisión Instrumental de Ambroxol clorhidrato

N° Inyecciones	Ambroxol clorhidrato		Clenbuterol clorhidrato	
	Áreas	Tiempos de retención	Áreas	Tiempos de retención
1	9153575	2.377	69019	11.00
2	9132724	2.377	70148	11.00
3	9110738	2.373	70350	11.00
4	9102893	2.373	70413	11.00
5	9103266	2.373	69019	11.00
6	9120639	2.375	69790	11.00
Promedio	9120639	2.375	69789	11.00
RSD (CV)	0.22	0.08	0.91	0.00

Fuente: Elaboración propia

En la tabla N° 3.12, se muestra el parámetro de repetibilidad del sistema (precisión instrumental), se debe realizar antes de iniciar el estudio de otros parámetros de validación, dado que así se conoce que el grado de respuesta del método es únicamente proporcionada por el analito. Para los dos casos el coeficiente de variación de los promedios de área y tiempo de retención son inferiores al $CV \leq 2\%$ teórico máximo por lo tanto la precisión del sistema (instrumental) es adecuado para ambos sistemas.

2.3.1.2. Repetibilidad Del Método

Estudia la variabilidad del método efectuado el análisis sobre la muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos, etc.), en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto. Es decir, evalúa la precisión del método (precisión intraensayo).

- En la prueba de repetibilidad del método se prepara un estándar de ambroxol clorhidrato y otro para clenbuterol clorhidrato, cuyos datos se presentan a continuación.

Estándar de referencia		
Nombre:	Ambroxol clorhidrato	Clenbuterol clorhidrato
Código:	SSTD-27-01-13	SSTD-64-01-13
Pot. tal cual :	100.54%	99.78 %
Peso (mg) :	30.02	50.00

- Las muestras en la prueba de repetibilidad del método se preparan con el jarabe que contiene ambroxol clorhidrato y ambroxol clorhidrato, es decir del producto terminado se preparan 6 muestras.

Después de haber realizado la preparación del estándar y muestras, fueron inyectadas al equipo obteniéndose como respuesta las respectivas áreas las cuales se detallan en la tabla N° 3.13 y 3.15.

Tabla N° 3. 13: Tabla Resumen de las Áreas Obtenidas tanto para el Estándar como para las Muestras en la Repetibilidad del Método de Ambroxol clorhidrato

	N° de Inyecciones	Área del Estándar (ASt)	
ESTANDAR	1	8440116	Promedio
	2	8548755	8467514
	3	8624120	CV
	4	8387584	1.18
	5	8364394	
	6	8440116	
		Área de la Muestra (AM)	
MUESTRAS	Muestra 1	8506955	Promedio
	Muestra 2	8456994	8523815.2
	Muestra 3	8511402	CV
	Muestra 4	8655457	0.80
	Muestra 5	8514216	
	Muestra 6	8497867	

Fuente: Elaboración propia

En la tabla N° 3.13 observamos las áreas del estándar y las áreas de las muestras, a partir de esto podemos determinar el contenido de ambroxol clorhidrato (mg/5mL) en cada muestra (jarabe), usando la fórmula 2.1, y cuyos resultados se evidencian en la tabla N° 3.14.

Tabla N° 3. 14: Variabilidad de la Concentración Promedio para el Ensayo de Precisión – Repetibilidad de Ambroxol clorhidrato Jarabe

Muestra N°	Volumen de Muestra (mL)	mg/5mL hallados	%
1	5	7.5758	100.01
2	5	7.5313	100.42
3	5	7.5797	101.06
4	5	7.7080	102.77
5	5	7.5822	101.10
6	5	7.5677	100.91
Promedio		7.5908	101.05
CV%		0.80	0.06
Desviación estándar		0.06	0.06

Fuente: Elaboración propia

La precisión evaluada como repetibilidad para ambroxol clorhidrato, mostró resultados satisfactorios, pues el coeficiente de variación (CV) determinado fue de 0.06%, el cual indica que el conjunto de datos en relación a su media, se encuentran con un grado de 0.06% de dispersión. Según la AEFI recomienda introducir los intervalos de confianza en el estudio de precisión – repetibilidad. Se obtuvo el intervalo de confianza de la media de 7.53 – 7.65; siendo nuestro resultado conforme por encontrarse dentro de la especificación.

Intervalo de confianza promedio: Se expresa de la siguiente manera:

$$\bar{x} \pm \frac{t_{\text{tabla}} \cdot S}{\sqrt{n}} \quad (\text{Ec. 3. 11})$$

Donde:

\bar{x} = promedio del resultado de los ensayos

t_{tabla} = Es el valor obtenido en la tabla de distribución de student para n – 1 grados de libertad y una probabilidad de cometer error (ρ) de 0.05, es decir un grado de confianza del 95%.

n = número de muestras

s = desviación estándar

Que para el presente método (ambroxol clorhidrato) de acuerdo a la tabla N° 3.14

$$\bar{x} = 7.59$$

$$S = 0.06$$

$$n = 6$$

$$t_{\text{tabla}} = 2.57 \text{ a un nivel de confianza del } 95\%$$

REEMPLAZANDO

$$\text{Intervalo de Confianza Promedio} = 7.59 \pm \frac{2.57 \times 0.06}{\sqrt{6}}$$

$$\text{Intervalo de Confianza Promedio} = 7.59 \pm 0.06 (7.53 - 7.65)$$

Tabla N° 3. 15: Tabla Resumen de las Áreas Obtenidas tanto Para el Estándar como para las Muestras en la Repetibilidad del Método de Clenbuterol clorhidrato

	N° de Inyecciones	Área del Estándar (ASt)	
ESTANDAR	1	69019	Promedio
	2	70148	69790
	3	70350	CV
	4	70413	1.01794
	5	69019	
	6	69019	
		Área de la Muestra (AM)	
MUESTRAS	Muestra 1	73039	Promedio
	Muestra 2	74142	72897
	Muestra 3	73067	CV
	Muestra 4	73046	1.38
	Muestra 5	73031	
	Muestra 6	71056	

Fuente: Elaboración propia

En la tabla N° 3.15 observamos las áreas del estándar y las áreas de las muestras, a partir de esto podemos determinar el contenido de clenbuterol clorhidrato (mg/5mL) en cada muestra (jarabe), usando la fórmula 2.2, y cuyos resultados se evidencian en la tabla N° 3.16.

Tabla N° 3. 16: Variabilidad de la Concentración Promedio para el Ensayo de Precisión – Repetibilidad de Clenbuterol clorhidrato Jarabe

Muestra N°	Volumen de Muestra (mL)	mg/5mL hallados	%
1	5	0.0052	104
2	5	0.0053	106
3	5	0.0052	104
4	5	0.0052	104
5	5	0.0052	104
6	5	0.0051	102
Promedio		0.0052	104
CV%		1.22	1.22
Desviación estándar		0.00006	1.26

Fuente: Elaboración propia

La precisión evaluada como repetibilidad para clenbuterol clorhidrato, mostró resultados satisfactorios, pues el coeficiente de variación (CV) determinado fue de 1.22%, el cual indica que el conjunto de datos en relación a su media, se encuentran con un grado de 1.22% de dispersión. Según la AEFI recomienda introducir los intervalos de confianza en el estudio de precisión – repetibilidad. Se obtuvo el intervalo de confianza de la media de $0.0051 - 0.0053$; siendo nuestro resultado conforme por encontrarse dentro de la especificación. El análisis estadístico de los resultados para la evaluación de la repetibilidad de la metodología analítica del ambroxol clorhidrato y clenbuterol clorhidrato, demostró que ambos métodos son precisos. Para ambos casos, se evaluó el límite de confianza promedio, el cual nos permitió determinar la máxima variabilidad en la respuesta de las muestras consideradas idénticas.

2.3.2. Precisión Intermedia

Evalúa la precisión frente a variaciones del analista, equipo y día (precisión intralaboratorio).

a. Ambroxol clorhidrato: En la prueba de precisión intermedia el analista A y el analista B preparan un estándar de ambroxol clorhidrato y 6 muestras. Después de haber realizado la preparación del estándar y muestras en diferentes días estas fueron inyectadas en equipos diferentes, obteniéndose como respuestas las respectivas áreas para el estándar y muestras las cuales se detallan en la tabla N° 3.17.

Tabla N° 3. 17: Áreas del Estándar y Muestras Obtenidos por el Analista A y por el Analista B, en diferentes equipos y días para Ambroxol clorhidrato

ANALISTA A				ANALISTA B			
ESTANDAR	N° de inyecciones		Áreas	ESTANDAR	N° de inyecciones		Áreas
	1		8440116		1		8248859
	2		8548755		2		8387988
	3		8624120		3		8477793
	4		8387584		4		8249698
	5		8364394		5		8191152
	Promedio		8472994		Promedio		8311098
	CV%		1.3029		CV%		1.4202
MUESTRAS	Mtra. N°	mg/5mL hallados	Áreas	MUESTRAS	Mtra. N°	mg/5mL hallados	Áreas
	1	7.5758	8506955		1	7.5562	8484978
	2	7.5313	8456994		2	7.5154	8439129
	3	7.5797	8511402		3	7.7094	8657011
	4	7.7080	8655457		4	7.8524	8817610
	5	7.5822	8514216		5	7.5929	8526181
	6	7.5677	8497867		6	7.5526	8480881

Fuente: Elaboración propia

En la tabla N° 3.18 se muestra el contenido de ambroxol clorhidrato en el jarabe expresado en porcentaje, obtenidos tanto por el analista A y por el analista B, determinando el coeficiente de variación entre ellos.

Tabla N° 3. 18: Parámetros de Precisión Intermedia de Valoración de Ambroxol Clorhidrato Jarabe Realizado Por Dos Analistas, Análisis T – Pareado

N°	Analista A (Cantidad en %)	Analista B (Cantidad en %)	Diferencia (d)
1	101.01	100.75	0.26
2	100.42	100.21	0.21
3	101.06	102.79	-1.73
4	102.77	104.70	-1.93
5	101.10	101.24	-0.14
6	100.90	100.70	0.20
Promedio	101.21	101.73	-0.52
S	0.81	1.70	1.02
CV	0.80	1.68	
	1.24 %		

Fuente: Elaboración propia

Como se puede observar en la tabla N° 3.18 se muestran los resultados de la precisión intermedia, se observa el coeficiente de variación total (1.24 %) es menor del 3 % como criterio de aceptación en precisión intermedia. Además se comprobó que no existen diferencias significativas desde un punto de vista estadístico (análisis T-Pareado) entre los resultados obtenidos para ambos analistas. Con esto se comprobó el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones establecidas en la técnica analítica aplicada.

El mejor test para establecer si hay diferencia significativa en los resultados obtenidos por el analista A y por el analista B es un TEST T - PAREADO.

Se realiza estableciendo una comparación entre “ t_{exp} ” y “ t_{tabla} ”

El análisis estadístico de T-pareado, se basó en dos hipótesis detalladas a continuación:

HIPOTESIS NULA (H_0): No hay diferencia entre los resultados obtenidos por el analista A y el analista B.

HIPOTESIS ALTERNATIVA (H_1): Si hay diferencia entre los resultados obtenidos por el analista A y el analista B.

Se determina el valor de $t_{experimental}$ hallado con la siguiente formula:

$$t : \frac{\bar{d} \cdot \sqrt{n}}{S} = \frac{-0.52 * 2.45}{1.02} = -1.25$$

RESULTADO:

t tabla: 2.57 Para 6 – 1= 5 grados de libertad y (α : 0.05)

t exp = -1.25

t exp < t tabla entonces se acepta la hipótesis nula (H_0) es decir no existe diferencias significativas entre los resultados obtenidos por el analista A y el analista B.

b. Clenbuterol clorhidrato: En la prueba de precisión intermedia el analista A y el analista B preparan un estándar de clenbuterol clorhidrato y 6 muestras. Después de haber realizado la preparación del estándar y muestras en diferentes días estas fueron inyectadas en equipos diferentes,

obteniéndose las respectivas áreas del estándar y muestras, las cuales se detallan en la tabla N° 3.19.

En la tabla 3.19 observamos las áreas del estándar y las áreas de las muestras del analista A y del analista B, a partir de esto podemos determinar el contenido de clenbuterol clorhidrato en mg/5mL, cuyos resultados se evidencian también en esta tabla y cuyo valor porcentual se evidencia en la tabla N° 3.20.

En la tabla N° 3.20, se expresa el contenido de clenbuterol clorhidrato en el jarabe en porcentaje, con ellos calculamos el coeficiente de variación entre ambos analistas.

Tabla N° 3. 19: Áreas del Estándar y Muestras Obtenidos por el Analista A y por el Analista B, en diferentes equipos y días para Clenbuterol clorhidrato

ANALISTA A			ANALISTA B						
ESTANDAR	N° de inyecciones		Áreas		ESTANDAR	N° de inyecciones		Áreas	
	1		69019			1		70093	
	2		70148			2		70813	
	3		70350			3		70056	
	4		70413			4		70567	
	5		69019			5		70658	
	Promedio		69542			Promedio		70872	
	CV%		69749			CV%		70510	
MUESTRAS	Mtra. N°	mg/5mL hallados	Áreas		MUESTRAS	Mtra. N°	mg/5mL hallados	Áreas	
	1	0.0052	73039			1	0.0052	73049	
	2	0.0053	74142			2	0.0052	73517	
	3	0.0052	73067			3	0.0052	72471	
	4	0.0052	73046			4	0.0052	73014	
	5	0.0052	73031			5	0.0052	72653	
	6	0.0051	71056			6	0.0052	73538	

Fuente: Elaboración propia

Tabla N° 3. 20: Parámetros de Precisión Intermedia de Valoracion de Clenbuterol clorhidrato Jarabe realizado por dos Analistas, Análisis T – Pareado

N°	Analista A Cantidad en %	Analista B Cantidad en %	Diferencia (d)
1	104	104	0
2	106	104	2
3	104	104	0
4	104	104	0
5	104	104	0
6	102	104	-2
Promedio	104	104	0
S	1.265	0	1.26
CV	1.216%	0 %	
	0.61 %		

Fuente: Elaboración propia

En tabla N° 3.20 se muestran los resultados de la precisión intermedia, el coeficiente de variación total (0.61 %) es menor del 3 % como criterio de aceptación en precisión intermedia. Además se comprobó que no existen diferencias significativas desde un punto de vista estadístico (análisis T – Pareado) entre los resultados obtenidos para ambos analistas. Con esto se comprobó el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones establecidas en la técnica analítica aplicada. Calculamos el test de T – Pareado de manera semejante al calculado para ambroxol clorhidrato y obtenemos el siguiente resultado: de $t_{exp} = 0$

$t_{exp} < t_{tabla}$ entonces se acepta la hipótesis nula (H_0) es decir no existe diferencias significativas entre los resultados obtenidos por el analista A y el analista B.

2.4. EXACTITUD

En la prueba de exactitud se trabaja con 3 niveles de concentración y cada nivel se analiza por triplicado determinado el porcentaje de recuperación para cada nivel de concentración. Se preparó un estándar de Ambroxol clorhidrato y un estándar de Clenbuterol clorhidrato, cuyos datos se presentan en la tabla N° 3.21.

Tabla N° 3. 21: Datos y Áreas de los Estándares de Ambroxol clorhidrato y Clenbuterol clorhidrato

Datos del Estándar		Áreas Obtenidas		
Ambroxol Clorhidrato			Ambroxol Clorhidrato	Clenbuterol Clorhidrato
Pot. tal cual :	100.54%	N° de Inyección	Áreas	Áreas
Peso (mg) :	30.00	1	9813715	70813
		2	9841488	70093
		3	9833954	70101
		4	9798626	70941
		5	9851426	70254
		6	9827844	70145
		Promedio	9827842	70391
		RSD	0.2180	0.54385
Clenbuterol Clorhidrato				
Pot. tal cual :	99.78%			
Peso (mg) :	50.02			

Fuente: Elaboración propia

- a. **Ambroxol clorhidrato:** Para el estudio de la exactitud del método se preparó concentraciones conocidas de estándar y se mezcló con el placebo, para poder hallar los mg de analito prácticos y así calcular el porcentaje de recuperación, también se determinó la varianza para realizar la prueba de homogeneidad, como se puede observar en la tabla N° 3.22.

Tabla N° 3. 22: Determinación de la Exactitud del Método para Ambroxol clorhidrato

Porcentaje de Analito Teórico	mg de Analito Añadido	Áreas	mg de Analito Hallado	Porcentaje de Recuperación (%R)	Varianza
Exactitud 70 %	21.03	27441992	20.9420	99.5817	0.148498
	21.02	27609970	21.0702	100.2389	
	21.02	27615481	21.0744	100.2589	
Exactitud 100 %	30.01	39763781	30.3453	101.1171	0.326602
	30.01	39327707	30.0125	100.0082	
	30.01	39451414	30.1069	100.3228	
Exactitud 130 %	39.02	50661788	38.6620	99.0825	0.374157
	39.02	50977252	38.9027	99.6994	
	39.01	50338719	38.4155	98.4760	
Promedio				99.8651	
Desviación Estándar (S)				0.7699	
Coefficiente De Variación				0.7709	

Fuente: Elaboración Propia

Con los datos hallados se calculó la desviación estándar relativa (coeficiente de variación), la cual fue de 0.77 %, este valor es inferior a la DSR teórica límite establecida por la USP.

Se calculó el porcentaje de recuperación de acuerdo al analito mezclado con el placebo y se usó la prueba de t de Student para realizar la comparación, obteniendo los siguientes datos:

$$t_{\text{exp}} : 1.375$$

$$t_{\text{tablas}} : 2.31 \text{ para } (n - 1) \text{ grados de libertad y } \rho = 0.05$$

Al ser $t_{\text{exp}} < t_{\text{tablas}}$ no existe diferencia significativa entre la recuperación media (R_{prom}) y el 100 %, confirmando la buena exactitud del método.

También se realizó la prueba de homogeneidad de la varianza.

$$G_{\text{exp}} : 0.441$$

$$G_{\text{tabla}} : 0.8709$$

$$G_{\text{tabla}} (\alpha = 0.05; k = 3; n = 3)$$

Donde:

K = número de grupos n = número de términos por grupo

Al ser $G_{\text{exp}} < G_{\text{tablas}}$ significa que las varianzas de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes, es decir, que el factor concentración no influye en la variable de los resultados.

De la tabla N° 3.22 se puede evidenciar que el valor del porcentaje promedio del analito recuperado (ambroxol clorhidrato) fue de 99.86 % calculado a partir de los porcentajes de recuperación obtenidos para cada nivel de concentración, este valor obtenido está dentro de los límites de las especificaciones (97.0% - 103.0%) y tiene un CV menor de 2% (0.77%), por lo que la exactitud es correcta según sus respectivos criterios de aceptación.

Este resultado nos condujo a considerar que los errores sistemáticos del método no fueron significativos, por lo que puede considerarse exacto.

b. Clenbuterol clorhidrato: Para el estudio de la exactitud del método se preparó concentraciones conocidas de estándar y se mezcló con el placebo, para poder hallar los mg de analito prácticos y así calcular el porcentaje de recuperación, también se determinó la varianza para realizar la prueba de homogeneidad, como se puede observar en la tabla N° 3.23.

Con los datos hallados se calculó la desviación estándar relativa (coeficiente de variación), la cual fue de 0.203 %, este valor es inferior a la DSR teórica límite establecida por la USP. Se calculó el porcentaje de recuperación de acuerdo al analito mezclado con el placebo y se usó la prueba de t de Student para realizar la comparación, obteniendo los siguientes datos:

Tabla N° 3. 23: Determinación de la Exactitud del Método para Clenbuterol clorhidrato

Porcentaje de Analito Teórico	mg de Analito Añadido	Áreas	mg de Analito Hallado	Porcentaje de Recuperación (%R)	Varianza
Exactitud 70 %	35.03	49387	35.0172	99.9635	0.0320409
	35.02	49210	34.8917	99.6337	
	35.02	49351	34.9917	99.9192	
Exactitud 100 %	50.05	70595	50.0545	100.0090	0.004667
	50.07	70589	50.0502	99.9605	
	50.05	70656	50.0977	100.0954	
Exactitud 130 %	65.02	91415	64.8166	99.6872	0.0691857
	65.03	91748	65.0527	100.0350	
	65.03	91275	64.7174	99.5193	
Promedio (R_{prom})				99.8692	
Desviación Estándar (S)				0.203	
Coefficiente De Variación				0.203	

Fuente: Elaboración propia

Con los datos hallados se calculó la desviación estándar relativa (coeficiente de variación), la cual fue de 0.203 %, este valor es inferior a la DSR teórica límite establecida por la USP.

Los cálculos estadísticos se realizaron de manera semejante al realizado para ambroxol clorhidrato:
t de Student:

$$t_{exp} : 1.932832$$

$$t_{tablas} : 2.31 \text{ para } (n - 1) \text{ grados de libertad y } \rho = 0.05$$

Al ser $t_{exp} < t_{tablas}$ no existe diferencia significativa entre la recuperación media (R_{prom}) y el 100 %, confirmando la buena exactitud del método.

También se realizó la prueba de homogeneidad de la varianza.

$G_{exp} : 0.653$

$G_{tabla} : 0.8709$

$G_{tabla} (\alpha = 0.05; k = 3; n = 3)$

Al ser $G_{exp} < G_{tablas}$; significa que las varianzas de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes, es decir, que el factor concentración no influye en la variable de los resultados.

De la tabla N° 3.23 se puede evidenciar que el valor del porcentaje promedio del analito recuperado (clenbuterol clorhidrato) fue de 99.87 % calculado a partir de los porcentajes de recuperación obtenidos para cada nivel de concentración, este valor obtenido está dentro de los límites de las especificaciones (97.0% - 103.0%) y tiene un CV menor de 2% (0.203 %), por lo que la exactitud es correcta según sus respectivos criterios de aceptación.

Este resultado nos condujo a considerar que los errores sistemáticos del método no fueron significativos, por lo que puede considerarse exacto.

2.5. ROBUSTEZ

La robustez de un método analítico indica el grado de confiabilidad del ensayo para permanecer inalterado ante pequeñas variaciones.

a. Ambroxol clorhidrato: Se realizó la prueba de robustez según los factores modificados mostrados en la tabla N° 3.24.

Las diferentes muestras analizadas cumplen con el criterio de aceptación de alteración (< 2 %). Por lo que el método cumple con el parámetro de robustez.

b. Clenbuterol clorhidrato: Se realizó la prueba de robustez según los factores modificados mostrados en la tabla N° 3.25.

Las diferentes muestras analizadas cumplen con el criterio de aceptación de alteración (< 2 %). Por lo que el método cumple con el parámetro de robustez.

Tabla N° 3. 24: Resultados de la Pruebas de Robustez para Ambroxol clorhidrato

Muestra	Factores Modificados	Condiciones	Áreas	Tiempo de Retención	Conc. mg/5mL	% Alteración	
Muestra 100%	-	Muestra	9522733	2.72	7.6079	100	-
	Volumen de inyección	10µl a 5µl	4145927	3.08	7.4118	97.42	2.58
	Temperatura de la Columna	25 °C a 30 °C	8349469	3.07	7.4185	97.51	2.49
	Variando tamaño de columna	Kinetex C18 100mmx4.6mmx2.6µm a Zorbax Eclipse XDB – C18 150mmx4.6mmx5.0µm	97177482	4.32	7.6779	100.92	0.92
	Variando marca y tamaño de columna	Kinetex C18 100mmx4.6mmx2.6µm a LiChospher RP 18 125mmx 4mmx5µm	9612429	3.5	7.7225	101.51	1.51
	variando pH buffer	pH= 7.0 ±0.1 a 7.2±0.1	9493477	3.39	7.6864	101.03	1.03
	Flujo	1.0 mL/min a 0.5 mL/min	16596044	6.18	7.6222	100.19	0.19
	Variando proporción de Fase Móvil	40:60 a 60:40	9681874	3.1500	7.7542	101.92	1.92
Estándar 100%	-	Muestra	9444633	2.74	Coefficiente de variación CV % 1.71953715		
	Volumen de inyección	10µl a 5µl	4220711	3.1000			
	Temperatura de la Columna	25° C a 30° C	8492425	3.07			
	Variando tamaño de columna	Kinetex C18 100mmx4.6mmx2.6µm a Zorbax Eclipse XDB-C18 150mmx 4,6mmx5µm	9549931	4.32			
	Variando marca y tamaño de columna	Kinetex C18 100mmx4.6mmx2.6µm a LiChospher RP 18 125mmx 4mmx5µm	9392146	3.5			
	variando pH buffer	pH= 7.0 ±0.1 a 7.2±0.1	9319471	3.39			
	Flujo	1.0 mL/min a 0.5 mL/min	16429034	6.18			
	Variando proporción de Fase Móvil	40:60 a 60:40	9421342	3.12			

Fuente: Elaboración Propia

Tabla N° 3. 25: Resultados de la Pruebas de Robustez para Clenbuterol clorhidrato

Muestra	Factores Modificados	Condiciones	Areas	Tiempo De Retención	Conc. mg/5mL	% Alteración	
Muestra 100%	-	Muestra	73056	12.61	0.0052	100	100
	Temperatura de trabajo	40°C a 25 °C	73028	12.61	0.0051	98.08	1.92
	Variando marca y tamaño de columna	Purospher RP-8e 75 mmx4.6mmx3.0µm a Zorbax Eclipse XDB-C8 75mmx 4.6mmx3.5µm	73047	12.69	0.0053	101.92	1.92
Estándar 100%	-	Muestra	70505	12.58	1.923076923	Coefficiente de variación CV %	
	Temperatura de la Columna	40°C a 25 °C	70045	12.54			
	Variando marca y tamaño de columna	Purospher RP-8e 75 mmx4.6mmx3.0µm a Zorbax Eclipse XDB-C8 75mmx 4.6mmx3.5µm	70345	12.60			

Fuente: Elaboración propia

2.6. RANGO

Tabla N° 3. 26: Rango del Método de Ambroxol clorhidrato y Clenbuterol Clorhidrato

PARAMETROS		RANGO	RESULTADO
Linealidad del Sistema		70 % - 130 %	CUMPLE
Linealidad del Método		70 % - 130 %	CUMPLE
Exactitud		70 % - 130 %	CUMPLE
Precisión	Repetibilidad	100 %	CUMPLE
	Precisión Intermedia	100 %	CUMPLE
RESULTADO		70 % - 130 %	

Fuente: Elaboración propia

2.7. RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE PARAMETROS DE VALIDACIÓN

En la tabla N° 3.27 se encuentra el resumen de los resultados de los parámetros de validación los cuales se han trabajado de acuerdo a las recomendaciones de la farmacopea americana (USP) y de la ICH;

Tabla N° 3. 27: Resumen de Resultados de los Parámetros de Validación, según la USP y la ICH

PARÁMETROS	LÍMITES	RESULTADOS	
		AMBROXOL CLORHIDRATO	CLENBUTEROL CLORHIDRATO
1. APTITUD DEL SISTEMA Tiempo de retención (rt) Factor de asimetría (T) Factor de Capacidad Coeficiente de variación (%RSD)	rt < 1 % 0.8 < T < 1.5 > 1 RSD < 2 %	0.44 1.58 2.09 1.215	0.033 1.128 21.001 1.018
2. SELECTIVIDAD 2.1. INTERFERENCIA DEL MÉTODO Porcentaje de interferencia en relación con el estándar de referencia • Placebo • Diluyente • Fase móvil	Interferencia < 2 % Interferencia < 2 % Interferencia < 2 %	0% 0% 0%	0% 0% 0%
2.2 DEGRADACIÓN FORZADA DE LA MUESTRA • Según método • Estresamiento térmico • Estresamiento alcalino • Estresamiento Ácido • Estresamiento oxidativo • Estresamiento luz UV	% degradacion (informativo) Sustancia de interferencia (i)	- -0.31 / Ninguna 3.45 / Ninguna 8.03 / Ninguna 1.78 / Ninguna 0.18 / Ninguna	- 3.85 / Ninguna 3.85 / Ninguna 1.92 / Ninguna 7.69 / Ninguna 1.92 / Ninguna
3. PRECISIÓN 3.1 REPETIBILIDAD DEL SISTEMA: Promedio de áreas (\bar{X}) Coeficiente de variación de áreas. Promedio de tiempo de retención (\bar{X}) Coeficiente de variación de tiempos	\bar{X} RSD < 2 % \bar{X} RSD < 1 %	9120639 0.22% 2.375 0.08%	69789 0.91% 11.0 0%
3.2 REPETIBILIDAD DEL MÉTODO Promedio (\bar{X}) Desviación estándar (s) Coeficiente de variación (%RSD)	\bar{X} s RSD < 2%	8523815.2 67821.0 0.80	72897 1002.85 1.38%

PARÁMETROS	LÍMITES	RESULTADOS	
		AMBROXOL CLORHIDRATO	CLENBUTEROL CLORHIDRATO
3.3 PRECISIÓN INTERMEDIA PRECISIÓN INTERMEDIA ANALISTA A Promedio (\bar{X}) Coeficiente de variación (% RSD)	\bar{X} RSD < 2%	101.21% 0.80%	104.0% 1.22%
PRECISIÓN INTERMEDIA ANALISTA B Promedio (\bar{X}) Coeficiente de variación (% RSD)	\bar{X} RSD < 2%	101.73% 1.68%	104.0% 0.0%
PRECISIÓN INTERMEDIA GLOBAL Coeficiente de variación global (% RSD)	RSD < 3 %	1.24%	0.61%
4. LINEALIDAD DEL SISTEMA Ecuación de la recta Coeficiente de correlación (r) Coeficiente de determinación (r^2) Test de linealidad Coeficiente de variación de los factores de respuesta (f) Variación del error experimental total Desviación estándar de la pendiente Test estadístico de la pendiente	$y = bx + a$ $r > 0.997$ $r^2 > 0.995$ RSD < 5 % S^2_{xy} Sb $t_{exp} > t_{tabla}$	$y = 6E+07x - 62397$ 0.9998 0.9996 0.3918 1463332112 310288.9338 192.13 > 2.16	$y = 1.4E+8x + 993.54$ 0.9996 0.9991 0.6961 236389.6019 1183028.138 121.81 > 2.16
Test de Proporcionalidad Desviación estándar del intercepto Test estadístico del intercepto "a" $t_{exp} < t_{tablas}$ Análisis de Varianza Homogeneidad de varianza	Sa $t_{exp} < t_{tabla}$ $G_{exp} < G_{tablas}$	47607.1244 -1.31 < 2.16 0.34 < 0.68	605.074 1.64 < 2.16 0.30 < 0.68

PARÁMETROS	LÍMITES	RESULTADOS	
		AMBROXOL CLORHIDRATO	CLENBUTEROL CLORHIDRATO
5. LINEALIDAD DEL MÉTODO Ecuación de la recta Coeficiente de correlación (r) Coeficiente de determinación (r ²) Test de linealidad Coeficiente de variación de los factores de respuesta (f) Variación del error experimental total D.S. de la pendiente (b) Prueba de T-Student de la pendiente (b) Test de Proporcionalidad Desviación estándar del intercepto "a" (S _a) Test estadístico del intercepto "a" t _{exp} < t _{tablas} Análisis de Varianza Homogeneidad de varianzas 6. EXACTITUD DEL MÉTODO Porcentaje de recuperación total (%) Prueba de homogeneidad de varianzas Prueba de "t" de student 7. RANGO O INTERVALO En linealidad En precisión En exactitud 8. ROBUSTEZ <ul style="list-style-type: none"> Muestra Modificando la temperatura Modificando el volumen de inyección Modificando el pH de la fase Móvil. Modificando el tamaño de la columna Coeficiente de variación global (%) 	$y = bx + a$ $r > 0.997$ $r^2 > 0.995$ $RSD < 5\%$ S^2_{xy} S_b $t_{exp} > t_{tablas}$ S_a $t_{exp} < t_{tablas}$ $G_{exp} < G_{tablas}$ 97 % - 103% $G_{exp} < G_{tablas}$ $t_{exp} < t_{tablas}$ (70% - 130%) 100% (70% - 130%) No hay cambios en la variable concentración % RSD < 2 %	$y = 57008110x + 200903$ 0.9992 0.9985 1.2874% 10090905700 611340.5 93.25 > 2.16 95298.6 2.11 < 2.16 0.58 < 0.68 99.8651 0.441 1.375 Conforme Conforme Conforme 7.6079 7.4185 7.4118 7.6864 7.6779 1.72%	$y = 150633612.8x + 192.9$ 0.9998 0.9996 0.4662% 87652.7 819329.7 188.85 > 2.16 365.6 0.52 < 2.16 0.44 < 0.68 99.8692 0.653 1.932 Conforme Conforme Conforme 0.0052 0.0051 - - 0.0053 1.92

3. CALCULO DE LA INCERTIDUMBRE

3.1. EVALUACIÓN TIPO A DE LA INCERTIDUMBRE

La evaluación Tipo A de la incertidumbre se relaciona con fuentes de error aleatorios, y pueden ser evaluadas a partir de distribuciones estadísticas de resultados que pueden ser caracterizadas a partir de desviaciones estándar.

Se procedió a analizar la muestra de jarabe conteniendo ambroxol clorhidrato y clenbuterol clorhidrato, se realizó 5 análisis con cinco repeticiones en dos equipos y días diferentes. Los resultados obtenidos se plasman en las tablas N° 3.27.

Tabla N° 3. 28: Resultados Obtenidos en Diferentes Días y en Diferentes Equipos para Ambroxol clorhidrato (Amb. HCl) y Clenbuterol clorhidrato (Clen. HCl)

Día	Equipo1	Equipo 2	% Recup. (Amb. HCl)	RSD (Amb. HCl)	% Recup. (Clen. HCl)	RSD (Clen. HCl)
1	HITACHI – LaChrom Elite	-	98.8	1.59	98.74	1.13
2	HITACHI – LaChrom Elite	-	99.0	1.21	100.41	1.56
3	HITACHI – LaChrom Elite	-	99.4	1.13	100.61	0.98
4	HITACHI – LaChrom Elite	-	100.1	1.87	99.43	1.37
5	HITACHI – LaChrom Elite	-	100.7	1.91	99.69	1.84
6	-	HITACHI - Chromaster	101.1	0.54	100.13	0.74
7	-	HITACHI - Chromaster	99.8	0.85	100.56	0.35
8	-	HITACHI - Chromaster	99.3	0.96	101.35	0.44
9	-	HITACHI - Chromaster	100.4	0.37	99.74	0.26
10	-	HITACHI - Chromaster	99.5	0.75	99.81	0.30
Promedio equipo 1			99.6	1.542	99.6	1.376
Promedio equipo 2			100.02	0.694	100.02	0.42
Promedio final			99.81	1.118	99.81	0.8976

Fuente: Elaboración propia

- Ambroxol clorhidrato:

$$u = \frac{RSD_{promedio}}{\sqrt{n}} \rightarrow u = \frac{1.118}{\sqrt{10}} \rightarrow u = 0.3535$$

- Clenbuterol clorhidrato:

$$u = \frac{RSD_{promedio}}{\sqrt{n}} \rightarrow u = \frac{0.8976}{\sqrt{10}} \rightarrow u = 0.2838$$

3.2. EVALUACIÓN TIPO B DE LA INCERTIDUMBRE

3.2.1. Ambroxol Clorhidrato

a) Definición del Mensurando

Se efectúa la preparación del estándar de ambroxol clorhidrato para cuantificación por HPLC a partir de un estándar de referencia secundario, según los pasos detallados en la figura 3.9.

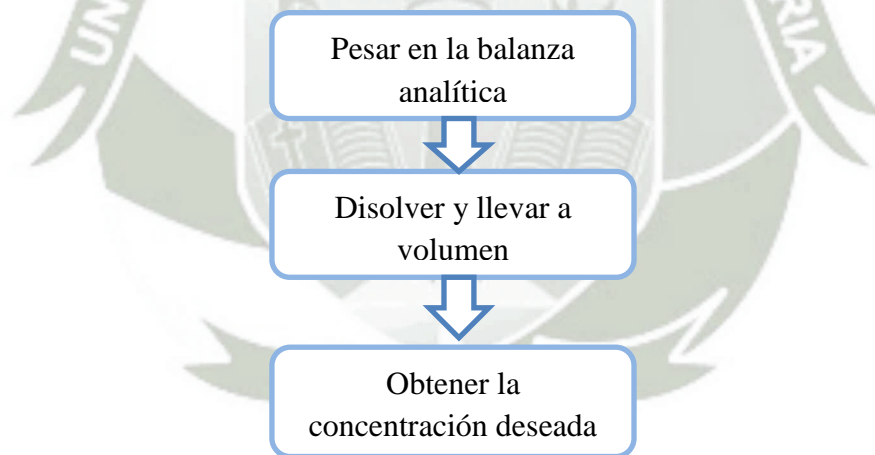


Fig. N° 3. 9: Preparación del Estándar de Ambroxol Clorhidrato

b) Identificación De Las Fuentes De Incertidumbre

Para proceder al cálculo de incertidumbre Tipo B, realizamos una lista completa de las fuentes relevantes de incertidumbre. Para visualizarlo de forma clara realizamos un diagrama de causa – efecto de Ishikawa o espina de pescado como el presentado en la figura N° 3.10.

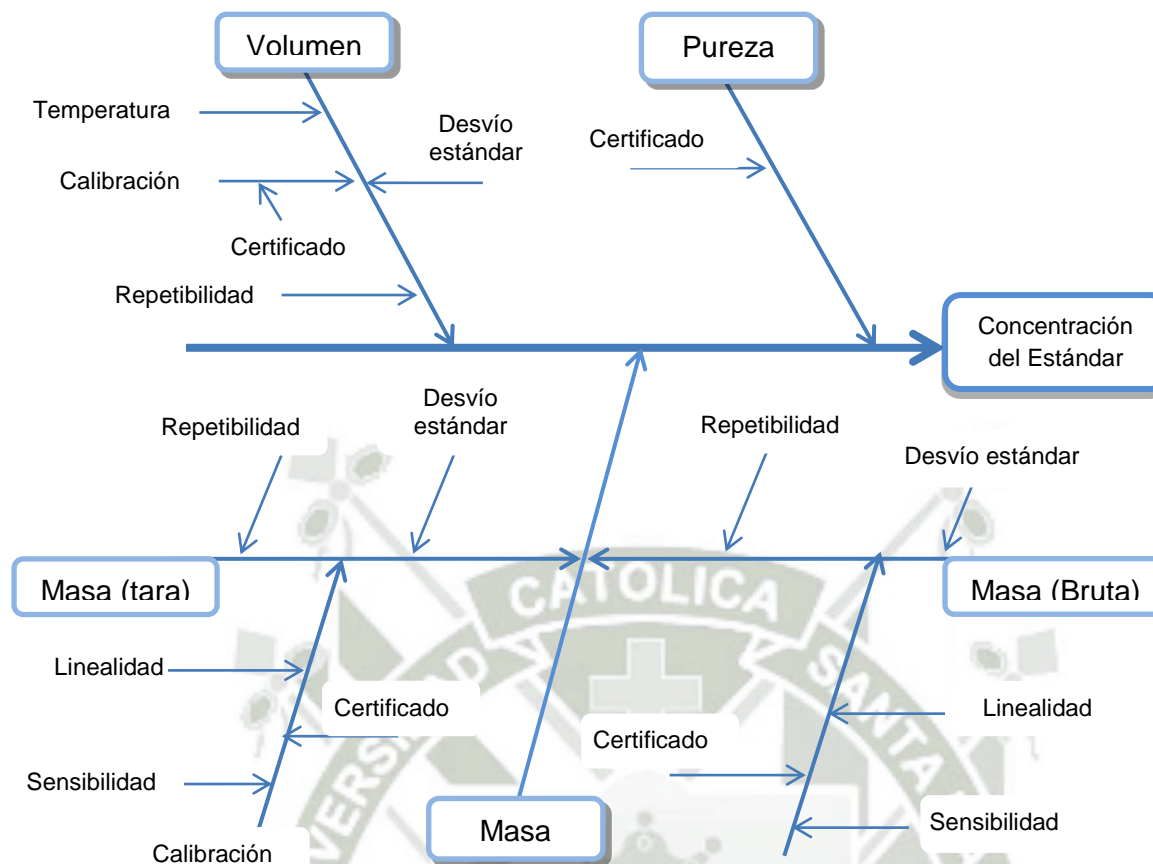


Fig. N° 3. 10: Diagrama Causa – Efecto para la Identificación de Fuentes de Incertidumbre

c) Cuantificación de la Incertidumbre de Cada Fuente

Las fuentes de incertidumbre para ambroxol clorhidrato, está dado por la incertidumbre del peso del estándar, volumen de dilución y pureza del estándar.

i) Cálculo de Incertidumbre de la Pesada del Estándar (u_{mstd})

- Calibración de la balanza u_{bal}
- Repetibilidad de la pesada u_{Rep} .
- Especificación de las masas u_{masas}

$$u_{mstd} = \sqrt{(u_{bal})^2 + (u_{rep})^2 + (u_{masas})^2} \quad (\text{Ec. 3. 12})$$

Incertidumbre en la pesada de 30 mg del estándar:

$$\text{Desarrollando: } \left(\frac{u(mstd)}{Mstd} \right)^2 = \quad (\text{Ec. 3. 13})$$

- **Calibración de la balanza: u_{bal}**

Según la información proporcionada por el certificado de calibración de la balanza: la ecuación de la incertidumbre expandida asociada a la indicación de la balanza, para un factor de cobertura $k = 2$ para un nivel de confianza de aproximadamente el 95%.

$$U_R = 2 * (2.5000000000000000E - 09 + 7.6250729185E - 11 * R^2)^{1/2}$$

$$U_R = 2 * (2.5000000000000000E - 09 + 7.6250729185E - 11 * 0.030^2)^{1/2}$$

$$U_R = 0.000100001g$$

$$u_{bal} = \frac{U_R}{2}$$

$$u_{bal} = 0.00005 g = 0.05 mg$$

- **Repetibilidad de la pesada (masas): u_{rep}**

La desviación estándar de una masa patrón efectuada en el rango de pesada 30 mg es de 0.0039 mg (n=10) ver tabla N° 3.28

$$u_{rep} = \frac{0.00001229 g}{\sqrt{10}} = 3.8873 \times 10^{-6} g = 0.0039 mg$$

Tabla N° 3. 29: Repetibilidad de la Pesada con Intervalo de 10 Segundos

N° Lectura	Lectura de las pesas (mg)	Lectura de las pesas (g)
1	30.01	0.03001
2	30.00	0.03000
3	30.00	0.03000
4	30.00	0.03000
5	30.01	0.03001
6	29.99	0.02999
7	30.03	0.03003
8	30.00	0.03000
9	30.02	0.03002
10	30.02	0.03002
Promedio	30.008	0.030008
Desviación estándar	0.012292726	0.00001229

Fuente: Elaboración Propia

- **Calibración de las masas (pesas patrón): u_{masas}**

Para ello se realizó la trazabilidad de las pesas custodiadas en el Servicio Nacional de Metrología – Indecopi de Perú.

Según la información proporcionada por el certificado de calibración de las pesas patrón de 10 mg y 20 mg la incertidumbre es:

- 10 mg: ± 0.003 mg (k=2); Esto significa una incertidumbre estándar de:

$$u_{masas} = \frac{0.003 \text{ mg}}{2} = 0.0015 \text{ mg}$$

- 20 mg: ± 0.003 mg (k=2); Esto significa una incertidumbre estándar de:

$$u_{masas} = \frac{0.003 \text{ mg}}{2} = 0.0015 \text{ mg}$$

Para calcular la incertidumbre total de ambas pesas patrón:

$$u_{\text{masas total}} = u_{10 \text{ mg}} + u_{20 \text{ mg}}$$

$$u_{\text{masas total}} = 0.0015_{10 \text{ mg}} + 0.0015_{20 \text{ mg}}$$

$$u_{\text{masas total}} = 0.003 \text{ mg}$$

Entonces:

$$u_{\text{mstd}} = \sqrt{(u_{\text{bal}})^2 + (u_{\text{rep}})^2 + (u_{\text{masas}})^2}$$

$$u_{\text{mstd}} = \sqrt{(0.05 \text{ mg})^2 + (0.0039 \text{ mg})^2 + (0.003)^2}$$

$$u_{\text{mstd}} = 0.05 \text{ mg}$$

Reemplazando en la ecuación 3.13: $\left(\frac{u(\text{mstd})}{\text{Mstd}}\right)^2 = \left(\frac{0.05 \text{ mg}}{30 \text{ mg}}\right)^2 = 2.78 \times 10^{-6}$

ii) Cálculo de incertidumbre por dilución

Peso del estándar entre el volumen de dilución: $\frac{\text{Pstd}}{200 \text{ mL}}$

Peso del estándar: Pstd = 30 mg

Expresión del cálculo de incertidumbre asociado al proceso de dilución:

$$u(c) = C(\text{dil}) \times \sqrt{\left(\frac{u(\text{cstd})}{\text{Cstd}}\right)^2 + \left(\frac{u(\text{vfin})}{\text{vfin}}\right)^2} \quad (\text{Ec. 3. 14})$$

Donde:

$C(\text{dil})$: Concentración final del estándar

$C\text{std}$: Concentración del estándar

$V\text{fin}$: Volumen final

Incertidumbre asociada a la concentración del estándar:

- Pureza del estándar de ambroxol clorhidrato (100.54 ± 0.21)
- Matraz volumétrico de (200 ± 0.06) mL (incertidumbre estándar)

$$C_{std} = \frac{P_{std}}{Volumen} \rightarrow \frac{30 \text{ mg}}{200 \text{ mL}} = 0.15 \text{ mg/mL}$$

Incertidumbre de C (std)

$$C_{std} = C(dil) \pm \sqrt{\left(\frac{u(c_{std})}{C_{std}}\right)^2 + \left(\frac{u(v_{fin})}{v_{fin}}\right)^2}$$

$$C_{std} = 0.15 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \pm \sqrt{\left(\frac{0.21}{100.54}\right)^2 + \left(\frac{0.06}{200}\right)^2}$$

$$C_{std} = 0.15 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \pm 0.0021$$

- $\left(\frac{u(c_{std})}{c_{std}}\right)^2 = \left(\frac{0.0021}{0.15 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}\right)^2 = 1.96 \times 10^{-4}$ Incertidumbre del estándar

- $\left(\frac{u(v_{final})}{v_{final}}\right)^2 = \left(\frac{0.06 \text{ mL}}{200 \text{ mL}}\right)^2 = 9.0 \times 10^{-8}$ Incertidumbre del matraz

Sustituyendo las incertidumbres en la ecuación general de incertidumbre tenemos:

$$u(c) = C(dil) \times \sqrt{\left(\frac{u(c_{std})}{C_{std}}\right)^2 + \left(\frac{u(v_{fin})}{v_{fin}}\right)^2}$$

$$u(c) = 0.15 \text{ mg/mL} \times \sqrt{(0.0002)^2 + (9.0 \times 10^{-8})^2}$$

$$u(c) = 0.15 \text{ mg/mL} \times 1 \times 10^{-4}$$

$$u(c) = 1.5 \times 10^{-5} \text{ mg/mL}$$

Incertidumbre Tipo B errores sistemáticos y datos de fabricante (por ejemplo material de vidrio) para el proceso de dilución.

La evaluación de tipo B de la incertidumbre en el presente trabajo de investigación se divide en la incertidumbre de dilución y pesada, en este caso la incertidumbre de dilución es menor a la incertidumbre de pesada. De igual forma la evaluación tipo A de la incertidumbre por ser cuatro magnitudes más grande que la evaluación tipo B de la incertidumbre es la representación final de la incertidumbre combinada para esta metodología analítica por HPLC; en la tabla N° 3.29 y en la figura N° 3.11. se muestran los resultados obtenidos para la evaluación tipo A y tipo B de la incertidumbre para el método analítico de Ambroxol clorhidrato.

Tabla N° 3. 30: Resumen de Cálculo de Incertidumbre (Ambroxol Clorhidrato)

Evaluación Tipo B	
U peso	5×10^{-2}
U diluciones	1.5×10^{-5}
Evaluación Tipo A	
U reproducibilidad	$0.3535 \sim 3.5 \times 10^{-1}$

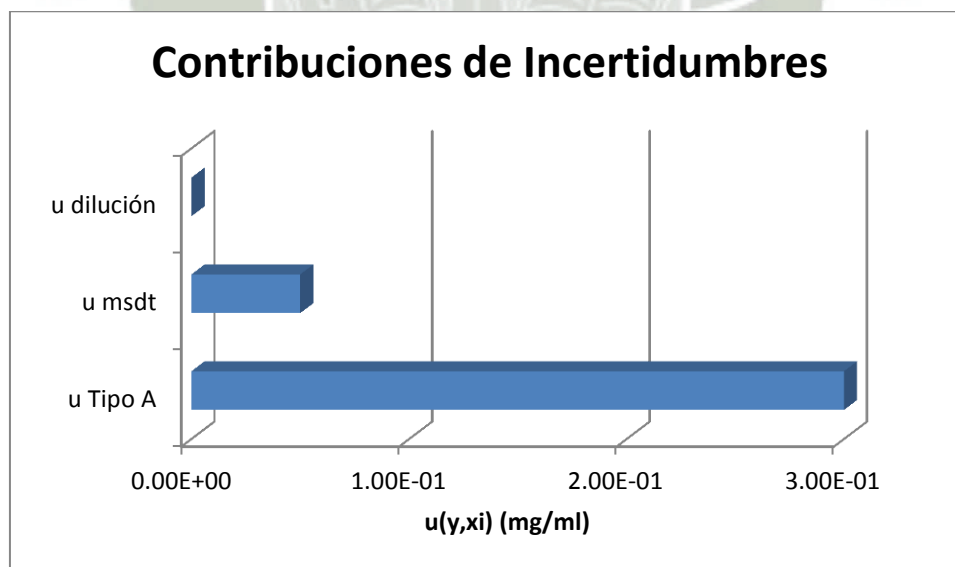


Fig. N° 3. 11: Gráfico Comparativo de Aportes de cada Fuente de Incertidumbre (Ambroxol HCl)

Ahora la incertidumbre combinada final es la siguiente:

$$u_c = \sqrt{(u_{\text{tipo A}})^2 + (u_{\text{tipo B}})^2}$$

$$u_c = \sqrt{(0.3535)^2 + (1.5 \times 10^{-5})^2}$$

$$u_c = 0.3535$$

Teniendo el resultado de la incertidumbre combinada estándar podemos calcular la incertidumbre expandida (U) del método analítico antes validado.

$$U = k \times u_c$$

$$U = 2 \times 0.3535$$

$$U = 0.71\%$$

k factor de seguridad o de cobertura. Aproximadamente $k=2$ para un nivel de confianza de 95%.

Se reporta el resultado de concentración del analito ambroxol clorhidrato en términos de porcentaje, ejemplo 7.41 mg/5mL (97.42% \pm 0.71%).

3.2.2. Clenbuterol Clorhidrato

a) Definición del Mensurando

Se efectúa la preparación del estándar de clenbuterol clorhidrato para determinación por HPLC a partir de un estándar de referencia secundario, según los pasos detallados en la figura N° 3.11.

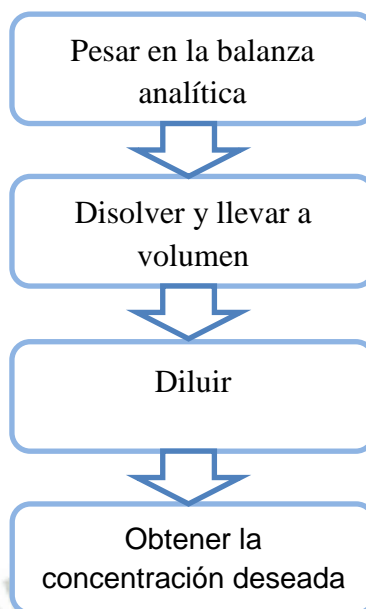


Fig. N° 3. 12: Preparación del Estándar de Clenbuterol Clorhidrato

b) Identificación De Las Fuentes De Incertidumbre

Para proceder al cálculo de incertidumbre Tipo B, realizamos una lista completa de las fuentes relevantes de incertidumbre. Para visualizarlo de forma clara realizamos un diagrama de causa – efecto de Ishikawa o espina de pescado como el presentado en la figura N° 3.10.

c) Cuantificación de la Incertidumbre de Cada Fuente

Las fuentes de incertidumbre para clenbuterol clorhidrato, está dado por la incertidumbre del peso del estándar, volumen de dilución y pureza del estándar.

i. Cálculo de la Incertidumbre por la Pesada del estándar

- Calibración de la balanza u_{bal}
- Repetibilidad de la pesada u_{Rep} .
- Especificación de las masas u_{masas}

$$u_{mstd} = \sqrt{(u_{bal})^2 + (u_{rep})^2 + (u_{masas})^2}$$

Incertidumbre en la pesada de 50 mg del estándar:

Desarrollando: $\left(\frac{u(mstd)}{Mstd}\right)^2 =$

- **Calibración de la balanza:** u_{bal}

Según la información proporcionada por el certificado de calibración de la balanza, la Ecuación de la incertidumbre expandida asociada a la indicación de la balanza, para un factor de cobertura $k=2$ para un nivel de confianza de aproximadamente el 95%.

$$U_R = 2 * (2.500000000000000E - 09 + 7.6250729185E - 11 * R^2)^{1/2}$$

$$U_R = 2 * (2.500000000000000E - 09 + 7.6250729185E - 11 * 0.050^2)^{1/2}$$

$$U_R = 0.000100004 \text{ g}$$

$$u_{bal} = \frac{U_R}{2}$$

$$u_{bal} = \frac{0.00010004}{2}$$

$$u_{bal} = 0.00005 \text{ g} = 0.05 \text{ mg}$$

- **Repetibilidad de la pesada (masas):** u_{rep}

La desviación estándar de una masa patrón efectuada en el rango de pesada 50 mg es de 0.0023 mg (n=10) ver tabla N°3.30.

$$u_{rep} = \frac{0.00000738 \text{ g}}{\sqrt{10}}$$

$$u_{rep} = 2.3333E-06 \text{ g}$$

$$u_{rep} = 0.0023 \text{ mg}$$

Tabla N° 3. 31: Repetibilidad de la Pesada con Intervalo de 10 Segundos

N° Lectura	Lectura de las pesas (mg)	Lectura de las pesas (g)
1	50.00	0.05000
2	49.99	0.04999
3	49.99	0.04999
4	50.01	0.05001
5	50.00	0.05000
6	50.00	0.05000
7	49.99	0.04999
8	50.01	0.05001
9	50.00	0.05000
10	50.00	0.05000
Promedio	49.999	0.049999
Desviación estándar	0.007378648	0.00000738

Fuente: Elaboración propia

– **Calibración de las masas (pesas patrón): u_{masas}**

Para ello se realizó la trazabilidad de las pesas custodiadas en el Servicio Nacional de Metrología – Indecopi de Perú.

Según la información proporcionada por el certificado de calibración de las pesas patrón de 50 mg la incertidumbre es:

- 50 mg: ± 0.004 mg (k=2)

Esto significa una incertidumbre estándar de:

$$u_{masas} = \frac{0.004 \text{ mg}}{2} = 0.002 \text{ mg}$$

Entonces:

$$u_{mstd} = \sqrt{(u_{bal})^2 + (u_{rep})^2 + (u_{masas})^2}$$

$$u_{mstd} = \sqrt{(0.05 \text{ mg})^2 + (0.0023 \text{ mg})^2 + (0.002)^2}$$

$$u_{mstd} = 0.05 \text{ mg}$$

Desarrollando:

$$\left(\frac{u(mstd)}{Mstd}\right)^2 = \left(\frac{0.05 \text{ mg}}{50 \text{ mg}}\right)^2 = 1 \times 10^{-6}$$

ii. Cálculo de incertidumbre por dilución

$$\frac{Pstd}{100 \text{ mL}} \xrightarrow{0.1 \text{ mL}} 100 \text{ mL}$$

$$Pstd = 50 \text{ mg}$$

Expresión del cálculo de incertidumbre asociado al proceso de dilución:

$$u(c) = C(dil) \sqrt{\left(\frac{u(cstd)}{cstd}\right)^2 + \left(\frac{u(vstd)}{vstd}\right)^2 + \left(\frac{u(vfin)}{vfin}\right)^2}$$

Incertidumbre asociada a la concentración del estándar:

Pureza M.R. (99.78 ± 0.16) mg

Matraz volumétrico de (100 ± 0.10) mL (incertidumbre estándar)

Micropipeta de 1000 µL para (100 ± 0.05) µL (incertidumbre estándar)

$$Cstd = \frac{Pstd}{Volumen} \rightarrow \frac{50 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} = 0.50 \text{ mg/mL}$$

Incertidumbre de C (std)

$$Cstd = 0.50 \text{ mg/mL} \pm \sqrt{\left(\frac{u(cstd)}{100}\right)^2 + \left(\frac{0.10}{100}\right)^2}$$

$$Cstd = 0.50 \text{ mg/mL} \pm \sqrt{\left(\frac{0.16}{99.78}\right)^2 + \left(\frac{0.10}{100}\right)^2}$$

$$Cstd = 0.50 \text{ mg/mL} \pm 0.0019$$

$$Cdil = \frac{Cstd \times Vstd}{Vfinal} \rightarrow Cdil = \frac{0.50 \text{ mg/mL} \times 0.1 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} \rightarrow Cdil = 0.0005 \text{ mg/mL}$$

- $\left(\frac{u(cstd)}{cstd}\right)^2 = \left(\frac{0.0019}{0.50 \text{ mg/mL}}\right)^2 = 1.44 \times 10^{-5}$ **Incertidumbre del estándar**
- $\left(\frac{u(vstd)}{vstd}\right)^2 = \left(\frac{0.00005 \text{ mL}}{0.1 \text{ mL}}\right)^2 = 2.5 \times 10^{-7}$ **Incertidumbre de la alícuota**
- $\left(\frac{u(vfinal)}{vfinal}\right)^2 = \left(\frac{0.10 \text{ mL}}{100 \text{ mL}}\right)^2 = 1.0 \times 10^{-6}$ **Incertidumbre del matraz**

Sustituyendo las incertidumbres parciales en la ecuación general de incertidumbre por dilución tenemos:

$$u(c) = C(dil) \sqrt{\left(\frac{u(cstd)}{Cstd}\right)^2 + \left(\frac{u(vstd)}{vstd}\right)^2 + \left(\frac{u(vfin)}{vfin}\right)^2}$$

$$u(c) = 0.0005 \text{ mg/mL} \times \sqrt{(1.44 \times 10^{-5})^2 + (2.5 \times 10^{-7})^2 + (1.0 \times 10^{-6})^2}$$

$$u(c) = 0.0005 \text{ mg/mL} \times 1.44 \times 10^{-5}$$

$$u(c) = 7.21 \times 10^{-9} \text{ mg/mL}$$

La evaluación tipo B de la incertidumbre en el presente trabajo se divide en la incertidumbre de dilución y pesada, en este caso la incertidumbre de dilución es despreciable con respecto a la incertidumbre de peso. De igual forma la evaluación tipo A de la incertidumbre es cinco magnitudes más grande que la evaluación tipo B tal como se observa en la tabla N° 3.31 y en la figura N° 3.13, por lo cual la evaluación Tipo A es la representación final de la incertidumbre combinada para esta metodología por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC).

Tabla N° 3. 32: Resumen de Cálculo de Incertidumbre (Clenbuterol clorhidrato)

Incertidumbre Tipo B	
U peso	1×10^{-6}
U diluciones	7.21×10^{-9}
Incertidumbre Tipo A	
U reproducibilidad	$0.2838 \sim 2.838 \times 10^{-1}$

Fuente: Elaboración Propia

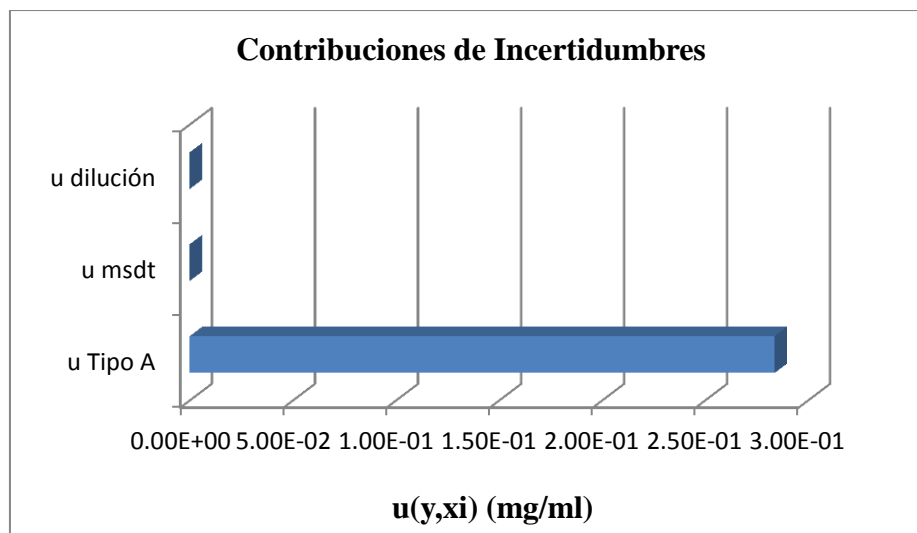


Fig. N° 3. 13: Gráfico Comparativo de Aportes de cada Fuente de Incertidumbre (Clenbuterol HCl)

Ahora la incertidumbre combinada final es la siguiente:

$$u_c = \sqrt{(u_{\text{tipo A}})^2 + (u_{\text{tipo B}})^2}$$

$$u_c = 0.2838$$

Teniendo el resultado de la incertidumbre combinada están dar podemos calcular la incertidumbre expandida (U). Del método analítico antes validado

$$U = k \times u_c$$

$$U = 2 \times 0.2838$$

$$U = 0.5676 \sim 0.57$$

k = factor de seguridad o de cobertura. Aproximadamente k = 2 para un nivel de confianza del 95%.

Se reporta el resultado de concentración del analito clenbuterol clorhidrato en términos de porcentaje, ejemplo 0.0052 mg/5mL (104% ± 0.57%).

CAPITULO IV

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

1. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

En el presente trabajo de investigación se desarrolló dos técnicas de análisis por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para la cuantificación de Ambroxol clorhidrato y Clenbuterol clorhidrato en un jarabe, las cuales no figuran en la literatura vigente; los métodos de análisis por HPLC presentan mayores ventajas por ser más selectivos en relación a otros métodos como son los volumétricos y espectrofotométricos.

Se efectuaron diferentes ensayos para determinar las mejores condiciones cromatográficas en relación a la longitud de onda, al tipo de fase estacionaria, proporción de los componentes de la fase móvil y pH de la fase móvil.

Considerando estas condiciones de trabajo se procedió a la validación de los métodos desarrollados.

2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICOS

2.1. SELECTIVIDAD

En la farmacopea americana (USP) y en documentos de la ICH, indican que en una valoración, la demostración de selectividad requiere evidencia de que el procedimiento no resulta afectado por la presencia de impurezas, excipientes o productos de degradación.

En el presente trabajo se comprueba la selectividad del método al trabajar con el placebo y los principios activos puros bajo las condiciones establecidas. En los cromatogramas según Anexos N° 2, 3 y 4 para ambroxol clorhidrato y Anexos N° 12, 13 y 14, no se observa interferencia del placebo, ni de la fase móvil sobre la muestra, es decir, no presentan ningún pico en el tiempo de retención tanto del ambroxol clorhidrato y ni del clenbuterol clorhidrato, pues no hay respuesta del mismo al momento de realizar las lecturas.

Cabe anotar también que ambos principios activos pudieron ser elucidados en sus respectivos tiempos de retención a pesar de ser tratados bajo diferentes condiciones tales como condiciones ácidas, básicas, oxidativas, luz y calor, por lo que su aplicación en este punto encuentra aceptabilidad; ver Anexos N° 5, 6, 7, 8 y 9 para ambroxol clorhidrato, y Anexos N° 14, 15, 16, 17 y 18 para clenbuterol clorhidrato. Se observó una reducción en la concentración de los analitos en las muestras debido a la degradación provocada al someterlos a las condiciones antes mencionadas, los resultados se muestran en las tablas N° 3.3. y 3.4.

Por lo antes mencionado los métodos son selectivos, ya que al no observarse interferencia se cumple con los criterios de aceptación de $< 2\%$.

2.2. LINEALIDAD

Así mismo la farmacopea americana y los documentos de la ICH, recomiendan que para establecer la linealidad se utilicen normalmente un mínimo de cinco concentraciones, también recomiendan que se consideren los intervalos especificados para la valoración de un fármaco (o de un producto terminado) de 80% a 120% de la concentración de prueba.

2.2.1. Linealidad del Sistema

El método analítico responde linealmente a las concentraciones en las cuales se trabaja, tal como se observa en los gráficos presentados, para ambos principios activos (Figuras N° 3.5 y 3.6).

En la linealidad del sistema las lecturas que se observan son proporcionales a las concentraciones con las cuales se trabajan los activos (70%, 85%, 100%, 115% y 130%).

Para el principio activo ambroxol clorhidrato, la concentración al 100% es de 0.15 mg/mL. Luego de la evaluación estadística, se obtuvo como resultado un coeficiente de correlación (r) de 0.9998, siendo la especificación un mínimo de 0.997, y un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9996; siendo la especificación un mínimo de 0.995; lo que evidencia que hay relación lineal entre ambas variables (dependiente “x” e independiente “y”). Se realiza una prueba adicional para evidenciar esta relación, utilizando un test estadístico para “t”, donde $t_{\text{regresión}} = 192.126$ es mayor que $t_{\text{tablas}} = 2.16$ con un intervalo de confianza de 95% y $n-2$ grados de libertad; demostrando así que existe una correlación lineal significativa entre las variables dependiente e independiente.

Para el principio activo clenbuterol clorhidrato, la concentración al 100% es de 0.0005 mg/mL. Luego de la evaluación estadística se obtuvo como resultado un coeficiente de correlación de correlación (r) de 0.9996, siendo la especificación un mínimo de 0.997, y un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9991; siendo la especificación un mínimo de 0.995; lo que evidencia que hay relación lineal entre ambas variables (dependiente “x” e independiente “y”). Se realiza una prueba adicional para evidenciar esta relación, utilizando un test estadístico para “t”, donde $t_{\text{regresión}} = 121.811$ es mayor que $t_{\text{tablas}} = 2.16$ con un intervalo de confianza de 95% y $n-2$ grados de libertad; demostrando así que existe una correlación lineal significativa entre las variables dependiente e independiente.

2.2.2. Linealidad del Método

En la linealidad del método se observan también las lecturas proporcionales a las concentraciones de los analitos y la ecuación de la recta que se obtiene es muy similar a la obtenida para la linealidad del sistema, lo que nos demuestra que el método responde linealmente en el rango de trabajo empleado. Las lecturas que se observan son proporcionales a las concentraciones con las cuales se trabajan los activos (60%, 80%, 100%, 120% y 140%).

Para el principio activo ambroxol clorhidrato, la concentración al 100% es de 0.15 mg/mL. Luego de la evaluación estadística, se obtuvo como resultado un coeficiente de correlación (r) de 0.9998, siendo la especificación un mínimo de 0.997, y un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9985; siendo la especificación un mínimo de 0.995; lo que evidencia que hay relación lineal entre ambas variables (dependiente “x” e independiente “y”). Se realiza una prueba adicional para evidenciar esta relación, utilizando un test estadístico para “r”, donde $t_{\text{regresión}} = 90.08$ es mayor que $t_{\text{tablas}} = 2.16$ con un intervalo de confianza de 95% y $n-2$ grados de libertad; demostrando así que existe una correlación lineal significativa entre las variables dependiente e independiente.

Para el principio activo clenbuterol clorhidrato, la concentración al 100% es de 0.0005 mg/mL. Luego de la evaluación estadística se obtuvo como resultado un coeficiente de correlación de correlación (r) de 0.9998, siendo la especificación un mínimo de 0.997, y un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9996; siendo la especificación un mínimo de 0.995; lo que evidencia que hay relación lineal entre ambas variables (dependiente “x” e independiente “y”). Se realiza una prueba adicional para evidenciar esta relación, utilizando un test estadístico para “r”, donde $t_{\text{regresión}} = 180.25$ es mayor que $t_{\text{tablas}} = 2.16$ con un intervalo de confianza de 95% y $n-2$ grados de libertad; demostrando así que existe una correlación lineal significativa entre las variables dependiente e independiente.

2.3. PRECISIÓN

La farmacopea americana (USP) y los documentos de la ICH, indican que la precisión de un procedimiento analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. En este trabajo se ha considerado como criterio de aceptación un coeficiente de variación menor o igual al 2%.

En los análisis de precisión del sistema, repetibilidad y precisión intermedia se encuentra similitud en los resultados a través de los diversos ensayos realizados a las muestras, dando como resultado en todos los casos una desviación estándar relativa menor al 2%, lo cual evidencia que las técnicas analíticas son precisas.

2.4. EXACTITUD

En la farmacopea americana (USP) y en los documentos de la ICH, indican que la evaluación de la exactitud puede calcularse como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de analito añadida a la muestra. Así mismo recomiendan la evaluación de la recuperación del analito (porcentaje de recuperación) en todo el intervalo de la valoración, el criterio de aceptación dependerá de la valoración, de su variabilidad, y del producto. En este trabajo se ha establecido como criterio de aceptación de 97% - 103% del porcentaje de recuperación..

Los resultados obtenidos son satisfactorios y están dentro de la especificación establecida; el porcentaje de recuperación es aceptable, así mismo, esto se verifica en las diferentes concentraciones trabajadas, en los cuales el porcentaje de recuperación del analito no presenta diferencias significativas entre ellas, por lo que se puede afirmar que a diferentes concentraciones se obtendrían porcentajes de recuperación similares.

Para el principio activo ambroxol clorhidrato, el porcentaje de recuperación fue de 99.87%, siendo la especificación de 97% a 103%, el valor de la desviación estándar relativa es de 0.77, siendo la especificación de un menor a 2%. El test de t de student sirve para confirmar si el valor obtenido no difiere significativamente de un grado de probabilidad ya establecido, siendo $t_{exp} = 1.375$ menor que $t_{tabla} = 2.306$ con un intervalo de confianza de 95% y n-1 grados de libertad. Para el principio activo clenbuterol clorhidrato, el porcentaje de recuperación fue de 99.87%, siendo la especificación de 97% a 103%, el valor de la desviación estándar relativa es de 0.203, siendo la especificación de un menor a 2%. El test de t de student sirve para confirmar si el valor obtenido no difiere significativamente de un grado de probabilidad ya establecido, siendo $t_{exp} = 1.93$ menor que $t_{tabla} = 2.306$ con un intervalo de confianza de 95% y n-1 grados de libertad.

2.5. ROBUSTEZ

La guía ICH Q2A indica que la robustez es una medida de su capacidad para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros proporcionando idea de su fiabilidad o estabilidad durante su empleo.

La prueba de robustez de esta técnica analítica ha demostrado dar resultados reproducibles efectuando algunos cambios o ajustes en la metodología analítica propuesta (ambroxol clorhidrato: volumen de inyección, columna, pH, flujo y variando la proporción del fase móvil, y para clenbuterol clorhidrato variando la temperatura de trabajo y columna). Lo cual se demuestra con los cromatogramas obtenidos y los resultados que se encuentran plasmados en los tablas N° 3.24 y 3.25.

Es decir, para ambos principios activos se obtuvieron resultados que no varían significativamente con el método original, obteniéndose un coeficiente de variación de 1.72% para ambroxol clorhidrato y 1.92% para clenbuterol clorhidrato, los cuales son menores al criterio de aceptación de $<2\%$.

3. CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN

Para ambos principios activos se realizó la evaluación Tipo A cuyos resultados se encuentran plasmados en la tabla N° 3.27, para ambroxol clorhidrato $u = 0.3535$ y para clenbuterol clorhidrato 0.2838.

Para ambroxol clorhidrato la evaluación Tipo B resulta despreciable la contribución de incertidumbre de la dilución y en el caso de clenbuterol clorhidrato la contribución de la incertidumbre de dilución resulta ser despreciable. Para ambos principios activos la evaluación Tipo A resulta ser relevante con respecto a la evaluación de la incertidumbre Tipo B, por lo cual para ambroxol clorhidrato la incertidumbre combinada es de 0.71% y para clenbuterol clorhidrato es de 0.57% con un factor de cobertura de 2 para un nivel de confianza de 95%.

No se ha establecido el rango en el cual deba encontrarse la incertidumbre de la medición, ello va a depender del usuario y del uso. En nuestro trabajo las incertidumbres combinadas calculadas están dentro de las especificaciones para cada uno de los principios activos (95% a 105%), tal es así que para una concentración de ambroxol clorhidrato de 7.41 mg/5mL en términos de porcentaje ($97.42\% \pm 0.71\%$). y para clenbuterol clorhidrato 0.0052 mg/5mL ($104\% \pm 0.57\%$).

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que:

1. Se desarrolló una técnica analítica usando HPLC para la determinación de ambroxol clorhidrato y clenbuterol clorhidrato en jarabe, para esto se usó cromatografía de fase reversa con detección en la región UV en diferentes sistemas analíticos.
2. Las metodologías analíticas propuestas cumplen con los parámetros de validación, según los criterios establecidos:
 - Especificidad: Los métodos son específicos porque no se evidenciaron interferentes tanto de excipientes, diluyente, productos de degradación, permitiéndonos cuantificar el principio activo.
 - Linealidad: Los métodos cumplen con los parámetros de linealidad del sistema y linealidad del método dado que se obtuvo un coeficiente de correlación $r_{\text{Amb. HCl}}=0.9998$, $r_{\text{Clenb. HCl}}=0.9996$ para la linealidad del sistema y un coeficiente de correlación de $r_{\text{Amb. HCl}}=0.9992$, $r_{\text{Clenb. HCl}}=0.9998$ para linealidad del método.
 - Precisión: El coeficiente de variación (CV) de la precisión instrumental para las áreas y los tiempos de retención es $\leq 2\%$, la repetibilidad del método tiene un $CV_{\text{Amb. HCl}}=0.06\%$ y $CV_{\text{Clenb. HCl}}=1.22\%$, la precisión intermedia tiene un $CV_{\text{Amb. HCl}}=1.24\%$ y $CV_{\text{Clenb. HCl}}=0.61\%$.
 - Exactitud: Los métodos son exactos con una recuperación media de Amb. HCl = 99.86% y Clenb. HCl = 99.87%
 - Robustez: Los métodos son robustos ya que ante cambios como el volumen de inyección, tamaño de columna, temperatura de columna, variación de pH, variación de proporción de fase móvil en el caso de ambroxol clorhidrato, y para clenbuterol clorhidrato se cambió la temperatura de trabajo y se varió tamaño y marca de columna; para ambos casos los resultados obtenidos no muestran variación significativa.

3. Las metodologías analíticas propuestas cumplen con los requerimientos oficiales para la validación de metodologías analíticas, resultan ser confiables, consistentes y pueden emplearse en los análisis de rutina del laboratorio.
4. En el caso de la incertidumbre, de los resultados tabulados para las metodologías analíticas de ambroxol clorhidrato y clenbuterol clorhidrato, la evaluación Tipo A (repetibilidad del método) resulta ser muy relevante en relación con la evaluación Tipo B.
5. En la evaluación de la incertidumbre de los métodos se obtuvo una incertidumbre expandida con un factor de cobertura de $k=2$ y un 95% de nivel de confianza de 0.71% y 0.57% para ambroxol clorhidrato y clenbuterol clorhidrato respectivamente.

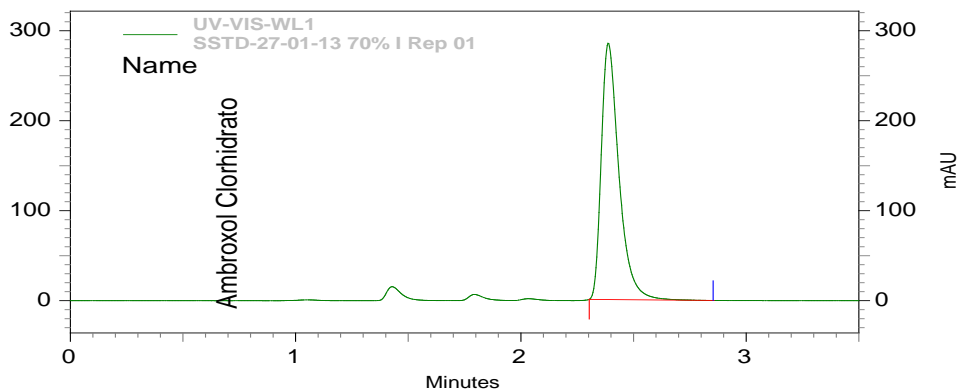


RECOMENDACIONES

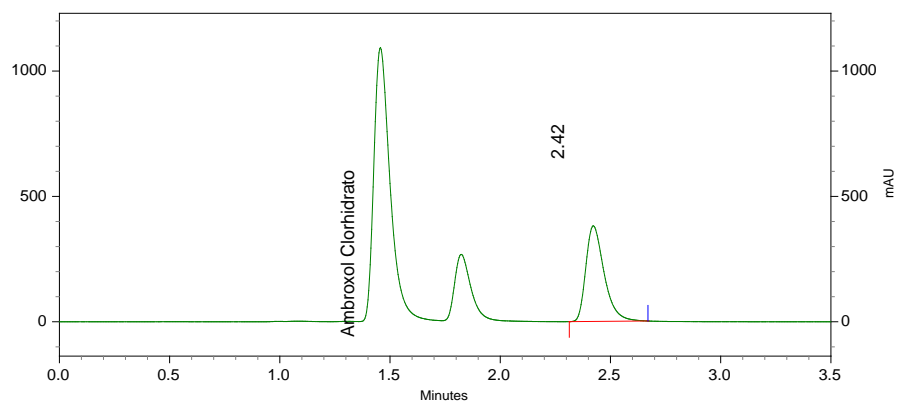
1. Es recomendable que antes de iniciar la validación se cumpla con la verificación de los materiales de referencia como son los estándares, la adecuada calificación de los instrumentos analíticos como el HPLC, balanzas, potenciómetros calificación de proveedores de materias primas, calificación del personal, las pruebas de aptitud del sistema y que se cumplan con las Buenas Prácticas de Laboratorio todo esto es Garantía de Calidad y nos asegura la confiabilidad de nuestros resultados.
2. Es muy importante que el analista que comienza un análisis lo termine, para evitar variaciones en los resultados.
3. En el caso de la metodología para la cuantificación de Clenbuterol clorhidrato realizar más pruebas para mejorar la eficiencia y así disminuir los tiempos de retención.
4. Poner mayor énfasis durante la etapa universitaria en el desarrollo de habilidades en el manejo de equipos automatizados de análisis, permitiendo de esta manera que los futuros profesionales químicos farmacéuticos se conviertan en especialistas capacitados de alto nivel científico.

ANEXOS

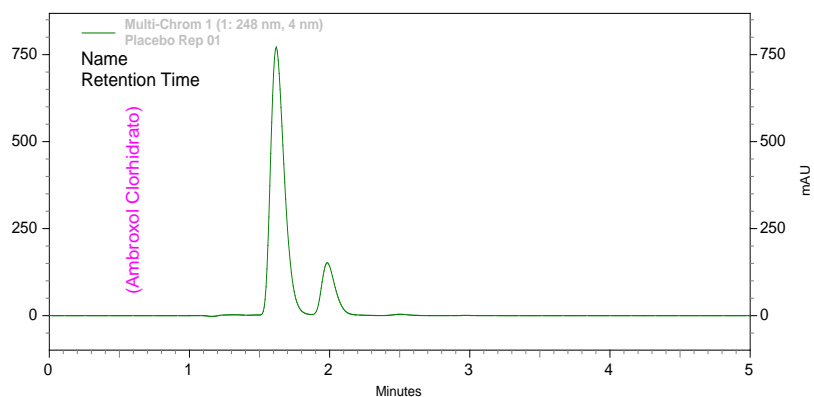
ANEXO N° 1: CROMATOGRAMA DEL ESTANDAR DE AMBROXOL CLORHIDRATO



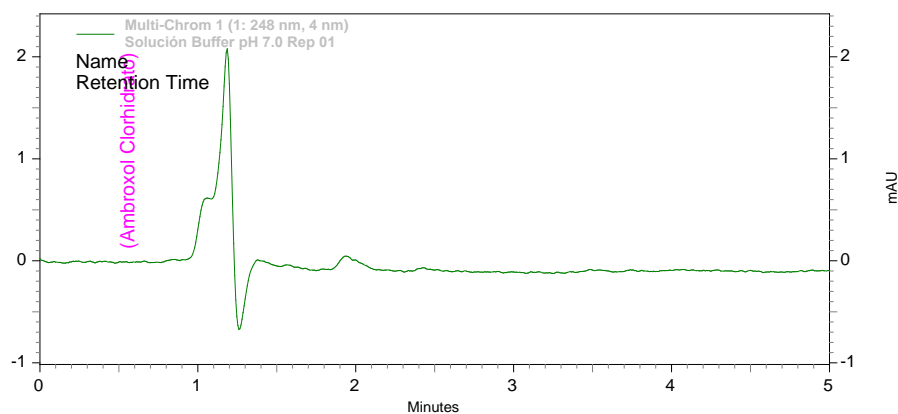
ANEXO N° 2: CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA (JARABE) CON AMBROXOL CLORHIDRATO



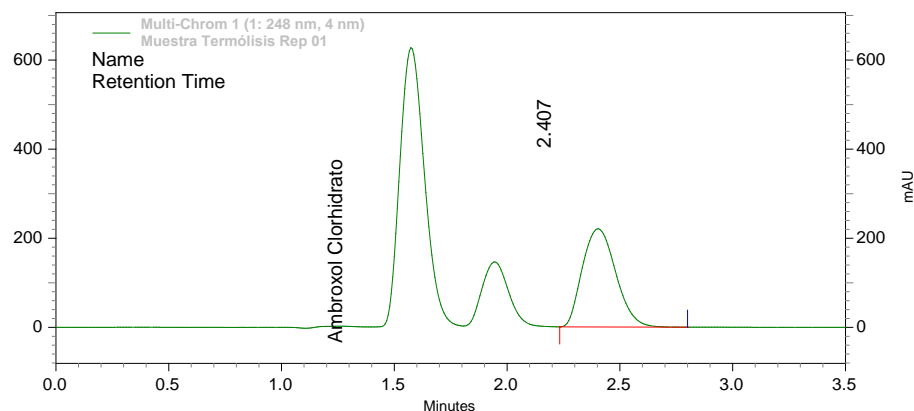
ANEXO N° 3: CROMATOGRAMA DEL PLACEBO PARA AMBROXOL CLORHIDRATO



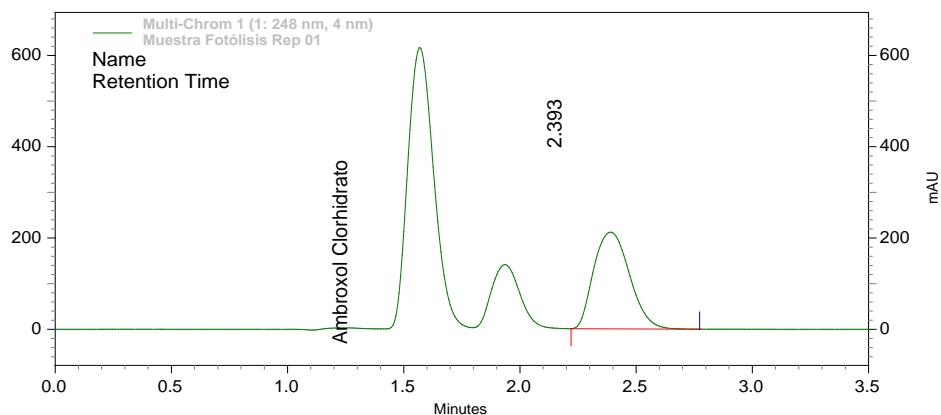
ANEXO N° 4: CROMATOGRAMA DE LA SOLUCIÓN BUFFER PARA AMBROXOL CLORHIDRATO



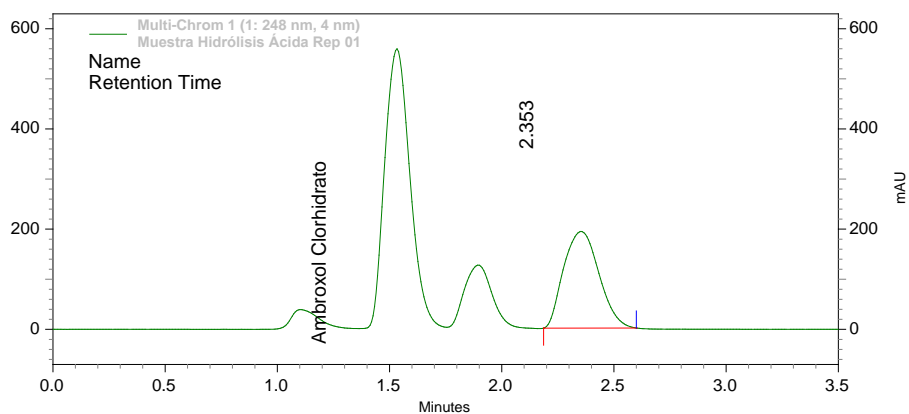
ANEXO N° 5: CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA SOMETIDA A TERMÓLISIS PARA AMBROXOL CLORHIDRATO



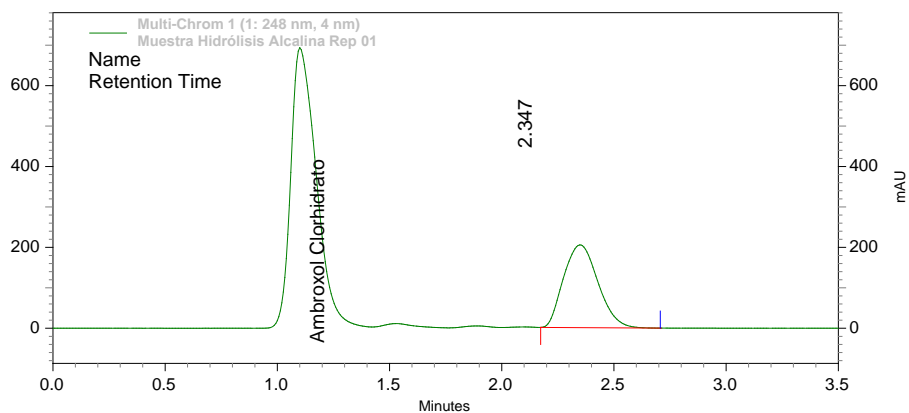
ANEXO N° 6: CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA SOMETIDA A FOTOLISIS PARA AMBROXOL CLORHIDRATO



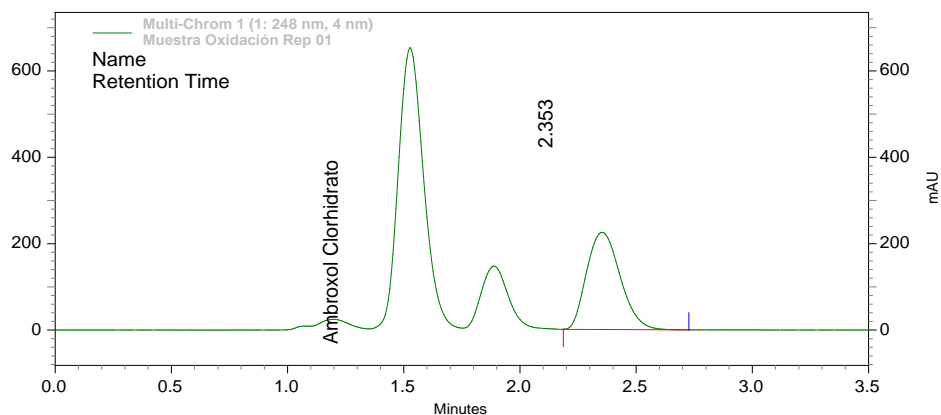
ANEXO N° 7: CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA SOMETIDA A HIDRÓLISIS ÁCIDA PARA AMBROXOL CLORHIDRATO



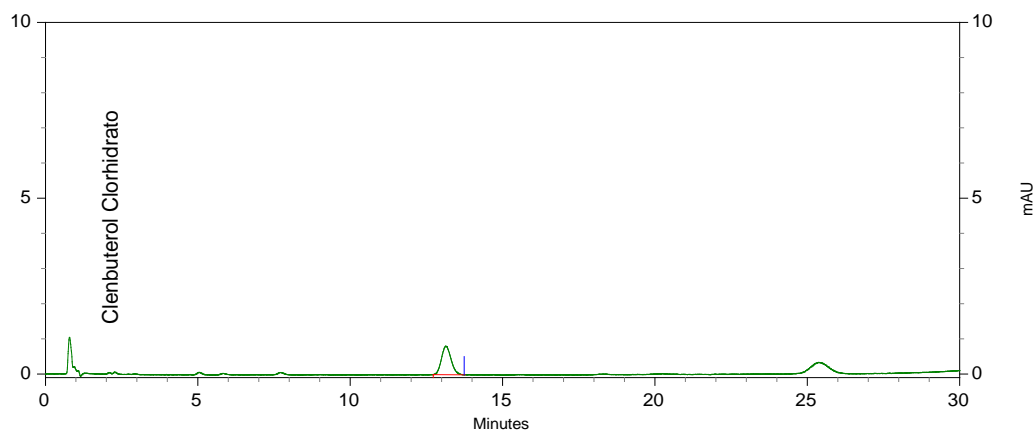
ANEXO N° 8: CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA SOMETIDA A HIDRÓLISIS ALCALINA PARA AMBROXOL CLORHIDRATO



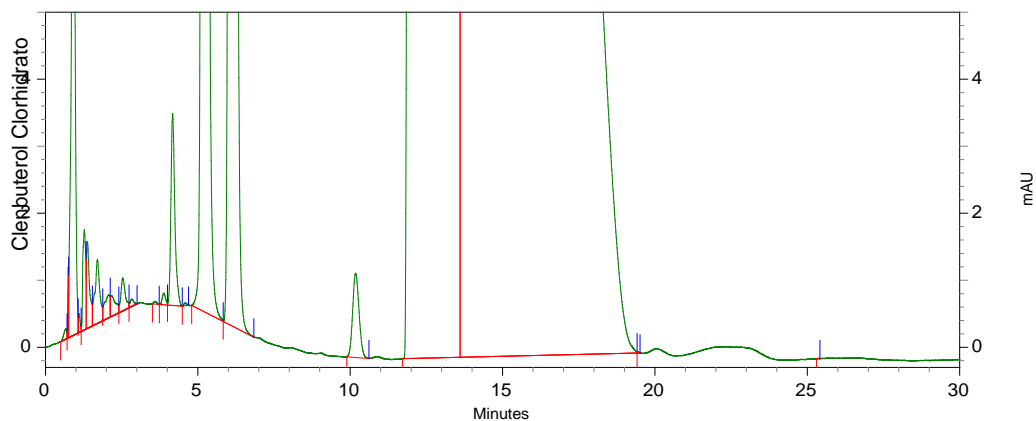
ANEXO N° 9: CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA SOMETIDA A OXIDACIÓN PARA AMBROXOL CLORHIDRATO



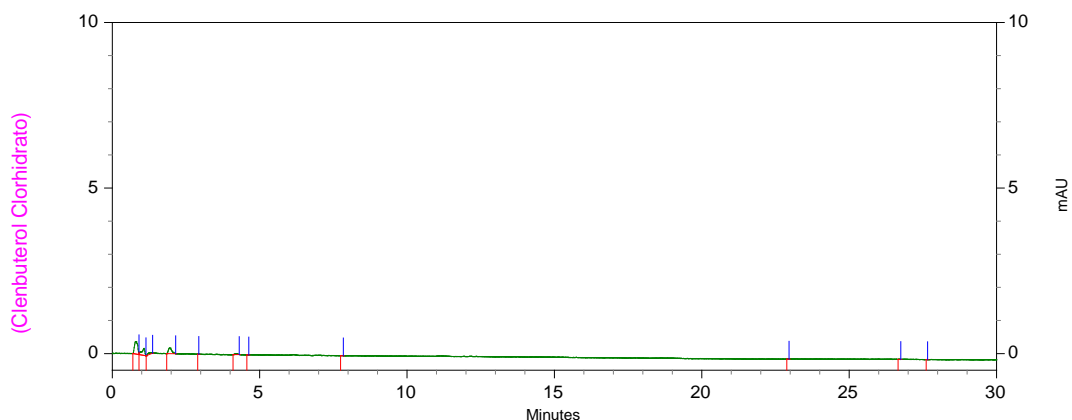
ANEXO N° 10: CROMATOGRAMA DEL ESTANDAR DE CLENBUTEROL CLORHIDRATO



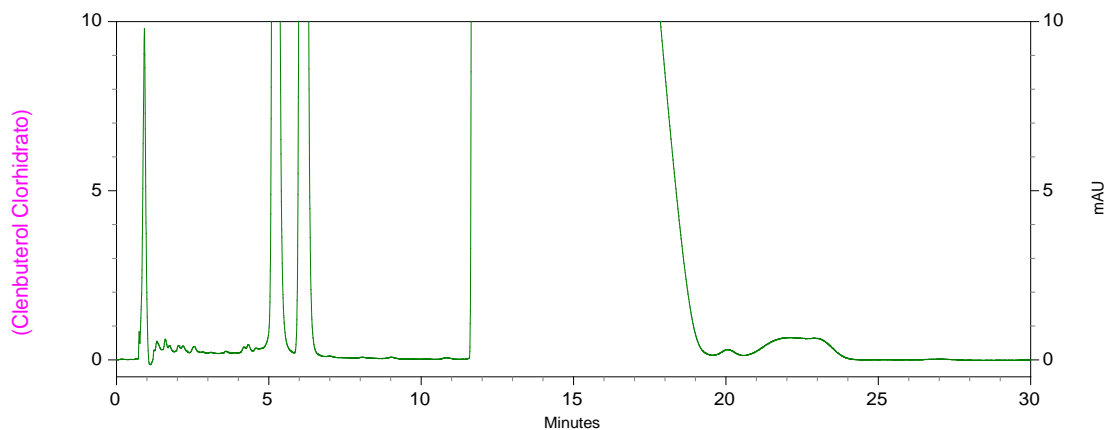
ANEXO N° 11: CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA (JARABE) CON CLENBUTEROL CLORHIDRATO



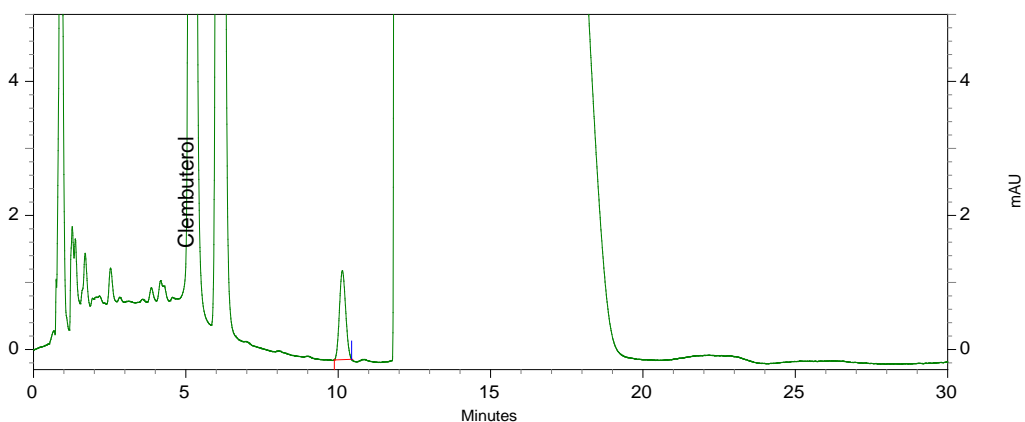
ANEXO N° 12: CROMATOGRAMA DE LA FASE MÓVIL (CLENBUTEROL CLORHIDRATO)



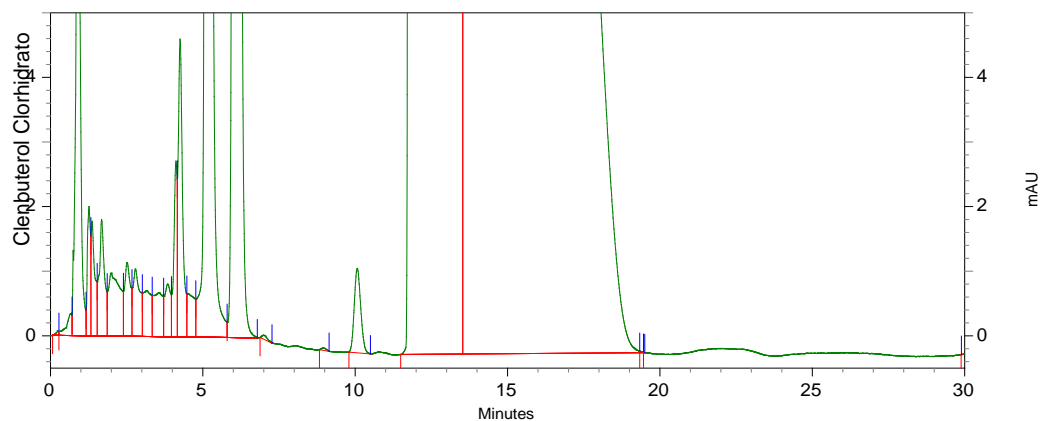
ANEXO N° 13: CROMATOGRAMA DEL PLACEBO + AMBROXOL CLORHIDRATO



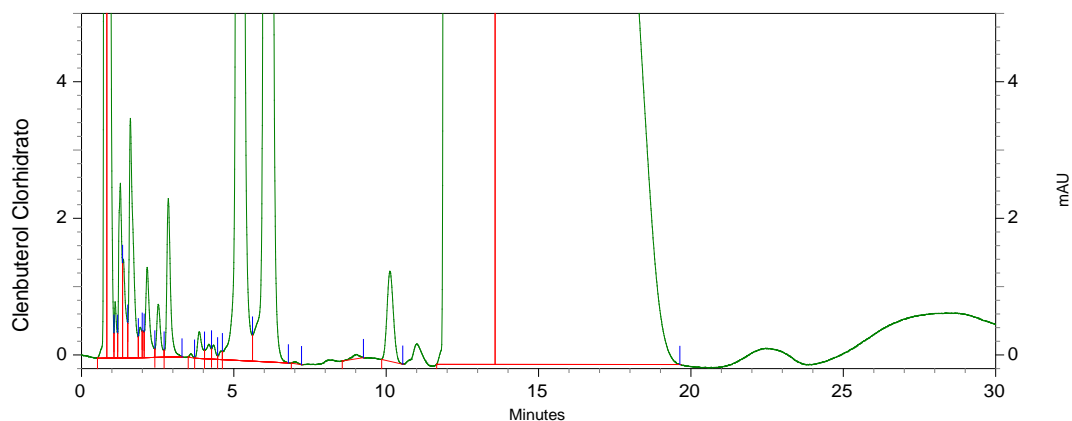
ANEXO N° 14: CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA SOMETIDA A TERMÓLISIS (CLENBUTEROL CLORHIDRATO)



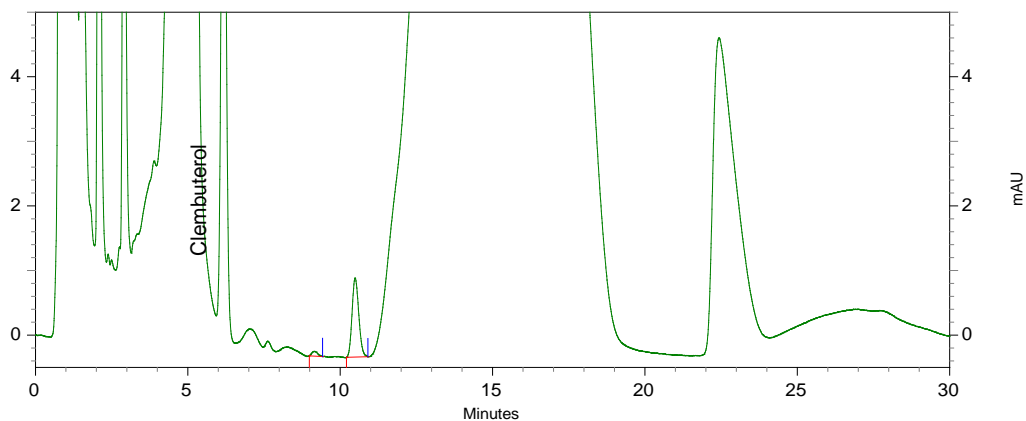
ANEXO N° 15: CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA SOMETIDA A FOTOLISIS (CLENBUTEROL CLORHIDRATO)



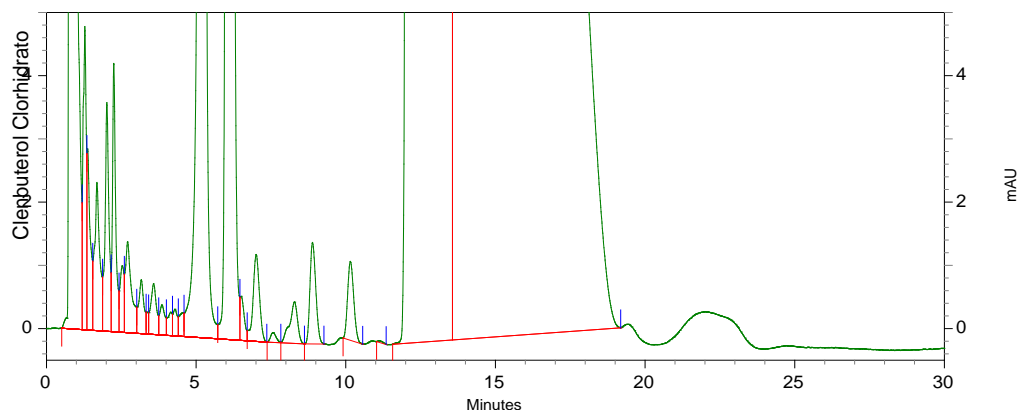
**ANEXO N° 16: CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA SOMETIDA A HIDRÓLISIS
ÁCIDA (CLENBUTEROL CLORHIDRATO)**



**ANEXO N° 17: CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA SOMETIDA A HIDRÓLISIS
ALCALINA (CLENBUTEROL CLORHIDRATO)**



**ANEXO N° 18: CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA SOMETIDA A OXIDACIÓN
(CLENBUTEROL CLORHIDRATO)**



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) British Pharmacopeia 2012 En: Monograph Development: Methods of analysis (supplementary chapter III). Vol 2
- 2) Washington University School Of Medicine: “Manual Washington de Terapéutica Médica 2”
- 3) Lemus Gonzales, Paola María: “Análisis comparativo de estabilidad acelerada y estabilidad a largo plazo de jarabe ambroxol en dos diferentes concentraciones, adultos y niños”, Guatemala, Universidad San Carlos de Guatemala, 2006
- 4) Litter, Manuel 1992 “Compendio de Farmacología” 4º Edición, El Ateneo, Buenos Aires, 265-275
- 5) United States of Pharmacopeia 36, National Formulary 31, Tomo 1, Tomo 4, Edición anual en español, 2012; 4116-4123.
- 6) Diccionario de Especialidades Farmacéuticas (DEF). Editorial PLM 17ª Edición, Lima, 2008.
- 7) Valls O., Del Castillo B., Técnicas Instrumentales en Farmacia y Ciencias de la Salud, 4ª ed. Barcelona, Ediciones Piro, 1998
- 8) Barcelli V. “Curso de Entrenamiento de Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC)” Lachrom Merck, Lima Abril 2009
- 9) Quattrochi, O; Abelaira, S; et al, “Introducción a la HPLC” 1ºed. Ed. Artes Gráficas Farro S.A. Argentina 1992.
- 10) Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria; “Validación de Métodos Analíticos” 1º ed. Ed. Gispert, S.A., Inc. España 2001, Pp: 42-130
- 11) Internacional Conference on Armonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, “Validation of Analytical Procedures ICH-Q2B”, Genova:1996
- 12) Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas (DIGEMID). Ministerio de salud. “Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Farmacéuticos”, Perú 1999, Pp: 9-11; 13-17; 19-25.
- 13) EURACHEM/CITAC Guide, “Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement.” (2000), 2º edition. (16 – 20)
- 14) Maroto Alicia, et al, “Estrategias para el cálculo de la Incertidumbre” Técnicas de Laboratorio 270 (2002) 223-227

- 15) Maroto Alicia, et al, “Incertidumbre y Precisión” Técnicas de Laboratorio, 266 (2001) 834 - 837
- 16) Maroto Alicia, et al, “Estimating uncertainties using information from the validation process” Analytica Chimica Acta 391 (1999) 173-185
- 17) INDECOPI, “Guía para la Expression de la Incertidumbre en la Medición”, Segunda Edición, Lima, 2001
- 18) Dalmau, R. “Control de Calidad en la industria farmacéutica: Concepto de validación. Industria Farmacéutica”. España 1989 Pp:85-91
- 19) EURACHEM, “A laboratory guide to method validation and related topics. The fitness for purpose of Analytical Methods”.Guía para validación de métodos de ensayo. OAA.DC-LE-05. 2009. Web disponible en : http://www.suelos.org.ar/adjuntos/validacion_metodos_analiticos.pdf. [Con fecha de acceso el 20 de Octubre del 2013]
- 20) Aguilar, G; Alcántara, A; et al, “Validación de Métodos Analíticos” 1° ed. Ed C.E.S.A. México 1992. Pp:354
- 21) Benitez, J. “Procedimiento a seguir para llevar a cabo la validación de técnicas analíticas”. 1° ed. España 1997. P:11
- 22) Del Monte, José Luis, “Desarrollo y Validación de Metodología para Minimizar la Incertidumbre de los Calibradores en Determinaciones por HPLC en Muestras Biológicas”, Tesis, Buenos Aires, 2012

PAGINAS WEB

- 23) Informes 34 de la OMS, http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_863_spa.pdf [Visitada el 23 de agosto del 2013]
- 24) Informe 37 de la OMS, <http://www.who.int/medicines/publications/pharmprep/en/> [Visitada el 02 de setiembre del 2013)
- 25) Resolución N° 0008-2003 / INDECOPI – CRT ,
[http://www2.congreso.gob.pe/Sicr/TraDocEstProc/Contdoc01_2011.nsf/d99575da99ebf305256f2e006d1cf0/d837d02f4f29a72005257933007970db/\\$FILE/NL20030201.pdf](http://www2.congreso.gob.pe/Sicr/TraDocEstProc/Contdoc01_2011.nsf/d99575da99ebf305256f2e006d1cf0/d837d02f4f29a72005257933007970db/$FILE/NL20030201.pdf) [Visitada el 02 de setiembre del 2013]
- 26) Guía de la AOAC
http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/AOAC_Validation_Guidelines_for_Food_Microbiology-Prepub_version.pdf [Visitada el 09 de octubre del 2013]
- 27) Guía de la FAO, <http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/ah833s15.htm> [Visitada el 05 de noviembre del 2013]
- 28) Guía de EURACHEM, <http://www.eurachem.org/index.php/publications/guides> [Visitada el 05 de noviembre del 2013]
- 29) ICH Q2A: Validation of Analytical Methods Definitions and Terminology, <http://www.ikev.org/haber/stabilite/kitap/35%201.7%20Stability%20Workshop%20ICH%20Q2A%20C%20.pdf> [Visitada el 09 de diciembre del 2013]

ANEXOS





"Decenio de las Personas con Discapacidad en el Perú"
"Año de la Inversión para el Desarrollo Rural y la Seguridad Alimentaria"



Laboratorio de Masa


Certificado de Calibración

LM - 286 - 2013

Página 1 de 4

Expediente	68196	Este certificado de calibración documenta la trazabilidad a los patrones nacionales, que realizan las unidades de medida de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI)
Solicitante	LABORATORIO PORTUGAL S.R.L.	
Dirección	Parque Industrial Rio Seco Mza. A Lte. 2 Cerro Colorado - Arequipa.	El SNM custodia, conserva y mantiene los patrones nacionales de las unidades de medida, calibra patrones secundarios, realiza mediciones y certificaciones metrológicas a solicitud de los interesados, promueve el desarrollo de la Metrología en el país y contribuye a la difusión del Sistema Legal de Unidades de medida del Perú. (SLUMP).
Patrón de Medición	PESA	
Valor Nominal	1 mg a 1 kg	El SNM es miembro del Sistema Interamericano de Metrología (SIM) y participa activamente en las Inter comparaciones que éste realiza en la región.
Clase de Exactitud	E2	
Material	ACERO INOXIDABLE	Con el fin de asegurar la calidad de sus mediciones el usuario está obligado a recalibrar sus instrumentos a intervalos apropiados.
Marca	NO INDICA	
Procedencia	NO INDICA	
Número de Serie	1739	
Cantidad	25	
Fecha de Calibración	2013-04-16 al 2013-04-17	

Este certificado de calibración sólo puede ser difundido completamente y sin modificaciones. Los extractos o modificaciones requieren la autorización del Servicio Nacional de Metrología. Certificados sin firma y sello carecen de validez.

	Fecha	Sub Jefe del Servicio Nacional de Metrología	Responsable del laboratorio
	2013-04-17	 HENRY POSTIGO LINARES	 ALDO QUIROGA ROJAS

Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual – Indecopi
 Servicio Nacional de Metrología
 Calle De La Prosa 104, San Borja Lima – Perú / Telf: 2247800 Anexo 1331 ; Fax: Anexo 1264
 email: metrologia@indecopi.gob.pe
 WEB: www.indecopi.gob.pe



Laboratorio de Masa

Certificado de Calibración

LM - 286 - 2013

Página 2 de 4

Método de Calibración

Norma Metrológica Peruana NMP-004-2007 "Pesas de las Clases E1, E2, F1, F2, M1, M1-2, M2, M2-3, M3

Lugar de Calibración

Laboratorio de Masas
Calle de la Prosa 104, San Borja - Lima

Condiciones Ambientales

	INICIAL	FINAL
Temperatura	22,83 °C	23,05 °C
Humedad Relativa	53,3 %	53,3 %
Presión Atmosférica	991 mbar	994 mbar

Patrones de referencia

Trazabilidad	Patrón utilizado	Certificado de calibración
Patrones de referencia del Centro Español de Metrología	PESAS (Clase de exactitud E1)	110478001

Observaciones

Manipular las pesas con cuidado y mantenerlas limpias para evitar la alteración de su masa.
Se ha considerado para la determinación de la masa una densidad : 7 950 kg/m³
Con fines de identificación se ha colocado una etiqueta autoadhesiva de color verde INDECOPI-SNM.
Las pesas con valores nominales desde 1 g hasta 1 kg presentan una grabación que no cumple con el capítulo de MARCADO, establecido en la NMP 004-2007 para pesas de clase E2.



INSTITUTO NACIONAL DE DEFENSA DE LA COMPETENCIA
Y DE LA PROTECCIÓN DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL



Servicio
Nacional de Metrología
Laboratorio de Masa

Certificado de Calibración

LM - 286 - 2013

Página 3 de 4

Resultados de Medición

VALOR NOMINAL	IDENTIF.	MASA CONVENCIONAL	INCERTIDUMBRE	FORMA	MATERIAL	ERROR MÁXIMO PERMITIDO E2
1 mg	--	1 mg + 0,005 mg	0,002 mg	LAMINAR	ACERO INOXIDABLE	0,006 mg
2 mg	--	2 mg + 0,003 mg	0,002 mg	LAMINAR	ACERO INOXIDABLE	0,006 mg
2 mg	(.)	2 mg + 0,006 mg	0,002 mg	LAMINAR	ACERO INOXIDABLE	0,006 mg
5 mg	--	5 mg - 0,002 mg	0,002 mg	LAMINAR	ACERO INOXIDABLE	0,006 mg
10 mg	--	10 mg + 0,005 mg	0,003 mg	LAMINAR	ACERO INOXIDABLE	0,008 mg
20 mg	--	20 mg + 0,007 mg	0,003 mg	LAMINAR	ACERO INOXIDABLE	0,010 mg
20 mg	(.)	20 mg + 0,008 mg	0,003 mg	LAMINAR	ACERO INOXIDABLE	0,010 mg
50 mg	--	50 mg + 0,004 mg	0,004 mg	LAMINAR	ACERO INOXIDABLE	0,012 mg
100 mg	--	100 mg + 0,005 mg	0,005 mg	LAMINAR	ACERO INOXIDABLE	0,016 mg
200 mg	--	200 mg + 0,006 mg	0,006 mg	LAMINAR	ACERO INOXIDABLE	0,020 mg
200 mg	(.)	200 mg + 0,007 mg	0,006 mg	LAMINAR	ACERO INOXIDABLE	0,020 mg
500 mg	--	500 mg + 0,007 mg	0,008 mg	LAMINAR	ACERO INOXIDABLE	0,025 mg
1 g	1739	1 g + 0,014 mg	0,010 mg	CILINDRICA CON BOTON	ACERO INOXIDABLE	0,03 mg
2 g	1739	2 g + 0,013 mg	0,012 mg	CILINDRICA CON BOTON	ACERO INOXIDABLE	0,04 mg
2 g	1739 (*)	2 g + 0,008 mg	0,012 mg	CILINDRICA CON BOTON	ACERO INOXIDABLE	0,04 mg
5 g	1739	5 g + 0,019 mg	0,016 mg	CILINDRICA CON BOTON	ACERO INOXIDABLE	0,05 mg
10 g	1739	10 g + 0,040 mg	0,020 mg	CILINDRICA CON BOTON	ACERO INOXIDABLE	0,06 mg
20 g	1739	20 g + 0,018 mg	0,025 mg	CILINDRICA CON BOTON	ACERO INOXIDABLE	0,08 mg
20 g	1739 (*)	20 g + 0,011 mg	0,025 mg	CILINDRICA CON BOTON	ACERO INOXIDABLE	0,08 mg
50 g	1739	50 g + 0,05 mg	0,03 mg	CILINDRICA CON BOTON	ACERO INOXIDABLE	0,10 mg
100 g	1739	100 g + 0,11 mg	0,05 mg	CILINDRICA CON BOTON	ACERO INOXIDABLE	0,16 mg
200 g	1739	200 g + 0,13 mg	0,10 mg	CILINDRICA CON BOTON	ACERO INOXIDABLE	0,3 mg
200 g	1739 (*)	200 g + 0,17 mg	0,10 mg	CILINDRICA CON BOTON	ACERO INOXIDABLE	0,3 mg
500 g	1739	500 g + 0,73 mg	0,25 mg	CILINDRICA CON BOTON	ACERO INOXIDABLE	0,8 mg
1 kg	1739	1 kg + 0,8 mg	0,5 mg	CILINDRICA CON BOTON	ACERO INOXIDABLE	1,6 mg

NOTA : La caja que contiene a las pesas está identificada con la serie Nro 1739

Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual – Indecopi
Servicio Nacional de Metrología
Calle De La Prosa 104, San Borja Lima – Perú / Telf.: 2247800 Anexo 1331 ; Fax: Anexo 1264
email: metrologia@indecopi.gob.pe
WEB:www.indecopi.gob.pe



Servicio
Nacional de Metrología
Laboratorio de Masa

Certificado de Calibración

LM - 286 - 2013

Página 4 de 4

Incertidumbre

La incertidumbre reportada en el presente certificado es la incertidumbre expandida de medición que resulta de multiplicar la incertidumbre estándar por el factor de cobertura $k=2$. La incertidumbre fue determinada según la "Guía para la Expresión de la Incertidumbre en la Medición", segunda edición, julio del 2001 (Traducción al castellano efectuada por Indecopi, con autorización de ISO, de la GUM, "Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement", corrected and reprinted in 1995, equivalente a la publicación del BIPM JCGM:100 2008, GUM 1995 with minor corrections "Evaluation of Measurement Data - Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement").

La incertidumbre expandida de medición fue calculada a partir de los componentes de incertidumbre de los factores de influencia en la calibración. La incertidumbre indicada no incluye una estimación de variaciones a largo plazo.

Recalibración

Los resultados son válidos en el momento de la calibración. Al solicitante le corresponde disponer en su momento la ejecución de una recalibración, la cual está en función del uso, conservación y mantenimiento del instrumento de medición o a reglamentaciones vigentes.

SERVICIO NACIONAL DE METROLOGÍA - SNM

El Servicio Nacional de Metrología (SNM) fue creado el 6 de Enero de 1983 mediante la Ley N° 23560 y ha sido encomendado al INDECOPI - mediante el Decreto Supremo DS-024-93 ITINCI.

El SNM cuenta con Laboratorios Metrológicos debidamente acondicionados, instrumentos de medición de alta exactitud y personal calificado. Cuenta con un Sistema de Gestión de la Calidad que cumple con los requisitos de las Normas ISO 9001, ISO Guía 34 e ISO/IEC 17025 con lo cual se constituye en una entidad capaz de brindar un servicio integral, confiable y eficaz de aseguramiento metrológico para la industria, la ciencia y el comercio.

El SNM cuenta con la cooperación técnica de organismos metrológicos internacionales de alto prestigio tales como: el Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB) de Alemania; el Centro Nacional de Metrología (CENAM) de México; el National Institute of Standards and Technology (NIST) de USA; el Centro Español de Metrología (CEM) de España; el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) de Argentina; el Instituto Nacional de Metrología (INMETRO) de Brasil; entre otros.

SISTEMA INTERAMERICANO DE METROLOGÍA- SIM

El Sistema Interamericano de Metrología (SIM) es una organización regional auspiciado por la Organización de Estados Americanos (OEA), cuya finalidad es promover y fomentar el desarrollo de la metrología en los países americanos. El Servicio Nacional de Metrología -Indecopi es miembro del SIM a través de la subregión ANDIMET (Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela) y participa activamente en las Inter comparaciones realizadas por el SIM.

Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual – Indecopi
Servicio Nacional de Metrología
 Calle De La Prosa 104, San Borja Lima – Perú / Telf.: 2247800 Anexo 1331 ; Fax: Anexo 1264
 email: metrologia@indecopi.gob.pe
 WEB: www.indecopi.gob.pe



CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN

LB - 014 - 2013

Página 1 de 4

1.- Del Solicitante

Razón Social : Laboratorios Portugal S.R.L.
Dirección : Parque Industrial Río Seco Mza. A' Lte. 2, Cerro Colorado - Arequipa.

2.- Del Instrumento o Equipo a ensayar

Equipo a ensayar :	Balanza	Alcance :	31 g
Fabricante :	Mettler Toledo	División de escala (d) :	0.0001 g
Modelo :	XP105DR	Escala de verificación (e) :	0.001 g
N° de Serie :	B107112658	Coef. Deriva Temp. :	0.00001 1/°C
Identificación :	BAL-006	Tipo :	Electronica
Procedencia :	Suiza	Clase :	I

3.- Del Ensayo

Fecha del Ensayo : 2013-04-23
Lugar del Ensayo : Zona de Pesado - Control de Calidad

4.- Método y Procedimiento de calibración

Para la calibración se ha empleado el método descrito en la Norma Metrológica Peruana MNP 003 - 2009 equivalente a la OIML R76-1, empleando el procedimiento **MET - 008 "Calibración de balanzas de Funcionamiento No Automático clase I y clase II"**.

5.- Declaración de Patrones y Trazabilidad Metrológica

Equipo / Instrumento	Código	Certificado	Trazabilidad
Set de Pesas	JPP - 001	LM - 286 - 2013	SNM - INDECOPI
Termohigrómetro	THM-001	4189-4786294	NIST - USA
Barómetro	BTH - 001	LFP - 660 - 2013	SNM - INDECOPI

6.- Condiciones Ambientales

Temperatura : 22.1 °C
Humedad Relativa : 35 % RH

7.- Aclaraciones

- Los resultados del presente certificados son válidos para el momento y condiciones en los que se realizaron los ensayos correspondientes.
- El presente certificado solo puede ser difundido completamente y sin modificaciones. La reproducción parcial y/o modificaciones requieren la autorización expresa del Área de Metrología de Laboratorios Portugal S.R.L.
- La incertidumbre se ha determinado siguiendo la Guía para la expresión de la Incertidumbre en la Medición GUM.

Sello



Aseguramiento de la Calidad

Director Técnico
Laboratorios Portugal S.R.L.

Q.F. V. Manuela Alvarado Carbajal
C.Q.F.P. 01689

Jefe de Metrología

César A. Prado Arenas



CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN

LB - 014 - 2013

Página 2 de 4

8.- Resultados

Inspección Visual

Ajuste de Cero	Tiene	Escala	No tiene
Oscilación Libre	Tiene	Cursor	No tiene
Plataforma	Tiene	Nivelación	Tiene
Sistema de traba	No tiene		

Ensayo de Repetibilidad

Inicio		Final	
°C	%RH	°C	%RH
22.3	35	22.0	35

Medición N°	Carga L1 = 15000.0 mg			Carga L2 = 31000.0 mg		
	I (mg)	ΔL (mg)	E (mg)	I (mg)	ΔL (mg)	E (mg)
1	15000.08	0.000	0.085	31000.13	0.000	0.135
2	15000.06	0.000	0.065	31000.13	0.000	0.135
3	15000.09	0.000	0.095	31000.11	0.000	0.115
4	15000.07	0.000	0.075	31000.12	0.000	0.125
5	15000.07	0.000	0.075	31000.14	0.000	0.145
6	15000.09	0.000	0.095	31000.10	0.000	0.105
7	15000.06	0.000	0.065	31000.11	0.000	0.115
8	15000.06	0.000	0.065	31000.11	0.000	0.115
9	15000.08	0.000	0.085	31000.11	0.000	0.115
10	15000.09	0.000	0.095	31000.13	0.000	0.135

$E = I + 1/2d - \Delta L - L$

Carga mg	E _{max} - E _{min} mg
15000.00	0.030
31000.00	0.040



Laboratorios Portugal S.R.L.
Área de Metrología
2013-04-23



CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN

LB - 014 - 2013

Página 3 de 4

Ensayo de Excentricidad

Posición de la Carga

2	5
1	
3	4

Inicio		Final	
°C	%RH	°C	%RH
22.1	35	22.2	35

Posición de la Carga	Determinación de E ₀				Determinación de E _c			
	Carga L ₀ * mg	I mg	ΔL mg	E ₀ mg	Carga L mg	I mg	ΔL mg	E mg
1	10.00	10.00	0.000	0.005	10000.00	10000.05	0.000	0.055
2		10.00	0.000	0.005		10000.06	0.000	0.065
3		10.00	0.000	0.005		10000.05	0.000	0.055
4		10.00	0.000	0.005		10000.03	0.000	0.035
5		10.00	0.000	0.005		10000.03	0.000	0.035

Ensayo de Pesaje

Inicio		Final	
°C	%RH	°C	%RH
22.0	35	22.2	35

Carga L kg	Determinación de E ₀				Determinación de E _c			
	I mg	ΔL mg	E mg	E ₀ mg	I mg	ΔL mg	E mg	E _c mg
10.00	10.01	0.000	0.010					
100.00	100.01	0.000	0.010	0.000	100.01	0.000	0.010	0.000
200.00	200.02	0.000	0.019	0.009	200.00	0.000	-0.001	-0.011
500.00	500.02	0.000	0.018	0.008	500.00	0.000	-0.002	-0.012
1000.00	1000.03	0.000	0.021	0.011	1000.02	0.000	0.011	0.001
2000.00	2000.03	0.000	0.022	0.012	2000.05	0.000	0.042	0.032
5000.00	5000.04	0.000	0.026	0.016	5000.05	0.000	0.036	0.026
10000.00	10000.08	0.000	0.045	0.035	10000.07	0.000	0.035	0.025
20000.00	20000.10	0.000	0.087	0.077	20000.09	0.000	0.077	0.067
30000.00	30000.12	0.000	0.067	0.057	30000.13	0.000	0.077	0.067
31000.00	31000.14	0.000	0.073	0.063	31000.14	0.000	0.073	0.063

(*) Carga para determinar E₀

$$E = I + 1/2d - \Delta L - L$$

$$E_c = E - E_0$$



Laboratorios Portugal S.R.L.
Área de Metrología
2013-04-23

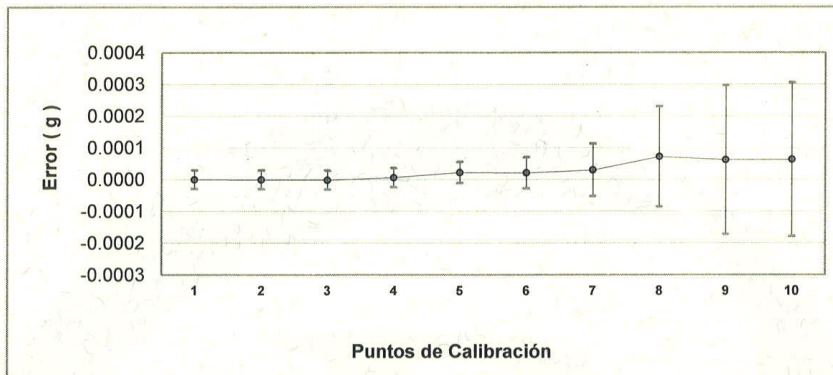


CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN

LB - 014 - 2013

Página 4 de 4

**Gráfica de Errores e Incertidumbres
Ensayo de Pesaje**



Ecuación para corregir la indicación de la Balanza

$$R \text{ corregida} = (R - 0.00000282291 * R) \text{ g}$$

Ecuación de la incertidumbre expandida asociada a la indicación de la balanza, para un factor de cobertura k=2 para un nivel de confianza de aproximadamente el 95%.

$$U_F = 2 * (0.000000000216 + 0.000000000015 * R^2)^{1/2} \text{ g}$$

- I Lectura del Instrumento de Pesaje
- E Error encontrado
- E_o Error en cero
- E_c Error corregido
- L Carga
- R Lectura de uso del Instrumento de Pesaje, en gramos
- U_R Incertidumbre expandida para la lectura en uso R

9.- Observaciones

- Este Certificado de calibración cumple con los requisitos de la norma Metrológica Peruana NTP ISO/IEC 17025:2006, "Requisitos Generales para la competencia de los Laboratorios de Calibración y Ensayo".
- La incertidumbre declarada en el punto 8 del presente documento se refiere a la incertidumbre expandida correspondiente a un factor de cobertura k=2, para nivel de confianza de aproximadamente el 95%.
- Si, debido al uso del instrumento, no es aconsejable aplicar la corrección de la calibración, se puede aplicar una incertidumbre maximizada, que englobe la máxima desviación en valor absoluto:

$$\pm U = \pm (U_{max} + |e_{max}|)$$



Laboratorios Portugal S.R.L.
Área de Metrología
2013-04-23

INFORME DE VERIFICACIÓN 

IV - 0141 - 2013

Página 1 de 2

1.- Del Solicitante

Razón Social : Laboratorios Portugal S.R.L.
Dirección : Parque Industrial Río Seco Mz. A' Lote 2, Cerro Colorado - Arequipa, Arequipa

2.- Del Instrumento o Equipo a ensayar

Equipo a ensayar : Matraz de un solo trazo Capacidad Nominal : 200 ml
Fabricante : Fortuna P&G División de Escala (d) : NA
Modelo : No indica Clase : A
N° de Serie : No indica Temp. de Referencia : 20 °C
Identificación : F200-08 Tipo : In
Procedencia : Alemania Tiempo de Descarga (EX) : No aplica

3.- Del Ensayo

Fecha del Ensayo : 2013-12-30
Lugar del Ensayo : Area de Metrología

4.- Método y Procedimiento de calibración

Para la calibración se ha empleado el método gravimétrico, empleando el procedimiento PC-015 Procedimiento para la calibración de Material Volumétrico de Vidrio, Cuarta edición SNM - INDECOPI.

5.- Declaración de Patrones y Trazabilidad Metrológica



Equipo / Instrumento	Código	Certificado	Trazabilidad
Balanza	BLM-001	B-0035-2013	SNM - INDECOPI
Termómetro	TTM-001	LT-870-2013	SNM - INDECOPI
Termómetro	TTM-002	LT-871-2013	SNM - INDECOPI
Termohigrómetro	THM-001	4189-4786294	NIST - USA
Barotermohigrómetro	BTH-001	LFP-658-2013	SNM - INDECOPI

6.- Condiciones Ambientales

Temperatura : 23.2 °C
Humedad Relativa : 38 % Rh
Presión Atmosférica : 758 MPa

7.- Aclaraciones

- Los resultados del presente certificado son válidos para el momento y condiciones en los que se realizaron los ensayos correspondientes.
- El presente certificado solo puede ser difundido completamente y sin modificaciones. La reproducción parcial y/o modificaciones requieren la autorización expresa del Área de Metrología de Laboratorios Portugal S.R.L.
- La incertidumbre se ha determinado siguiendo la Guía para la expresión de la Incertidumbre en la Medición GUM Segunda Edición SNM - INDECOPI.
- El usuario está en la obligación de recalibrar el instrumento a intervalos adecuados, los cuales deben ser elegidos con base en las características del trabajo realizado y el tiempo de uso del instrumento.
- El Área de Metrología no se responsabiliza de los perjuicios que pueda ocasionar el uso inadecuado de este instrumento, ni de una incorrecta interpretación de los resultados de la calibración aquí declarados.

Sello  Jefe de Metrología

Aseguramiento de Calidad César Prado Arenas

Parque Industrial Río Seco 1ra. Etapa Mz. A' Lote 2 - C. Colorado
Teléfono: (054) 316031 Arequipa - Perú
Los Talladores 402 Ate Vitarte Lima, Perú (01) 435 3470

www.laboratoriosportugal.com
e-mail: labportugal@naturaperu.com

INFORME DE VERIFICACIÓN  Portugal
1864

IV - 0141 - 2013

Página 2 de 2

8.- Resultados

Código	Valor Nominal ml	Volumen Contenido ml	Desviación ml	Incertidumbre ml
F200-08	200	199.9825	-0.0175	0.0161

9.- Observaciones

- Este Certificado de calibración cumple con los requisitos de la norma Metroológica Peruana NTP ISO/IEC 17025:2006, "Requisitos Generales para la competencia de los Laboratorios de Calibración y Ensayo".
- La incertidumbre declarada en el punto 8 del presente documento se refiere a la incertidumbre expandida correspondiente a un factor de cobertura $k=2$, para nivel de confianza de aproximadamente el 95%.
- Si, debido al uso del instrumento, no es aconsejable aplicar la corrección de la calibración, se puede aplicar una incertidumbre maximizada, que englobe la máxima desviación en valor absoluto:

$$\pm U = \pm(U_{max} + |e_{max}|)$$

Laboratorios Portugal S.R.L.
Área de Metrología
2013-12-31



Parque Industrial Río Seco 1ra. Etapa Mz. A¹ Lote 2-C. Colorado
Teléfono: (054) 316031 Arequipa - Perú
Los Talladores 402 Ate Vitarte Lima, Perú (01) 435 3470

www.laboratoriosportugal.com
e-mail: labportugal@naturaperu.com



CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN

V - 0045 - 2013

Página 1 de 2

1.- Del Solicitante

Razón Social : Laboratorios Portugal S.R.L.
Dirección : Parque Industrial Río Seco Mz. A', Lote 2, Cerro Colorado - Arequipa

2.- Del Instrumento o Equipo a ensayar

Equipo a ensayar : Matraz de un solo trazo Capacidad Nominal : 100 ml
Fabricante : Fortuna División de Escala (d) : NA
Modelo : No indica Clase : A
N° de Serie : No indica Temp. de Referencia : 20 °C
Identificación : F100-100 Tipo : In
Procedencia : Alemania Tiempo de Descarga (EX) : NA

3.- Del Ensayo

Fecha del Ensayo : 2013-09-18
Lugar del Ensayo : Área de Metrología - Laboratorios Portugal S.R.L.

4.- Método y Procedimiento de calibración

Para la calibración se ha empleado el método gravimétrico, empleando el procedimiento PC-011 Procedimiento de calibración de Material Volumétrico de vidrio Cuarta Edición SNM - INDECOPI.

5.- Declaración de Patrones y Trazabilidad Metrológica

Equipo / Instrumento	Código	Certificado	Trazabilidad
Balanza	BLM-002	B-490-2012	SNM - INDECOPI
Termómetro	TTM-001	T-675-2012	SNM - INDECOPI
Termohigrómetro	THM-001	4189-4786294	NIST - USA
Termohigrómetro	THM-002	4189-4753249	NIST - USA
Barotermohigrómetro	BTH-001	LFP-660-2012	SNM - INDECOPI

6.- Condiciones Ambientales

Temperatura : 22 °C
Humedad Relativa : 36 % Rh
Presión Atmosférica : 760 MPa

7.- Aclaraciones

- Los resultados del presente certificados son válidos para el momento y condiciones en los que se realizaron los ensayos correspondientes.
- El presente certificado solo puede ser difundido completamente y sin modificaciones. La reproducción parcial y/o modificaciones requieren la autorización expresa del Área de Metrología de Laboratorios Portugal S.R.L.
- La incertidumbre se ha determinado siguiendo la Guía para la expresión de la Incertidumbre en la Medición GUM Segunda Edición SNM - INDECOPI.
- El usuario está en la obligación de recalibrar el instrumento a intervalos adecuados, los cuales deben ser elegidos con base en las características del trabajo realizado y el tiempo de uso del instrumento.
- El Área de Metrología no se responsabiliza de los perjuicios que pueda ocasionar el uso inadecuado de este instrumento, ni de una incorrecta interpretación de los resultados de la calibración aquí declarados.

Sello



Aseguramiento de la Calidad

Director Técnico
Laboratorios Portugal S.R.L.



Q.F. V. Manuela Alvarado Carbajal
C.Q.F.P. 01689

Jefe de Metrología



César A. Prado Arenas



CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN

V - 0045 - 2013

Página 2 de 2

8.- Resultados

Valor Nominal ml	Volumen Contenido ml	Desviación ml	Incertidumbre ml
100	100.0142	0.0142	0.0094

9.- Observaciones

- Este Certificado de calibración cumple con los requisitos de la norma Metroológica Peruana NTP ISO/IEC 17025:2006, "Requisitos Generales para la competencia de los Laboratorios de Calibración y Ensayo".
- La incertidumbre declarada en el punto 8 del presente documento se refiere a la incertidumbre expandida correspondiente a un factor de cobertura $k=2$, para nivel de confianza de aproximadamente el 95%.
- Si, debido al uso del instrumento, no es aconsejable aplicar la corrección de la calibración, se puede aplicar una incertidumbre maximizada, que englobe la máxima desviación en valor absoluto:

$$\pm U = \pm (U_{max} + |e_{max}|)$$
- Se ha colocado una etiqueta autoadhesiva de color blanco con el logotipo de Laboratorios Portugal S.R.L. con la indicación 'Calibrado'.

Laboratorios Portugal S.R.L.
Área de Metrología
2013-09-20

