

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA.  
(UNAN –LEÓN)**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**ESCUELA DE FARMACIA.**



**Desarrollo y Validación para la determinación de Clenbuterol y Ambroxol en jarabe  
por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).**

**Monografía para optar al Título de:  
LICENCIADO QUÍMICO FARMACEUTICO.**

**Autor: Br. Clelia Guadalupe Quiroz Larios.**

**Tutor: Lic. Yader Francisco Sánchez.**

**LEÓN 2004.**

# **AGRADECIMIENTO**

- *At Dios por darme fortaleza y el deseo de luchar por alcanzar todas mis metas.*
- *At mi madre Maria del Socorro Larios por su apoyo y comprensión que me brindo en todo momento.*
- *At mis hermanas por estar conmigo en todo momento y darme su apoyo gracias por ser más que mis hermanas.*
- *At mi tutor Yader Francisco Sánchez por tener mucha paciencia, dedicación y tiempo para la realización de mi monografía.*
- *At Lic. Cesar Martinez por brindarme su constante apoyo y aporte de medios técnicos durante la reproducción de mi monografía.*

# **DEDICATORIA**

- *At mi madre Maria del Socorro Larios por haber estado conmigo en todo momento brindándome comprensión, amor, paciencia y sacrificio para poder culminar mi carrera.*
- *At mis hermanas Ruth Carolina Quiroz y Sayda Lissette Quiroz por apoyarme en mis decisiones y estando siempre unidas como hermanas.*
- *Al Lic. Yader F. Sanchez por ser amigo, por tener mucha paciencia y dedicarme parte de su tiempo.*
- *At todas las personas que de una u otra manera me ayudaron a culminar mi carrera.*

# **INDICE**

<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>3</b>
<b>Marco Teórico.....</b>	<b>5</b>
<b>Material y Métodos.....</b>	<b>25</b>
<b>Resultados y Discusión.....</b>	<b>30</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>47</b>
<b>Recomendaciones.....</b>	<b>49</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>51</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>55</b>



# INTRODUCCIÓN



## Desarrollo y Validación para la determinación de Clenbuterol y Ambroxol en jarabe por HPLC

El Clenbuterol (4-amino-3,5-dicloro- $\alpha$ -tert-butilaminometilbenzil-etanol.HCl) es una droga beta-adrenérgica usada como un agente dilatador bronquial para tratamiento de la deficiencia pulmonar en humanos y animales. Es especialmente usado en el caso del asma crónica, la estructura química esta relacionada con las catecolaminas y puede interaccionar con receptores adrenergicos. (1)

El Ambroxol, 4-[(2-amino-3,5-dibromofenil-metil) amino] ciclohexanol.HCl, es un derivado de la anilina altamente sustituida, metabolito de la Brohmexina la cual también actúa como un agente mucolítico bronquial. (1)

Se han publicado métodos de análisis para la determinación de residuos de Clenbuterol en tejido animal y fluidos corporales, estos incluyen inmunoensayos (2-4), cromatografía líquida de alta resolución con detección espectrofotometría UV (2,4-5), detección electroquímica (6) y cromatografía gaseosa acoplado con espectrofotometría de masa (7-9). Para el análisis de Clenbuterol como materia prima la BP 2002 proporciona los métodos de cromatografía en capa fina para el análisis cualitativo, cromatografía líquida micelar para el estudio de sustancias relacionadas y volumetría en medio no acuoso con detección potenciométrica para el análisis cuantitativo (10).

Se han propuesto dos procedimientos para la determinación de Clenbuterol en preparaciones farmacéuticas usando colorimetría e inyección de flujo con detección fluorimétrica. (11)

Se han reportado métodos de electroforesis capilar en presencia de enantiómeros de Clenbuterol (12) y en presencia de otros analitos (13)

Para la determinación de Ambroxol se han publicado métodos de análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución utilizando Brohmexina como patrón interno (14). En la Farmacopea Mexicana (15) se determina Ambroxol en jarabe por espectrofotometría UV-VIS y por inyección de flujo de pares iónicos con detección espectrofotométrica (16). Se han propuesto métodos de análisis para Ambroxol en Tabletas (17) por HPLC y Espectrofotometría derivativa UV. Para el análisis de Ambroxol como materia prima la BP 2002 (10) proporciona los métodos de cromatografía en capa fina y colorimetría para el análisis cualitativo, cromatografía líquida para el estudio de sustancias relacionadas y volumetría ácido-base con detección potenciométrica para el análisis cuantitativo.

El desarrollo y validación de un método de análisis de Clenbuterol y Ambroxol en jarabe por cromatografía líquida de alta resolución se debe a la ausencia de monografías en las Farmacopeas tales como la Europea, USP, BP, etc. y a la inexistencia de métodos de análisis publicados en revistas periódicas de química analítica y de farmacia suscritas por la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN-León). El producto a analizar es fabricado por el Laboratorio nacional Ceguel.

La metodología de validación se basa en los criterios y recomendaciones proporcionadas por las guías de la FDA (17-21).



# OBJETIVOS



**OBJETIVO GENERAL.**

Desarrollar y validar un método de análisis por cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de Clenbuterol y Ambroxol en jarabe.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- ❖ Desarrollar un método de análisis para la determinación de Clenbuterol y Ambroxol.
- ❖ Demostrar que el método analítico es adecuado para el análisis de Clenbuterol y Ambroxol.
- ❖ Identificar y cuantificar Clenbuterol y Ambroxol en Jarabe.
- ❖ Evaluar los parámetros de validación para la determinación de Clenbuterol y Ambroxol.



# MARCO TEÓRICO



## 1. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE AMBROXOL

Diversos métodos se han utilizado para la determinación de Ambroxol, incluyendo espectroscopia ultravioleta, cromatografía en capa fina, cromatografía líquido-gas en conjunto con captura electrónica, y cromatografía de alta resolución usando detección UV y amperométrico.

### 1.1 Métodos de análisis de Ambroxol por inyección de flujo.

Pérez-Ruiz y col. (16) desarrollaron un método espectrofotométrico acoplado con inyección de flujo para la determinación de Ambroxol en preparaciones farmacéuticas. El método se basa en la formación y extracción de pares iónicos de Ambroxol con colorantes ácidos. Los resultados mostraron que el azul bromotimol y 1,2-diclorometano fue el más efectivo colorante y extractante respectivamente. La absorbancia del extractante orgánico fue máxima y constante en el rango de pH de 3 a 4.2.

### 1.2 Métodos de análisis de Ambroxol por HPLC.

Ferreira y col (14) publicaron un método para la identificación y cuantificación de Ambroxol por HPLC. Ellos utilizaron una columna  $\mu$ Bondapak<sup>TM</sup> C18(10 $\mu$ m)30cmx3.9mm D.I. Se utilizó un patrón interno de Brohmexina. Fue ensayada una elución isocrática de acetonitrilo: metanol: tampón de fosfatos (0,001M) pH 7 (41:41:18) con una velocidad de flujo de 2ml/min. La longitud de onda analítica utilizada es de 254 nm.

Z. Dincer y col. (17) proponen un método de HPLC en fase reversa para el análisis de Ambroxol en tabletas. Utilizan una columna C-18 con la fase móvil de fosfato acuoso (0.01M): acetonitrilo: ácido acético glacial (59:40:1) (pH 3.12) y detección ultravioleta 252nm.

### 1.3 Métodos de análisis de Ambroxol por espectrofotometría.

Z. Dincer y col. (17) desarrollaron un método de espectrofotometría UV de derivadas para la primera derivada y de orden cero.

## 2. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE CLENBUTEROL.

Se han reportado diversos métodos para la determinación de Clenbuterol en matrices biológicas incluyendo radioinmunoensayos, inmunoensayos enzimáticos, GC-MS, HPLC con detección UV, detección con espectrofotometría de masas y detección electroquímica y HPTLC.

Para la determinación de Clenbuterol en preparaciones farmacéuticas se reportó un procedimiento fluorimétrico usando inyección de flujo y un procedimiento calorimétrico. Para la determinación de materia prima la BP 2002 reporta un método por cromatografía líquida micelar, de capa fina y un método volumétrico con detección del punto final potenciométrico.



## 2.1 Determinación de Clenbuterol por HPLC.

Ramos y col.(8) optimizaron un método de cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta a 246nm para el análisis de Clenbuterol en muestra de orina en ganado vacuno. La fase móvil utilizada fue hidrogeno fosfato di-amonio 3,5mM pH =3/ metanol (10:90) con una velocidad de flujo de 1,5 ml/min. La fase estacionaria incluía una precolumna Waters NOVA-PAK C18 y la columna analítica Sherisorb ODS 2, 150 x4,6 mm, 5  $\mu$ m de diámetro de partícula.

Eddins y col. (5) determinaron Clenbuterol en orina de Equino utilizando cromatografía en fase normal. Operaron a una longitud de onda de 222nm e inyectando 20 $\mu$ L. Las columnas HPLC usadas fueron:

- $\mu$ Bondapak enlazada a fase ciano (Waters Associates), con un tamaño de partícula de 10  $\mu$ m, y 30 cm x 3,9-mm de d.i.
- Enlazada a fase ciano (Analytical Systems Inc.), con un tamaño de partícula de 10  $\mu$ m, y 30 cm x 4,4-mm de d.i.

La fase móvil consistió de una solución de isopropanol 30% v/v, y dodecilsulfato de sodio al 0,4% en agua. La solución se ajusto a pH aparente 4,85 con ácido clorhídrico. Las muestras y los estándares fueron cromatografiados usando 2 ml/min a temperatura ambiente.

Posyniak y col. (2) determinaron Clenbuterol utilizando las siguientes condiciones cromatográficas: Columna LiChrospher 100 RP-8 (250 mm ,4 mm) con la fase móvil 0.025 nM ácido ortofosfórico: ACN (70:30), la lectura se efectuó a 240 nm, el volumen de inyección de 100  $\mu$ l y con la velocidad de flujo de 1.0 ml min<sup>-1</sup>

X. Z. Zhang y col. (6) determinaron Clenbuterol en hígado de cerdo por Cromatografía líquida de alta resolución con un sistema de detección de electroquímico debido a que el contiene un grupo electroactivo amino aromático. El Clenbuterol fue analizado por HPLC en la modalidad de fase reversa usando la columna Hypersil ODS (150 mmx4mm i.d. y de tamaño de partícula de 5 $\mu$ m, Hewlett-Packard, USA). Se utilizo una guarda columna (Hypersil, 5 $\mu$ m, Alltech Associates Inc. USA) para proteger la columna analítica.

El componente A de la fase móvil es 50 mM ácido fosfórico-30 mM trietilamina y el pH se ajusto a 4,0 con solución de hidróxido de sodio 2M. La fase móvil del componente B es acetonitrilo: metanol en la proporción de 45:30 (v/v). La mezcla de los componentes A y B 80:20 (v/v) se utilizo como fase móvil en el método a una velocidad de flujo de 0,8 ml/min y un volumen de inyección de 20  $\mu$ L. El tiempo de retención obtenido es de 8,1 min.

El pH de la fase móvil tiene efecto sobre el factor de retención y la altura del pico del Clenbuterol. El factor de retención del Clenbuterol aumenta con el incremento del pH, pero la altura del pico del Clenbuterol disminuye continuamente a pH menores y mayores de 4, por ello la máxima sensibilidad del sistema la realizaron a pH 4.0.



Las muestras del tejido fueron pretratadas usando una extracción líquido-líquido con dietileter y la fase orgánica fue evaporada a sequedad. El residuo fue disuelto en la fase móvil. Los resultados de los experimentos iniciales demuestran que la eficiencia de la extracción varía con el pH. La eficiencia de extracción es mayor del 70% cuando el rango del pH es de 11,1 a 11,8 y el punto de mayor extracción es a pH 11,6. Cuando el pH fue ajustado a pH 10,8 la eficiencia de extracción disminuyó al 53%. Y cuando el pH fue modificado a 13,5 se presentaron dificultades para encontrar el Clenbuterol. Se escogió el pH de  $11,6 \pm 2$  como el valor óptimo.

## **2.2 Determinación de Clenbuterol por fluorimetría.**

C. López-Erroz y col.(11) determinan Clenbuterol usando la metodología de inyección de flujo y detección fluorimétrica. El método se basa en la reacción de derivatización del grupo amino primario con los reactivos o-ftaldehído (OPA) y 2-mercaptoetanol (ME) dando un producto fluorescente. El procedimiento propuesto fue aplicado con excelentes resultados en la determinación de la droga en preparaciones farmacéuticas comerciales.

## **2.3. Determinación de Clenbuterol por colorimetría**

El método se basa en la reacción de Clenbuterol con nitrito de sodio, sulfamato de amonio y el reactivo N-naftiletilendiamina, para formar un compuesto coloreado con un máximo de absorción a 545 nm. (11)

## **3. VALIDACIÓN.**

Según el glosario de las GMP de la Unión Europea (23), validación es la “obtención de pruebas con arreglo a las Normas de Correcta fabricación, de que cualquier procedimiento, proceso, equipo, material, actividad o sistema produce en realidad el resultado previsto.”

Para B. Rossi (24) “la validación es la presentación de pruebas documentadas que demuestran que un proceso particular responde a una serie de especificaciones o directrices elaboradas por entidades reguladoras”.

Se define validación de un método analítico como el proceso mediante el cual se establece por medio de estudios de laboratorio que las características representativas del método analítico cumplen con las especificaciones para su aplicación. (25).

### **3.1 Parámetros para la validación de métodos HPLC para drogas.**

Según la USP XXVI los métodos analíticos se clasifican en varias categorías para su validación (26). Los métodos que son objeto de estudio en el presente trabajo pertenecen a la categoría I y se clasifican como "métodos cuantitativos para la determinación del principio activo como materia prima o en formulaciones farmacéuticas". Los parámetros de



validación que se deben considerar varían según los requisitos legales exigidos por distintas organizaciones. Según la literatura consultada (20,25-26), para este tipo de métodos deben de evaluarse la linealidad, la sensibilidad, la exactitud, la precisión, la selectividad. En el estudio, sin embargo se ha incluido el límite de cuantificación por las concentraciones a nivel de microgramos/mL del Clenbuterol en el jarabe.

### **3.2 SELECTIVIDAD.**

La selectividad es la capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultánea o separadamente los analitos de interés, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que puedan estar presentes en la muestra. (21,25-26).

#### **3.2.1 Ámbito de aplicación.**

El estudio de la selectividad es uno de los parámetros de mayor importancia dentro de la validación de un método analítico. Atendiendo a criterios técnicos, se deberá establecer, en cada caso, hasta que punto se debe buscar interferencia (con excipientes, impurezas y productos de degradación), debido a la imposibilidad de reflejar todas las situaciones y consideraciones posibles.

Las conclusiones de los estudios de selectividad están vinculadas al origen de la muestra, la optimización de la preparación, la especificidad de la medida y las condiciones instrumentales. Por tanto cualquier cambio en las mismas supone una reconsideración del estudio realizado.

#### **3.2.2 Determinación cuantitativa de un compuesto o riqueza de un principio activo.**

El método debe evitar la interferencia de excipientes, productos de degradación y/o impurezas en la respuesta proporcionada por el compuesto o el principio activo objeto de la evaluación analítica.

#### **3.2.3 Procedimiento para la determinación de la selectividad.**

En el estudio de la selectividad se comparan los resultados del análisis de muestras con y sin analito en presencia o ausencia de impurezas, productos de degradación, sustancias relacionadas y/o excipiente.

Se pueden plantear diferentes alternativas para proceder a la demostración documental de la selectividad del método.

Uno de los procedimientos para determinar la selectividad es la aplicación de técnicas confirmatorias con muestras sometidas a estrés para generar los compuestos potencialmente interferentes.

Este tipo de estudio adquiere especial importancia para los métodos en que se desea evaluar la estabilidad de un principio activo o forma farmacéutica. Se debe comprobar, a ser posible, la identidad del analito y que la señal proviene solo de él.



Las condiciones de estrés para lograr una degradación del orden del 10-20% en la mayoría de principios activos son calor (40-70°C), luz y humedad relativa (85%).

Las condiciones para la materia prima son las siguientes:

- Calor (40°C a 100°C).
- Luz
- Ácido (HCl 0.1N)
- Base (NaOH 0.1N)
- Oxidante (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3%)

Los productos así tratados son analizados y se evalúa la pureza cromatográfica y su resolución respecto a los picos más próximos.

La siguiente tabla indica los criterios de aceptación recomendables (21).

Parámetro	Criterio de aceptación propuesto
Capacidad de discriminación del procedimiento	El método ha de permitir distinguir entre todas las especies químicas que puedan generarse.
Resolución cromatográfica entre picos cercanos	Mayor de 1.5 (>2)
Factor de cola cromatográfico	< de 2
Numero de platos teóricos cromatográficos	>2000
Identidad del pico cromatográfico	Pureza del pico, ausencia de coelución.

### 3.4 LINEALIDAD Y RANGO.

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido.

El rango se define como 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.

En la especialidad farmacéutica los límites de especificaciones suelen establecerse entre el 95% a 105% a liberación, 90% a 110% a caducidad, respecto al valor nominal.

Debido a esto se suele evaluar la linealidad de los métodos en un rango más amplio, la ICH recomiendan del 80%-120%.



### 3. 4.1 Procedimiento para la determinación de la linealidad.

1. Dentro del rango establecido se recomiendan estudiar al menos cinco niveles de concentración y analizarlos por triplicado.
2. Para realizar los análisis se recomienda hacer pesadas independiente, ya que así se elimina el posible error sistemático que se podría arrastrar partiendo de una sola pesada y realizando diluciones.
3. El número de repeticiones de cada muestra dependerá de la presión del sistema instrumental empleado y de lo que se decida incluir como rutina en el procedimiento analítico a validar.

Con el resultado del estudio de linealidad se prepara una tabla relacionando las cantidades o concentraciones  $x$  (variable dependiente o predictiva) y la respuesta  $y$  (variable dependiente, por ejemplo áreas, alturas, etc). La relación entre ambas variables se expresa matemáticamente como una recta de regresión del tipo  $y=b*x + a$ , obtenida por un método de ajuste, por lo general el de mínimo cuadrados. (Ver Anexo 1)

Si la recta no pasa cerca del origen de coordenadas significa que el método a evaluar esta afectado por un error sistemático, por defecto o por exceso en el intervalo estudiado.

La evaluación estadística de la linealidad se presenta en el anexo 1.

Los test estadístico relacionados con la linealidad de carácter obligatorio son los siguientes:

- ❖ Ecuación de la recta de regresión.
- ❖ Representación grafica de la recta de regresión y de los resultados experimentales.
- ❖ Coeficiente de correlación,  $r$  y de determinación  $r^2$ .
- ❖ Característica de la variancia residual.
- ❖ Análisis de la variancia (significación de la pendiente y linealidad) comprobando los supuestos de homogeneidad de variancia y normalidad de residuales.

El test de proporcionalidad 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.

### 3.5 PRECISIÓN.

Expresa 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 prescritas.

El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad o el más-menos del método de ensayo. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todos métodos de ensayos. Como consecuencia de la existencia de estos errores, los análisis efectuados sobre muestras idénticas, en las mismas circunstancias no conducen generalmente a resultados idénticos. Los factores susceptibles de influir sobre los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados (analista, equipo instrumental, reactivo y tiempo), de aquí la importancia del estudio de la precisión.



La precisión engloba diferentes tipos de estudios.

1. Repetibilidad
  - 1.1 Repetibilidad instrumental
  - 1.2 Repetibilidad del Método
2. Presión Intermedia
3. Reproducibilidad

En el documento solo nos vamos a referir a la Repetibilidad.

### **3.5.1 Repetibilidad.**

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en la misma condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos, etc), en un mismo laboratorio y en un período de tiempo corto.

### **3.5.2 Repetibilidad del sistema instrumental.**

Este parámetro estudia la variabilidad debida únicamente al instrumento, y se determina analizando repetidamente una misma muestra de forma consecutiva de 6 a 10 veces.

Se evalúa mediante el cálculo del coeficiente de variación de los resultados obtenidos tras el análisis de una serie de replicados de una muestra. La USP XXVI establece como criterio un coeficiente de variación igual o inferior al 2% en la inyección de 5 replicados (o realizarlo sobre 6 replicados si el requerimiento es superior al 2%).

### **3.5.3 Repetibilidad del método.**

El ensayo de Repetibilidad del método se efectúa sobre una serie de alícuotas de una misma muestra que se analiza independientemente desde el principio (preparación de muestra) hasta el final (lectura de resultados) por el mismo instrumento y el mismo analista.

Se proponen dos alternativas para realizar este estudio:

- Un mínimo de 6 muestra a la concentración nominal.
- Un mínimo de 3 muestras a 3 niveles de concentración cubriendo el intervalo especificado (un total de 9 muestras).

La estimación de la Repetibilidad del método se realiza con el cálculo del coeficiente de variación de las muestras obtenidas y con los intervalos de confianza a cada nivel de concentración estudiado.

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



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

Donde:

s = es la desviación estándar.

$\bar{x}$  = es media aritmética de los resultados.

Según Camacho y col, (21), el CV (%) máximo aceptable para un intervalo de aceptación viene dada por la ecuación:

$$CV = |100 - LA| * \frac{\sqrt{n}}{Z}$$

Donde:

LA = valor límite aceptado.

n = número de replicados que deben de hacerse en el análisis.

$Z(\alpha = 0,01) = 2,58$ .

Para un intervalo de aceptación del 80% al 110% se tiene un CV del 13,4% y 6,7 (n=3) para las concentraciones respectivas.

Los intervalos de confianza se calculan a partir de:

Para resultados individuales

$$\bar{x} \pm t * s$$

Para resultados promedios:

$$\bar{x} \pm t * \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Donde

t = es el valor de la t Student de tablas para n-1 grados de libertad y  $\alpha = 0,05$ .

n = es el número de análisis.

s = es la desviación estándar.

$\bar{x}$  = es media aritmética de los resultados.



### 3.6. EXACTITUD.

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado.

#### 3.6.1 Procedimiento de determinación de la exactitud.

La exactitud debe de mostrarse en todo el rango especificado para el método analítico. Se recomienda un mínimo de nueve determinaciones sobre tres niveles de concentraciones diferente del analito que cubra el rango especificado. En función del tipo de método a validar de cada caso concreto se deberá tener en cuenta el rango de concentración de trabajo.

Para los ensayos de riqueza de un principio activo en materia prima o en producto acabado se recomienda determinar la exactitud en el rango de concentración de trabajo del 80 a 120 %.

La exactitud se expresará como porcentaje de recuperación en la valoración de una cantidad conocida de analito añadida sobre la muestra o como la diferencia entre la media obtenida y el valor aceptado como verdadero juntos a los intervalos de confianza.

$$\text{Porcentaje de recuperación (R)} = \frac{X_m}{\mu} * 100$$

$$\text{Diferencia} = X_m - \mu$$

Donde:

$X_m$ : valor medio hallado.

$\mu$ : valor aceptado como verdadero.

#### 3.6.2 Criterio de aceptación.

Los valores orientativos aceptable en la industria farmacéutica en formulados farmacéuticos debe de ser del 97.0% a 103.0% recuperado. A nivel de trazas (0.1-10 ppm) el coeficiente de recuperación debe de ser como mínimo del 90%.(22).

Los valores orientativos aceptables según la AOAC (Asociación oficial de Químicos Analíticos), en función de la concentración del analito (27), a nivel del factor de concentración desde 100ppb a 10000 ppb es del 80-110%.



### 3.7 LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.

#### 3.7.1 Límite de Detección.

Se puede describir el límite de detección (LD) de un analito como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento y significativamente diferente de la señal de una muestra en blanco o señal de fondo.

Una definición (28) que se utiliza comúnmente en química analítica es: la cantidad de concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco, y  $y_B$  mas tres veces la desviación estándar del blanco,  $s_B$ .

$$y - y_B = 3s_B$$

Donde:

$y_B$  = es la señal del blanco.

$s_B$  = la desviación estándar del blanco.

Dado un método analítico determinado, se entiende por límite de cuantificación (LC) de dicho método, la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo las condiciones experimentales descritas, con una adecuada precisión y exactitud; y por límite de detección la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar bajo dichas condiciones experimentales (19).

$$y - y_B = 10s_B$$

#### 3.7.2 Límite de Cuantificación.

Una prueba de idoneidad del sistema también puede ser útil para confirmar la consecución de un determinado límite de cuantificación o de detección, con el fin de comprobar la capacidad de cumplimiento con la función para el cual se ha establecido, por ejemplo para analizar bajos niveles de impurezas.

#### 3.7.1 Método basado en la relación señal/ruido.

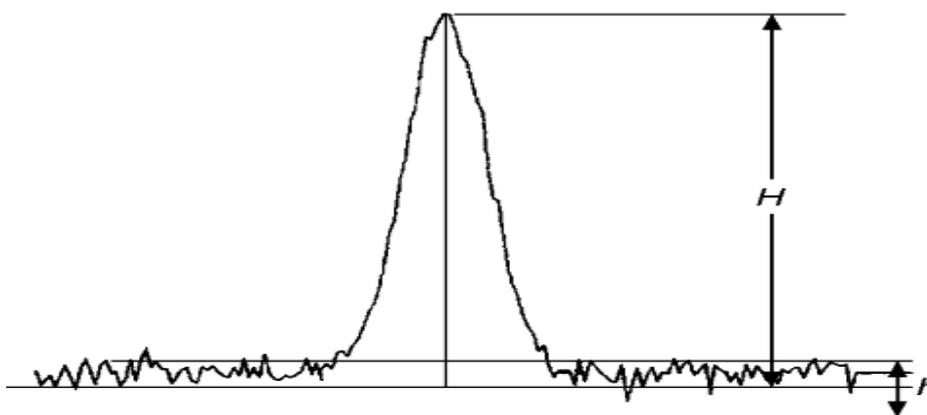
Este método, uno de los más conocidos y empleados, requiere que el procedimiento de análisis sea instrumental y que proporcione una señal blanco, un ruido de fondo o una línea de base, es decir una señal residual a concentración cero de analito. Es el caso de métodos instrumentales tan empleados en el campo químico-farmacéutico como la espectrofotometría UV visible o la cromatografía de gases o líquida (HPLC).

Cuando el método de análisis se basa en alguna de estas técnicas, puede establecerse el límite de detección y cuantificación de forma teórica mediante el siguiente procedimiento:



Se establece una señal ruido que proporciona un blanco o placebo (matriz de la muestra conteniendo todos los ingredientes a excepción del analito a estudiar) a partir del análisis reiterado de dicho blanco (se recomienda un mínimo de 6-10 análisis consecutivos). Para métodos cromatográficos el LC será igual a la concentración de analito que proporcione una señal 10 veces superior al ruido de fondo, y que el LD será igual a la concentración de analito que proporcione una señal 3 veces superior a este.

Resulta evidente que una vez establecida esta concentración no se puede escapar a la comprobación experimental de que el análisis de muestras conteniendo la concentración de analito correspondiente al LD y LC teóricos conducen a los resultados esperados, y para ello se prepararan un número adecuado de muestras (habitualmente un mínimo de 6) a dichas concentraciones y se analizaran de forma que puedan obtenerse los datos para calcular la precisión y la exactitud en el LC, tal y como recomienda la guía tripartita ICH, Q2B.



### 3.8 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 de 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 factores a evaluar en cualquier método de análisis pueden ser tantos factores cuantitativos (ej Influencia del valor de pH, del valor de temperatura, porcentaje de componente orgánico en una fase móvil HPLC, etc.) como cualitativos (ej. Fabricante de la columna cromatográfica, fabricante de un determinado reactivo, etc.). Los factores más comúnmente evaluados en técnica analítica HPLC son:



- Composición de la fase móvil.
  1. Porcentaje de orgánico.
  2. Concentración de sales en el tampón (fuerza iónica)
  3. Concentración de aditivos (ej. aminos)
  4. En gradientes. Composición inicial y final de la fase móvil y pendiente del gradiente.
  
- Volumen de inyección.
- pH de la fase de la fase móvil.
- Temperatura de la columna.
- Flujo.
- Tipo de columna:
  1. Fabricante de la fase estacionaria.
  2. Lote de columna.
  3. Antigüedad de la columna.
  
- Detector: Variación de longitud de onda (UV).
- Sensibilidad de integración.

Una vez definido los factores que pueden influir en el análisis se ha de fijar entre que márgenes de variación se quiere evaluar.

La forma más eficaz de estudiar a Robustez es efectuar un diseño factorial. Normalmente se utilizan dos tipos de diseños factoriales.

- Diseños factoriales completos y fraccionados.
  
- Diseños de Plackett-Burman y de Youden-Steiner.

### **3.9 IDONEIDAD DEL SISTEMA.**

El test de idoneidad del sistema consiste en un conjunto de ensayos que permiten comprobar en el momento de utilización del método, que el sistema, (analista, reactivos, e instrumental) es adecuado para llevar a cabo la determinación para la que se ha establecido y validado dicho método. Por lo tanto, el test de idoneidad del sistema se ha de entender como parte integrante del procedimiento de análisis y requisito previo a su realización.

#### **3.9.1 Procedimiento de determinación de la idoneidad.**

El test de idoneidad del sistema debe encontrarse vinculado de forma directa a las características del método analítico para el que se estableció, ya que debe reflejar su viabilidad en el momento de emplearlo.

Los ensayos de idoneidad del sistema que se establezcan vendrán por el conocimiento adquirido del método y la viabilidad de su empleo en rutina debiendo



corresponderse con los valores mínimos para los que los parámetros estudiados permanecen dentro de las especificaciones establecidas.

Estos ensayos no solo demuestran que el sistema se encuentra en perfectas condiciones para realizar el análisis sino que también permiten establecer el criterio por el que modificar las condiciones analíticas descritas en el procedimiento con el fin de alcanzar la idoneidad. Estas modificaciones se encontraran siempre dentro de unos límites establecidos durante el estudio de Robustez.

El procedimiento de realización del test de idoneidad, así como sus criterios de aceptación deben encontrarse perfectamente establecidos dentro del método de análisis, indicando las acciones a realizar en caso de no cumplirse.

### 3.9.2 Parámetros de evaluación.

Los parámetros de evaluación de los ensayos de idoneidad se pueden agrupar en tres categorías.

- Precisión.
- Parámetros cromatográficos.
  1. Factor de capacidad ( $k'$ )
  2. Numero de platos teóricos (N)
  3. Factor de asimetría o de cola (F)
  4. Resolución (Rs)
- Límites de detección o cuantificación.

La precisión instrumental se comento en el apartado 3.5, y la de Límites de Identificación y Cuantificación en el apartado 3.7, de aquí en adelante solo nos vamos a referir los parámetros cromatográficos.

### 3.9.3 Parámetros cromatográficos.

#### a) Factor de capacidad $k'$ .

El factor de capacidad, también definido como relación de distribución de masa (D), se interpreta como el número de volúmenes de fase móvil necesarios para eluir un compuesto después del volumen inicial contenido en la columna ( $t_0$ ). Este factor determina la retención de un soluto y puede ser calculado como.

$$k' = \frac{tr - t_0}{t_0}$$



Donde:

$t_0$  : tiempo en el que un compuesto no retenido pasa por el interior del sistema.

$t_R$  : tiempo de retención del compuesto considerado.

Valores bajos de  $k'$  indican que el pico eluye muy próximo al frente de solvente, pudiendo verse comprometida la selectividad. Son recomendables valores de  $k'$  superiores a 1 consiguiéndose una óptima resolución con valores mayores de 2.

### b) Número de platos teóricos (N).

El número de platos teóricos es una medida de la eficacia del sistema cromatográfico, que expresa el número de picos que puedan aparecer en el cromatograma por unidad de tiempo y, por lo tanto, de la capacidad del sistema de proporcional bandas de elusión estrechas.

El cálculo del número de platos teóricos se basa en la relación entre el tiempo de retención y la anchura del pico cromatográfico pudiendo emplearse distintas fórmulas como:

\* Farmacopea Europea y Japonesa (Opcional en USP integradores electrónicos).

$$N = 5.54 * \left( \frac{R_t}{w} \right)^2$$

Donde:

$R_t$  = Tiempo de retención.

$W$  = Anchura de pico al 50% de la altura.

\* USP.

$$N = 16 * \left( \frac{R_t}{W} \right)^2$$

Donde:

$R_t$  = El tiempo de retención.

$W$  = La anchura del pico en la línea de base determinado por la tangente ajustada a un % de la altura del pico.



Los parámetros sobre los que se puede incidir para modificar el número de platos teóricos son la columna o soporte (longitud, calidad, tamaño de partícula) y las diversas condiciones Cromatográficas definidas en el método (temperatura, flujo, fase móvil, etc.)

El número de platos teóricos depende del tiempo de elusión pero en general se recomienda que sea superior de 2 000. Este parámetro tiene especial interés en las pruebas de idoneidad del sistema donde existe un solo pico de interés dentro del cromatograma y en el estudio de trazas como complemento a la comprobación del límite de detección.

**c) Factor de asimetría o de cola.**

Factor de asimetría o de cola es una medida de la señal generada por el que existen varias fórmulas de cálculo que toman la anchura de ambos lados del pico a distintas alturas, siendo la más habitual en las farmacopeas.

$$T = \frac{W_{0.05}}{2F}$$

Donde:

$W_{0.05}$  = Anchura de pico al 5% de la altura del pico.

F = Distancia entre la perpendicular trazada desde el máximo del pico y el frente al 5% de la altura del pico.

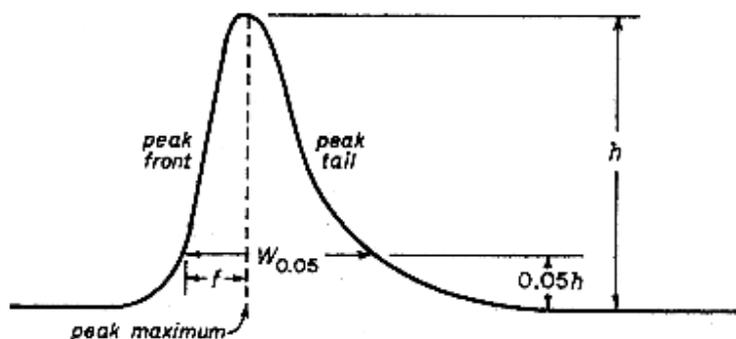


Fig. Determinación del factor de asimetría según la USP 26.

Como norma general el factor de asimetría debería encontrarse entre 0.8 y 1.5, aunque pueden aceptarse valores de hasta 2.0

Las señales simétricas son preferibles porque minimizan las imprecisiones en la detección del inicio y el final del pico por parte de los sistemas de integración. Por tanto, permite una mejor y más precisa cuantificación del área bajo la curva.



#### d) Resolución.

La resolución es la medida de la separación entre dos picos. Este parámetro resulta muy útil para controlar el comportamiento de posibles interferencias. La fórmula de cálculo para la resolución es:

$$R = C * \frac{t_{R1} - t_{R2}}{W_1 - W_2}$$

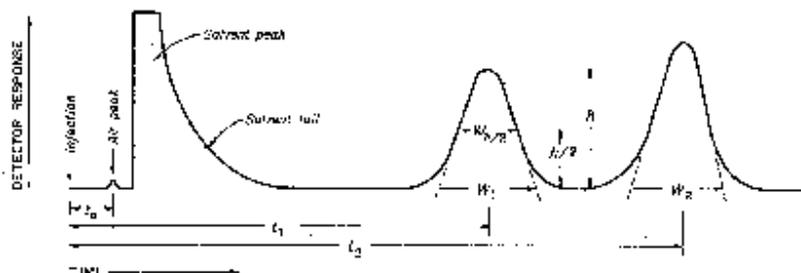
Donde:

$t_{R1}$  y  $t_{R2}$  =Tiempo de retención (tiempo de ilusión del máximo del pico medido el inicio de la inyección),  $t_{R1} < t_{R2}$ .

C= Constante cuyo valor varia según el criterio con el que se mida la anchura de pico.

$W_1$  y  $W_2$  =Anchura del pico a media altura, C=1.18 (EP y JP)

$W'_1$  y  $W'_2$  =Anchura del pico por tangentes, C=2.0 (USP).



#### 4. CROMATOGRAFÍA LIQUIDA.

La cromatografía (29-33) agrupa un conjunto importante y diverso de métodos, que permite a los científicos separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible en otros medios. En todas las separaciones cromatográficas la muestra se disuelve en una fase móvil que puede ser un gas, un líquido, o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible, la cual se mantiene fija en una columna o sobre una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son retenidos con fuerza por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil. Por el contrario los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad los componentes de la muestra se separan en bandas discriminadas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente.



#### 4.1 Cromatografía de reparto.

La cromatografía se puede subdividir en cromatografía líquido-líquido y cromatografía de fases unidas químicamente. La diferencia entre estas técnicas radica en la forma en que se retiene la fase estacionaria sobre las partículas soporte del relleno.

En líquido-líquido, la fase estacionaria líquida se retiene sobre la superficie del soporte por absorción física. En la fase unida químicamente, la fase estacionaria se une químicamente a la superficie del soporte.

#### 4.2 Columnas para cromatografía de fase unida químicamente.

En cromatografía de reparto, los soportes para casi todos los rellenos de fases unidas químicamente se separan con sílice rígida o composiciones constituidas básicamente por sílice. Estos sólidos están formados por partículas mecánicamente resistentes, porosas y uniformes, con diámetros de 3.5 a 10  $\mu\text{m}$ . La superficie de la sílice totalmente hidrolizada (hidrolizada por calentamiento con HCl 0.1 M durante unos o dos días) está constituida por grupos silanol químicamente reactivos. Es decir, la superficie de sílice característica contiene cerca de  $8\mu\text{mol}/\text{m}^2$  de grupos OH.

Los recubrimientos de fase enlazada más utilizados son los siloxanos, que se forman por reacción de la superficie hidrolizada con un organoclorosilano.

El recubrimiento de la superficie por sililación se limita a  $4\mu\text{mol}/\text{m}^2$  o menos a causa de los efectos estéricos. Los grupos SiOH que no han reaccionado, desafortunadamente proporcionan una polaridad indeseable a la superficie, lo que origina picos cromatográficos con cola en especial con los solutos básicos. Para deducir este efecto, los rellenos de siloxanos muchas veces se desactivan por **un proceso de bloqueo** mediante reacción con clorotrimetilsilano, el cual, debido a su pequeño tamaño, puede unirse químicamente a muchos de los grupos silanol que no habían reaccionado.

### 5. FASE INVERSA

En la cromatografía en fase inversa, la fase estacionaria es no polar, con frecuencia se trata de un hidrocarburo, y la fase móvil es relativamente polar (como el agua, metanol o el acetonitrilo), en los métodos en fase inversa, los componentes más polares aparecen primero, y un aumento de la polaridad de la fase móvil aumenta el tiempo de elusión.

#### 5.1 Fases de utilización más frecuente en la fase inversa.

Octil	=	$\text{Si}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$	$\text{C}_8$
octadecil	=	$\text{Si}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$	$\text{C}_{18}$



## 5.2 Características de cromatografía de fase reversa.

FASE REVERSA	
Polaridad de la fase estacionaria.	Bajo
Polaridad de la móvil.	Medio alto
Fase móvil prototipo	CH <sub>3</sub> OH/H <sub>2</sub> O
Orden de elusión	Primero el más polar.
Incremento del tiempo de retención.	Incremento de la polaridad de la fase móvil.

## 5.3 Fase móvil.

En la cromatografía sobre fase inversa con fases enlazadas, la fase móvil más habitual es la mezcla de agua con un disolvente miscible y menos polar, como metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, etc. El agua es un disolvente más débil, y origina los mayores tiempos de retención.

La elección del componente menos polar de la fase móvil depende de diversos factores, principalmente de la solubilidad de la muestra, compatibilidad fase móvil-muestra-detector, viscosidad de la fase móvil y eficacia del equipo utilizado.

Debe elegirse una fase móvil en la cual se disuelva fácilmente la muestra. Si se realiza la detección en el UV lejano, la fase móvil debe tener una baja Absortividad molar en el UV en la zona de detección.

## 5.4 Parámetros de solubilidad y polaridad.

SOLVENTE	$\delta, \text{Pa}^{1/2} * 10^{-3}$	P'
Acetonitrilo	23.9	5.8
Metanol	29.4	5.1
Agua	47.8	10.2

## 5.5 Cromatografía de pares iónicos.

La cromatografía de pares iónicos (o de formación de parejas de iones) es un tipo de cromatografía de reparto en fase inversa que se utiliza para la separación y determinación de especies iónicas. En la cromatografía de pares iónicos la fase móvil esta constituida por una disolución tampón acuosa que contiene un disolvente orgánico como metanol o acetonitrilo, y un compuesto iónico que aporta un contra ión de carga opuesta al analito.



Un contra ión es un ión que se combina con el ión del analito para formar una pareja de iones, que es una especie neutra que es retenida por el relleno de fase inversa. La elusión de los pares iónicos se consigue mediante una disolución acuosa de metanol o de otro disolvente orgánico soluble en agua.

Las aplicaciones de la cromatografía de pares iónicos con frecuencia se superponen con las de la cromatografía iónica.

### 5.6 Modo de separación en cromatografía iónica.

Los diferentes modos de separación para moléculas orgánicas de interés farmacéutico por cromatografía de intercambio iónico en fase reversa se resumen a continuación.

	<b>PARES IÓNICOS</b>	<b>SUPRESIÓN IÓNICA</b>
Tipo de columna	Sílica C-18, 12.5-25cm	Sílica C18. 12.5-25cm
Fase móvil	Buffer + reactivo de par iónico o buffer + modificador orgánico + reactivo de par iónico.	Buffer + modificador orgánico.
Rango de pH	2-8	2-8
Cambio de retención	pH o naturaleza/concentración del par iónico o naturaleza /concentración del modificador o tipo buffer/ concentración.	Naturaleza o pH/ concentración del buffer o modificador orgánico.



# MATERIAL Y MÉTODOS



**Tipo de Estudio:** Experimental.

**Area de Estudio:** El estudio se realizo en el Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos

**Población de Estudio:** 1200 frascos de Jarabe de Neumosan Compuesto producidos en el laboratorio Nacional Ceguel y un Laboratorio extranjero (producto de referencia).

**Muestra:** 10 frascos de Neumosan Compuesto (Lote 013034) proporcionado por Laboratorio Ceguel S.A e igual cantidad para Mucosolvan Compuesto (Lote 954660) de Laboratorio Boehringer Ingelheim.

**Unidad de Análisis:** Jarabe de Neumosan Compuesto.

**Plan de Análisis:** El análisis de datos se realizo a través del programa EXCEL XP presentando la información a través de cuadros y cromatogramas.

❖ **Reactivos.**

El Acetonitrilo, Metanol y Trietilamina, grado HPLC, se obtuvo de Fisher Scientific.

El Hidróxido de Sodio y Peróxido de Hidrógeno al 30%, grado reactivo, producidos por Laboratorios Merck.

El Ácido Clorhídrico, grado reactivo de JT Baker.

Agua producida por el sistema de destilación Classic Electrically Heated Stills.

Estándares de Clorhidrato de Clenbuterol y Ambroxol es proporcionada por el Laboratorio Ceguel de Nicaragua.

❖ **Muestra**

Numosan Compuesto (Lote: 013034) proporcionado por Laboratorio Ceguel S.A.

Mucosolvan Compuesto (Lote: 954660) de Laboratorio Boehringer Ingelheim

❖ **Equipos.**

Cromatógrafo Líquido con detector UV de longitud de onda variable: (Hewlett Packard Series 1100) acoplado a una computadora y controlado con el software ChemStation.

Balanza Analítica: (A&D-182A)

pH-metro (Fisher Accumet Model 230A)

❖ **Material volumétrico y otros.**

Balón clase A de 100ml  $\pm 0.08$ ml (Pirex)

Balón de 25 $\pm 0.03$ ml (Pirex)

Pipetas de 1ml y de 5ml (Pirex)

Probeta de 100ml (Pirex)

Beaker 100ml (Pirex)

Espátula

Vidrio Reloj



Papel de Aluminio (Diamond)

Filtros Econofilter 25/0,2  $\mu\text{m}$  N/L. (Agilent Technologies)

Jeringas de 10 mL para filtrar las muestras y los estándares (Agilent Technologies).

Jeringas de 100  $\mu\text{L}$  para introducir las muestras y los estándares (Agilent Technologies).

#### ❖ Condiciones del método cromatográfico.

Se utilizó el Cromatógrafo Líquido (Hewlett Packard Series 1100), equipado con un detector UV G1314A, de longitud de onda variable. El control del cromatógrafo líquido, la adquisición de los datos y la integración de los picos fue desarrollado por el sistema Chem Station instalado en una computadora.

#### Fase Móvil.

La fase móvil está compuesta por los siguientes componentes:  
Buffer Fosfato pH 4:Acetonitrilo:Metanol (75:22:3)

#### Preparación del Buffer Fosfato pH 4.

Transferir 900 ml de agua destilada a un frasco volumétrico de 1000ml, añadir 2.2ml de ácido ortofosfórico y 4.2ml de trietilamina agitar y llevar a pH  $4 \pm 0.05$  con solución de hidróxido de sodio 2M; aforar con agua destilada.

#### Sistema cromatográfico.

El siguiente cuadro describe las condiciones cromatográficas utilizadas en la investigación.

<b>Volumen de Inyección</b>	<b>50 <math>\mu\text{L}</math></b>
<b>Velocidad de Flujo</b>	<b>1.0 ml <math>\text{min}^{-1}</math></b>
<b>Longitud de Onda Analítica</b>	<b>244nm</b>
<b>Columna Analítica</b>	<b>Eclipse XDB-C18, 5 <math>\mu\text{m}</math> (4.6x250mm)</b>
<b>Guarda Columna</b>	<b>Zorbax XDB-C18, 5 <math>\mu\text{m}</math> (4x4mm)</b>

#### ❖ Preparación de las soluciones estándares:

##### 1. Solución Madre.

Pesar 10mg de Clorhidrato de Clenbuterol, pasar a un matraz volumétrico de 100ml. Pesar 30mg de Clorhidrato de Ambroxol, pasar al mismo matraz volumétrico, disolver y llevar al aforo con fase móvil.



## 2. Solución Stock diluida.

Pasar una alícuota de 1ml de esta solución a un matraz volumétrico de 100ml, llevar aforo con fase móvil.

## 3. Soluciones de trabajo para preparar la curva de calibración.

Las soluciones estándar de trabajo se preparan en mezcla fase móvil, a partir de la solución stock diluida.

La siguiente tabla orienta el volumen a tomar y diluir con fase móvil en un frasco volumétrico de 10 mL.

Volumen a tomar de la solución stock diluida	Concentración final del Clenbuterol.HCl (ppb)	Concentración final del Ambroxol.HCl (ppb)
0,5 mL	50	150
1,0 mL	100	300
2,0mL	200	600
3,0 mL	300	900
4,0mL	400	1200

### ❖ Preparación de la Muestra. Estudio de Exactitud y precisión.

#### Muestra 1. Análisis de Clorhidrato de Clenbuterol.

Las soluciones de la muestra se preparan en fase móvil. La siguiente tabla orienta el volumen a tomar del jarabe y se lleva a aforo en un frasco volumétrico de 10 mL.

Volumen a tomar del jarabe.	Concentración final del Clenbuterol.HCl (ppb)
0,5 mL	50
1,0 mL	100
2,0mL	200



**Muestra 2.** Análisis de Clorhidrato de Ambroxol.

**Solución 1.** Pasar una alícuota de 1ml del jarabe a un matraz de 100ml y llevar al aforo con agua destilada.

**Solución 2.** La siguiente tabla orienta el volumen a tomar de la solución 1 y se lleva a aforo en un frasco volumétrico de 100 mL con agua destilada. Esta última solución se filtra y se introduce al cromatógrafo.

Volumen a tomar del jarabe.	Concentración final del Ambroxol.HCl (ppb)
1,0 mL	150
2,0 mL	300
3,0 mL	450



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN



## 1. DESARROLLO DEL MÉTODO DE ANÁLISIS

Para la determinación del Clenbuterol en jarabe nuestro estudio se basó en la investigación de Zhang X.Z., Gan, Y.R., y Zhao (6) con algunas modificaciones en la fase móvil y en el tipo de detector. Las mismas condiciones cromatográficas se aplicaron para la determinación de Ambroxol. El método de análisis propuesto utiliza una fase móvil terciaria (MeOH: ACN: Buffer pH 4) con la incorporación de trietilamina, para evitar la presencia de colas que pueden deberse a la interacción del silanol con el Clenbuterol y Ambroxol.

## 2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

### Linealidad del sistema para clorhidrato de Clenbuterol y clorhidrato de Ambroxol.

La linealidad del sistema se ha comprobado con 5 soluciones de Clorhidrato de Clenbuterol y clorhidrato de Ambroxol patrón de distinta concentración, abarcando un intervalo que incluye la concentración teórica de la muestra problema (50-150%).

Los resultados del estudio de linealidad se agrupan en la siguiente tabla; se eliminaron los datos correspondientes a la concentración de 150 ppb para el Ambroxol ya que con estos, el CV de los factores respuestas se disparaba a valores mayores del 6%, lo que indicaba una mala linealidad.

**Tabla 1**

Curva de calibrado del Clenbuterol			Curva de calibrado del Ambroxol		
Concentración	Área	F	Concentración	Área	F
50	5,7	0,114			
50	5,8	0,116			
50	5,6	0,112			
100	11,5	0,115	300	27,7	0,0923
100	11,4	0,114	300	27,4	0,0913
100	10,7	0,107	300	28,4	0,0947
200	22,2	0,111	600	56,1	0,0935
200	22,2	0,111	600	54,7	0,0912
200	22,5	0,113	600	55,9	0,0932
300	32,7	0,109	900	81,5	0,0906
300	32,5	0,108	900	80,9	0,0899
300	33,1	0,110	900	83	0,0922
400	44,4	0,111	1200	109	0,0908
400	44,1	0,110	1200	110	0,0917
400	45,1	0,113	1200	110,3	0,0919



A estos datos (concentraciones y áreas) se ha aplicado el test estadístico de homogeneidad de variancias de Cochran (tabla 3), obteniéndose una  $G_{\text{experimental}}$  de 0,658, para el sistema de Clorhidrato de Clenbuterol que se compara con la  $G_{\text{tablas}} = 0,6838$  para  $p=0,05$  de probabilidad, en 5 concentraciones estudiadas y 3 replicados de cada concentración (tabla 2). Para el sistema del Clorhidrato de Ambroxol se obtiene una  $G_{\text{experimental}}$  de 0,474 que es comparado con la  $G_{\text{tablas}} = 0,7679$  para  $p=0,05$  de probabilidad, para 4 concentraciones estudiadas y 3 replicados de cada concentración (tabla 2).

Dado que el valor experimental de G es inferior al tabulado (tabla 3), puede afirmarse que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las variancias de los diferentes niveles de concentración y puede aplicarse la hipótesis de un modelo lineal, estimado por el método de mínimos cuadrados.

**Tabla 2.**

CLENBUTEROL .HCl				AMBROXOL .HCl			
	Área	Des. Est.	Varianza( $s^2$ )		Área	Des. Est.	Varianza( $s^2$ )
50	5,7	0,100000	0,01000	300	27,7	0,513160	0,26333
50	5,8			300	27,4		
50	5,6			300	28,4		
100	11,5	0,057735	0,003333	600	56,1	0,757188	0,57333
100	11,4			600	54,7		
100	10,7			600	55,9		
200	22,2	0,173205	0,030000	900	81,5	1,081665	1,17000
200	22,2			900	80,9		
200	22,5			900	83		
300	32,7	0,305505	0,093333	1200	109	0,680686	0,46333
300	32,5			1200	110		
300	33,1			1200	110,3		
400	44,4	0,513160	0,263333				
400	44,1						
400	45,1						

**Tabla 3.** Resultados del test de Cochran.

Analitos	G experimental	Gtablas
Clenbuterol.HCl	0,658	0,6838
Ambroxol.HCl	0,474	0,7679

El factor de respuesta se calcula dividiendo el área con la concentración (tabla 1). Se determina el valor medio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los factores de respuesta calculados.



**Tabla 4.**

Estadística de factores respuesta del Analito del Clenbuterol.HCl	Estadística de los factores respuesta del Analito del Ambroxol.HCl
s =0,00222	s = 0,00135
$\bar{x}$ = 0,1121	$\bar{x}$ = 0,0919
CV =1,98%	CV = 1,47%

El coeficiente de variación de los factores de respuesta es menor de un 5%, se considera que se presenta una linealidad suficiente.

Se determina la ecuación de la recta de calibrado  $y = bx + a$ , tomando las ordenadas como concentraciones (en ppb) y en abscisas las correspondientes áreas:

$$\text{Área} = \text{pendiente} * \text{concentración} + \text{ordenada origen}$$

**Tabla 5.**

Analitos	Ecuación de la recta
Clenbuterol.HCl	$Y = 0,2526 + \text{Conc} * 0,1100$
Ambroxol.HCl	$Y = 0,7330 + \text{Conc} * 0,0907$



Figura 1

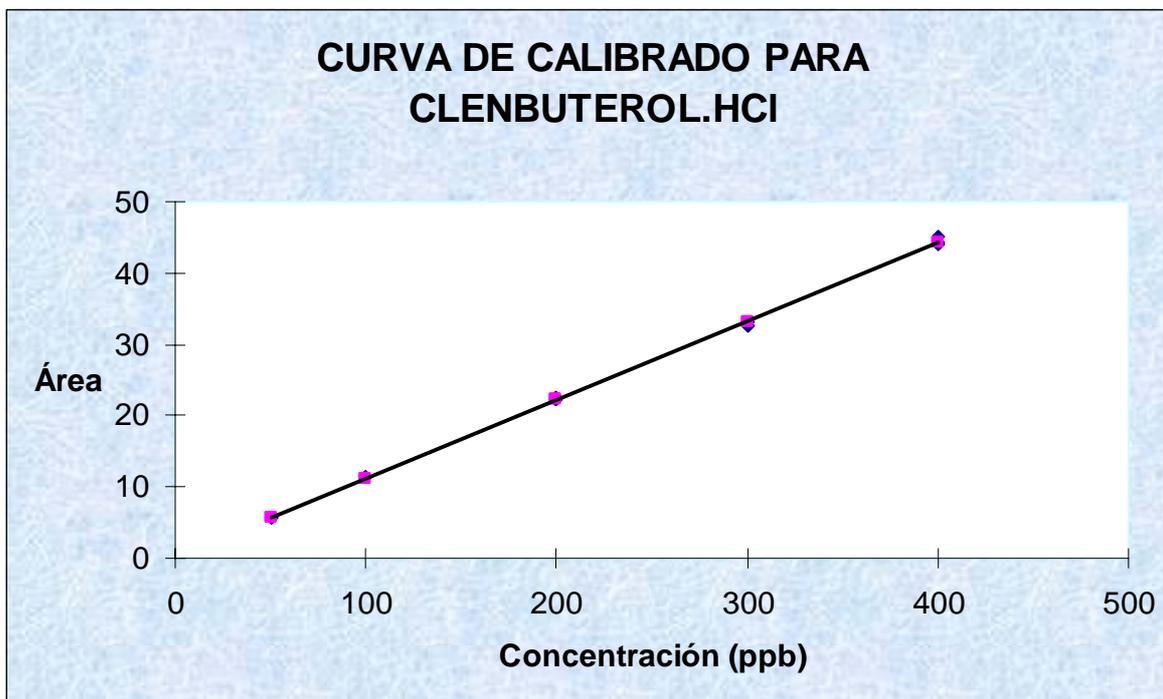


Figura 2

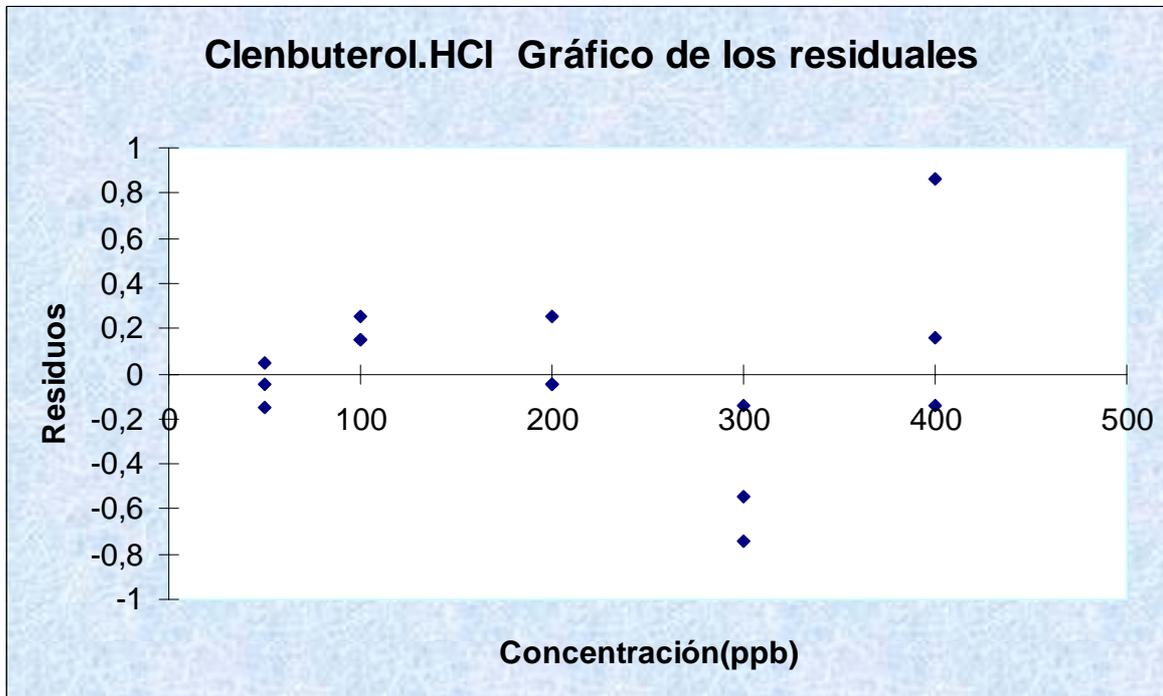




Figura 3

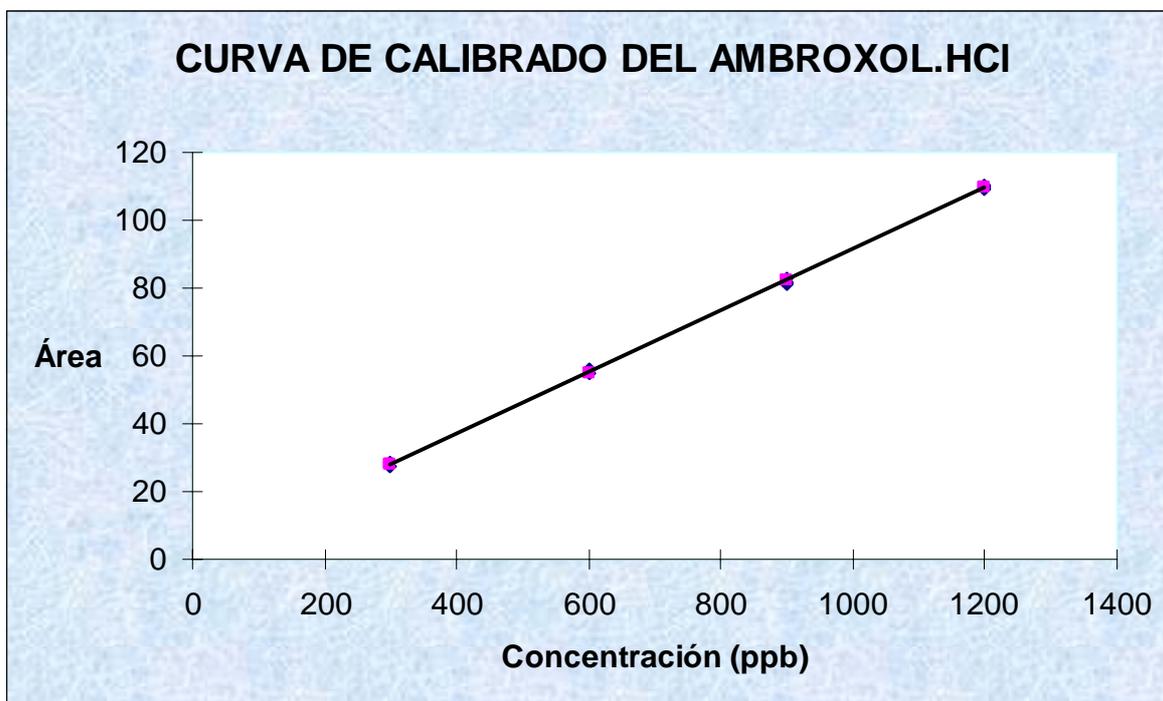
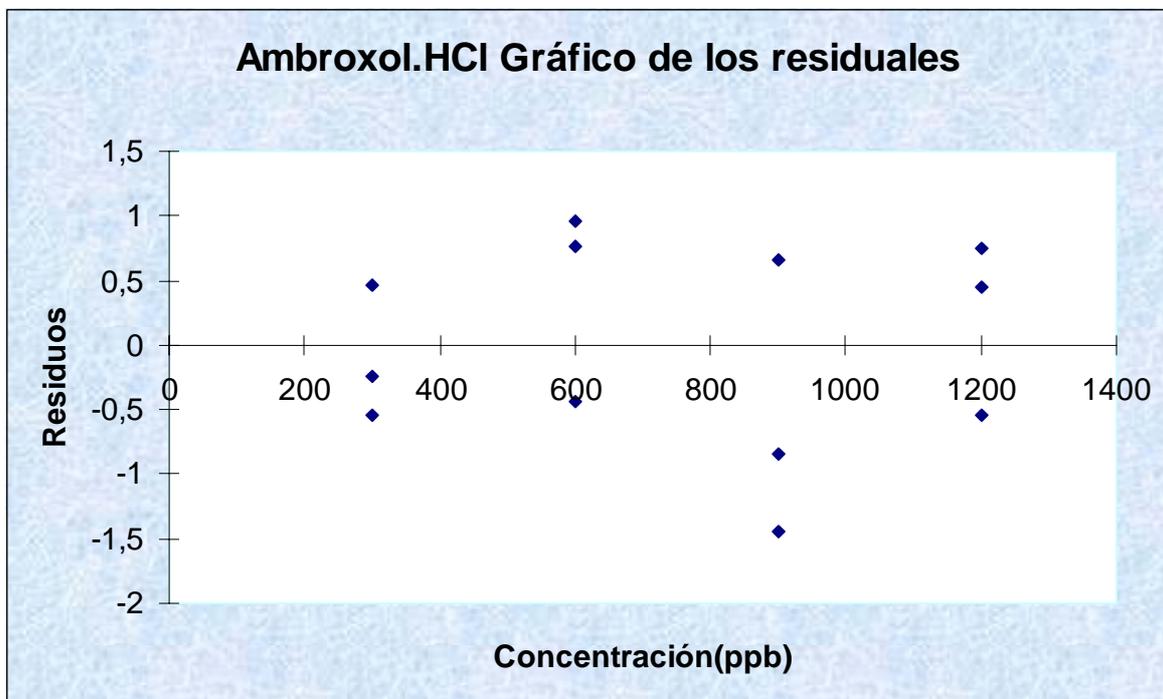


Figura 4





Tanto el valor del coeficiente de correlación (cercano a 1,) como el de determinación  $r^2$ , indican una buena linealidad (tabla 6). El coeficiente de determinación da una indicación del grado de aproximación de los puntos a la relación lineal. Por lo tanto, puede afirmarse que esta relación lineal explica en un 99,938% y 99,941% la variancia de las áreas para el Clenbuterol y Ambroxol respectivamente.

**Tabla 6.**

	Clenbuterol.HCl	Ambroxol.HCl
Coeficiente de correlación múltiple	0,99969	0,99971
Coeficiente de determinación $r^2$	0,99938	0,99941
Error típico ( $s_{x/y}$ )	0,37796	0,80926

Para terminar de comprobar la linealidad y estudiar la proporcionalidad, se calculan los límites de confianza de la pendiente (b);  $b \pm s_b t$ , y de la ordenada en el origen (a);  $a \pm s_a t$  (tabla 7).

**Tabla 7.**

	Clenbuterol.HCl				Ambroxol.HCl			
	Coeficientes	Error típico (s)	LCI 95%	LCS 95%	Coeficientes	Error típico (s)	LCI 95%	LCS 95%
a	0,2526	0,1874	-0,1523	0,6576	0,7333	0,5722	-0,5417	2,0083
b	0,1100	0,0008	0,1083	0,1116	0,0907	0,0007	0,0891	0,0922

Los intervalos de confianza de ambas rectas de regresión lineal incluyen el cero por lo que no existe sesgo a este nivel.

Los intervalos de confianza para la pendiente no incluyen el cero.

Otro test estadístico de alta significación es aplicar un análisis de la variancia (ANOVA) completo a la recta de regresión:

ANÁLISIS DE VARIANZA DEL SISTEMA DE CLENBUTEROL.HCl					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	2975,0602	2975,060199	20825,5191	3,19698E-22
Residuos	13	1,85713415	0,142856473		
Total	14	2976,91733			

Del cual puede concluirse, que dado que  $F_{exp} > F_{tablas}$  ( $p=0,05$ ; 1; 13) = 4,67 queda demostrada la existencia de una pendiente  $\neq 0$ .



ANÁLISIS DE VARIANZA DEL SISTEMA DE AMBROXOL.HCl					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	11100,3202	11100,32017	16949,6414	1,75438E-17
Residuos	10	6,549	0,6549		
Total	11	11106,8692			

Del cual puede concluirse, que dado que  $F_{exp} > F_{tablas}$  ( $p=0,05$ ; 1; 10) = 4,96 queda demostrada la existencia de una pendiente  $\neq 0$ .

Significación estadística de la desviación estándar de la pendiente y test de proporcionalidad.

Test de verificación de la	Clenbuterol.HCl		Ambroxol.HCl	
	Estadístico $t_{exp}$	$t_{tab}$ g.l = 13 $\alpha = 0,05\%$	Estadístico $t_{exp}$	$t_{tab}$ g.l = 10 $\alpha = 0,05\%$
Variable independiente o de proporcionalidad	1,35	2,16	1,28	2,23
Pendiente o de linealidad	144,31		130,19	

Se cumple con el test de Student de la variable independiente en ambos analitos  $t_{exp} < t_{tablas}$ .

Cumple también con el test de Student de la pendiente ya que el  $t_{exp} > t_{tablas}$ .

### ESTUDIO DE SELECTIVIDAD EN MATERIA PRIMA.

Para el estudio de la selectividad se aplico técnicas confirmatorias con muestras sometidas a estrés. Todo el estudio de degradación de los estándares fue desarrollado a la concentración de 200 ppb.

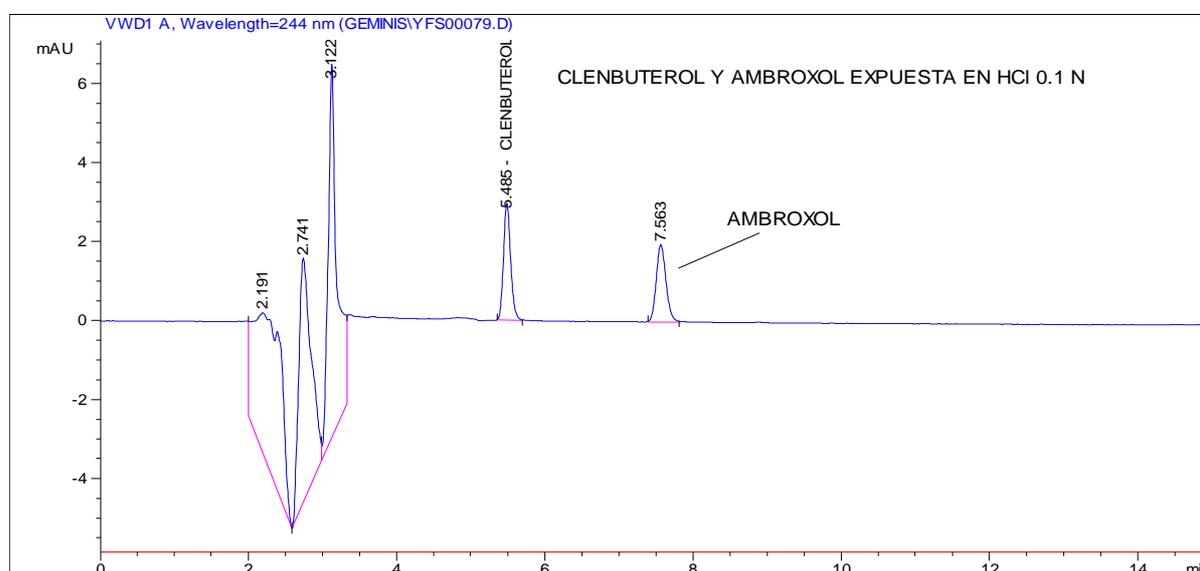
#### Condiciones de estrés ácidas.

Bajo condiciones ácidas se demuestra que el Clenbuterol sufre más degradación que el Ambroxol, no produciéndose interferencia en los tiempos de retención de los picos. La figura 5 presenta el cromatograma bajo estas condiciones.



Analito	Área	CR	% R	Media	Desv. Est.	CV
Clenbuterol.HCl	19,9	178,659	89,33	89,78%	0,4546	0,51%
	20,1	180,477	90,24			
	20	179,568	89,78			
Ambroxol.HCl	17,8	188,170	94,08	95,55	1,6842	1,76%
	18,4	194,785	97,39			
	18	190,375	95,19			

Figura 5



### Condiciones de estrés básico.

Cuando el hidróxido fue adicionado a las preparaciones de ensayo designadas para el estrés básico, se produjo una precipitación masiva causada por el Clenbuterol y Ambroxol, por esta razón los experimentos bajo estas condiciones fueron descontinuados y no se presentan datos.

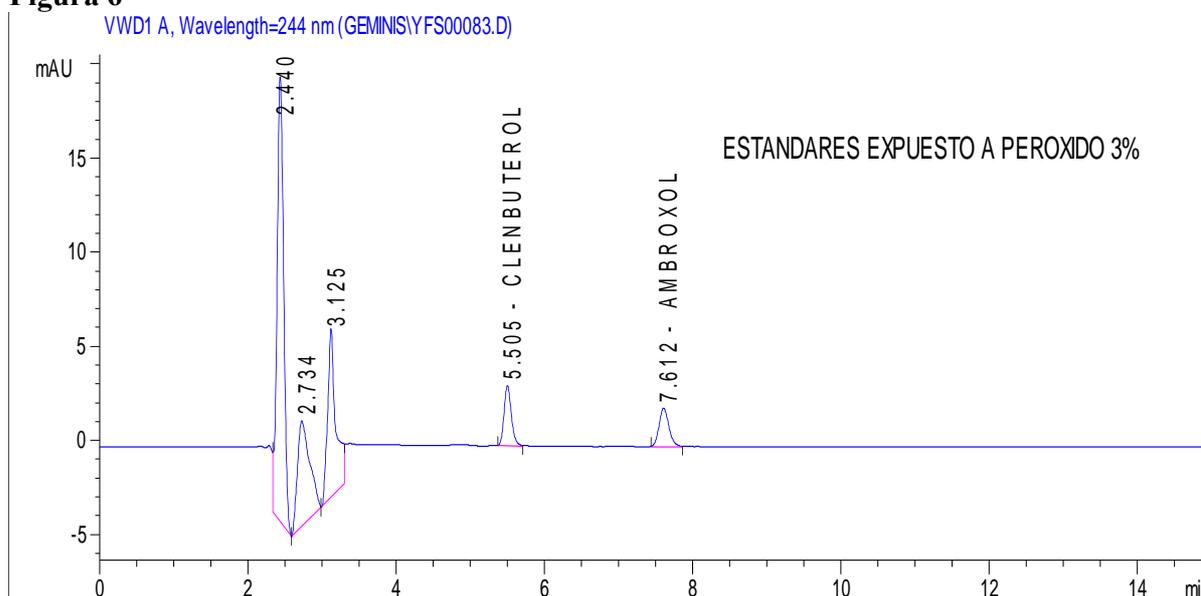
### Condiciones de estrés oxidantes.

Bajo condiciones oxidantes el Clenbuterol no sufre degradación en peróxido al 3%. Bajo estas condiciones el método es específico. En la figura 6 se observa que el Clenbuterol y Ambroxol no presenta interferencia en sus tiempos de retención ni deformación de los picos.



Analitos	Área	Con. Encontrada	% Recuperado	Media	Desv. Est.	CV
Clenbuterol.HCl	22,2	199,998	100,00	99,39	0,6924	0,70%
	22,1	199,092	99,55			
	21,9	197,278	98,64			
Ambroxol.HCl	23,4	203,1	101,53	101,53	1,3078	1,29 %
	23,1	200,4	100,22			
	23,7	205,7	102,84			

Figura 6



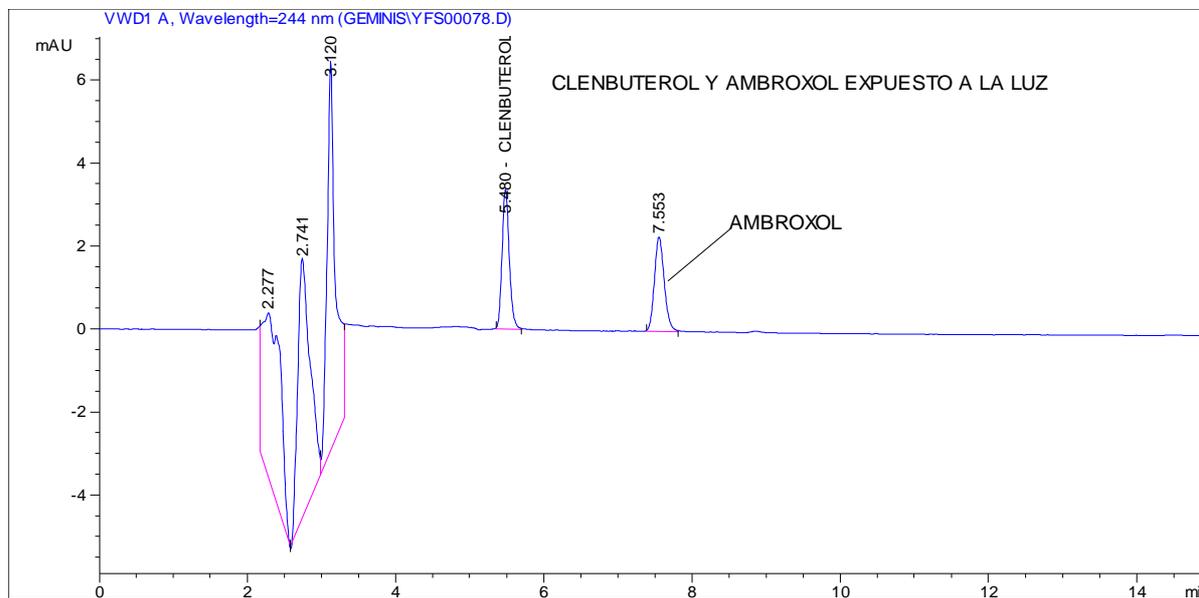
**Condiciones de estrés de luz natural.**

Bajo condiciones de estrés de luz natural el Clenbuterol no sufre degradación. Bajo estas condiciones el método es específico. En la figura 7 se presenta el cromatograma.

	Área	Con. Encontrada	% Recuperado	Media	Desv. Est.	CV
Clenbuterol	22,6	203,210	101,61	101,61	0,90933	0,89%
	22,8	205,029	102,51			
	22,4	201,392	100,70			
Ambroxol	18,6	196,990	98,50	99,78	1,14756	1,15%
	18,9	200,298	100,15			
	19	201,400	100,70			



Figura 7

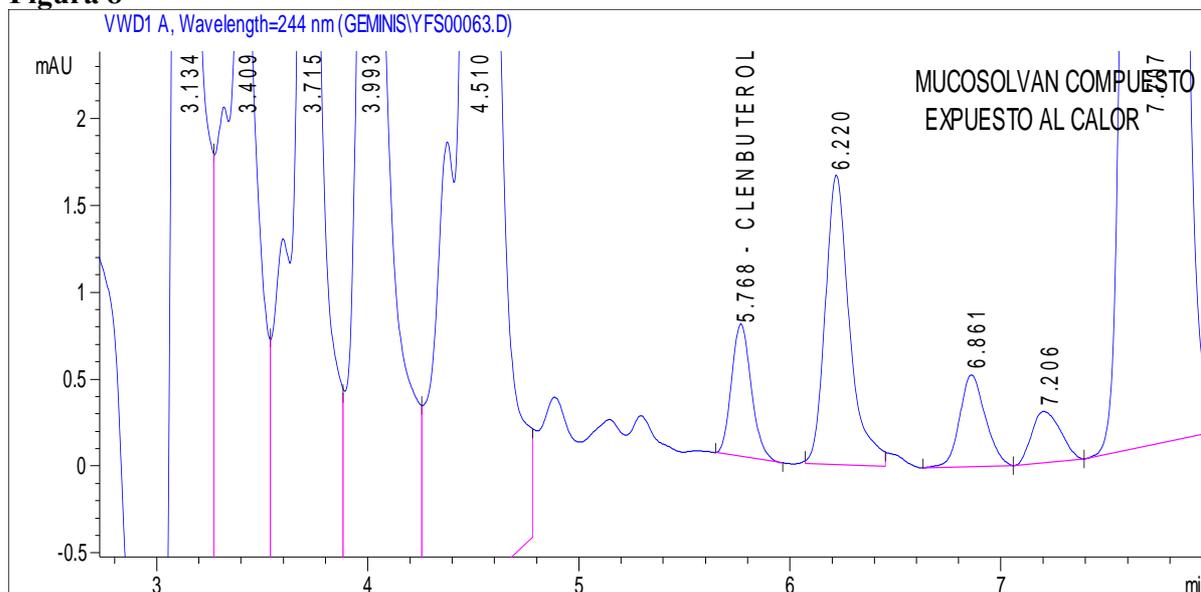


**Condiciones de estrés calor.**

Para el análisis de la muestra el método es selectivo para la determinación de Clenbuterol en jarabe de Mucosolvan compuesto. En la figura 8 se demuestra que el Clenbuterol presenta un pico simétrico.



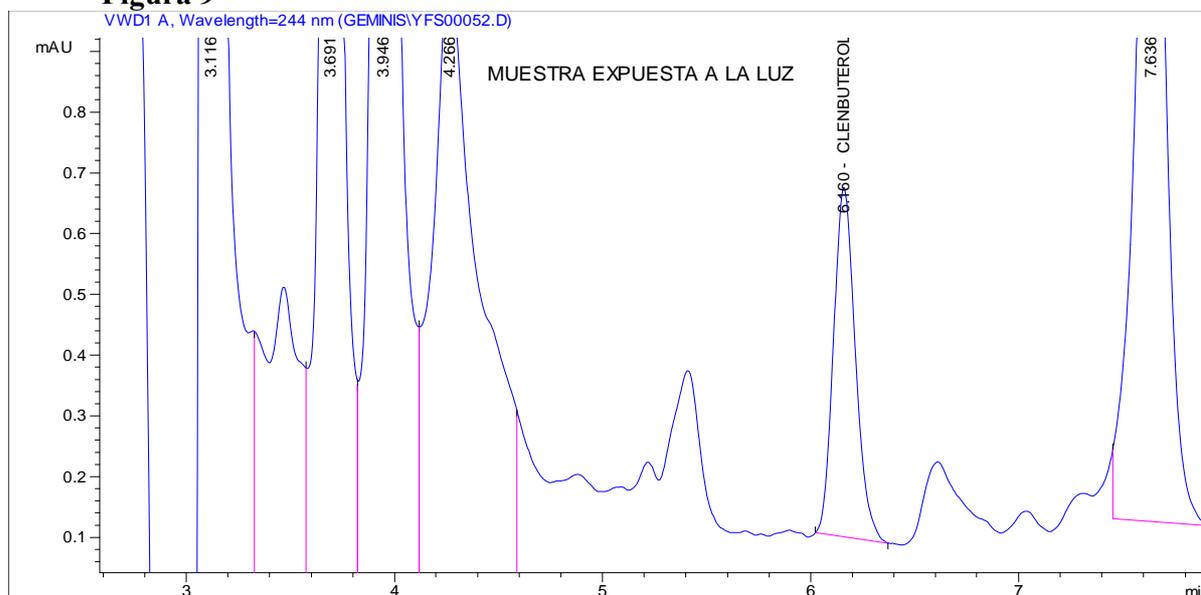
Figura 8



Condiciones de estrés luz natural.

Para el análisis de la muestra el método es selectivo para la determinación de Clenbuterol en jarabe de Numosán compuesto. Según se observa en la figura 9

Figura 9





## EXACTITUD Y PRECISIÓN DEL MÉTODO.

Para la evaluación de la exactitud y precisión del método se trabajó a tres niveles de concentración y se determinó por triplicado (3x3)

CA (ppb)	Área	CR (ppb)	% R.	CA (ppb)	Área	CA. (ppb)	%R.
50	5,6	48,625	97,25	300	27,7	297,321	99,11
50	5,3	45,897	91,79	300	27	289,603	96,53
50	5,5	47,716	95,43	300	27,3	292,911	97,64
100	10,7	95,001	95,00	450	41,8	452,778	100,62
100	10,3	91,363	91,36	450	41,4	448,368	99,64
100	11,1	98,638	98,64	450	40	432,933	96,21
200	21,8	195,936	97,97	600	55	598,313	99,72
200	21,4	192,298	96,15	600	53,7	583,980	97,33
200	21,6	194,117	97,06	600	56	609,338	101,56
$\bar{x} = 95,63$ $s = 2,57$ $CV = 2,69\%$				$\bar{x} = 98,71$ $s = 1,87$ $CV = 1,89\%$			

A la vista de los resultados se observa que existe precisión (repetibilidad) en el método, ya que el CV en ambos instrumentos es menor 6.71% (n = 3) para el análisis a nivel de trazas.

Se considera que el método presenta exactitud ya que la recuperación media se encuentra en el rango establecido de 80-110% de recuperado para concentraciones de 1000ppb a 100ppb (AOAC,1993).

El cálculo del intervalo de confianza se realiza aplicando la siguiente fórmula:

$$\bar{x} \pm t * \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Donde

$$n = 9$$

$$t = (g.l = 8, \alpha = 0,05\%) = 2,31$$



## Desarrollo y Validación para la determinación de Clenbuterol y Ambroxol en jarabe por HPLC

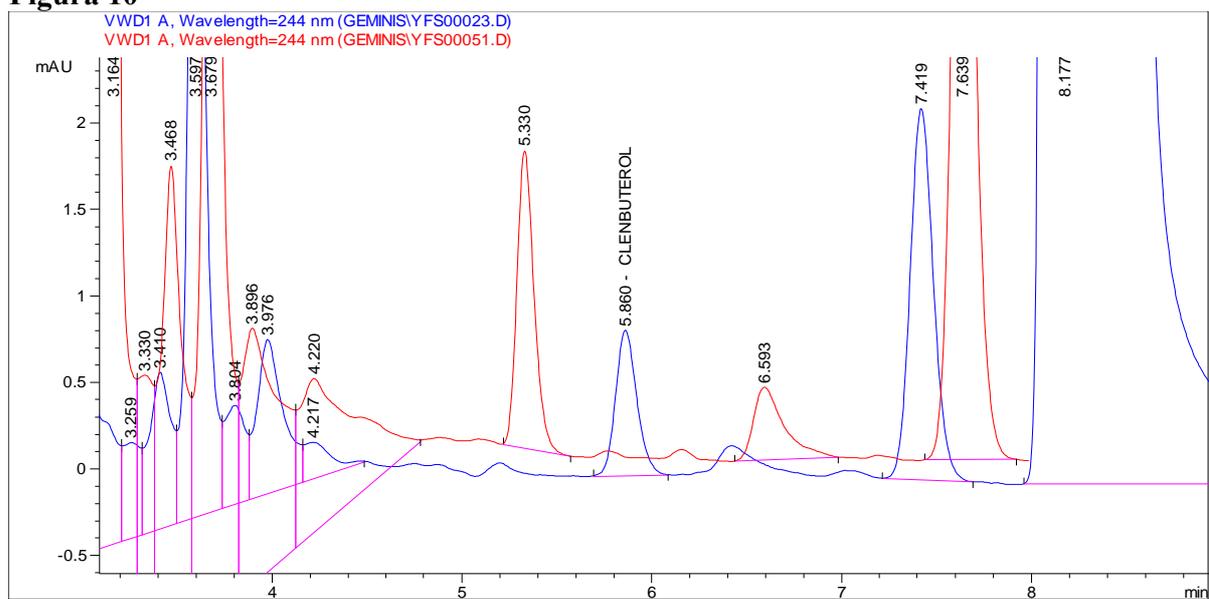
Para el *Clenbuterol* se tiene entonces que:

% Recuperado =  $95,63\% \pm 1,98\%$

Para el *Ambroxol* se tiene entonces que:

% Recuperado =  $98,71\% \pm 1,60\%$

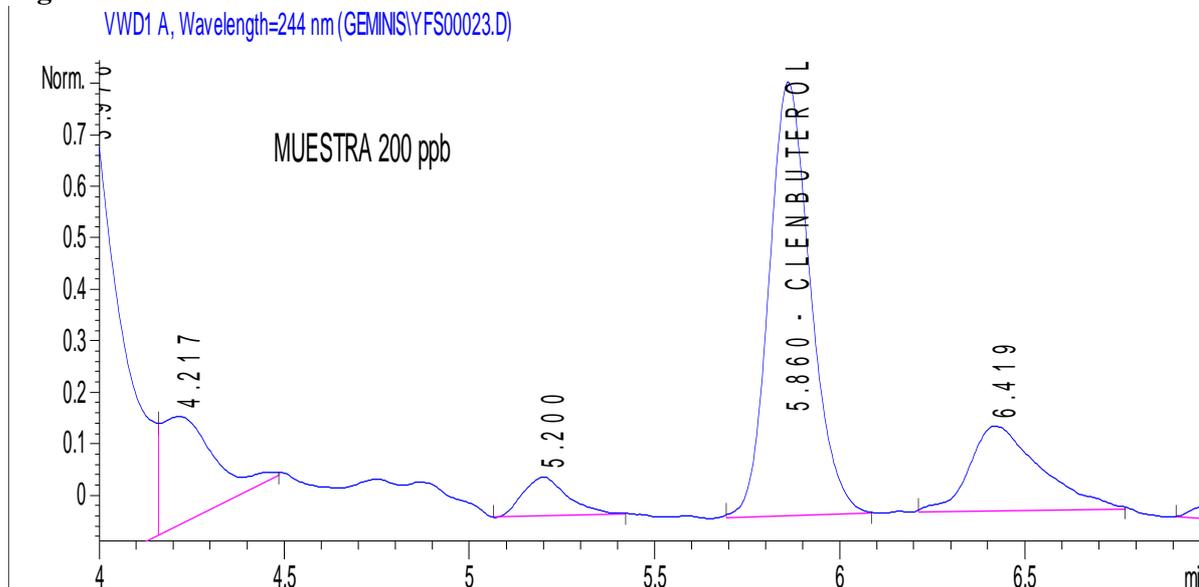
**Figura 10**





En la figura 11 se presenta el cromatograma de Neumosan Compuesto, se observa que el pico es simétrico no presentando interferencia para el tiempo de retención.

**Figura 11**



En la figura 12 y 13 se presentan los cromatogramas de Ambroxol para Mucosolvan Compuesto y Neumosan Compuesto respectivamente, a estos niveles de concentración se observa que no se produce interferencia en los tiempos de retención.



Figura 12

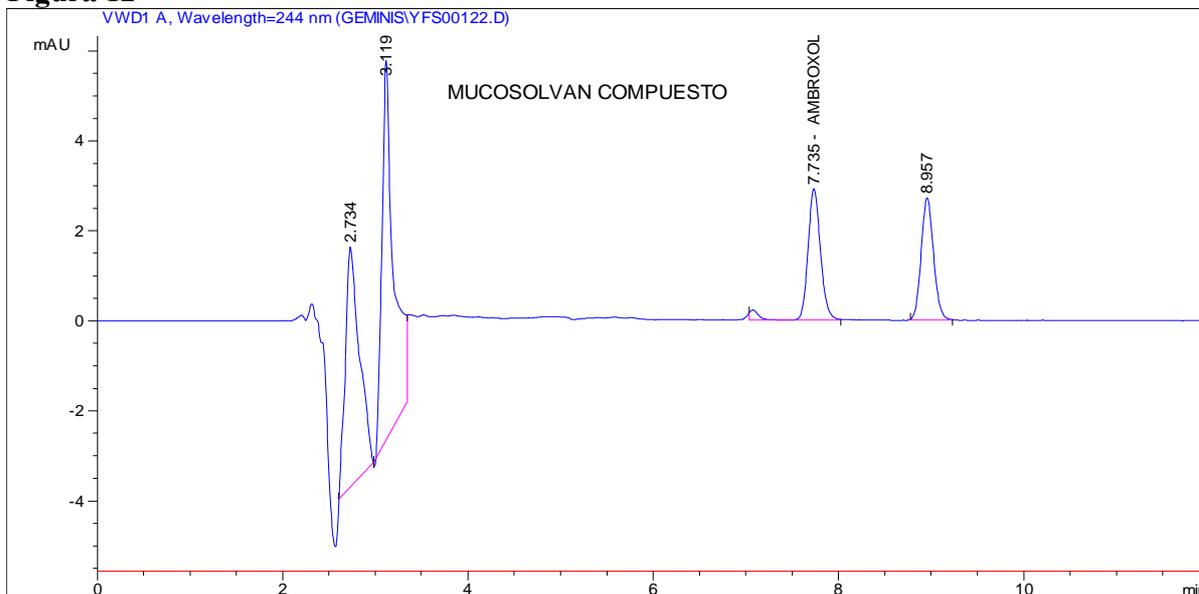
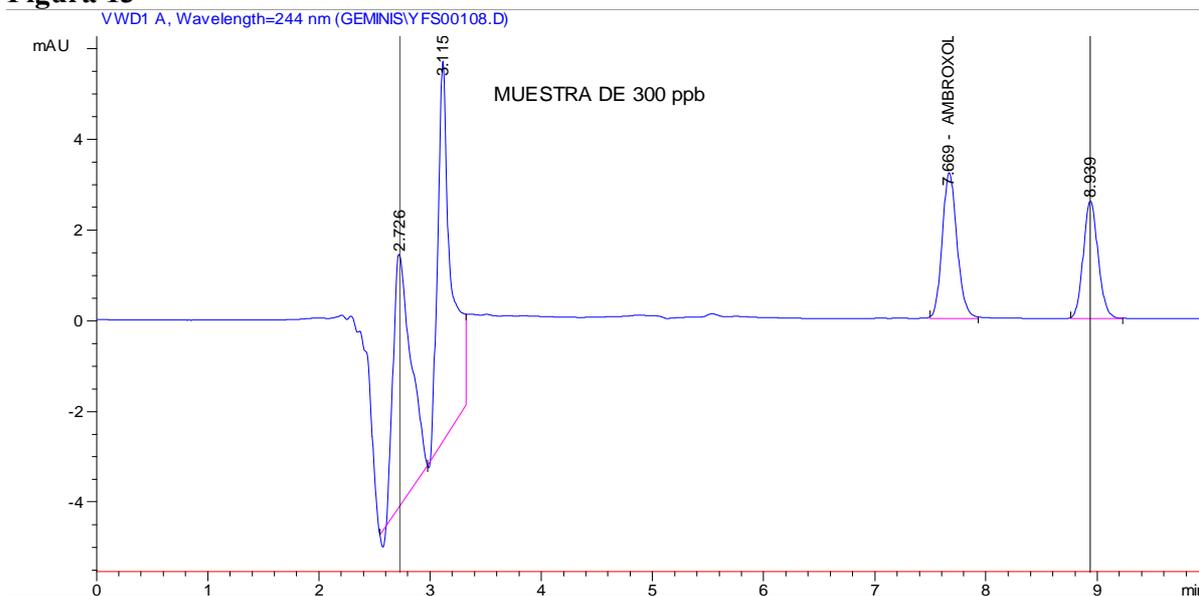


Figura 13





### LÍMITE DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACIÓN.

En la siguiente tabla se demuestran los resultados para la determinación del Límite de detección (LD) y del Límite de Cuantificación (LC). El cálculo para la evaluación de ambos parámetros se basa en la metodología proporcionada por organismos estadounidenses (27). Para el Límite de detección criterio es el siguiente:

$$y - y_B = 3s_B$$

y para el límite de cuantificación (LC).

$$y - y_B = 10s_B$$

Donde  $y_B$  = señal del blanco (se puede utilizar el valor del intercepto  $b_0$ ).

$s_B$  = desviación estándar del blanco (es apropiado utilizar  $s_{x/y}$  en lugar de  $s_B$ )

Clenbuterol.HCl		Ambroxol.HCl	
$s_{x/y} = 0,37796$	LD=10,308 ppb	$s_{x/y} = 0,80926$	LD=26,767 ppb
$b_0 = 0,2526$		$b_0 = 0,5722$	
$y = 1,38648$ (Para LD) $y = 4,0322$ (Para LC)	LC= 34,360ppb	$y = 2,99998$ (Para LD) $y = 8,66480$ (Para LC)	LC=89,224 ppb

### Idoneidad del sistema.

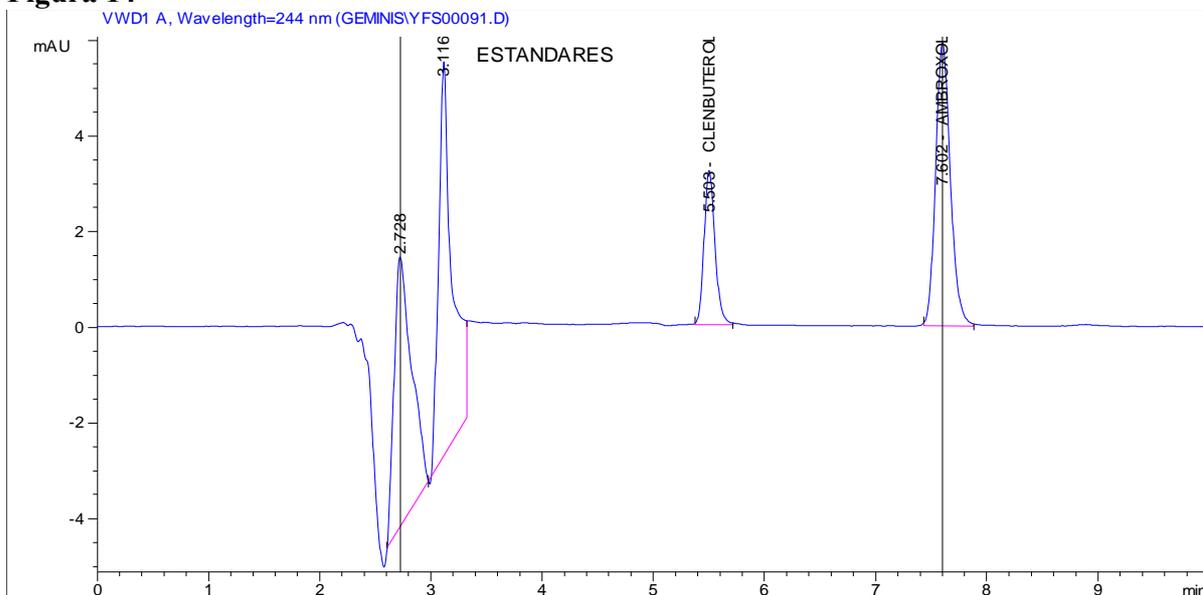
Para el test de idoneidad del sistema cromatográfico, los tiempos de retención y la simetría del pico es obtenida por medio de la estación química ChemStation. La determinación de los LCI y LCS se calculo por medio de EXCEL XP.

	Tiempo de retención (min.)	LCI para el $t_r$	LCS para el $t_r$	Simetría del pico.	Ancho del pico	Resolución
Clenbuterol.HCl	5.877	5.785	5.969	0,823	0,1056	13,90
Ambroxol.HCl	7,604	7,535	7,801	0,837	0,1428	



Conforme a los resultados se observa que existe una buena resolución ( $R_s > 2$ ) y simetría en ambos picos ( $T > 0,80$ )

Figura 14





# CONCLUSIONES



El Clenbuterol y Ambroxol puede determinarse a nivel de trazas en Jarabe con buena sensibilidad usando un procedimiento simple por Cromatografía Líquida de Alta Resolución. El procedimiento evita los procesos de extracción líquido-líquido y/o la extracción de fase sólida (SPE).

El método es preciso y exacto para la determinación de Clenbuterol y Ambroxol en formulaciones farmacéuticas y materia prima.

Con el método analítico propuesto se puede identificar y cuantificar Clenbuterol y Ambroxol en materia prima y jarabe. La longitud de onda escogida es la de máxima absorción en la región UV para Clenbuterol por que este se encuentra a nivel de trazas en la formulación. La longitud de onda escogida presenta selectividad y sensibilidad para niveles bajos de analitos.



# RECOMENDACIONES



- Determinar el Clenbuterol y Ambroxol utilizando la combinación de un método de extracción en fase sólida y el método HPLC propuesto.
- Determinar el Clenbuterol y Ambroxol utilizando cromatografía líquida micelar en fase reversa.
- Desarrollar y validar un método de análisis para la determinación de Clenbuterol y Ambroxol en jarabe por electroforesis capilar.
- Validar el método propuesto para la determinación de Clenbuterol en jarabe.
- Validar el método propuesto para la determinación de Ambroxol en jarabe.



# BIBLIOGRAFÍA



1. Reynolds J.E.F. Martindale The Extra Pharmacopoeia. Twenty-ninth Edition. The Pharmaceutical Press. London. 1989. Pag 904 y 1458.
2. Posyniak A, Zmudzki J, Niedzielska J. *Analytica Chimica Acta* 483(2003)61-67. Screening procedures for Clenbuterol residue determination in bovine urine and liver matrices using enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography.
3. Roda A, Manetta A, C. Piazza F, Simoni P. y Lelli R. *Talanta* 52 (2000)311-318. A rapid and sensitive 384-microtiter wells format chemiluminescent enzyme immunoassay for Clenbuterol.
4. Ramos F., Castilho M. C., Da Silveira, I. N. *Revista Portuguesa Farmacia* Vol. XLIII, nº 1, 1993, (23-26) Resíduos de Clenbuterol: desenvolvimento e implementação de uma estratégia analítica.
5. Eddins C, Hamann J. Johnson K. *Journal of Chromatographic Science*, vol. 23, July, 1985. HPLC Analysis of Clenbuterol, a Beta-Adrenergic Drug, in Equine Urine.
6. Zhang X.Z., Gan, Y.R, and Zhao F.N. *Analytica Chimica Acta* 489(2003)95-101. Determination of Clenbuterol in pig liver by high-performance liquid chromatography with a coulometric electrode array system.
7. Ramos F., Castilho M. C., da Silveira, I. N. *Revista Portuguesa Farmacia* Vol. L, nº 3, 2000, (117-123). Estudo dos efeitos do processamento culinário sobre os resíduos de Clenbuterol e salbutamol em fígado de vitela.
8. Ramos F., Ribeiro L., Saltão R., Costa J. M. da Silveira, I. N. *Revista Portuguesa Farmacia*, 1999, Vol. XLIX, nº 1 (37-40). Clenbuterol em alimentos compostos para animais por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS).
9. Hernández -Carrasquilla M. *Analytica Chimica Acta* 489(2003)95-101. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of  $\beta_2$ -agonistas in bovine retina.
10. BP 2002. CD-ROM.
11. Lopez-Erroz C. Viñas P. Cerdan F.J. Hernandez-Cordoba M. *Talanta* 53 (2000) 47-53. Determination of Clenbuterol in pharmaceutical preparations by reaction with o-phthalaldehyde using a flow-injection fluorimetric procedure.
12. Hewlett-Packard. The comprehensive, interactive tool for beginners and advanced users of CE. CD-ROM.
13. Ross G. and Serwe M. HP Capillary Electrophoresis System Hewlett-Packard Company Germany. 1988. Pág 47.



## Desarrollo y Validación para la determinación de Clenbuterol y Ambroxol en jarabe por HPLC

14. Ferreira D. C. Morgado R., e Bahia M. F. *Revista . Portuguesa Farmacia*. Vol. XLVII, nº 4, 1997, (169-172). Validação de um método para identificação e doseamento do Ambroxol por cromatografia de HPLC.
15. Secretaria de Salud. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. Sexta edición. México 1994. Pág.
16. Perez-Ruiz T., Martinez-Lozano C., Sanz A., *Talanta* 43 (1996) 1029-1034. San Miguel M.T. Automatic extraction-spectrophotometric method for the determination of Ambroxol in pharmaceutical preparations
17. Dincer Z., Basan H., Goger NG. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003 Apr 1; 31(5):867-872. Quantitative determination of Ambroxol in tablets derivative UV spectrophotometric method and HPLC.
18. VICH Steering Committee. Validation of Analytical Procedures: Definition and Terminology. VICH GL1. Guidance 63. July 1999. [www.fda.gov/cder](http://www.fda.gov/cder)
19. Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine. Validation of Analytical Procedures: Metodology. VICH GL2. Guidance 64. October 1999. [www.fda.gov/cder](http://www.fda.gov/cder)
20. ICH-Q2A. Text on Validation of Analytical Procedures. March 1995. [www.fda.gov/cder](http://www.fda.gov/cder)
21. Center for Drug Evaluation and Research(CDER). Reviewer Guidance. Validation of Chromatographic Methods. November 1994. <http://www.fda.gov/cder>
22. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Validación de métodos analíticos. Barcelona. 2001.
23. Raboso R., Folgado A.A., Botet J. *Industria Farmacéutica*, nº 106, Julio/Agosto 2003 Año XVIII.(72-82). Más allá de la validación: la evaluación.
24. Rossi B. *Industria Farmacéutica*, nº 100, Julio/Agosto 2002 Año XVII.(37-38). Validación: mejorando la calidad, la fiabilidad y la seguridad.
25. Por que validar?. [http://es.melma.com/mag/34/m00002234/index\\_bn.html](http://es.melma.com/mag/34/m00002234/index_bn.html).
26. USP 26/NF21S2. Validation of Compendial Methods <1225>. CD-ROM
27. Official Methods of Analysis of AOAC Internacional. 17<sup>th</sup> Edition 2, 2003. CD-ROM
28. Miller J.C. Miller J.N. Estadística para química analítica. Addison-Wesley Iberoamerican. S.A., Delaware USA. 1993. Pág. 100-102.
29. Skoog D. A., Leary J.M. Analisis Instrumental. McGRAW-HILL. Mexico, 1994.



30. Yost R. W., Ettre L.S y Conlon R. D. Introducción a la Cromatografía Líquida Practica. Perkin-Elmer. USA. 1981.

31. Lindsay Sandie. High Performance Liquid Chromatography. Second Edition. John Wiley & Sons. London UK. 1992.

32. Mahuzier G., Hamon M. Ferrier D. Prognon P. Chimie analytique. Tome 2. Méthodes de séparation. 3er. Edition. Masson. Paris, 1999.

33. Braithwaite A. and Smith F.J. Chromatographic Methods. Fifth Edition, Chapman & Hall. 1996.



# ANEXOS



ANEXO 1

EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LA LINEALIDAD.

El estudio de la linealidad no solo implica una representación gráfica sino que es necesario realizar una comparación estadística. Para realizar esta evaluación las fórmulas que se pueden aplicar son las siguientes.

**Ecuación de la recta**  
**Valor estimado para  $x_i$**   
**Valor residual**

$y = b \cdot x + a$   
 $\hat{y}_i = b \cdot x_i + a$   
 $e_i = \hat{y}_i - y_i$   
 $i$  grupos

**Término independiente.**

$$a = \bar{y} - b\bar{x} = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$$

**Pendiente.**

$$b = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum (x - \bar{x})^2} = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

**Coefficiente de correlación.**

$$r^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}} = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{\left[ \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right] \left[ \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right]}}$$



**Cálculo de la residual.**

$$S_{y,x}^2 = \frac{\sum (y - \bar{y})^2 - \frac{\left[ \sum (x - \bar{x})(y - \bar{y}) \right]^2}{\sum (x - \bar{x})^2}}{n - 2} = \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n - 2} =$$

$$= \frac{\sum (y - \bar{y})^2}{n - 2} (1 - r^2) = \frac{\sum (y_i - \hat{y})^2}{n - 2} = \frac{\sum e_i^2}{n - 2}$$

**Cálculo de la variancia de la pendiente.**

$$S_b^2 = \frac{S_{y,x}^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

**Cálculo de la varianza del término independiente.**

$$S_a^2 = S_b^2 * \frac{\sum x^2}{n} = \frac{S_{y,x}^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} * \frac{\sum x^2}{n} = \frac{S_{y,x}^2}{\sum (x - \bar{x})^2} * \frac{\sum x^2}{n}$$

**Enfoque del análisis de varianza para la prueba de significancia de la regresión.**

Para probar la significancia de una regresión puede utilizarse el método de análisis de varianza. Como base de la prueba el procedimiento proporciona la variabilidad total en la variable de respuesta en componentes más semejantes. La identidad del análisis de varianza es la siguiente:

$$\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 + \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$$



## Desarrollo y Validación para la determinación de Clenbuterol y Ambroxol en jarabe por HPLC

Se llama a  $SSE = \sum (y_i - \hat{y}_i)^2$  la suma de los cuadrados de los errores.

y  $SSR = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$  es la suma de los cuadrados de la regresión.

La suma de ambos términos se puede escribir como  $SS_{yy} = SSR + SSE$

Donde  $SS_{yy} = \sum_{n=1}^n (y_i - \bar{y})^2$  es la suma total de cuadrados corregidos de y.

Por otro lado se tiene que  $SSE = SS_{yy} - bSS_{xy}$ , o puesto que  $SS_{yy} = bSS_{xy} + SSE$ , la suma de los cuadrados de la regresión en la ecuación es:

$$SSR = bSS_{xy}$$

La suma de los cuadrados  $SS_{yy}$  tiene n-1 grados de libertad, y  $SSR$  y  $SSE$  tienen 1 y n-2 grados de libertad, respectivamente.

Si la hipótesis nula  $H_0: b = 0$  es verdadera, el estadístico

$$F_0 = \frac{SSR/1}{SSE/(n-2)} = \frac{MSR}{MSE}$$

Sigue a la distribución  $F_{1,n-2}$ , con lo que  $H_0$  debe de rechazarse si  $F_0 > F_{\alpha,1,n-2}$ .

Las cantidades  $MSR = SSR/1$  y  $MSE = SSE/(n-2)$  recibe el nombre de medias de cuadrados.

Lo usual es acomodar el procedimiento de prueba en una **tabla de análisis de varianza**.

Tabla de ANOVA.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Medias de cuadrados	$F_0$
Regresión	$SSR = bSS_{xy}$	1	MSR	MSR/MSE
Error	$SSE = SS_{yy} - bSS_{xy}$	n-2	MSE	
Total	$SS_{yy}$	n-1		

## ANEXO 2



## PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS.

### Ambroxol.

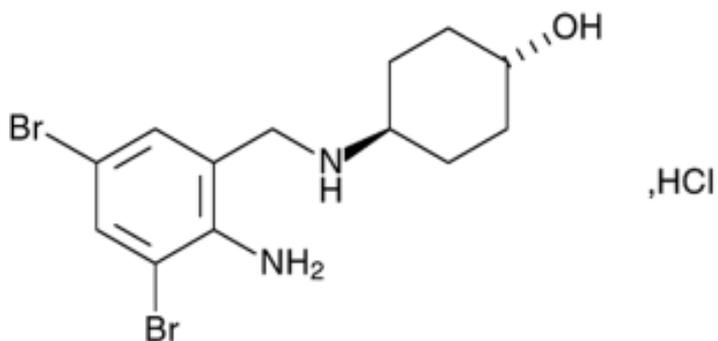
4-[[[(2-Amino-3,5-dibromopentil)-metil] amino] ciclohexanol; forman metabolito con la Brohmexina, forman cristales con etanol. (13).

**Peso molecular:** 414.61

**Punto de fusión:** 233-234.5°

**Formula química:** C<sub>13</sub> H<sub>19</sub> Br<sub>2</sub> CL N<sub>2</sub> O

**Estructura química:**



### Clenbuterol.



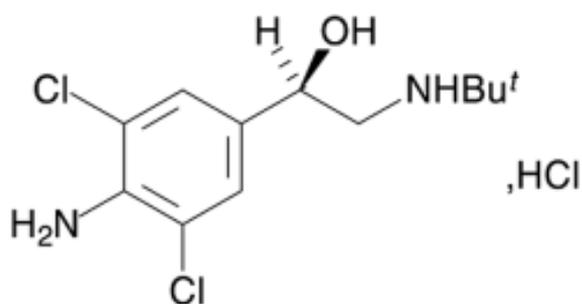
4-Amino-3,5-di cloro- $\alpha$  -[[[1,1-dimetiletil) amino] metil] bencilmetano]; Muy soluble en agua, metanol, etanol, ligeramente soluble en cloroformo, insoluble en benceno.(13)

**Peso molecular:** 313.68

**Punto de fusión:** 174-175.5°

**Formula química:** C<sub>12</sub> H<sub>18</sub> CL<sub>2</sub> N<sub>2</sub> O

**Estructura química:**



and enantiomer