

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA

UNAN-LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

CARRERA DE FARMACIA



**“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE
AMBROXOL CLORHIDRATO EN JARABE 15 mg/ 5 mL POR LA TÉCNICA
ESPECTROFOTOMÉTRICA UV-VIS, MARZO-AGOSTO 2016.”**

MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
LICENCIADO QUÍMICO FARMACÉUTICO.

AUTORES:

Br. YESENIA YAOSKA PARRALES DELGADO.

Br. MARLING ANTONIA QUIROZ QUIROZ.

Br. LARRY JOSÉ RAYO LÚQUEZ.

TUTOR: LIC. FANIA VALESCA VALLADARES SILVA.

LEÓN, NICARAGUA, AGOSTO 2016.

¡A la libertad por la Universidad!



AGRADECIMIENTO

Cuando Dios te permite llegar a la cima, no lo hace para que te quedes ahí, sino para que desde lo alto puedas ver cuál será tu siguiente meta y conquistarla. Infinitas gracias al creador y al señor Jesucristo por lo que somos y tenemos, por lo que deseamos y recibimos; gracias padre amado por permitirnos culminar esta etapa de nuestras vidas y darnos la sabiduría necesaria.

A nuestros padres por ser incondicionales, apoyarnos siempre y proveernos de los recursos necesarios para que culmináramos esta etapa en nuestras vidas.

A nuestra tutora, Lic. Fania Valladares por su paciencia, dedicación, criterio, aliento y conocimientos que nos sirvieron de guía en la realización de este trabajo.

Al laboratorio Mauricio Díaz Müller, por permitirnos realizar la validación de este método analítico y proveernos de muestras y placebos requeridos para nuestro trabajo monográfico.

Al laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos de la UNAN-León, por brindarnos su apoyo y permitirnos realizar nuestro estudio en sus instalaciones.

A los docentes de la carrera de farmacia de la UNAN-León, por aportarnos de sus conocimientos, los cuales de una u otra manera nos fueron de utilidad para realizar este trabajo.

Y por último pero no menos importante a cada una de las personas que con su tiempo y trabajo colaboraron en la realización y culminación de nuestro trabajo monográfico.



DEDICATORIA

Dedico este trabajo monográfico a:

A Dios primeramente, creador y padre celestial por sus infinitas y maravillosas bendiciones, por regalarme el conocimiento y la sabiduría necesaria para poder culminar esta inolvidable etapa de mi vida.

A mi madre, Petrona Isabel Delgado, la persona más importante de mi vida a quien le debo todo lo que tengo y todo lo que soy, quien día a día, paso a paso me ha llevado de la mano por la vida, quien ha compartido mis risas y ha hecho suyos mis sentimientos más difíciles, quien ha estado presente siempre que he necesitado y me ha apoyado en todo momento, son tantos los detalles tan lindos que no terminaría de enumerarlos. Hoy quiero expresarte mi gratitud más sincera al dedicarte a ti mi amada y querida madre este logro de mi vida, con todo el amor que hay en mi corazón, ya que sin ti no habría sido posible.

A mi familia, a mis hermanos Noel, Fabiola, Freddy, María y Carlos por ser la base en la que se fundamentan mis valores y mis principios, por alentarme en todo momento, ser un motivo que me impulsa a seguir adelante, por contar con su apoyo siempre que lo he necesitado y nunca dejarme sola, porque siempre han estado acompañándome en los buenos y malos momentos, mi logro es su logro también.

A mis amigos quienes siempre han estado presente con su cariño y con su apoyo cuando lo he necesitado, porque siempre me han motivado a luchar por alcanzar mis sueños y contribuir de una u otra manera al logro de esta meta.

Yesenia Yaoska Parrales Delgado.



DEDICATORIA

A mi padre amado, Dios, por regalarme vida para llegar a este momento en el cual culmino una de mis metas más anheladas, por darme sabiduría para llegar hasta aquí.

A mi madre, GUILLERMINA QUIROZ. Mamá este logro no es mío únicamente sino tuyo también, a ti quien desde que supiste de mi existencia aun sin conocerme ni estar preparada te llenaste de valor para luchar por sacarme adelante día con día sacando fuerzas de donde no las tenías para darme siempre lo mejor, sé que con este logro ves realizado en mi todo tu esfuerzo y te digo, valió la pena, gracias mamá, sin ti este logro no hubiera sido posible pues mientras yo estudiaba tú te desgastabas trabajando para que no me faltara nada. Eres una mujer que me llena de orgullo por tu fortaleza, te amo y no hay manera de devolverte tanto que me has dado.

A mi abuelita, Petrona Luna, porque desde que tengo memoria su amor, buenos valores y consejos han sido la base que me han forjado para ser la persona que soy hoy en día. A mi padre Santiago por apoyarme siempre que ha podido y contar con usted a la distancia. A mis tías: María, Lesbia, Zorayda, Olga, Yadira, Mercedes, Esther por siempre creer en mí, por su apoyo incondicional, por motivarme a seguir adelante a pesar de las dificultades pues sé que esperan lo mejor de mí en cada cosa que hago, por apoyarme en los momentos difíciles, sin su respaldo este logro no habría sido posible.

A mis hermanas por servirme de motivación para querer hacer las cosas cada vez mejor y servirles de ejemplo en lo bueno y ayudarnos a corregir en lo malo. A todos mis primos por su cariño, apoyo y respeto que siempre me han demostrado.

A mis amigos, gracias por ayudarme a alcanzar esta meta con su apoyo, comprensión y cariño, por los buenos y malos momentos que han compartido a lo largo de mi vida conmigo.

Marling A. Quiroz Quiroz.



DEDICATORIA

A Dios por ser lo que soy, por darme la voluntad para terminar mis estudios con éxito, por concederme la fuerza para levantarme en cada caída, darme la paz en los momentos difíciles, y la sabiduría para tomar las mejores decisiones.

A mi mami Reyna Isabel Lúquez López, por su amor, paciencia, apoyo incondicional, por creer en mí, sobre todo por sus oraciones que me dieron paz cuando más lo necesitaba.

A mis hermanos, Kevin Rayo e Isabella Gamboa, por darme su alegría, motivación y ser un ejemplo para mí de la perseverancia, la lucha constante y que todo se puede lograr.

A mi abuela y tía Mirtha, quienes con sus consejos y apoyo han logrado explotar lo mejor de mí.

A mis amigos gracias por su constante, incondicional e inigualable apoyo emocional, intelectual y económico, que permitió llevar a cabo este proyecto. Buscando en todos y cada uno de los segundos de mi vida no defraudar su confianza.

Larry José Rayo Lúquez.



ÍNDICE

Contenido	Página N°
I. Introducción.....	7
II. Planteamiento del problema.....	10
III. Objetivos.....	11
3.1 General.....	11
3.2 Específicos.....	11
IV. Marco Teórico.....	12
4.1 Generalidades de la validación.....	12
4.2 Parámetros de validación.....	27
4.2.1 Idoneidad del sistema.....	27
4.2.2 Selectividad.....	28
4.2.3 Linealidad y Rango.....	36
4.2.4 Precisión.....	43
4.2.5 Exactitud.....	49
4.2.6 Robustez.....	55
4.3 Espectrofotometría.....	61
4.4 Monografía Terapéutica del Ambroxol Clorhidrato.....	69
V. Diseño Metodológico.....	73
5.1 Tipo de estudio.....	73
5.2 Población.....	73
5.3 Muestra.....	73
5.4 Alcance.....	73
5.5 Variables de estudio.....	73
5.6 Tipos de variables.....	73
5.7 Plan de análisis.....	74
5.8 Verificación de balanzas.....	74
5.9 Materiales y Equipos.....	75
5.10 Reactivos y Patrones.....	76
5.11 Procedimiento analítico para la cuantificación de Ambroxol Clorhidrato Jarabe.....	77
5.12 Procedimiento experimental para determinar los parámetros de la validación.....	79
5.12.1 Idoneidad del sistema.....	79
5.12.2 Selectividad.....	80
5.12.3 Linealidad y Rango.....	82
5.12.4 Precisión.....	86



5.12.5 Exactitud.....	89
5.12.6 Robustez.....	91
5.12.7 Estabilidad de las soluciones analíticas.....	94
VI. Resultados y Análisis de Resultados.....	96
6.1 Idoneidad del sistema.....	96
6.2 Selectividad.....	97
6.3 Linealidad y Rango.....	98
6.4 Precisión.....	110
6.5 Exactitud.....	118
6.6 Robustez.....	120
6.7 Estabilidad de la solución analítica.....	122
VII. Conclusiones.....	123
VIII. Recomendaciones.....	124
IX. Bibliografía.....	125
X. Anexos.....	127



I. INTRODUCCIÓN

Los métodos utilizados en un laboratorio de análisis químico deben de ser evaluados y sometidos a prueba para asegurar la obtención de resultados válidos y coherentes con el objetivo previsto, es decir, han de ser validados.

La validación ha sido un concepto amplio y comúnmente definido. Sin embargo, los múltiples artículos publicados por expertos y estudiosos, poco han aportado a las ideas de Nash (11), quien en 1979 concluía en un artículo pionero, ya clásico en la materia, que la validación tendría su apogeo y reconocimiento dentro de al menos 15 años (19). Hoy, años después, resulta que ha sido así: la validación es una especificación que se sobreentiende cuando se está desarrollando cualquier procedimiento farmacéutico, ya sea de análisis o de producción. Incluso los pasos y fases citados para desarrollar una validación, no difieren de algunas validaciones que se llevan a cabo hoy en día.

Nash planteaba como parámetros básicos a asegurar la calibración de los equipos y el mantenimiento del proceso y de los equipos, la cualificación de equipos y productos y una atención especial a los cambios (11).

La validación de un método analítico es el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. Es la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista; siendo la validación el establecimiento de la evidencia documental de que un método analítico conducirá con un alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y atributos de calidad previamente establecidos. (15)

Todos los laboratorios que fabrican medicamentos tienen la obligación de garantizar que sus productos cumplen con los parámetros de calidad requeridos para su comercialización y



consumo, para ello deben demostrar la validez del método de cuantificación del principio activo contenido en cualquiera de las formas farmacéuticas elaboradas. Cualquier cambio que se realice en la formulación de un medicamento es objeto para ser validado nuevamente (16).

La biblioteca de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN-LEÓN), no tiene referencias de tesis de validación de un método de cuantificación de Ambroxol Clorhidrato en jarabe por el método de espectrofotometría, únicamente por HPLC. En 2004, en la UNAN-LEÓN, se desarrolló y validó un método para la determinación de Clenbuterol y Ambroxol en jarabe por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Monografía para optar al título de licenciado químico farmacéutico. Autor: Br. Clelia Guadalupe Quiroz Larios. (4)

En noviembre de 2010 en la Universidad de San Carlos de Guatemala en la facultad de Ciencias Químicas se realizó la validación del método analítico de cuantificación para Clorhidrato de Ambroxol jarabe en el Laboratorio de Producción de Medicamentos – LAPROMED por la técnica espectrofotométrica, presentado por Susana Paola Carranza Díaz para optar al título de Química Farmacéutica. (20)

El Ambroxol es un derivado de la anilina altamente sustituida, metabolito de la bromexhina la cual también actúa como un agente mucolítico bronquial. (9).

El laboratorio Mauricio Díaz Müller requiere que se valide el método para la determinación de Ambroxol clorhidrato en jarabe por espectrofotometría UV-VIS, ya que el RTCA 11:03:59:11 (Productos Farmacéuticos. Medicamentos de uso humano. Requisitos de Registro Sanitario) establece como requisito para trámites de registro sanitario presentar un método validado de cuantificación del principio activo del producto que se desea comercializar (17). Además este método será implementado por el Laboratorio Mauricio Díaz Müller como método de rutina; y así proporcionarle al cliente un alto grado de confianza y seguridad en el método utilizado para el análisis de su producto.



En este documento, se presentan los resultados obtenidos de la validación del método analítico para la cuantificación de Ambroxol Clorhidrato en jarabe 15 mg/ 5mL fabricado en el Laboratorio Mauricio Díaz Müller por espectrofotometría UV-VIS. Dicha validación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos de la UNAN-León. Se evaluó la idoneidad del sistema y los parámetros de desempeño correspondientes a la categoría I, establecidos en el RTCA 11:03:39:06 (Selectividad, Linealidad y Rango, Precisión y Exactitud); asimismo se determinó la robustez del método y la estabilidad de las soluciones analíticas (muestra y estándar).



II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Nicaragua, uno de los requisitos para registro sanitario de productos farmacéuticos es tener la metodología analítica según el RTCA 11:03:59:11 (Productos farmacéuticos. Medicamentos para uso humano. Requisitos de registro sanitario) (16), adjuntando el informe del estudio de validación correspondiente.

Para realizar la validación de una metodología analítica se deben de evaluar los parámetros establecidos por el RTCA 11.03.39:06 (Productos farmacéuticos. Validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos) (14) en relación al producto y la forma farmacéutica indicada. Cada prueba de desempeño debe satisfacer cada uno de los criterios establecidos a fin de asegurar que estos parámetros brindan información clara y objetiva.

El Laboratorio Mauricio Díaz Müller desea registrar el producto Ambroxol Clorhidrato jarabe 15 mg/5 mL y para llevar a cabo tal registro, debe entregar el informe del estudio de validación de la técnica analítica.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

¿Cuáles son los parámetros de validación que cumple la metodología analítica empleada en la cuantificación de Ambroxol Clorhidrato en jarabe 15 mg/ 5 mL?



III. OBJETIVOS

3.1. GENERAL:

Validar un método analítico para la cuantificación de Ambroxol Clorhidrato en Jarabe 15 mg/5 mL por la técnica espectrofotométrica UV-VIS.

3.2. ESPECÍFICOS:

- Describir la metodología analítica empleada para la cuantificación de Ambroxol Clorhidrato en jarabe 15 mg/5 mL por la técnica espectrofotométrica UV-VIS.
- Evaluar los parámetros de desempeño establecidos en el RTCA 11.03.39:06 tales como selectividad, linealidad, precisión y exactitud.
- Medir la capacidad del método para permanecer inalterado ante pequeñas y deliberadas variaciones.
- Determinar la estabilidad de las soluciones analíticas bajo las condiciones establecidas en el método.



IV. MARCO TEÓRICO

4.1. Generalidades de la Validación (1)

4.1.1. Validación de métodos analíticos

El término validación ha sido definido en la literatura, de diversas maneras y por numerosos autores. Aunque los términos dados son diferentes el significado de las mismas es siempre el mismo: a.) especificar e implementar, b.) aprobar y c.) Documentar.

Veamos tres de las posibles definiciones de validación:

4.1.1.1. Definición general:

Según las Normas de Correcta Fabricación

Validación: 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. (13)

4.1.1.2. Definición analítica:

Validación: Es el establecimiento de la evidencia documental de que un 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 establecido. (1)

4.1.1.3. Según el RTCA:

Validación: Es el Procedimiento para establecer pruebas documentales que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son



adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. Implica la demostración de la determinación de las fuentes de variabilidad y del error sistemático y al azar de un procedimiento, no sólo dentro de la calibración sino en el análisis de muestras reales. (15)

4.1.1.4.Otros términos relacionados con la validación:

- **Cualificación:** El termino validación se amplía a veces para incluir el concepto de cualificación y consiste en la operación por la que se comprueba que un equipo funciona correctamente y produce en realidad los resultados previstos. (13)
- **Calibración:** Conjunto de operaciones que determinan, bajo condiciones previamente definidas, la relación entre los valores indicados por el sistema de medición y los valores conocidos correspondientes a un patrón de referencia. (13)

En resumen, los términos "validación, cualificación y calibración", son conceptos que suelen emplearse de forma indistinta, sin embargo conceptualmente son diferentes.

Validar es verificar documentalente que un método o proceso hace lo que tiene que hacer.

Cualificar es dotar o verificar las cualidades o características inherentes a un aparato (maquina, equipo, instrumento, etc.).

Calibración es una parte de la cualificación.

Por consiguiente se puede decir que los métodos deben ser validados y los aparatos deben ser cualificados.



4.1.1.5. Razones que justifican la validación de métodos analíticos (1)

- Demostrar que los métodos son adecuados a los análisis propuestos en las condiciones descritas. La validación es la herramienta que permite obtener las pruebas documentales al respecto
- Trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados, lo cual a su vez minimizará el número de fallos y repeticiones permitiendo un importante ahorro de costes.
- Trabajar con métodos validados permite no sólo el conocimiento del método analítico sino también cumplir con las exigencias legales tanto del registro de especialidades, farmacéuticas como de las Buenas Prácticas de Laboratorio, con el fin de asegurar la calidad y eficacia del producto.
- La validación es también un paso o requisito previo de los procesos de transferencia de métodos analíticos.

Para iniciar la validación es necesario previamente:

- Tener perfectamente caracterizado el analito.
- Trabajar con una formulación definitiva (en caso de especialidad), puesto que cambios en la composición incluso a nivel de excipientes afectarán probablemente al procedimiento analítico.
- Trabajar suficientemente con el método de análisis como para que nuestro conocimiento acerca de éste, nos ofrezca garantías de que la validación puede ser satisfactoria. Sólo cuando el procedimiento está definido en todos sus detalles y se tiene el convencimiento de que las condiciones descritas son idóneas para alcanzar los resultados esperados debe iniciarse la validación. Por ello en el desarrollo previo del método, es recomendable llevar a cabo el estudio de robustez para garantizar la bondad del procedimiento que se quiere validar.



4.1.2. Métodos susceptibles de ser validados (1)

Son validables los métodos analíticos clasificados en la siguiente forma:

- Ensayos de identificación.
- Ensayos para la determinación del analito de interés de una materia prima o de una especialidad farmacéutica.
- Ensayos para la determinación de características farmacotécnicas inherentes (EJ. test de disolución).
- Ensayos de límite de impurezas y de cuantificación de impurezas
- Ensayos para la determinación de analitos en fluidos biológicos, y en productos naturales
- Ensayos microbiológico

4.1.3. Entorno legal

4.1.3.1.Requerimientos para el registro (8)

En el Procedimiento o Registro Multi estado de Productos Farmacéuticos de la Comunidad Económica Europea, vigente en España desde 1986, se contempla la necesidad en los apartados IIC, IIE y IIF de la validación de los métodos analíticos utilizados. En el mismo documento se indica lo siguiente respecto al "Informe de Experto" (parte 11):

"El experto debe resumir los datos relativos a la validación de los métodos de análisis. Debe comentar la forma en que los controles propuestos garantizan las propiedades químicas, físicas y organolépticas".

Además la FDA (Food and Drug Administration) requiere para el registro de nuevos productos que los métodos analíticos sean validados y debidamente documentados.



4.1.3.2. Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos (13)

Las Normas de Correcta Fabricación de medicamentos de la CEE en el capítulo 6 de Control de Calidad indican que los métodos de análisis deben estar validados (apartado 6.15). De igual forma las Goodman facturing Practice de los EEUU indican que deben establecerse y documentarse la exactitud, sensibilidad, especificidad y reproducibilidad de los métodos analíticos utilizados.

4.1.3.3. Farmacopeas (1)

Validación frente a los Métodos oficiales y/0 de Farmacopeas:

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

- Principios activos de síntesis: Los métodos oficiales o de Farmacopea se considerarán validados siempre y cuando se apliquen a principios activos con la misma ruta de síntesis y por tanto el mismo perfil de impurezas que aquéllos para los que fuera redactada la Monografía.
- 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.

No obstante pueden emplearse como punto de partida métodos desarrollados para especialidades tipo, como pueden ser los de la Farmacopea Europea (EP), Farmacopea, Americana (USP) o Farmacopea Británica (BP), que permitirán obviar una gran parte del desarrollo analítico. En la USP 36 (USP 36, NF 31 2013) aparece, en la sección de Información General, en el apartado "Validation of Compendial Methods" pág. 2149-2152, que es de aplicación para métodos analíticos nuevos o revisados.



4.1.4. Organización: buenas prácticas de laboratorio (1)

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

Los laboratorios de I+D especializados en estudios no clínicos destinados al registro de medicamentos (de toxicología, farmacología, farmacocinética, etc.) fueron los primeros en establecer unas Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL). Las BPL surgieron para evitar deficiencias tales como experimentos sin protocolos previos, datos y resultados no supervisados o trazables, instrumentos y reactivos en condiciones inaceptables, muestras no representativas, personal no cualificado, etc. Frente a estas deficiencias las BPL preconizaban un sistema unificado de trabajo y de gestión que permitiera establecer comparaciones entre laboratorios diferentes, intercambiar información, la aceptación mutua de resultados y la resolución de conflictos.

Las primeras BPL fueron las de Estados Unidos en 1979 y en la actualidad son de aplicación general en todos los laboratorios que realizan estudios no solamente sobre medicamentos sino también sobre cosméticos, aditivos alimentarios, plaguicidas y productos químicos en general cuando afecten a temas de salud humana, animal o medio ambiente. En España las BPL están reguladas por Reales Decretos, 82211993 del 18 de mayo y el 204311994 del 14 de octubre, y anexos a dichos Reales Decretos.

La filosofía de las BPL se ha extendido también a los laboratorios de ensayo de los sectores químico, agroalimentario, etc. y a los laboratorios de control de calidad de la Industria Farmacéutica y Biosanitaria.

La Guía de Normas de Correcta fabricación de Medicamentos de la CEE, desde su primera edición, dedica un capítulo a las Buenas Practicas del Laboratorio de Control (BPLC) que, conceptualmente, son muy afines a las BPL. (13)



Las áreas de trabajo bajo normas BPL son:

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

A continuación se comentan algunos de estos aspectos:

4.1.4.1.Organización y personal

Es uno de los factores más importantes a la hora de asegurar la calidad del análisis. El laboratorio debe disponer de suficiente personal técnico, bien organizado y dirigido para que puedan efectuarse los estudios en un tiempo razonable y sin sobresaltos, de manera que existan las condiciones apropiadas para poder efectuar las tareas de preparación, formación, supervisión, calibración, validación, etc.; actividades en suma que podrían denominarse de "prevención de errores". Una de las causas más importantes de obtención de resultados erróneos es el apresuramiento, para evitarlo es necesario establecer una planificación de los controles y análisis que se han de realizar.

El personal debe poseer unos conocimientos y una preparación adecuados al tipo de estudios que vayan a realizar, así como experiencia en las técnicas a emplear, de lo contrario deberá recibir la adecuada formación.



4.1.4.2.Instalaciones

Las instalaciones del laboratorio, tanto interiores como exteriores, deben reunir las condiciones idóneas en cuanto a dimensiones, construcción, diseño y ubicación para poder realizar los estudios de forma correcta. Por ejemplo, su diseño debe permitir la correcta disposición entre las sustancias químicas, biológicas existentes y el flujo de los materiales para que no puedan confundirse. Deben existir procedimientos de control y supervisión de las condiciones ambientales en las zonas críticas, como pueden ser los estabularios.

4.1.4.3.Aparatos, reactivos, material y especímenes

4.1.4.3.1. Aparatos

El laboratorio debe disponer de instrumentos en cantidad suficiente y de capacidad adecuada para responder a las exigencias de los ensayos que se realizan. Se deben mantener limpios y en buen funcionamiento para obtener resultados fiables. Con este fin se realizarán las comprobaciones, calibraciones y cualificaciones de los equipos e instrumentos de medición (incluidos los sistemas informáticos).

La cualificación requiere que los equipos sean instalados correctamente e inspeccionados, limpiados, conservados, comprobados y calibrados periódicamente, según procedimientos escritos. Estos Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) describirán con suficiente detalle las instrucciones de funcionamiento, los métodos, materiales y programas a realizar en los aparatos. También se indicará la persona responsable de cada operación.

Debe mantenerse un registro de las diferentes operaciones que se realicen en el equipo o instrumento.

Ya sean de funcionamiento, mantenimiento, limpieza, calibración o cualificación. Estos registros es recomendable archivarlos durante un periodo de tiempo no inferior a 5 años.



Los diversos PNT's, los registros de comprobación y una copia del manual de instrucciones deben estar localizables a disposición del analista.

4.1.4.3.2. Reactivos

Los reactivos químicos deben ser preparados por personas cualificadas y según procedimientos descritos en las Farmacopeas u otros procedimientos aprobados.

En la etiqueta de los reactivos es conveniente hacer constar:

- ✓ origen
- ✓ identificación de la sustancia
- ✓ concentración
- ✓ condiciones de conservación
- ✓ fecha de preparación
- ✓ seguridad
- ✓ fecha de caducidad
- ✓ analista

4.1.4.3.3. Material y especímenes

El material de vidrio interviene en la mayoría de los análisis y se tiende erróneamente a dar por supuesta su idoneidad. Esto puede extenderse a materiales de porcelana, cuarzo, plástico y metálicos. Los errores a causa de estos materiales pueden ser debidos a:

- ✓ Suciedad o contaminación: tras su limpieza hay que considerar la posibilidad de que queden residuos contaminantes de utilizaciones anteriores y10 detergentes. En algunos casos se requiere la utilización adicional de disolventes orgánicos o mezcla crómica. Se recomienda un aclarado final con agua purificada y/o alcohol.
- ✓ Defectos del material: la exactitud del material volumétrico (buretas, pipetas y matraces aforados) tiene una gran influencia en el resultado de los análisis. Por



tanto, debe calibrarse y contrastarse a su recepción y periódicamente, desechando el que no cumpla las especificaciones.

En el análisis de concentraciones muy bajas de analito (por ejemplo en bioanálisis, validaciones de limpieza y validaciones de impurezas) es recomendable el uso de material desechable. Los especímenes se identificarán por sistema experimental, estudio, naturaleza y fecha de muestra.

4.1.4.4.Sistemas experimentales

Son estudios realizados en el laboratorio a partir de sistemas químicos y físicos, celulares, microbianos y vegetales o animales.

- **Sistemas físicos y químicos:** la instrumentación empleada para la obtención de datos deben estar correctamente situada, diseñada y dimensionada.
Se podrán utilizar sustancias de referencia para verificar estos sistemas experimentales. En los sistemas automatizados, los datos generados se tratarán como datos primarios y se archivarán.
- **Sistemas biológicos:** Para asegurar la calidad de los datos que nos proporcionen estos sistemas, se crearán y mantendrán unas condiciones apropiadas de alojamiento, cuidado, y confinamiento de los mismos. Se registrará la recepción, manejo, alojamiento/confinamiento, cuidado y evaluación de la salud. Además se generarán registros de los exámenes, medidas de cuarentena, morbilidad, mortalidad, comportamiento, diagnóstico y tratamiento de los sistemas experimentales. Se realizara también una adecuada eliminación de residuos y desechos al finalizar los ensayos.



4.1.4.5. Productos de referencia y muestras de ensayo

Todos ellos deben presentar protocolos de preparación, manipulación y almacenaje. Además se ha de registrar una serie de datos como son la recepción, la toma de muestras, la utilización y el almacenamiento. Se etiquetaran debidamente y se llevará un registro sobre su identidad, pureza, composición, estabilidad, trazabilidad, así como de posibles impurezas.

Se puede encontrar diferentes tipos de productos de referencia y de ensayo:

- ✓ Procedentes de proveedores externos
- ✓ Patrones de referencia primarios originales (USP, EP, etc.)
- ✓ Patrones de referencia secundarios de trabajo (workingstandards)
- ✓ Mezclas o diluciones que se preparan en el laboratorio

Las muestras de ensayo deben ser representativas y obtenidas según procedimientos de muestreo escritos y aprobados, que deberán incluir los agrupamientos y tratamientos previos al análisis.

4.1.5. Documentación de la validación (1)

Toda validación comienza a partir de un método ya probado y ajustado. La validación trata de demostrar con un número mínimo de ensayos, que tanto el método de análisis como su sistema analítico asociado producirán resultados adecuados a las exigencias preestablecidas.



Dicha demostración debe ser siempre documentada de acuerdo al siguiente esquema:



4.1.5.1.Documentación que debe presentarse para la revisión de los métodos analíticos validados. (17)

Para la revisión por parte de la Autoridad Reguladora de los métodos validados, el informe del estudio de validación debe contener la siguiente documentación:

- a. Descripción detallada del procedimiento analítico.
- b. Descripción de los parámetros de desempeño evaluados según la tabla.
- c. Evaluación y cálculos estadísticos para la verificación de los parámetros de desempeño.
- d. Resumen de los resultados instrumentales obtenidos (áreas o absorbancias impresas).
- e. Resumen de los resultados de la validación obligatoriamente en idioma español/castellano o debidamente traducido.
- f. Conclusiones deben ser obligatoriamente entregadas en idioma español/castellano o debidamente traducidas.



4.1.5.2. Protocolo de validación (1)

Se trata de un documento que ha de recoger el objetivo, la definición del sistema a validar, la identificación de los parámetros, el diseño del plan experimental y los criterios de aceptación. Debe ser específico para cada producto y método, debiendo ir firmado y fechado por las personas responsables de la validación y aprobación.

El esquema de un protocolo de validación puede incluir los puntos siguientes:

- ✓ **Objetivo:** Exposición de la finalidad de la validación y propuesta de fechas de inicio y final.
- ✓ **Responsables:** Relación de las personas que llevarán a cabo la validación y de las que la aprobarán.
- ✓ **Parámetros a estudiar:** Los parámetros a estudiar se seleccionan en función de las características de la muestra, tipo de método analítico y rango de concentración del analito.
- ✓ **Muestras:** El muestreo se realizará de acuerdo con procedimientos escritos en los cuales se indicaran los sistemas de identificación y tratamiento previo de las muestras. Si se precisan placebos, también existirán procedimientos del método de preparación.
- ✓ **Equipos:** Se han de identificar los equipos implicados en el proceso de validación (pH-metros, balanzas, cromatógrafos, etc.), y comprobar que están convenientemente cualificados, referenciando estos datos en el informe de validación.
- ✓ **Métodos analíticos:** Existirán métodos escritos describiendo el procedimiento para la determinación de los parámetros a evaluar, con indicación de reactivos, patrones, materiales, técnica y cálculos.
- ✓ **Criterios de aceptación:** se establecerán a priori para cada uno de los parámetros, basándose en las necesidades o finalidad del método y en la información recogida durante la fase de desarrollo del procedimiento analítico.



4.1.5.3. Realización de la validación y evaluación de los resultados (1)

Todos los datos primarios deben ser perfectamente auditables. Una vez realizada la parte experimental de la validación, se evaluarán los resultados obtenidos. Si durante la ejecución del protocolo se produce alguna modificación se añadirá como un anexo al mismo explicando el cambio introducido respecto al original y la razón que lo justifica.

4.1.5.4. Informe de validación (1)

Los informes de validación deberán incluir:

- ✓ Referencia al protocolo en el cual se describe el procedimiento para la determinación de cada uno de los parámetros a evaluar.
- ✓ Resultados de la determinación de cada parámetro incluyendo todos los datos primarios.
- ✓ Referencias de la calibración y cualificación de los instrumentos utilizados y resultados de la verificación de los parámetros de idoneidad antes de iniciar el estudio de validación.
- ✓ Discusión de los resultados y conclusiones. Se indicará la aceptación o no de la validación del método analítico. También se puede aceptar un método analítico con limitaciones para un tipo de muestras concreto.

4.1.5.5. Certificado de validación (1)

El certificado de validación es un documento formal de aprobación que emite el laboratorio con los resultados obtenidos para cada parámetro, debe ser firmado por las personas responsables. Este certificado puede ser independiente, incluyendo un resumen del protocolo de validación y de los resultados obtenidos, o bien anexarse al final del informe.



4.1.5.6. Archivo (1)

Los documentos referentes a la validación se archivarán adecuadamente durante todo el tiempo de vida del producto.

4.1.6. Criterios de validación según el RTCA (15)

Según el RTCA, se deben validar los siguientes procedimientos analíticos químicos, físicos y microbiológicos:

Categoría I: pruebas cuantitativas del contenido del (los) principio(s) activo(s), constituyen procedimientos químicos o microbiológicos que miden el (los) analito(s) presente(s) en una muestra determinada.

Categoría II: pruebas para la determinación del contenido de impurezas o de valores límites para el control de impurezas. Pueden ser pruebas cuantitativas o una prueba cualitativa para determinar si la impureza está presente en la muestra por encima o por debajo de un valor límite especificado.

Cualquiera de los dos pretende reflejar con exactitud las características de pureza de la muestra. Los parámetros de validación requeridos por una prueba cuantitativa son diferentes a los de una prueba cualitativa de cumplimiento de límite.

Categoría III: pruebas físico químicas de desempeño. Constituyen procedimientos de ensayo que miden características propias del desempeño del medicamento, por ejemplo la prueba de disolución. Las características de la validación son diferentes a las de las otras pruebas, aunque las pueden incluir.



Categoría IV: pruebas de identificación. Aquellas que se realizan para asegurar la identidad de un analito en una muestra. Esto normalmente se realiza por comparación de una propiedad de la muestra, contra la de un estándar de referencia, por ejemplo espectros, comportamiento cromatográfico, reactividad química y pruebas microcristalinas.

Parámetros de desempeño de los procedimientos analíticos físico-químicos y potencia microbiológica: (15)

Categoría de prueba Parámetro desempeño	I:	II:	II:	III:	IV:
	Principios activos	Prueba de Limite cuantitativa	Prueba de Limite cualitativa	Físicoquímico desempeño	Identificación
Exactitud	SI	SI	*	*	NO
Precisión	SI	SI	NO	SI	NO
Especificidad	SI	SI	SI	*	SI
Límite de Detección	NO	NO	SI	*	NO
Límite de cuantificación	NO	SI	NO	*	NO
Linealidad	SI	SI	NO	*	NO
Intervalo	SI	SI	*	*	NO

* puede requerirse según la naturaleza del análisis

4.2. Parámetros de validación

4.2.1. Idoneidad del sistema (1)

4.2.1.1. Definición

El test de idoneidad del sistema (system suitability test) 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. El test de idoneidad del sistema ha de entenderse como parte integrante del procedimiento de análisis y requisito previo a su realización. En la práctica, podría equipararse a una cualificación del proceso analítico o una revalidación en continuo, ya que proporciona la seguridad de que en el momento de iniciar el ensayo, el conjunto del sistema continúa siendo válido para el propósito para el que fue concebido.

4.2.1.2.Ámbito de aplicación

El test de idoneidad del sistema es susceptible de emplearse en cualquier procedimiento de medida en el que las condiciones analíticas puedan estar sometidas a variación de las condiciones operacionales. Este test no solo debe circunscribirse al ámbito de determinación final sino que puede diseñarse con el fin de comprobar la idoneidad de cualquier etapa del procedimiento.

4.2.2. Selectividad (1)

4.2.2.1.Definición:

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.

Frecuentemente el término especificidad se utiliza como sinónimo del anterior, aunque debería reservarse para aquellas situaciones donde la respuesta obtenida sólo se puede producir con una única entidad química, algo que no es posible cuando se refiere a procedimientos analíticos que emplean instrumentación no específica. Como existen muy pocos métodos que den respuesta solo a un único analito, el término selectividad es normalmente más apropiado.

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 (afectan normalmente a la pendiente y ordenada en el origen de la recta de calibrado). Este efecto puede delatar la presencia de interferencias desconocidas, aunque también puede ser consecuencia de recuperaciones no lineales.

La selectividad de un método analítico se 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 interferencia de otras sustancias relacionadas con él de una u otra forma.

4.2.2.2.Ámbito de aplicación

En el análisis farmacéutico la tendencia mayoritaria es la utilización de métodos lo más selectivos posibles, en los que la presencia de otros componentes tienen escasa influencia en los resultados, por ejemplo métodos cromatográficos. No obstante, se pueden utilizar métodos poco específicos (por ejemplo potenciométricos o espectrofotométricos) si existen métodos complementarios que demuestren la ausencia de sustancias que puedan interferir.

De hecho es muy difícil declarar que no existe interferencia en la determinación de un analito porque siempre existe la posibilidad de encontrar alguna sustancia, hasta el momento desconocida, que interfiera. También se puede dar el caso contrario, de hallar alguna posible interferencia que en la práctica diaria sea improbable que se produzca.

Para efectuar estudios de selectividad se precisa la máxima información sobre impurezas y productos de degradación potencialmente presentes en la muestra, así como sobre posibles interferencias debidas a excipientes u otros componentes.

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 qué punto se debe buscar interferencias (con excipientes, impurezas y



productos de degradación), debido a la imposibilidad de reflejar todas las situaciones y consideraciones posibles.

Los criterios de selectividad que debe satisfacer un método pueden diferir dependiendo de la finalidad con que se aplique. El grado de selectividad asociado a un método adquiere mayor relevancia si su finalidad es evaluar la estabilidad del principio activo o de la forma farmacéutica. El método ha de permitir distinguir entre todas las posibles especies químicas existentes o que puedan generarse.

Sin embargo, para un método de control de calidad de rutina la existencia de alguna interferencia se podría aceptar si ésta es conocida y de magnitud aceptable. En estos casos la selectividad puede entrar en conflicto con el coste y el tiempo necesarios para la determinación del analito.

Las conclusiones de los estudios de selectividad están vinculados 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. Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto el estudio de la selectividad es el parámetro que en más ocasiones debe revisarse.

A grandes rasgos el estudio de la selectividad variará su planteamiento según el objetivo y la técnica analítica aplicada.

4.2.2.2.1 Según el objetivo del ensayo

- **Identificación:** Se debe demostrar que el método es capaz de discriminar sin interferencias entre el analito, sustancias de composición similar y otros productos que puedan estar presentes en la muestra. Durante el desarrollo de una molécula la identificación requerirá la comprobación de la estructura de la molécula mientras que en un método para el control de calidad rutinario no será necesaria la confirmación



completa de la estructura química o composición del producto y bastará con la comparación con una sustancia de referencia. En estos casos el objetivo es confirmar, con un grado de seguridad aceptable, que el producto se corresponde con lo esperado.

- **Ensayos de pureza:** Se debe garantizar que el método permite una evaluación de las impurezas y los productos de degradación definidos en estudios previos, sin interferencia de otras sustancias que puedan estar presentes en la muestra.

Para estos ensayos se presupone que se han realizado estudios previos y se han definido las impurezas y productos de degradación susceptibles de aparecer. Si el método es selectivo para determinados productos de degradación puede utilizarse para controlar la estabilidad del producto.

- **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.

4.2.2.2.2 Según la técnica analítica aplicada:

- ✓ **Ensayos específicos:** Como se ha indicado anteriormente se considera apropiado reservar este término para aquellos métodos analíticos que proporcionen un 100% de selectividad. Este tipo de métodos representaría la situación ideal aunque en el análisis farmacéutico actual su utilización no es muy común. Se podrían considerar ensayos específicos algunos inmuno-ensayos, la espectroscopia de absorción atómica o un acoplamiento masas/masas. El uso de métodos de valoración no específicos se debe combinar con la utilización de otros procedimientos analíticos para demostrar la idoneidad del análisis, como por ejemplo una valoración potenciométrica combinada con un test de impurezas.



- ✓ **Ensayos separativos:** Son los ensayos de más amplia aplicación en la industria farmacéutica actual aunque hay que recordar que no están libres de interferencias. Por ejemplo, en cromatografía líquida no es suficiente para asegurar la selectividad del ensayo con determinar el tiempo de retención. Sería necesaria la comprobación de la ausencia de interferencias con la aplicación de una técnica complementaria adecuada. Este tipo de análisis proporciona una segunda vía de información que confirma la primera.

Entre las combinaciones posibles se puede citar las siguientes:

- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a un detector de diodos (DAD)
- HPLC / Espectrometría de masas (MS)
- HPLC con confirmación por columnas de diferente polaridad
- Cromatografía de gases (GC) / MS
- GC / Espectroscopia de infrarrojos con transformada de Fourier (FT-IR)

4.2.2.3.Procedimientos de determinación de la selectividad

En el estudio de la selectividad, como norma general, 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 excipientes. Se pueden plantear diferentes alternativas para proceder a la demostración documental de la selectividad del método.

➤ **Por adición de las interferencias:**

La primera aproximación sería de aplicación para aquellos analitos para los que se tienen identificadas las posibles interferencias y éstas se encuentran disponibles de forma aislada.

En estos casos se puede comprobar la selectividad comparando los resultados del análisis de muestras con y sin analito en presencia o ausencia de dichas interferencias. Se evaluará a



qué nivel se producen y si es preciso modificar el método o afiliar alguna técnica complementaria.

Para una forma farmacéutica y una materia prima los grupos de muestras que se preparan normalmente serían los siguientes:

Determinaciones para la forma farmacéutica:	Determinaciones para la materia prima:
Matriz	Blanco
Analito	Analito
Matriz + Analito	Otras sustancias similares
Matriz + analito + Impurezas (disolventes residuales, trazas metálicas) + productos de degradación.	Analitos, productos de degradación + Impurezas (disolventes residuales, trazas metálicas, reactivos de síntesis).

Nota:

1. Entendida como todo aquello que acompaña el analito de interés. La cantidad de matriz sobre la que se realizara el análisis será equivalente a la fracción que se tomaría en una aplicación rutinaria del método. En el análisis de la matriz ninguno de los componentes debería dar, de forma ideal, una respuesta cuantificable para descartar posibles interferencias por su parte.
2. El analito a comprobar corresponderá al 100% de la concentración de trabajo. Es el punto de referencia.
3. Especialmente en métodos de identificación es susceptible comprobar el carácter discriminatorio del ensayo si se aplica sobre otros productos de composición similar por los que pudiera ser confundido (ej. una sal sódica por una potásica o cálcica).
4. Las impurezas y productos de degradación que se adicionen corresponderán a los niveles máximos aceptados en el producto en cada caso. Puede ser de interés el análisis de las impurezas por separado.



La elección de la concentración en la que se realiza el estudio podría ser la teórica de trabajo para el principio activo u otros compuestos de interés (ej. conservantes) y las interferencias a su límite máximo establecido. En caso de que se observen interferencias, su nivel puede evaluarse a partir del análisis de seis replicados y el grado de discrepancia entre las determinaciones en presencia o ausencia de las posibles interferencias, mediante la fórmula siguiente:

$$\% \text{ de discrepancia} = \frac{(D_i - D_s)}{D_s} \times 100$$

Donde:

D_i = respuesta media con interferencia

D_s = respuesta media sin interferencia.

También sería de aplicación una prueba “t de Student “para comprobar la existencia o no de diferencias significativas entre los dos grupos.

En métodos muy precisos dicha prueba puede indicar la existencia de diferencias significativas cuando realmente la influencia de las interferencias es aceptable. En estos casos conviene determinar el intervalo de confianza de la diferencia entre los grupos.

La selectividad es un parámetro de aplicación universal ya que debe estudiarse en todo tipo de métodos analíticos. Su estudio requiere la utilización de todos los criterios técnicos que se posean para adaptarlo a las necesidades que se precisen en cada momento y, aun así, resulta imposible reflejar todas las situaciones.

Para la correcta evaluación de un analito se requiere que la señal producida se deba inequívocamente a su presencia y que no existan interferencias de otras sustancias que puedan estar en la muestra. No es necesario desechar los métodos analíticos poco selectivos. Se podrán utilizar siempre que en el método de control de rutina se incluya un procedimiento complementario que demuestre que las sustancias interferentes están



ausentes, o bien que se encuentran en concentraciones inferiores a las que puede producir una interferencia significativa en el resultado.

➤ **Aplicación de técnicas confirmatorias con muestras sometidas a estrés**

Otra posible aproximación se puede realizar mediante el estudio de muestras sometidas a 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, a ser posible, la identidad del analito y que la señal proviene sólo de él. Las condiciones de estrés para lograr una degradación del orden del 10-20% en la mayoría de los principios activos son:

Condiciones para la forma farmacéutica	Condiciones para la materia prima
Calor (40 - 70 °C)	Calor (40 - 100 °C)
Luz	Luz
Humedad relativa (85%)	Ácido (HCl 0.1 N)
	Base (NaOH 0.1 N)
	Oxidante (H ₂ O ₂ 3%)

Los productos así tratados son analizados y se evalúa la pureza cromatográfica y su resolución respecto a los picos más próximos. Un criterio de selectividad para los métodos cromatográficos sería para el pico principal y el conjunto de impurezas superiores al 0.1%, para obtener una resolución cromatografía superior a 1.5 (los picos están resueltos hasta la línea de base). Puede ser necesario ampliar este criterio si aparecen colas en los picos que no permite su clara separación. Si no es posible una perfecta separación debe demostrarse que el valor de la interferencia no es superior al 0.5%.

La evaluación de la degradación se puede determinar comparando los perfiles obtenidos del producto estresado y no estresado. Con esta finalidad puede ser de interés la superposición de los distintos cromatogramas obtenidos.



4.2.3. Linealidad y Rango (1)

4.2.3.1. Definición

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.

Siempre que sea posible se buscará una respuesta de tipo lineal que facilitará su trazado, interpolación e interpretación. Por ejemplo en algunos procedimientos como en los inmuno ensayos la respuesta del método no suele ser lineal pero si proporcional a la concentración. En estos casos son válidos otros ajustes matemáticos.

El rango se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito.

Aunque el proceso lógico consistiría en evaluar cuáles son los límites de concentración en los que el método analítico pierde su linealidad, normalmente se toma como punto de partida un intervalo de concentraciones ya establecido de acuerdo con la experiencia, el conocimiento analítico de la técnica empleada y principalmente en función de las especificaciones.

4.2.3.2. Ámbito de aplicación

Según la guía ICH Q2A se recomienda estudiar la linealidad en todos los métodos de tipo cuantitativo:

➤ Valoración del contenido de principio activo:

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



prima los límites son 98-102% o 99-101%. Debido a esto se suele evaluar la linealidad de los métodos en un rango más amplio, las, ICH recomiendan del 80-120%.

➤ **Uniformidad de contenido**

Puesto que los límites habituales de especificaciones son 85-115% suele evaluarse la linealidad entre el 70-130%. En el caso de que el procedimiento analítico para el análisis del contenido y el de uniformidad coincidan, puede aprovecharse el mismo rango y evaluar la linealidad una sola vez entre el 70-130%.

➤ **Disolución de principio activo**

Se establecerá un rango de ($\pm 20^\circ$) respecto a la especificación, es decir, si se trata de un producto de liberación inmediata el rango sería:

$R = (Q + 20\%, Q - 20\%)$ Siendo Q la especificación establecida (véase USP 36).

En el caso de un producto de liberación controlada, este ($\pm 20\%$) se aplicará a cada límite de disolución parcial. Por ejemplo, en el caso de un producto de liberación controlada que después de una hora se debe haber disuelto un 20% y al cabo de 24 horas un 90 %, el rango a estudiar sería del 0-110%.

➤ **Cuantificación de impurezas**

En este caso se establece como rango de trabajo desde el límite de cuantificación o desde el 50% de la especificación límite de cada impureza hasta un 120% de dicha especificación.

Cuando el límite de especificaciones no esté establecido, la guía ICH (**Q3A, Q3B**) relativa a impurezas describe el "reporting level" cuyo cálculo está basado en el perfil toxicológico de la impureza y la dosis máxima diaria del fármaco en cuestión. Para nuevos principios activos cualquier impureza superior al 0.1% debe ser cualificada (identificación de la estructura molecular, perfil toxicológico, cuantificación, etc.). En



cualquier impureza a este nivel, el límite de cuantificación del método debe ser como mínimo del 0.05% (50% del nivel de especificación).

Si el ensayo de valoración y determinación de impurezas se realizan conjuntamente a partir de un único patrón de principio activo al 100%, la linealidad debe cubrir el rango desde el límite de cuantificación (o el 50% de la especificación de la impureza con un límite inferior) hasta el 120% del valor nominal de dicho principio activo

4.2.3.3.Procedimientos de determinación de la linealidad

4.2.3.3.1. Consideraciones generales

Para evaluar la linealidad existen unos criterios mínimos aplicables a cualquier procedimiento.

- ✓ Dentro del rango establecido se recomienda; estudiar al menos 5 niveles de concentración y analizarlas por triplicado ($K=5$, no de réplicas = 3) con un total de 15 determinaciones ($n=15$). Por ejemplo; 80, 90, 100, 110, 120% del contenido teórico. Estadísticamente lo correcto sería analizar las muestras de forma aleatoria, no obstante, se establece como criterio práctico analizarlas en sentido creciente de concentración para minimizar posibles efectos memoria en el equipo.
- ✓ Para realizar los análisis se recomienda hacer pesadas independientes (por ejemplo 15 pesadas), ya que así se elimina el posible error sistemático que se podría arrastrar partiendo de una sola pesada y realizando diluciones. No obstante, para evaluar la linealidad en las impurezas se suelen utilizar sucesivas diluciones ya que normalmente se trabaja a niveles de concentración muy bajos y esto dificultaría las pesadas.

Las muestras a analizar pueden prepararse a partir de estándares de analito de concentración conocida, o bien a partir de un lote de concentración conocida de la



especialidad terminada. De esta Última forma el estudio de linealidad puede servir también para evaluar la recuperación y con ella la exactitud del método.

El número de repeticiones de cada, dependerá de la precisión del sistema instrumental empleado, y de lo que se decida incluir, como rutina en el procedimiento analítico a validar.

Con los resultados del estudio de la linealidad se prepara una tabla relacionando las cantidades o concentraciones x (variable independiente o predictiva) y la respuesta y (variable dependiente, por ejemplo áreas, alturas, absorbancias, etc.).

La relación entre ambas variables se expresa matemáticamente como una recta de regresión del tipo $y = b \cdot x + a$, obtenida por un método de ajuste (por lo general el de mínimos cuadrados). En algunos casos podría ser necesario alguna transformación matemática previa (uso de logaritmos, recíprocos de las variables, etc.) para obtener funciones lineales.

La representación gráfica de la recta de regresión en un sistema de coordenadas junto con los valores experimentales, permite visualizar la bondad del ajuste. Se pueden representar además las hipérbolas indicativas de los intervalos de confianza.

Si la recta no pasa cerca del origen de coordenadas significa que el método a evaluar está afectado por un error sistemático por defecto o por exceso en el intervalo estudiado. Si existen diferencias apreciables entre los valores experimentales y los puntos de la recta significa que la linealidad no es buena (existe falta de ajuste) o bien que el error experimental es importante y los intervalos de confianza serán amplios (hipérbolas anchas).

4.2.3.3.2. Evaluación estadística de la linealidad

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



Ecuación de la recta	$y = b \cdot x + a$
Valor estimado para x_i	$\hat{y}_i = b \cdot x_i + a$
Valor residual	$e_i = \hat{y}_i - y_i$

a) Ecuación de la recta. Pendiente y ordenada en el origen

En la recta de regresión $y = b \cdot x + a$, “x” es la concentración, “y” la respuesta, “b” el valor de la Pendiente y, “a” el término independiente.

La pendiente “b” se encuentra relacionada con la Sensibilidad del método de forma que a mayor pendiente mayor sensibilidad (respuesta del método frente a, los cambios de la concentración del analito). El término independiente “a”, u ordenada en el origen, es la intersección de la recta con el eje de ordenadas y es indicativo del error sistemático, no difiriendo estadísticamente de cero en caso de no existir sesgo.

b) Coeficiente de correlación (r) y coeficiente de determinación (r^2)

El coeficiente de correlación 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.

El valor recomendable para el coeficiente de correlación es ≥ 0.999 , aunque en el caso de impurezas se admite ≥ 0.990 .

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



c) Variancia residual constante (homoscedasticidad)

La representación de los residuales “ e_i ” aporta mucha información acerca de la validez del modelo. De entre las diversas formas de hacerlo la más habitual consiste en representar los residuales (eje de ordenadas) frente a los valores estimados (eje de abscisas). La distribución de los puntos debería ser aleatoria y no reflejar ninguna tendencia.

d) Análisis de la Variancia: ANOVA

Para poder realizar una **ANOVA** se deben cumplir los siguientes supuestos:

1. Homogeneidad de variancias
2. Normalidad de los residuales

1. Homogeneidad de variancias

La homogeneidad de variancias se puede comprobar aplicando, por ejemplo, un test de Cochran que indicará, si el factor concentración tiene alguna influencia en la variabilidad de los resultados. Estadísticamente sería más correcto normalizar previamente las respuestas, ya que de lo contrario se comparan coeficientes de variación que corresponden a medias de concentración diferentes entre sí. De todas formas es habitual efectuar el test sin cumplir este requisito cuando el intervalo de concentraciones no es excesivamente amplio.

2. Normalidad de los residuales

Se puede comprobar mediante la representación gráfica que algunos programas estadísticos realizan de los mismos o bien aplicando un test de normalidad.

Una vez comprobado estos supuestos se calcularan los estadísticos F_1 y F_2 .

$F_{1exp} > F_{1\text{ tabla}}$ demuestra una pendiente distinta de cero.

$F_{2exp} < F_{2\text{ tabla}}$ demuestra la linealidad entre los resultados obtenidos.

Los valores tabulados para F se obtienen en las tablas estadísticas de acuerdo a los grados de libertad correspondientes y a un grado de significación α normalmente igual a 0.05.



e) Test de linealidad

Existen varios procedimientos para verificar la linealidad, uno de ellos es el coeficiente de variación de los factores respuestas (f).

El factor de respuesta (f) expresa la relación entre la lectura o respuesta (Absorbancia) 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 sí y cercanos a los valores de la pendiente. Valores del coeficiente de variaciones superiores al 5% serían indicativos de una posible falta de linealidad, siendo recomendables no superiores al 2%.

f) Test de proporcionalidad

El test de proporcionalidad 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 corresponde a un 1 % de la respuesta del analito a valor nominal.

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, $\alpha = 0.05$)

La ordenada en el origen tiene que ser estadísticamente igual a cero para el grado de significación escogido. En los intervalos de confianza ($a \pm t * S_a$) debe estar incluido el cero. En caso de no cumplirse el test de proporcionalidad sería necesario interpolar el resultado del análisis de cualquier muestra entre al menos dos estándares, uno superior y otro inferior. De esta forma se obvia el sesgo del método.



4.2.4. Precisión (1)

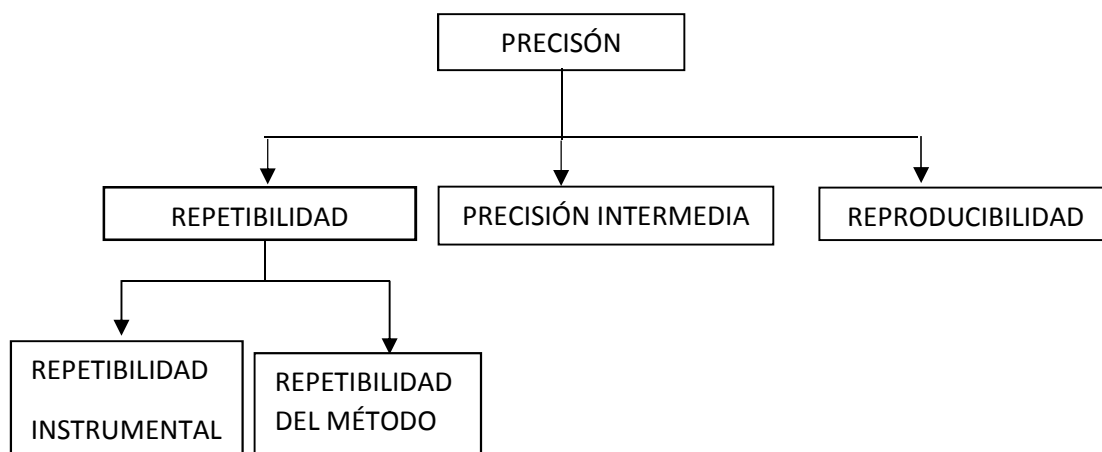
4.2.4.1. Definición

La 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.

La procedencia de las muestras destinadas al estudio de la precisión puede ser de muestras reales o preparadas en el laboratorio.

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 todo método de ensayo. 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, reactivos, tiempo, etc.) de aquí la importancia del estudio de la precisión.

La precisión engloba diferentes tipos de estudios:





- **Repetibilidad:** estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma 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.
- **Precisión intermedia:** estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra pero en condiciones operativas diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, etc.) y en un, mismo laboratorio.
- **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 y se calcula matemáticamente de la siguiente manera:

$$CV = \frac{s}{X}(100\%)$$

Dónde:

s = desviación estándar

x = media aritmética de los resultados

En la siguiente tabla (Huber, 1999) se resumen los factores que pueden o no pueden variar en el estudio de la repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

	Repetibilidad	Precisión intermedia	Reproducibilidad
Instrumento	Igual	Diferente	Diferente
Día de análisis	Igual	Diferente	Diferente
Analista	Igual	Diferente	Diferente
Otros factores (p. ej. reactivos)	Igual	Diferente	Diferente
Laboratorio	Igual	Igual	Diferente



4.2.4.2 Ámbito de aplicación

Según la ICH Q2B el estudio de la precisión se debe realizar únicamente para la determinación cuantitativa de principios activos y cuantificación de impurezas. Por lo tanto la evaluación de la precisión no es necesaria ni en el ensayo de identificación ni en el test límite de impurezas.

4.2.4.3 Repetibilidad

La repetibilidad se expresa matemáticamente por el coeficiente de variación (desviación estándar relativa) de una serie de medidas (ver ecuación anterior).

Uno de los factores que más pueden influir en la repetibilidad del método de análisis es la concentración del analito, ya que la desviación estándar de las respuestas obtenidas aumenta al disminuir la concentración del analito.

Así por ejemplo, cuando se trabaja a concentraciones altas (materia prima) se aceptan valores de coeficientes de variación más bajos que cuando se trabaja a concentraciones más bajas (por ejemplo impurezas).

Por otro lado, el valor aceptado del coeficiente de variación depende del intervalo de aceptación (especificaciones) especificado en el método de análisis. El número de replicados se deduce a partir del coeficiente de variación de repetibilidad del método.

➤ 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. En el caso que se desee analizar el principio activo de una materia prima o de una especialidad farmacéutica se prepara la muestra a la concentración



nominal, y en el caso de analizar impurezas a la concentración del límite especificado.

La estimación de la repetibilidad instrumental se realiza con el cálculo del coeficiente de variación de las respuestas obtenidas

➤ Repetibilidad del método

El ensayo de repetibilidad del método se efectúa sobre una serie de alícuotas de una muestra homogénea 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 muestras a la concentración nominal.
- ✓ Un mínimo de 3 muestras a tres 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 respuestas obtenidas y con los intervalos de confianza a cada nivel de concentración estudiado.

a) Coeficiente de variación

El cálculo del coeficiente de variación permite deducir el número de replicados que se deben realizar en el método de ensayo para un determinado intervalo de aceptación. Esta relación se establece según la fórmula siguiente (aplicable a principios activos):

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

Donde:

LA = valor límite aceptado.

n = número de replicados que se deben realizar en el método de análisis.



$$Z (\alpha= 0.01) = 2.58$$

4.2.4.4 Precisión intermedia

El objetivo del estudio de la precisión intermedia es determinar la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, en un mismo laboratorio pero en condiciones operativas diferentes.

En el estudio de la precisión intermedia se deben considerar aquellas circunstancias en las que se pretende desarrollar el método de ensayo. El analista debe evaluar los efectos causados al variar una serie de factores.

Típicos factores a estudiar incluyen el día, el analista, el instrumento, etc.

No es necesario estudiar cada uno de estos factores individualmente sino que es suficiente comprobar que la variabilidad aportada por el conjunto de factores está dentro de los límites establecidos.

Para estudiar los, factores de una manera aleatoria se recomienda un estudio matricial y, para cada combinación de éstos, las muestras deben ser preparadas independientemente como mínimo por triplicado.

A continuación se propone un modelo de un diseño experimental donde se estudia la variación de los factores; día de análisis, analista e instrumento. En este modelo se presenta el caso particular de determinar la variación de los resultados obtenidos al considerar dos analistas, dos instrumentos y realizando el análisis tres días diferentes.



Precisión intermedia:

Instrumento A	Analista x	Día 1	Día 2	Día 3
	Analista y	Día 1	Día 2	Día 3
Instrumento B	Analista x	Día 1	Día 2	Día 3
	Analista y	Día 1	Día 2	Día 3

La estimación de la precisión intermedia se realiza con el cálculo del coeficiente de variación global de las respuestas obtenidas, es decir, considerando cada resultado independientemente.

Generalmente se aceptan valores de coeficiente de variación de la precisión intermedia inferiores al doble del coeficiente de variación de la repetibilidad del método. En caso de que no se cumpla es necesario evaluar cuál es el factor responsable de esta variabilidad.

Se recomienda, además, determinar el coeficiente de variación para cada grupo de análisis para comprobar que se cumplen las especificaciones establecidas en la repetibilidad del método.

4.2.4.5 Reproducibilidad

La reproducibilidad estudia la variabilidad de los resultados inter-laboratorio. El objetivo de este estudio es verificar que el método de análisis proporciona los mismos resultados en diferentes laboratorios. La reproducibilidad de dicho método de análisis se determina analizando una serie de alícuotas procedentes de lotes homogéneos en diferentes laboratorios, diferentes analistas y utilizando condiciones operativas y ambientales distintas pero siguiendo el procedimiento descrito en el método.

Estas condiciones operativas y ambientales diferentes pueden ser:

- ✓ Humedad y temperatura ambiental diferente



- ✓ Analistas con diferente experiencia
- ✓ Instrumentos de características diferentes (volumen muerto en un HPLC)
- ✓ Variaciones de condiciones instrumentales (composición de la fase móvil, pH y flujo)
- ✓ Variaciones de detalles experimentales no especificados en el método
- ✓ Equipos y fungibles de diferente antigüedad
- ✓ Disolventes y reactivos de diferente calidad

Este estudio es necesario si se pretende realizar el método en diferentes laboratorios o si se quiere estandarizar un procedimiento analítico, por ejemplo para incluirlo en las Farmacopeas.

4.2.5 Exactitud (1)

4.2.5.2 Definición y generalidades

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.

No deben confundirse exactitud y precisión. La precisión está relacionada con la dispersión de una serie de mediciones, pero no da ninguna indicación de lo cerca que está del valor verdadero. Se puede tener mediciones muy precisas pero poco exactas; sin embargo, para que un método sea exacto se requiere un cierto grado de precisión.

De la definición de exactitud surge el principal problema: ¿cuál es el valor verdadero del analito en la muestra? Por desgracia el valor verdadero en muchos casos se desconoce, no obstante, cuando se dispone de patrones de referencia certificados, el valor de dicho patrón es el que se acepta como valor verdadero y la exactitud puede evaluarse aplicando el



método sobre dicho patrón, o bien analizando muestras placebo o de problema a las que se ha añadido una cantidad conocida de dicho patrón.

También se acepta la comparación de los resultados con un con un método de referencia validado del que ya se ha demostrado 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.

4.2.5.3 Ámbito de aplicación

Según la guía (ICH, Q2A) debe ensayarse la exactitud en métodos de análisis para la valoración en materia prima y en producto acabado y en métodos de análisis de cuantificación de impurezas.

Según la USP 36 también debe evaluarse la exactitud en los métodos de análisis de estudios de velocidad de disolución.

4.2.5.4 Procedimientos de determinación de la exactitud

La exactitud debe demostrarse en todo el rango especificado para el método analítico. Se recomiendan un mínimo de 9 determinaciones sobre 3 niveles de concentración del analito que cubran el rango especificado, por ejemplo 3 determinaciones x 3 niveles de concentración, que podrían ser la concentración central y las concentraciones en los extremos del rango.

En función del tipo de método a validar y de cada caso concreto se deberá tener en cuenta el rango de concentraciones de trabajo:

- 1) Riqueza de un principio activo en materia prima o en producto acabado: 80-120%.
- 2) Impurezas: desde el 50% del nivel de especificación hasta el 120% de dicho nivel.



- 3) Ensayo de disolución: si se trata de un producto de liberación inmediata sería de Q-20% a Q+20%; si se trata de un producto de liberación controlada, sobre cada límite de disolución en cada periodo de tiempo se aplicaría ($\pm 20\%$).

La exactitud se expresara 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 junto a los intervalos de confianza.

Expresión matemática de la exactitud

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

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

Donde:

x_m = valor medio hallado

μ = valor aceptado como verdadero

4.2.5.4.1 Riqueza de un principio activo

➤ Aplicación del método analítico a una muestra de riqueza conocida

Para evaluar la riqueza de un principio activo o de una materia prima es habitual la utilización de un método absoluto, por ejemplo una valoración ácido-base. En este caso para demostrar la exactitud del método puede valorarse un patrón de referencia de concentración conocida y se compara el valor hallado con el valor verdadero conocido.

No obstante, como ya se ha comentado anteriormente, en muchos casos no existen patrones de referencia certificados por un organismo oficial, como los patrones del NIST (National Institute of standards and Technology) o los suministrados por las diferentes



Farmacopeas (EP, USP standards, BP standards). Entonces la evaluación de la exactitud puede llevarse a cabo por comparación con un método de referencia validado.

➤ Comparación con un método de referencia validado

Se comparan los resultados obtenidos con el método analítico que se quiere validar con los obtenidos con un método de referencia. Cuya exactitud este bien determinada o definida. Ambos métodos deben ser independientes.

➤ Determinación cuantitativa de un analito en un producto acabado

El enfoque es similar al que se plantea para evaluar la exactitud de un método para la riqueza de un principio activo pero en este caso se trabaja sobre el producto acabado.

➤ Aplicación del método analítico a una muestra de concentración conocida

La muestra de concentración conocida se prepara a partir de un placebo cargado con cantidades conocidas de analito, o bien, cuando es difícil o imposible obtener un placebo que no contenga el analito en cuestión, se puede usar el método de adición de patrón sobre el problema.

a) Método del placebo cargado.

Se prepara un placebo del problema que contiene todos los ingredientes excepto el analito a determinar. Sobre dicho placebo se añaden cantidades conocidas de un analito patrón a tres niveles de concentración dentro del rango a estudiar.

El ensayo de recuperación se realiza como mínimo con 3 replicados para cada nivel. El analito se determina en cada muestra utilizando el mismo método analítico a evaluar y se calcula la recuperación.



El problema del método del placebo cargado está en cómo se introduce el analito sobre el placebo. El proceso de adición, por mucho que simule lo más exactamente posible la preparación del producto acabado, sólo se trata de una aproximación ya que en el producto acabado real el analito o principio activo está íntimamente mezclado con los otros ingredientes. Por lo tanto, la eficacia de la recuperación obtenida con el método del placebo cargado puede llegar a ser más elevada de lo que en realidad es.

Aun teniendo en cuenta este inconveniente, el método del placebo cargado es una técnica común y aceptada para la determinación de la recuperación y la exactitud de un método.

b) Método de adición de patrón.

Se utiliza esta aproximación cuando no es posible preparar un placebo de la matriz de la muestra que no contenga el analito. Este podría ser el caso de las muestras liofilizadas en los que la presencia o ausencia del analito es significativamente distinta. Se añaden sobre una o varias muestras cantidades conocidas de un analito patrón a tres niveles de concentración dentro del rango a estudiar. Se realizan como mínimo 3 replicados para cada nivel y se analizan las muestras adicionadas y no adicionadas según el método analítico calculando finalmente la recuperación.

Este método tiene la ventaja de utilizar muestras reales y no requiere la preparación especial de un placebo cargado. No obstante, también debe hacerse la misma reflexión que para el método del placebo cargado, ya que la adición de un patrón sobre una muestra no es exactamente lo mismo que el producto acabado real.

✓ Comparación con un método de referencia validado

Se comparan los resultados obtenidos con el método analítico que se quiere validar con los obtenidos con un método de referencia, cuya exactitud está bien determinada o definida. Ambos métodos deben ser independientes.



4.2.5.5 Criterios de aceptación

La recuperación esperada depende de la matriz de la muestra, del procedimiento de preparación de la muestra (más o menos complejo) y de la concentración del analito en la misma. Aunque es deseable alcanzar valores de recuperación cercanos al 100%, en según qué tipos de muestras de matrices complejas (productos naturales, fluidos biológicos, alimentación, etc.) sólo se obtienen valores del 50, 80 o 90%. En estos casos es importante que aunque la recuperación sea baja, la precisión del método sea alta ya que entonces puede intentarse aplicar un factor de corrección.

A continuación se presentan algunos criterios de aceptación que pueden orientar en la estimación de la recuperación en función del tipo de muestra a analizar y de la concentración del analito en dicha muestra, aunque pueden aceptarse valores de recuperación más bajos según las necesidades del método:

1. Valores orientativos aceptables en la industria farmacéutica.

Tipo	Coef. Recuperación (%)
Materia prima	99.0 - 101.0
Formulado farmacéutico	97.0 - 103.0
Trazas (0.1 -1 ppm)	Min. 90%
Trazas (<0.1 ppm)	Mín. 75%

2. Valores orientativos aceptables según la AOAC (Asociación Oficial de Químicos Analíticos), en función de la concentración del analito.



% Analito	Relación	Unidades	Factor de recuperación (%)
100	1	100%	98-102
210	10^{-1}	10%	98-102
≥ 1	10^{-2}	1%	97-103
≥ 0.1	10^{-3}	0.1%	95-105
0.01	10^{-4}	100 ppm	90-107
0.001	10^{-5}	10 ppm	80-110
0.0001	10^{-6}	1 ppm	80-110
0.00001	10^{-7}	100 ppb	80-110
0.000001	10^{-8}	10 ppb	60-115
0.0000001	10^{-9}	1 ppb	40-120

- Valores orientativos aceptables para los métodos descritos en EPA: el porcentaje de la recuperación debe estar entre el 50 y el 150 % del valor teórico.
- Otros autores recomiendan que la recuperación expresada como porcentaje sea ± 4 del valor teórico en todos los niveles, siendo CV el coeficiente de variación en porcentaje obtenido en el ensayo de la precisión del método.

4.2.6 Robustez (1)

4.2.6.2 Definición

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.

La robustez (Robustness) no debe confundirse con el término Ruggedness. Este último no se menciona en las guías ICH, pero sí en la Farmacopea USP. Esta define el término Ruggedness como el grado de reproducibilidad de los resultados mediante el análisis de las mismas muestras bajo una variedad de condiciones tales como diferentes laboratorios, diferentes analistas, diferentes instrumentos, lotes de reactivos, días, tiempos, diferentes temperaturas, etc. Es decir, se sigue el método analítico dentro de los parámetros especificados en él, pero introduciendo en las condiciones experimentales las variaciones habituales de laboratorio a laboratorio. Da una idea de la influencia que tienen las variables ambientales y operacionales del método en los resultados, por lo que podría asimilarse al término Reproducibilidad.

4.2.6.3 Ámbito de aplicación

Aunque tanto las guías ICH como la USP definen la robustez junto con los parámetros de validación de un método analítico, no es considerado, todavía, un requisito necesario para registro de especialidades, sino que se trata de un estudio que surgió con el fin de resolver los problemas que se planteaban en la transferencia de métodos analíticos entre laboratorios.

En estas circunstancias era frecuente que algún parámetro del método sufriera una variación que provocaba serias dificultades en la equivalencia entre los resultados de ambos centros de análisis, de modo que con el fin de identificar los factores potencialmente críticos surgió la necesidad de evaluar las fuentes de variación del método de análisis.

Por esta misma razón, las guías ICH recomiendan incluir la robustez en una fase apropiada del desarrollo del método y no en la validación propiamente dicha, dado que si la robustez del método no se comprueba con anterioridad a iniciar la validación, puede suceder que se



intente validar un método poco robusto, con los consiguientes malos resultados y pérdida de tiempo y dinero.

Incluso después de realizar el estudio de robustez podría concluirse que se debe modificar algún parámetro del método, obligando a la consiguiente revalidación de los puntos necesarios. Se considera por tanto que antes de fijar los parámetros analíticos y redactar el método a validar, es recomendable hacer un estudio de robustez de forma que una vez fijados los márgenes en los que el método es robusto, se pudieran incluir éstos como parte del método final, dotándolo así de una cierta flexibilidad.

Es decir se tendría una justificación válida que apoyaría la modificación de ciertos parámetros en el caso de que fuera necesario, por ejemplo a la hora de cumplir una idoneidad del sistema en cromatografía. Por el contrario, en el caso de los factores más críticos, debe hacerse mención especial de la importancia que tiene ajustar el valor o seguir el procedimiento al pie de la letra.

De hecho la consecuencia directa de los resultados del estudio de robustez ha de ser la definición razonada del test de idoneidad del método, que en muchas ocasiones es fijado de una forma arbitraria y sin saber a ciencia cierta si los requisitos que impone son realmente necesarios o limitan la realización del método a unas condiciones escasamente reproducibles.

Todos los métodos, sea cual sea la técnica empleada, son susceptibles de ser sometidos a un estudio de robustez. Algunos pueden tener muchos parámetros sobre los que actuar y \ otros menos. Además éstos no tienen por qué ser sólo factores relacionados con la medida final, sino que pueden ser de cualquier etapa del procedimiento analítico, como por ejemplo la preparación de la muestra. Por esto, la primera etapa del estudio es precisamente analizar todo el método y definir qué factores son los que se espera que influyan más en el resultado final.



4.2.6.4 Procedimiento de determinación de la robustez

1. Factores y niveles de influencia

Antes de definir los factores de variación, hay que establecer dónde se quieren estudiar su influencia. Dicho de otra forma, qué parámetros se van a medir en cada ensayo.

En el caso de un análisis cuantitativo resulta evidente que se debe analizar la influencia de cada variable sobre la concentración de analito calculada. El estudio de la influencia sobre varios parámetros nunca implica la realización de más ensayos, sino que se puede hacer a partir de los mismos. Los factores a evaluar en cualquier método de análisis pueden ser tanto factores cuantitativos (ej. influencia de la longitud de onda, concentración de un determinado reactivo) como cualitativos (ej. fabricante de la celda de validación fabricante de un determinado reactivo).

2. Factores que pueden variarse para la técnica UV-VIS para determinar la robustez del método
 - ✓ La celda
 - ✓ El equipo UV-VIS
 - ✓ El solvente
 - ✓ La longitud de onda

4.2.6.4.1 Diseños factoriales fraccionados

Normalmente se utilizan dos tipos de diseños factoriales:

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

Los más habituales y sencillos son los diseños de Plackett-Burman, con los que a partir de $(f+1)$ experimentos se pueden llegar a evaluar el efecto de “f” factores, la desventaja es que en estos diseños, a diferencia de los diseños fraccionados, los efectos de las interacciones entre 2 o más factores quedan confundidas con los efectos principales, es decir, no puede



evaluarse el efecto de las interacciones entre factores. No obstante, también ha de, señalarse que dicho efecto suele ser en la práctica casi siempre despreciable

Diseño factorial completo de ocho experimentos (2^3) para evaluar la influencia de tres factores. Mediante la matriz resultante del análisis factorial para este caso, se puede establecer la influencia de tres factores A, B y C así como de sus interacciones dos a dos.

La interacción de los tres conjuntamente también puede ser tenida en cuenta:

Factores	Interacciones						
Nº de ensayo	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
1	-	-	-	+	+	+	-
2	+	-	-	-	-	+	+
3	-	+	-	-	+	-	+
4	+	+	-	+	-	-	-
5	-	-	+	+	-	-	+
6	+	-	+	-	+	-	-
7	-	+	+	-	-	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+

El signo contenido en las columnas A, B, C es el correspondiente a la desviación diseñada del factor respecto a su valor nominal. La columna Interacción AB es el resultado del producto algebraico de los signos de las columnas A y B. Y de la misma forma la de la columna ABC es el correspondiente al producto de cada una de las columnas A, B, C. Cada línea representa un experimento a realizar.

Se realizan los ocho ensayos según indica cada línea de la matriz con lo que se obtendrán ocho resultados para contenido en principio activo, o cualquiera de los parámetros que nos interese analizar: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 y R8.



Una vez obtenidos los resultados el siguiente paso es realizar la evaluación estadística que evidencie cuál de los factores, o que interacción entre ellos tiene una influencia significativa.

Una forma sencilla de llevarlo a cabo sería calcular la influencia de cada factor de la siguiente manera (Caporal-Gautier, 1992):

Influencia del factor A:

$$A = 1/4 (-R1 + R2 - R3 + R4 - R5 + R6 - R7 + R8)$$

Influencia del factor B:

$$B = 1/4 (-R1 - R2 + R3 + R4 - R5 - R6 + R7 + R8)$$

La influencia sobre el parámetro de la interacción entre el factor A y B será:

$$AB = 1/4 (+R1 - R2 - R3 + R4 + R5 - R6 - R7 + R8)$$

Así se calculan los efectos principales y las interacciones entre los diferentes factores, de forma que puede ya intuirse cuáles de ellos pueden tener realmente relevancia.

En cualquier caso una manera también sencilla de comprobar la importancia del efecto generado consiste en calcular para cada caso el correspondiente intervalo de confianza:

Por ejemplo para el factor A: $A \pm t * \frac{S_{exp}}{\sqrt{nt}}$

Dónde:

t = coeficiente de Student para probabilidad $(1-(\alpha/2))$ y el número de grados de libertad de S_{exp}

S_{exp} = desviación estándar de los resultados de los experimentos.

n = n° de experimentos.



Si el intervalo de confianza del efecto de un factor contiene el cero, este efecto puede considerarse como negligible. Si el cero no se encuentra dentro del intervalo el resultado del análisis significa que se halla influenciado por la variación del factor en cuestión.

De esta forma todos aquellos factores cuyo intervalo de confianza excluya el cero deberán ser fijados con gran exactitud en el procedimiento de análisis.

4.3 Espectrofotometría (2)

La espectrofotometría UV-visibles una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma literal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma.

4.3.1 Espectro:

Se define como una representación gráfica o fotográfica de la distribución de intensidades de la radiación electromagnética emitida o absorbida por la materia, en función de la longitud de onda de dicha radiación. Los espectros son debidos a transiciones entre estados de energía característicos de la materia.

Los espectros pueden ser:

- **Emisión:** que se obtienen excitando adecuadamente la materia para que emita radiación electromagnética.
- **Absorción:** obtenidos sometiendo a la materia a una radiación electromagnética continua y representando la proporción de radiación absorbida por la misma en función de la frecuencia o longitud de onda.



ESPECTROFOTOMETRÍA: Es un método de análisis que hace uso de la intercalación entre la materia y la energía radiante la cual se refiere a como las ondas electromagnéticas se propagan y transporta sin transferencia de materia.

ESPECTROFOTÓMETRO: Es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia.

4.3.2 Principio de la espectrofotometría:

Todas las sustancias pueden absorber energía radiante, aun el vidrio que parece ser completamente transparente absorbe radiación de longitudes de ondas que no pertenecen al espectro visible; el agua absorbe fuertemente en la región del infrarrojo.

La absorción de las radiaciones ultravioletas, visibles e infrarrojas depende de la estructura de las moléculas, y es característica para cada sustancia química.

Cuando la luz atraviesa una sustancia, parte de la energía es absorbida; la energía radiante no puede producir ningún efecto sin ser absorbida.

El color de las sustancias se debe a que estas absorben ciertas longitudes de onda de la luz blanca que incide sobre ellas y solo dejan pasar a nuestros ojos aquellas longitudes de onda no absorbidas.

La espectrofotometría ultravioleta-visible usa haces de radiación del espectro electromagnético, en el rango UV de 80 a 400 nm, principalmente de 200 a 400 nm y en el de la luz visible de 400 a 800 nm, por lo que es de gran utilidad para caracterizar los materiales en la región ultravioleta y visible del espectro.



Al campo de luz UV de 200 a 400 nm se le conoce también como rango de UV cercano, la espectrofotometría visible solamente usa el rango del campo electromagnético de la luz visible, de 400 a 800 nm.

Además, no está de menos mencionar el hecho de que la absorción y transmitancia de luz depende tanto de la cantidad de la concentración y de la distancia recorrida.

4.3.3 Componentes básicos de un espectrofotómetro:

4.3.3.1 Fuentes:

- Lámparas de deuterio e hidrógeno. La excitación eléctrica de deuterio o hidrógeno a baja presión produce un espectro continuo en la región UV, que es utilizable en la región de 160 a 375 nm. Puesto que el vidrio absorbe fuertemente a longitudes de onda menores que 350 nm, las lámparas de deuterio requieren la utilización de cubetas de cuarzo.
- Lámparas de filamento de tungsteno. Es la fuente más común de radiación visible e infrarrojo cercano, se utiliza en la región de longitud de onda de 350 a 2500nm.

4.3.3.2 Selectores de longitud de onda:

Es la parte más importante del equipo, determinando en gran parte su calidad. Son dispositivos que filtran el espectro producido por la fuente, dejando “pasar” sólo radiaciones en un rango de longitud de onda determinada.

4.3.3.3 Filtros de absorción:

Sirven para la región visible de espectro y funcionan absorbiendo ciertas zonas de éste. El tipo más usual es un vidrio colocado o una suspensión de gelatina entre dos placas de vidrio. El ancho de banda proporcionado por este tipo de filtros es bastante ancho (30 - 250 nm).



4.3.3.4 Filtros de interferencia:

Proporciona bandas de radiación bastante más estrechas que el filtro de absorción. Su funcionamiento se basa en la interferencia óptica, esto es, la interferencia destructiva entre la radiación que se quiere eliminar.

4.3.3.5 Monocromadores:

Son superiores en calidad a los filtros. Existen dos tipos, los de red y los de prisma

4.3.3.6 Recipientes para la muestra:

Las celdas o cubetas que contienen la muestra deben fabricarse de un material que no interfiera con la radiación que estamos utilizando. Para la región del ultravioleta (bajo de 350nm) se necesitan cubetas de cuarzo. Tales cubetas son sumamente costosas, por lo tanto se deben manipular con extremo cuidado. En la región entre 350 y 2000 nm se utilizan cubetas de vidrio de silicato. El plástico se puede utilizar para el visible (400-800 nm). El ancho más común de una cubeta es de un centímetro.

La calidad de los datos de absorbancia depende de manera crítica de la forma en que se usen y mantengan las cubetas. Las huellas dactilares, la grasa o la suciedad en las paredes alteran de forma notable las características de transmisión de una cubeta. La superficie de las ventanas no deben tocarse durante su manipulación, las cubetas no se deben frotar ni limpiar con abrasivos.

4.3.3.7 Detector de radiación y procesador de señales:

El detector es un transductor que convierte la energía radiante en una señal eléctrica. El procesador es un dispositivo que amplifica la señal electrónica que recibe del detector. Algunos pueden realizar operaciones matemáticas con la señal, tales como diferenciar, integrar o convertir en logaritmo.



4.3.4 Ley de Lambert y Beer

En la ley de Lambert se dice que la cantidad de luz absorbida por un objeto depende de la distancia recorrida por la luz.

4.3.4.1 Ley de Beer

La ley de Beer declara que la cantidad de luz absorbida por un cuerpo depende de la concentración en la solución.

Si hacemos incidir un haz de luz paralelo sobre una solución de una especie absorbente de concentración “c” contenida en una cubeta de “b” cm de grosor (ver figura), el haz se atenúa de P_0 hasta P. Donde P_0 y P es la cantidad de energía radiante que incide en el detector por unidad de superficie y por unidad de tiempo (potencia radiante o intensidad de radiación).

La transmitancia T de la solución es la fracción de radiación incidente transmitida por la solución: $T = P/P_0$

La absorbancia A o densidad óptica de una solución se define por la ecuación:

$$A = -\log_{10} T = \log_{10} P_0/P$$

La absorbancia es directamente proporcional a la longitud b que recorre la radiación a través de la solución y a la concentración de la especie absorbente. Como la longitud no varía y a es una constante de proporcionalidad tenemos una relación lineal entre absorbancia y concentración. De esta manera, si medimos la absorbancia de una solución y conocemos el valor de a y el grosor de la cubeta (b) estamos en condiciones de calcular la concentración (c) de la especie en solución. Esta relación se conoce como la ley de Lambert- Beer y se escribe usualmente como: $A = a \times b \times c$.



Donde:

A es la absorbancia de la muestra

“a” es la absortividad o coeficiente de extinción, propio de cada compuesto. Su magnitud depende de las unidades utilizadas para b y c. Si b está en centímetros y c en gramos por litro, entonces la absortividad tiene unidades de $L\ g^{-1}\ cm^{-1}$

“b” es el grosor de la cubeta (cm).

“c” es la concentración del analito (g/ L), cuando c se expresa en moles por litro (mol/ L o M), entonces a se cambia por ϵ , que es la absortividad molar o coeficiente de extinción molar. Entonces la ley de Beer queda así:

$$A = \epsilon \times b \times c$$

Donde ϵ tiene unidades de $L\ mol\ cm^{-1}$

4.3.4.2 Aplicaciones de la ley de Beer

La ley de Beer se puede utilizar en distintas maneras. Pueden calcularse las absortividades molares de las especies si se conocen sus concentraciones, también se puede utilizar el valor de la absorbancia medida para conocer la concentración si es que se conoce la absortividad y la longitud de la trayectoria de la radiación. Sin embargo, la absortividad es una función de diversas variables, tales como el disolvente, la composición de la solución y la temperatura, de ahí que los valores de la absortividad que se encuentra en la literatura varíen con las condiciones en las que se hace la medición.

Por esta razón, es aconsejable no depender nunca de los valores dados en la literatura para un análisis cuantitativo. Para conocer la absortividad en las condiciones del análisis, se preparan varias soluciones patrón analito en el mismo disolvente y una misma temperatura. Con las soluciones patrón se construye una curva de calibración, o curva de trabajo, de absorbancia frente a la concentración, o también puede obtenerse una ecuación de regresión lineal.



A veces es necesario hacer por duplicados de la solución del analito para compensar los efectos debidos a la matriz, también se puede aplicar el método de las adiciones estándar para el mismo fin.

4.3.4.3 Limitaciones de la ley de Beer

La relación lineal entre la absorbancia y longitud de la trayectoria de la radiación a una concentración fija, es una generalización para la que hay pocas excepciones. Por lo contrario, es muy frecuente encontrar desviaciones a la proporcionalidad directa entre absorbancia y concentración (cuando b es constante). Algunas de estas desviaciones, denominadas desviaciones reales, son significativas y representan limitaciones reales de esta ley.

A veces se observan desviaciones debidas a la forma en que se mide la absorbancia (desviaciones instrumentales) o como resultado de los cambios químicos asociados a las variaciones de concentración (desviaciones químicas)

4.3.4.4 Desviaciones de la ley de Beer

4.3.4.4.1 Desviaciones reales de la ley de Beer

La ley de Beer solo describe el comportamiento de la absorción en soluciones diluidas y, en este sentido es una ley limitada. Con concentraciones superiores a 0.01M. La distancia promedio entre los iones o moléculas de las especies absorbentes disminuyen a punto en que cada partícula afecta la distribución de carga (y, por tanto la absorción) de las partículas vecinas. Como el grado de interacción depende de la concentración, cuando este fenómeno ocurre se presenta se observan desviaciones de la relación lineal entre la absorbancia y concentración.

Esto también se observa en concentraciones diluidas de sustancias absorbentes que contienen concentraciones altas de otras especies, electrolitos en particular.



Cuando los iones están muy cerca del analito, alteran su absorptividad molar por interacción electrostática, ocasionando desviaciones de la ley de Beer.

4.3.4.4.2 Desviaciones químicas

Las desviaciones de la ley de Beer se presentan cuando las especies absorbentes experimentan asociación, disociación o reaccionan con el disolvente formando productos que tienen una absorción distinta de la del analito. La magnitud de estas desviaciones se puede predecir conociendo las absorptividades molares de las especies absorbentes y las constantes de equilibrio de las reacciones. Desafortunadamente, casi nunca se percibe que estos procesos están afectando al analito y, por tanto, es prácticamente imposible compensarlos.

Los equilibrios típicos que dan origen a este efecto incluyen a los equilibrios entre monómeros y dímeros, los que forman complejos metálicos con más de un tipo de complejo, los equilibrios ácido-base y los que llevan a asociaciones del disolvente y del analito.

4.3.4.4.3 Desviaciones debidas a los instrumentos

La necesidad de contar con fuentes de radiación monocromática y evitar la radiación parásita (radiación debida al instrumento y que esta fuera de la banda de longitud de onda seleccionada para hacer las mediciones) son algunos de los prácticos que restringen la aplicación de la ley de Beer. Estrictamente, esta ley se aplica sólo cuando las mediciones se hacen con una fuente de radiación monocromática, sin embargo en la práctica, se emplean las fuentes de radiación policromática junto con una rejilla o un filtro para aislar una banda de longitud de onda que sea más o menos simétrica en torno a la longitud de onda que se va utilizar. La luz policromática, literalmente luz multicolor, es la que tiene muchas longitudes de onda, como la que emite un filamento incandescente de tungsteno de una lámpara; tiene una sola longitud de onda, como la de un láser, o una sola banda estrecha de longitudes de onda. Si la banda seleccionada corresponde a una región en que el analito muestra una absorptividad casi constante, las desviaciones de la ley de Beer son mínimas.



Para evitar estas desviaciones es conveniente seleccionar una banda de longitud de onda cercana a la longitud de onda donde la absorción sea máxima y la absorptividad del analito cambie muy poco con la longitud de onda. Utilizar celdas no apareadas también puede ser una causa de desviación de la ley de Beer, que aunque es trivial, también es importante. Para evitar los problemas causados por las celdas óptimamente desiguales en instrumentos de un solo haz, se puede utilizar la misma celda para el blanco y la muestra. Después de hacer las lecturas con el blanco, la celda se vacía por aspiración, se lava, se enjuaga y se llena con la solución del analito.

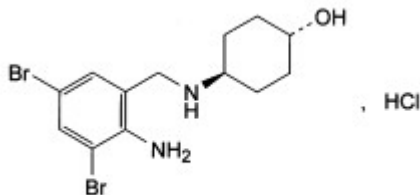
La linealidad de la ley de Lambert-Beer está limitada por factores químicos e instrumentales.

Estos pueden ser:

- Variaciones en las absorptividades a altas concentraciones ($>0.01M$) debido a interacciones electrostáticas de moléculas muy cercanas entre sí.
- Dispersión de la luz debido a la presencia de material particulado en la muestra.
- Fluorescencia o fosforescencia de la muestra.
- Cambios en el equilibrio químico dependientes de la concentración. Por ejemplo si el analito se asocia, disocia o reacciona con el disolvente en función de su concentración. ⁽²¹⁾

4.4 Monografía terapéutica del Ambroxol Clorhidrato (7)

4.4.1 Descripción: (22)





Nombre IUPAC: Clorhidrato de trans-4-(2-amino-3,5-dibromobencilamino) ciclohexanol.

Formula: $C_{13}H_{18}Br_2N_2O \cdot HCl$.

Masa Molecular: 414.60 g/mol

Descripción: Polvo cristalino blanco o ligeramente amarillo.

Solubilidad: Soluble en metanol, poco soluble en agua; casi insoluble en cloruro de metileno.

4.4.2 Propiedades Farmacoterapéuticas del Ambroxol Clorhidrato

4.4.2.1 Mecanismo de acción (9)

El Ambroxol actúa sobre secreciones de las vías respiratorias, dividiendo y disgregando la organización filamentosa del moco, rompe los enlaces de unión de los mucopeptidos, produciendo una fluidificación de las secreciones viscosas y adherentes del tracto respiratorio.

Estimula la secreción de las sustancias líquidas por parte de las glándulas submucosas bronquiales. Estimula la mucokinesis del epitelio bronquial. Estimula la formación de líquido surfactante pulmonar. Permite una mejor difusión de los antibióticos al sitio de acción.

4.4.2.2 Características farmacocinéticas (23)

La absorción de Ambroxol es rápida y casi completa, con linealidad de dosis dentro de los límites terapéuticos.

Las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan en el plazo de 0,5 hasta 3 horas. Dentro de los límites terapéuticos, la fijación a proteínas plasmáticas es de aproximadamente un 90%.



La distribución de Ambroxol de la sangre a tejidos es rápida, alcanzándose la concentración máxima de principio activo en el pulmón. La vida media en plasma es de 7 a 12 horas; no se ha observado acumulación.

Alrededor del 30% de la dosis oral administrada se elimina por efecto de primer paso hepático. Ambroxol se metaboliza fundamentalmente en el hígado por conjugación. La excreción renal total es de aproximadamente el 90%.

4.4.2.3 Características farmacodinámicas (9)

Los estudios han demostrado que el Ambroxol aumenta la secreción de las vías respiratorias y estimula la actividad ciliar. Estas acciones tienen como consecuencia una mejoría del flujo y del transporte de la mucosidad (aclaramiento mucociliar), según se ha demostrado en estudios farmacológicos. La potenciación de la secreción fluida y del aclaramiento mucociliar facilita la expectoración y alivia la tos.

4.4.3 Interacciones (9)

La administración de ambroxol junto con antibióticos (amoxicilina, cefuroxima, eritromicina, doxiciclina) eleva la concentración de antibiótico en tejido pulmonar.

4.4.4 Reacciones adversas (9)

Por lo general Ambroxol es bien tolerado. Se han comunicado ligeros trastornos del tracto gastrointestinal superior (principalmente pirosis y dispepsia y, ocasionalmente, náuseas y vómitos). Raras veces se han producido reacciones alérgicas, sobre todo exantemas cutáneos.

En muy raros casos se han comunicado reacciones agudas graves de tipo anafiláctico, pero su relación con el ambroxol es dudosa. Algunos de estos pacientes presentaban historial de hipersensibilidad a otras sustancias.



4.4.5 Indicación, dosis y vía de administración (9)

➤ **Indicación:**

Ambroxol es un mucolítico, expectorante adecuado para tratar enfermedades agudas y crónicas de las vías respiratorias que se acompañan de alteraciones patológicas en la formación de la secreción bronquial, en especial bronquitis aguda y crónica, traqueo-bronquitis, bronquitis asmática, neumonía y bronconeumonía, tos del fumador, bronquitis, sinusitis y rinitis seca.

➤ **Dosis:**

Adultos y mayores de 12 años: 5 ml cada ocho horas.

Niños de 5 a 12 años: 2.5 ml cada ocho horas.

➤ **Vía de administración:** oral.

4.4.6 Contraindicaciones (9)

No debe administrarse a pacientes con hipersensibilidad conocida al ambroxol o a cualquiera de los componentes del preparado.

4.4.7 Precauciones (9)

Este medicamento contiene sorbitol. Los pacientes con intolerancia hereditaria a la fructosa no deben tomar este medicamento. Puede tener un ligero efecto laxante. Valor calórico 2,6 kcal/g sorbitol. Por contener parahidroxibenzoato de metilo (E-218), y parahidroxibenzoato de propilo (E-216) puede provocar reacciones alérgicas (posiblemente retardadas).



V. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1. Tipo de Estudio:

El estudio es de tipo experimental y de laboratorio; ya que se realizaron pruebas de laboratorios donde se manipulan y controlan cada una de las variables de estudio. El tipo de validación es prospectiva.

5.2. Población:

La población en estudio son los frascos obtenidos en el lote de producción "X" de jarabe Ambroxol Clorhidrato de concentración 15 mg/ 5 mL, producidos en el Laboratorio Mauricio Díaz Müller.

5.3. Muestra:

Se tomaron 10 frascos de Ambroxol Clorhidrato jarabe 15 mg/ 5mL del lote No. "X"

5.4. Alcance:

Cuantificación de Ambroxol Clorhidrato jarabe 15 mg/ 5mL por espectrofotometría UV-VIS a una longitud de onda de 310 nm.

5.5. Variables de estudio:

- Selectividad
- Linealidad y Rango
- Precisión
- Exactitud
- Robustez
- Estabilidad de la solución analítica

5.6. Tipos de variables:

Las variables de estudio son de tipo cuantitativas.



5.7. Plan de análisis:

Para el procesamiento de los datos obtenidos en la investigación, se evaluaron las variables de estudio mediante indicadores establecidos que permiten dar respuesta al planteamiento del problema. La estrategia de análisis de los datos, se realiza mediante un análisis univariado (evaluando las características de cada variable de manera independiente), haciendo uso de datos estadísticos como: medidas de tendencia central, medidas de dispersión, regresión lineal, entre otros. El tratamiento estadístico de los datos se lleva a cabo mediante la utilización del programa estadístico Office Excel 2010.

Los resultados se presentan mediante tablas estadísticas y gráficos elaborados en el programa estadístico Office Excel 2010. Las tablas contienen notas explicativas para identificar la variable de estudio y los gráficos son seleccionados según la naturaleza de la variable e inducen a conclusiones iguales a la que los datos demuestran.

5.8. Verificación de balanzas

La verificación de la balanza, se realiza bajo un procedimiento establecido en el Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos, en el cual se calcula el promedio y la desviación estándar de los resultados obtenidos y éstas deben estar dentro de las especificaciones establecidas.

Especificaciones:

Media: (49.9998 g - 50.0003 g).

Desviación: (0.0000 g - 0.0005 g).



5.9. Materiales y equipos:

A continuación, se detallan los materiales y equipos utilizados en la validación del método analítico para la cuantificación de Ambroxol clorhidrato jarabe:

NOMBRE	DESCRIPCIÓN
Balanza analítica	Marca: A&D, Modelo: GH-120 No. Serie: ds102356 Capacidad: Max. 120 g. Min: 0.0001g. Desviación 0.1 mg.
Balones aforados	Balones de 50 mL, 100 mL, 1000 mL, Marca: Pyrex, Clase A.
Beaker	Capacidad: 250 mL, Marca: KIMAX, Clase A.
Campana extractora de gases	Marca: LABCONCO
Destilador	Marca: fistreem, Modelo: Branstead
Espátula	Material: acero inoxidable.
Espectrofotómetro UV-VIS	Marca: VARIAN, Modelo: Cary 50 EI008023238 OACN 004559540
Material de paso óptico	Marca: VARIAN Celda de cuarzo rectangular de 1 cm.
Papel de aluminio	Marca: Link, para pesar reactivos.
Pera de succión	Marca: FISHERBRAND
Pipetas	Capacidad: 2 mL. Marca: KIMBE USA. Clase A. Capacidad: 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, y 10 mL, Marca: FISHER Brand. Clase A.
Probeta	Capacidad: 50 mL, Marca PYREX USA.
Ultrasonic cleaner	Marca: Brasonic, Modelo: B3-R.



5.10. Reactivos y patrones:

Nombre	Grado	Descripción	Fórmula
Ácido Clorhídrico	Reactivo	Líquido incoloro y con vapores. Olor irritante, característico de ácido Clorhídrico. D: 1.18 g/ mL. PM: 36.5 g/ mol. Normalidad: 12.1 N	HCl
Agua	Destilada	Líquido incoloro e inodoro	H ₂ O
Ambroxol Clorhidrato	Estándar secundario	Polvo blanco Lote: AMBO 241112 Fecha de fabricación 11/12 Fecha de expiración: 10/18 Pureza: 99.6 % Proveedor: FISCHER + KORICTH	C ₁₃ H ₁₈ Br ₂ N ₂ O.HCl
Hidróxido de sodio	Reactivo	Sólido blanco deliquescente. PM: 40 g/ mol. Pureza: 98.2 %.	NaOH
Peróxido de hidrógeno	Reactivo	Líquido incoloro Pureza: 3 % p/v Lote: 16D001 Fecha de expiración: 04/18	H ₂ O ₂
Placebo de Ambroxol Jarabe	Placebo	Líquido incoloro Olor a fresa Lote: 210716	-



5.11. Procedimiento analítico para la cuantificación de ambroxol clorhidrato jarabe:

CONDICIONES DEL MÉTODO	
Técnica analítica	Espectrofotometría UV-VIS
Longitud de onda (λ)	310 nm
Sustancia de referencia	Estándar secundario de Ambroxol Clorhidrato
Solución blanco	HCl 0.1 N
Material de paso óptico	Celda de cuarzo 1 cm
Concentración nominal de la muestra al 100%	60 $\mu\text{g}/\text{mL}$

5.11.1. Preparaciones de reactivos:

- ✓ Preparación de HCl 0.1 N (Blanco): Medir 8.3 mL de ácido clorhídrico concentrado (12.1 N), llevar a un balón de 1000 mL, que contenga 500 mL de agua destilada y luego aforar a volumen con agua destilada.
- ✓ Preparación de HCl 0.08 N: Medir 0.66 mL de ácido clorhídrico concentrado (12.1 N), llevar a un balón de 100 mL, que contenga 50 mL de agua destilada y luego aforar a volumen con agua destilada.
- ✓ Preparación de HCl 0.12 N: Medir 0.99 mL de ácido clorhídrico concentrado (12.1 N), llevar a un balón de 100 mL, que contenga 50 mL de agua destilada y luego aforar a volumen con agua destilada.
- ✓ Preparación de HCl 1N: Medir 8.3 mL de ácido clorhídrico concentrado (12.1 N), llevar a un balón de 100 mL, que contenga 50 mL de agua destilada y luego aforar a volumen con agua destilada.
- ✓ Preparación de NaOH 1N: Pesar 4.07 g de hidróxido de sodio (98.2%) y llevar a un balón de 100 mL, disolver en una pequeña cantidad de agua destilada y luego aforar hasta volumen para obtener una solución de concentración 1 N.



5.11.2 Preparación de la curva de calibración:

Pesar exactamente el equivalente a 30 mg de estándar secundario de Ambroxol Clorhidrato, transferir a un balón de 50 mL, adicionar 10 mL de HCl 0.1 N, disolver por medio de agitación ultrasónica durante 5 minutos, enfriar y aforar a volumen con HCl 0.1 N. Tomar alícuotas separadas de 3, 4, 5, 6, y 7 mL respectivamente y diluir con HCl 0.1 N en balones de 50 mL para obtener las siguientes concentraciones: 36 $\mu\text{g/mL}$, 48 $\mu\text{g/mL}$, 60 $\mu\text{g/mL}$, 72 $\mu\text{g/mL}$, y 84 $\mu\text{g/mL}$. Leer por triplicado en la región ultravioleta a 310 nm, usando HCl 0.1 N como blanco. La concentración final de esta solución es de 60 $\mu\text{g/mL}$.

Alícuota	Concentración
3 mL	36 $\mu\text{g/mL}$
4 mL	48 $\mu\text{g/mL}$
5 mL	60 $\mu\text{g/mL}$
6 mL	72 $\mu\text{g/mL}$
7 mL	84 $\mu\text{g/mL}$

5.11.3 Preparación de la solución muestra de Ambroxol Clorhidrato Jarabe:

Solución 1: Tomar una alícuota de 5 mL de muestra (jarabe) equivalente a 15 mg de Ambroxol Clorhidrato, transferir a un balón de 50 mL, mezclar y aforar a volumen con HCl 0.1 N.

Solución 2: Tomar una alícuota de 10 mL de la solución 1, transferir a un balón de 50 mL y mezclar y aforar a volumen con HCl 0.1N. La concentración final de esta solución es de 60 $\mu\text{g/mL}$.

Leer por triplicado en la región ultravioleta a una longitud de onda de 310 nm usando HCl 0.1N como blanco.

Calcular el porcentaje recuperado de Ambroxol Clorhidrato en la muestra tomada, por la fórmula:



$$\%R = \frac{C_e}{C_t} \times 100$$

Donde:

C_e = Concentración encontrada

C_t = Concentración teórica.

5.12. Procedimiento experimental para determinar los parámetros de la validación:

5.12.1. Idoneidad del sistema.

5.12.1.1. Procedimiento:

Preparar tres soluciones estándares a la concentración nominal (60 µg/ mL), leerlas por triplicado a una longitud de onda de 310 nm y determinar el coeficiente de variación de las respuestas obtenidas.

5.12.1.1.1 Preparación de la solución estándar:

Solución 1: Pesar exactamente la cantidad equivalente a 30 mg de estándar secundario de Ambroxol Clorhidrato, transferir a un balón de 50 mL, adicionar 10 mL de HCl 0.1 N, disolver por medio de agitación ultrasónica durante 5 minutos, enfriar y aforar a volumen con HCl 0.1 N.

Solución 2: De la solución 1, tomar una alícuota de 5 mL, transferir a un balón de 50 mL y diluir a volumen con HCl 0.1 N. La concentración final de esta solución es de 60 µ/ mL.

5.12.1.2 Criterio de aceptación:

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Coeficiente de variación	$\leq 2\%$



5.12.2. Selectividad

5.12.2.1 Selectividad (identificación del activo):

5.12.2.1.1 Procedimiento:

Preparar una solución estándar de Ambroxol Clorhidrato a la concentración nominal como se indica en el acápite 5.12.1.1.1 (Solución X).

Preparar una solución muestra de Ambroxol Clorhidrato jarabe a la concentración nominal como se indica en el acápite 5.11.3. (Solución Y).

Preparar una solución blanco como se indica en el acápite 5.11.1 (Solución Z).

Leer por triplicado cada una de las soluciones y comparar los espectros obtenidos en la solución estándar con los espectros obtenidos en la solución muestra; y los espectros obtenidos en la solución estándar con los espectros obtenidos en la solución blanco.

5.12.2.1.2 Criterios de Aceptación:

El espectro de la solución X (estándar) y el espectro de la solución Y (muestra)

Identificación positiva.

El espectro de la solución X (estándar) y el espectro de la solución Z (blanco).

Identificación negativa.

5.12.2.2 Selectividad frente a productos de degradación:

Preparar una solución estándar a la concentración nominal sin someter a estrés como se indica en el apéndice 5.12.1.1.1 y tres soluciones estándares independientes sometidas a diferentes condiciones de estrés como son:

- ✓ Hidrólisis alcalina
- ✓ Hidrólisis ácida
- ✓ Oxidación



5.12.2.2.1 Hidrólisis alcalina:

Solución 1: Pesar exactamente la cantidad equivalente a 30 mg de estándar secundario de Ambroxol Clorhidrato, transferir a un balón de 50 mL, adicionar 10 mL de NaOH 1N y agitar manualmente por 30 segundos. Almacenar esta solución durante 2 horas a temperatura ambiente de trabajo. Trascurrido el tiempo de almacenamiento, adicionar 20 mL de HCl 0.1 N y disolver por medio de agitación ultrasónica durante 5 minutos, enfriar y aforar a volumen con HCl 0.1 N.

Solución 2: De la solución 1, tomar una alícuota de 5 mL, transferir a un balón de 50 mL y aforar a volumen con HCl 0.1 N. Leer por triplicado la solución a una longitud de onda de 310 nm.

5.12.2.2.2 Hidrólisis ácida:

Solución 1: Pesar exactamente la cantidad equivalente a 30 mg de estándar secundario de Ambroxol Clorhidrato, transferir a un balón de 50 mL, adicionar 10 mL de HCl 1N y agitar manualmente por 30 segundos. Almacenar esta solución durante 2 horas a temperatura ambiente de trabajo. Trascurrido el tiempo de almacenamiento, adicionar 20 mL de HCl 0.1 N y disolver por medio de agitación ultrasónica durante 5 minutos, enfriar y aforar a volumen con HCl 0.1 N.

Solución 2: De la solución 1, tomar una alícuota de 5 mL, transferir a un balón de 50 mL y diluir a volumen con HCl 0.1 N. Leer por triplicado la solución a una longitud de onda de 310 nm.

5.12.2.2.3 Oxidación:

Solución 1: Pesar exactamente la cantidad equivalente a 30 mg de estándar secundario de Ambroxol Clorhidrato, transferir a un balón de 50 mL, adicionar 10 mL de Peróxido de Hidrógeno al 3% y agitar manualmente por 30 segundos. Almacenar esta solución durante 2 horas a temperatura ambiente de trabajo.



Trascurrido el tiempo de almacenamiento, adicionar 20 mL de HCl 0.1 N y disolver por medio de agitación ultrasónica durante 5 minutos, enfriar y aforar a volumen con HCl 0.1 N.

Solución 2: De la solución 1, tomar una alícuota de 5 mL, transferir a un balón de 50 mL y diluir a volumen con HCl 0.1 N. Leer por triplicado la solución a una longitud de onda de 310 nm.

5.12.2.2.4 Criterio de Aceptación:

Comparar los espectros obtenidos de la solución estándar sin someter a estrés con los espectros obtenidos de las soluciones estándares sometidas a estrés químico y evaluar si el grado de respuesta del método analítico es únicamente proporcionado por el analito de interés sin interferencias de picos adyacentes sobre la banda de elución principal del pico de Ambroxol Clorhidrato.

5.12.3 Linealidad y Rango:

5.12.3.1 Linealidad del sistema:

Para la determinación experimental de la linealidad del sistema se preparan 5 soluciones a distintos niveles de concentración diferentes, las cuales se analizan por triplicado, ($k=5$, n^0 de réplicas=3), obteniéndose un total de 15 determinaciones ($n= 15$). Las concentraciones se encuentran dentro del intervalo establecido de 60 – 140 % de la concentración prevista de trabajo.

5.12.3.1.1 Procedimiento:

5.12.3.1.1.1 Preparación de la solución madre:

Pesar exactamente la cantidad equivalente a 30 mg de estándar secundario de Ambroxol Clorhidrato, transferir a un balón de 50 mL, adicionar 10 mL de HCl 0.1 N, disolver por



medio de agitación ultrasónica durante 5 minutos, enfriar y aforar a volumen con HCl 0.1 N.

5.12.3.1.1.2 Preparación de las soluciones a los distintos niveles de concentración:

- Preparación de la solución al 60 % de concentración:

De la solución madre, tomar una alícuota de 3 mL, llevar a un balón de 50 mL y aforar a volumen con HCl 0.1 N. La concentración final de esta solución es de 36 $\mu\text{g/mL}$.

- Preparación de la solución al 80 % de concentración:

De la solución madre, tomar una alícuota de 4 mL, llevar a un balón de 50 mL y aforar a volumen con HCl 0.1 N. La concentración final de esta solución es de 48 $\mu\text{g/mL}$.

- Preparación de la solución al 100 % de concentración:

De la solución madre, tomar una alícuota de 5 mL, llevar a un balón de 50 mL y aforar a volumen con HCl 0.1 N. La concentración final de esta solución es de 60 $\mu\text{g/mL}$.

- Preparación de la solución al 120 % de concentración:

De la solución madre, tomar una alícuota de 6 mL, llevar a un balón de 50 mL y aforar a volumen con HCl 0.1 N. La concentración final de esta solución es de 72 $\mu\text{g/mL}$.

- Preparación de la solución al 140 % de concentración:

De la solución madre, tomar una alícuota de 7 mL, llevar a un balón de 50 mL y aforar a volumen con HCl 0.1 N. La concentración final de esta solución es de 84 $\mu\text{g/mL}$.

Leer por triplicado cada una de las soluciones a los distintos niveles de concentración a una longitud de onda de 310 nm, comenzando desde la solución de menor concentración hasta la de mayor concentración.



5.12.3.1.1.3 Criterios de Aceptación

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Coeficiente de variación	$< 2\%$
Coeficiente de correlación (r)	≥ 0.999
Coeficiente de determinación (r^2)	≥ 0.998
Intervalo de confianza para el intercepto	El intervalo debe incluir el valor de cero
Intervalo de confianza para la pendiente	El intervalo no debe incluir el valor de cero
Análisis de varianza ANOVA	$F_{1\text{exp}} > F_{1\text{tabla}} (4.67)$ $F_{2\text{exp}} < F_{2\text{tabla}} (3.71)$
Test de Cochran	$G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}} (0.68)$
Prueba t para la pendiente	$t_{\text{exp}} > t_{\text{tabla}} (2.1604)$
Prueba t para el intercepto	$t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}} (2.1604)$
Gráfico de residuales	La distribución de los puntos debe ser aleatoria y no debe reflejar ninguna tendencia

5.12.3.2 Linealidad del método:

Para la determinación experimental de la linealidad del método se trabaja con el producto terminado de Ambroxol Clorhidrato jarabe 15 mg/ 5 mL. Se preparan 5 soluciones a distintos niveles de concentración las cuales se analizan por triplicado, ($k=5$, n° de réplicas=3), obteniéndose un total de 15 determinaciones ($n=15$). Las concentraciones se encuentran dentro del intervalo establecido de 60 - 140% de la concentración prevista de trabajo.

5.12.3.2.1 Procedimiento:

5.12.3.2.1.1 Preparación de la solución madre:

Medir exactamente la cantidad de 5 mL del jarabe equivalente a 15 mg de Ambroxol Clorhidrato, transferir a un balón de 50 mL y aforar a volumen con HCl 0.1N.



5.12.3.2.1.2 Preparación de las muestras a diferentes niveles de concentración:

- Nivel 1: De la solución madre, tomar una alícuota de 6 mL y transferir a un balón de 50 mL, aforar hasta volumen con HCl 0.1 N. La concentración final de la solución es de 36 µg/ mL equivalente al 60 % de nuestra concentración nominal.
- Nivel 2: De la solución madre, tomar una alícuota de 8 mL y transferir a un balón de 50 mL, aforar hasta volumen con HCl 0.1 N. La concentración final de la solución es de 48 µg/ mL equivalente al 80 % de nuestra concentración nominal.
- Nivel 3: De la solución madre, tomar una alícuota de 10 mL y transferir a un balón de 50 mL, aforar hasta volumen con HCl 0.1 N. La concentración final de la solución es de 60 µg/ mL equivalente al 100 % de nuestra concentración nominal.
- Nivel 4: De la solución madre, tomar una alícuota de 12 mL y transferir a un balón de 50 mL, aforar hasta volumen con HCl 0.1 N. La concentración final de la solución es de 72 µg/ mL equivalente al 120 % de nuestra concentración nominal.
- Nivel 5: De la solución madre, tomar una alícuota de 14 mL y transferir a un balón de 50 mL, aforar hasta volumen con HCl 0.1 N. La concentración final de la solución es de 84 µg/ mL equivalente al 140 % de nuestra concentración nominal.



5.12.3.2.1.3 Criterios de Aceptación:

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Coeficiente de variación	$< 3\%$
Coeficiente de correlación (r)	≥ 0.999
Coeficiente de determinación (r^2)	≥ 0.998
Intervalo de confianza para el intercepto	El intervalo debe incluir el valor de cero
Intervalo de confianza para la pendiente	El intervalo no debe incluir el valor de cero
Análisis de varianza ANOVA	$F_{1\text{exp}} > F_{1\text{tabla}} (4.67)$ $F_{2\text{exp}} < F_{2\text{tabla}} (3.71)$
Test de Cochran	$G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}} (0.68)$
Prueba t para la pendiente	$t_{\text{exp}} > t_{\text{tabla}} (2.1604)$
Prueba t para el intercepto	$t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}} (2.1604)$
Gráfico de residuales	La distribución de los puntos debe ser aleatoria y no debe reflejar ninguna tendencia

5.12.4 Precisión

5.12.4.1 Repetibilidad del sistema instrumental

El ensayo de repetibilidad instrumental se realiza efectuando una serie de análisis sobre una misma muestra (la cual está a la concentración principal o concentración de trabajo, 60 $\mu\text{g/mL}$), en las mismas condiciones operativas establecidas.

5.12.4.1.1 Procedimiento:

Preparar una solución estándar a la concentración nominal (60 $\mu\text{g/mL}$) como se indica en el apéndice 5.10.1.1.1 y efectuar 10 veces la lectura a una longitud de onda de 310 nm.



5.12.4.1.2 Criterio de Aceptación:

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Coeficiente de variación	$\leq 2 \%$

5.12.4.2 Repetibilidad del método:

Para realizar este estudio se analizan un mínimo de tres muestras a tres niveles de concentración diferentes (60%, 100% y 140%, cubriendo el intervalo especificado (un total de 9 muestras).

5.12.4.2.1 Procedimiento:

5.12.4.2.1.1. Preparación de la solución madre:

Medir exactamente la cantidad de 5 mL del jarabe equivalente a 15 mg de Ambroxol Clorhidrato, transferir a un balón de 50 mL y aforar a volumen con HCl 0.1N.

5.12.4.2.1.2 Preparación de las muestras a diferentes niveles de concentración:

- Nivel 1: De la solución madre, tomar una alícuota de 6 mL y transferir a un balón de 50 mL, aforar hasta volumen con HCl 0.1 N. La concentración final de la solución es de 36 µg/ mL equivalente al 60 % de nuestra concentración nominal.
- Nivel 2: De la solución madre, tomar una alícuota de 10 mL y transferir a un balón de 50 mL, aforar hasta volumen con HCl 0.1 N. La concentración final de la solución es de 60 µg/ mL equivalente al 100 % de nuestra concentración nominal.
- Nivel 3: De la solución madre, tomar una alícuota de 14 mL y transferir a un balón de 50 mL, aforar hasta volumen con HCl 0.1 N. La concentración final de la solución es de 84 µg/ mL equivalente al 140 % de nuestra concentración nominal.

Realizar lecturas de cada una de las soluciones de los distintos niveles de concentración por triplicado y calcular:



- Coeficiente de variación del % recuperado.
- Intervalo de confianza del % recuperado de los resultados individuales.
- Intervalo de confianza del % recuperado de los resultados promedios por nivel de concentración.

5.12.4.2.1.3 Criterios de Aceptación:

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Coeficiente de variación	$\leq 2\%$
Intervalo de confianza resultados individuales	El resultado individual debe estar dentro del intervalo de confianza calculado.
Intervalos de confianza resultados promedios	El resultado promedio debe estar dentro del intervalo de confianza calculados

5.12.4.3 Precisión intermedia del sistema:

Para evaluar la precisión intermedia del sistema se efectuará una serie de análisis sobre la misma muestra a la concentración nominal pero en diferentes condiciones de operación (diferentes días y distintos analistas).

5.12.4.3.1 Procedimiento:

Cada analista prepara tres soluciones estándares independientes a la concentración nominal como se indica en el apéndice 5.12.1.1.1 durante un periodo de tiempo de tres días.

Leer cada solución por triplicado a una longitud de onda de 310 nm y determinar el coeficiente de variación por analista y por día.

5.12.4.3.2 Criterios de aceptación:

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Coeficiente de variación por día y analista	$\leq 2\%$
Coeficiente de variación global	$\leq 3\%$



5.12.4.4 Precisión intermedia del método:

Para evaluar la precisión intermedia del método se efectuará una serie de análisis sobre la misma muestra (Jarabe) a la concentración nominal pero en diferentes condiciones de operación (diferentes días y distintos analistas).

5.12.4.4.1 Procedimiento:

Cada analista prepara tres soluciones muestras independientes a la concentración nominal como se indica en el apéndice 5.11.3 durante un periodo de tiempo de tres días.

Leer cada solución por triplicado a una longitud de onda de 310 nm y determinar el coeficiente de variación por analista y por día.

5.12.4.4.2 Criterios de aceptación:

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Coeficiente de variación por día y analista	$\leq 2 \%$
Coeficiente de variación global	$\leq 3 \%$

5.12.5 Exactitud:

5.12.5.1 Procedimiento:

La exactitud se determina mediante la aplicación del método del placebo cargado. Se prepara una solución placebo de la muestra problema que contiene todos los ingredientes excepto el analito a determinar y sobre dicha solución placebo se añaden cantidades conocidas del analito patrón a 3 niveles de concentración, los cuales están dentro del rango a estudiar (60% - 100% - 140%).

5.12.5.1.1 Preparación de la solución madre de estándar

Pesar exactamente la cantidad equivalente a 30 mg de estándar secundario de Ambroxol Clorhidrato, transferir a un balón de 50 mL, adicionar 10 mL de HCl 0.1 N, disolver por



medio de agitación ultrasónica durante 5 minutos, enfriar y aforar a volumen con HCl 0.1 N.

5.12.5.1.2 Preparación de una solución madre de placebo:

Tomar una alícuota de 5 mL de placebo, transferir a un balón de 50 mL, mezclar y aforar a volumen con HCl 0.1 N.

5.12.5.1.3 Preparación de las soluciones a distintas concentraciones:

➤ Preparación de la solución al 60 % de concentración:

En un balón de 50 mL, mezclar 10 mL de la solución madre de placebo y 3 mL de la solución madre de estándar, aforar a volumen con HCl 0.1 N. La concentración final de esta solución es de 36 µg/ mL.

➤ Preparación de la solución al 100 % de concentración:

En un balón de 50 mL, mezclar 10 mL de la solución madre de placebo y 5 mL de la solución madre de estándar, aforar a volumen con HCl 0.1 N. La concentración final de esta solución es de 60 µg/ mL.

➤ Preparación de la solución al 140 % de concentración:

En un balón de 50 mL, mezclar 10 mL de la solución madre de placebo y 7 mL de la solución madre de estándar, aforar a volumen con HCl 0.1 N. La concentración final de esta solución es de 84 µg/ mL.

Leer por triplicado cada una las soluciones a los distintos niveles de concentración a una longitud de onda de 310 nm y utilizando como blanco HCl 0.1 N.

Procesar los datos obtenidos y determinar el porcentaje de recuperación y el coeficiente de variación del factor respuesta. Y para determinar si el factor concentración tiene alguna influencia en los resultados calcular el test de Cochran y el test de Student.



5.12.5.1.4 Criterios de aceptación:

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
Porcentaje recuperado	97% - 103%
Coefficiente de variación	$\leq 2\%$
Test Cochran	$G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}} (0,87)$
Test de Student	$T_{\text{exp}} < T_{\text{tabla}} (2,306)$

5.12.6 Robustez

La determinación de la robustez se lleva a cabo mediante la realización de pequeños cambios en las condiciones nominales del método analítico. Realizar un diseño factorial completo de ocho experimentos (2^3) para evaluar la influencia de 3 factores. Se crea una matriz del análisis factorial en donde se detallan las condiciones en las cuales se llevan a cabo los ensayos.

Nº de ensayo	FACTORES			INTERACCIONES			
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
1	-	-	-	+	+	+	-
2	+	-	-	-	-	+	+
3	-	+	-	-	+	-	+
4	+	+	-	+	-	-	-
5	-	-	+	+	-	-	+
6	+	-	+	-	+	-	-
7	-	+	+	-	-	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+

Los factores que se varían para determinar la robustez del método analítico para la cuantificación de Ambroxol Clorhidrato son:

- ❖ Factor A: La celda del espectrofotómetro: Marca A y Marca B.
- ❖ Factor B: Concentración del medio de disolución: ± 0.02 N.
- ❖ Factor C: La longitud de onda: ± 0.2 nm



Valor	Celda (A)	Concentración (B)	Longitud de onda (C)
-	"A"	0.08 N	308 nm.
+	"B"	0.12 N	312 nm.

5.12.6.1 Procedimiento:

5.12.6.1.1 Preparación de una solución estándar con HCl 0.08 N:

Pesar exactamente la cantidad equivalente a 30 mg de estándar secundario de Ambroxol Clorhidrato, transferir a un balón de 50 mL y disolver con 10 mL de HCl al 0.08 N, por medio de agitación ultrasónica durante 5 minutos, enfriar y aforar a volumen con HCl 0.08 N. Tomar una alícuota de 10 mL y transferir a un balón de 50 mL, aforar a volumen con HCl 0.08 N.

5.12.6.1.2 Preparación de la solución estándar con HCl 0.12 N:

Pesar exactamente la cantidad equivalente a 30 mg de estándar secundario de Ambroxol Clorhidrato, transferir a un balón de 50 mL y disolver con 10 mL de HCl al 0.12 N, por medio de agitación ultrasónica durante 5 minutos, enfriar y aforar a volumen con HCl 0.12 N. Tomar una alícuota de 10 mL y transferir a un balón de 50 mL, aforar a volumen con HCl 0.12 N.

5.12.6.1.3 Ejecución del diseño factorial:

- ❖ Leer por triplicado la solución estándar preparada con HCl 0.08 N a la longitud de onda de 308nm y 312 nm, usando dos celdas diferentes (A y B). Utilizar HCl 0.08 N como blanco.
- ❖ Leer por triplicado la solución estándar preparada con HCl 0.12 N a la longitud de onda de 308 y 312 nm, usando dos celdas diferentes (A y B). Utilizar HCl 0.12 N como blanco.

A continuación, se presenta en tabla los ensayos a realizar:



Nº de ensayo	Marca de Celda	Concentración Medio	Longitud de onda
1	A	0.08 N	308 nm
2	B	0.08 N	308 nm
3	A	0.12 N	308 nm
4	B	0.12 N	308 nm
5	A	0.08 N	312 nm
6	B	0.08 N	312 nm
7	A	0.12 N	312 nm
8	B	0.12 N	312 nm

Mediante la matriz resultante del análisis factorial para este caso, se puede establecer la influencia de tres factores A, B y C así como de sus interacciones dos a dos. La interacción de los tres conjuntamente también puede ser tomada en cuenta.

Al terminar de realizar los ocho ensayos, se obtendrán ocho resultados para contenido en principio activo: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 y R8. Una vez obtenidos los resultados el siguiente paso es realizar la evaluación estadística que evidencie cuál de los factores, o que interacción entre ellos tiene una influencia significativa.

5.12.6.1.3.1 Influencia de cada factor:

Calcular la influencia de cada factor mediante la siguiente fórmula:

Calcular la influencia de cada factor mediante la siguiente fórmula:

Influencia del factor A: $A = 1/4(-R1 + R2 - R3 + R4 - R5 + R6 - R7 + R8)$

Influencia del factor B: $B = 1/4(-R1 - R2 + R3 + R4 - R5 - R6 + R7 + R8)$

Influencia del factor C: $C = 1/4(-R1 - R2 - R3 - R4 + R5 + R6 + R7 + R8)$

La influencia sobre el parámetro de la interacción entre el factor A y B será:

$AB = 1/4(+R1 - R2 - R3 + R4 + R5 - R6 - R7 + R8)$



$$AC=1/4(+R1-R2+R3-R4-R5+R6-R7+R8)$$

$$BC=1/4(+R1+R2-R3-R4-R5-R6+R7+R8)$$

$$ABC=1/4(-R1+R2+R3-R4+R5-R6-R7+R8)$$

Calcular los efectos principales y las interacciones entre los distintos factores.

5.12.6.2 Criterios de aceptación:

La influencia de cada factor y de sus interacciones no supera el límite inferior y superior a dos desviaciones estándares

5.12.7 Estabilidad de las soluciones analítica:

Para evaluar la estabilidad de las soluciones analíticas (estándar y muestra), se prepara una solución estándar y una solución muestra a la concentración nominal; se almacenan durante un cierto período determinado y se determina el % de recuperación.

5.12.7.1 Procedimiento:

5.12.7.1.1 Preparación de la solución estándar:

Solución 1: Pesar exactamente la cantidad equivalente a 30 mg de estándar secundario de Ambroxol Clorhidrato, transferir a un balón de 50 mL, adicionar 10 mL de HCl 0.1 N, disolver por medio de agitación ultrasónica durante 5 minutos, enfriar y aforar a volumen con HCl 0.1 N.

Solución 2: De la solución 1, tomar una alícuota de 10 mL, transferir a un balón de 100 mL y diluir a volumen con HCl 0.1 N. La concentración final de esta solución es de 60 µg/mL.

5.12.7.1.2 Preparación de la solución muestra:

Solución 1: Tomar una alícuota de 5 mL de muestra (jarabe) equivalente a 15 mg de Ambroxol Clorhidrato, transferir a un balón de 50 mL, mezclar y aforar a volumen con HCl 0.1 N.



Solución 2: Tomar una alícuota de 20 mL de la solución 1, transferir a un balón de 100 mL y mezclar y aforar a volumen con HCl 0.1N.

Leer las soluciones por triplicado a las condiciones establecidas en el método. Esto corresponde al tiempo inicial (tiempo 0 horas de almacenamiento).

Almacenar las soluciones analíticas a temperatura ambiente (25 °C) y leer por triplicado según las condiciones del método a las 2, 4, 6, 8, 24 y 96 horas de almacenamiento.

Determinar el % de Recuperación en cada uno de los tiempos analizados.

5.12.7.2 Criterios de aceptación:

Las soluciones analíticas son estables en la condición de almacenamiento evaluada si el valor del porcentaje recuperado de la muestra se encuentra dentro del rango ± 1 % del % recuperado inicial (tiempo 0 horas).



VI. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1. IDONEIDAD DEL SISTEMA

Tabla No. 1: Resultados de idoneidad del sistema para Ambroxol Clorhidrato

Se obtuvieron los siguientes resultados en la determinación de la idoneidad del sistema para la cuantificación de Ambroxol Clorhidrato:

Idoneidad del Sistema		
Solución	Replicas	Absorbancias
1	1	0,4201
	2	0,4206
	3	0,4208
2	1	0,4204
	2	0,4216
	3	0,4210
3	1	0,4214
	2	0,4209
	3	0,4212
Promedio		0,42088889
Desviación		0,000478133
CV		0,113600752 %

Análisis de Resultados: En la evaluación de la Idoneidad del sistema para la cuantificación de Ambroxol Clorhidrato, se obtuvo un coeficiente de variación de las absorbancias obtenidas menor al 1% (CV = 0.1136%), por tanto, las condiciones del sistema espectrofotométrico utilizadas son idóneas para llevar a cabo la cuantificación de Ambroxol Clorhidrato en jarabe.

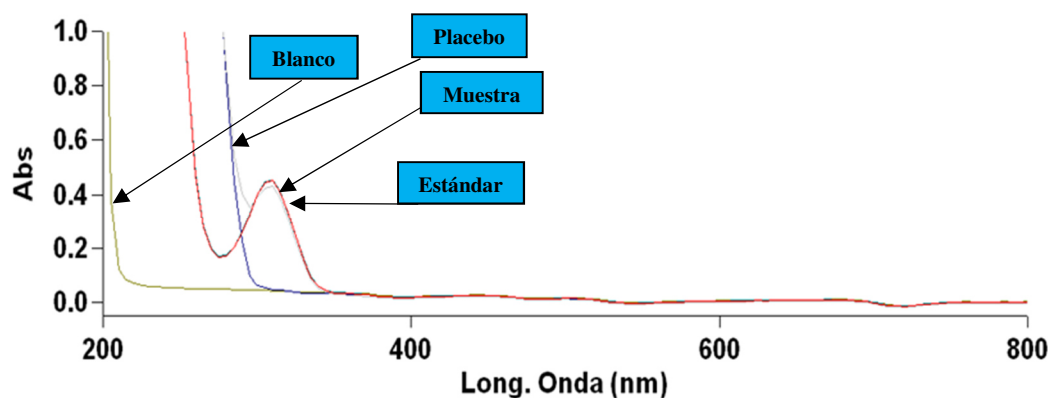


6.2. SELECTIVIDAD

6.2.1. SELECTIVIDAD PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL ACTIVO

Para la identificación del activo de Ambroxol Clorhidrato, se procedió a comparar los espectros obtenidos de las soluciones preparadas (blanco, estándar y muestra). Los resultados se muestran a continuación:

Figura 1: Espectros obtenidos en la Selectividad Identificación del Activo:



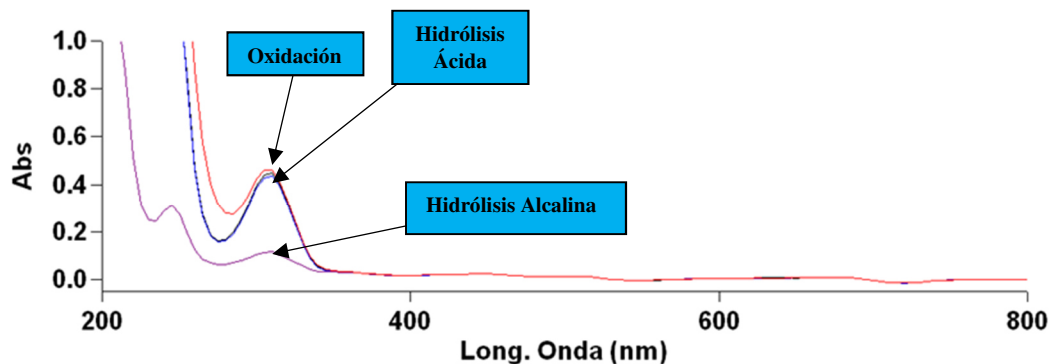
Análisis de Resultados: Como se puede apreciar en la Figura 1, se obtuvo una identificación negativa cuando se compara el espectro obtenido del blanco con el espectro del estándar de Ambroxol Clorhidrato y una identificación positiva cuando se compara el espectro del estándar de Ambroxol Clorhidrato con el espectro de la muestra. Por otro lado se puede apreciar que el placebo no absorbe a la longitud de onda establecida para la cuantificación de Ambroxol Clorhidrato. Por tanto, el método es selectivo para la identificación del activo en Jarabe de Ambroxol Clorhidrato.

6.2.2. SELECTIVIDAD FRENTE A PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN

Al evaluar la selectividad frente a productos de degradación, se obtuvieron los siguientes resultados al someter a diferentes condiciones de estrés al estándar de Ambroxol Clorhidrato:



Figura 2: Espectros obtenidos en la Selectividad frente a productos de degradación:



Análisis de Resultados: Al someter el estándar de Ambroxol Clorhidrato a degradación, se producen señales inequívocas de la presencia de Ambroxol Clorhidrato y no existen interferencias de otras sustancias que pueden estar presente en la muestra degradada. Por tanto, el método es selectivo frente a productos de degradación.

6.3. LINEALIDAD

6.3.1 Linealidad del Sistema

En la determinación experimental de la linealidad del sistema se obtuvieron los siguientes resultados:



Tabla No. 2: Cálculos para la ecuación de la recta:

X (Conc. µg/ml)	Y Abs	XY	X²	Y²	F(y/x)
35,97	0,2509	9,02487	1293,8409	0,0630	0,0070
35,97	0,2511	9,03207	1293,8409	0,0631	0,0070
35,97	0,2510	9,02847	1293,8409	0,0630	0,0070
47,96	0,3323	15,93711	2300,1616	0,1104	0,0069
47,96	0,3323	15,93711	2300,1616	0,1104	0,0069
47,96	0,3318	15,91313	2300,1616	0,1101	0,0069
59,96	0,4225	25,33310	3595,2016	0,1785	0,0070
59,96	0,4232	25,37507	3595,2016	0,1791	0,0071
59,96	0,4175	25,03330	3595,2016	0,1743	0,0070
71,95	0,5015	36,08293	5176,8025	0,2515	0,0070
71,95	0,5016	36,09012	5176,8025	0,2516	0,0070
71,95	0,5012	36,06134	5176,8025	0,2512	0,0070
83,94	0,5828	48,92023	7045,9236	0,3397	0,0069
83,94	0,5843	49,04614	7045,9236	0,3414	0,0070
83,94	0,5914	49,64212	7045,9236	0,3498	0,0070
Promedio					0,0070
S					4,30833E-05
CV					0,6176 %

Tabla No. 3: Resultados del análisis de regresión lineal del Sistema:

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,9998
Coeficiente de determinación R ²	0,9995
R ² ajustado	0,9995
Error típico	0,0028
Observaciones	15



Gráfico N° 1: Curva de regresión lineal Ambroxol HCl

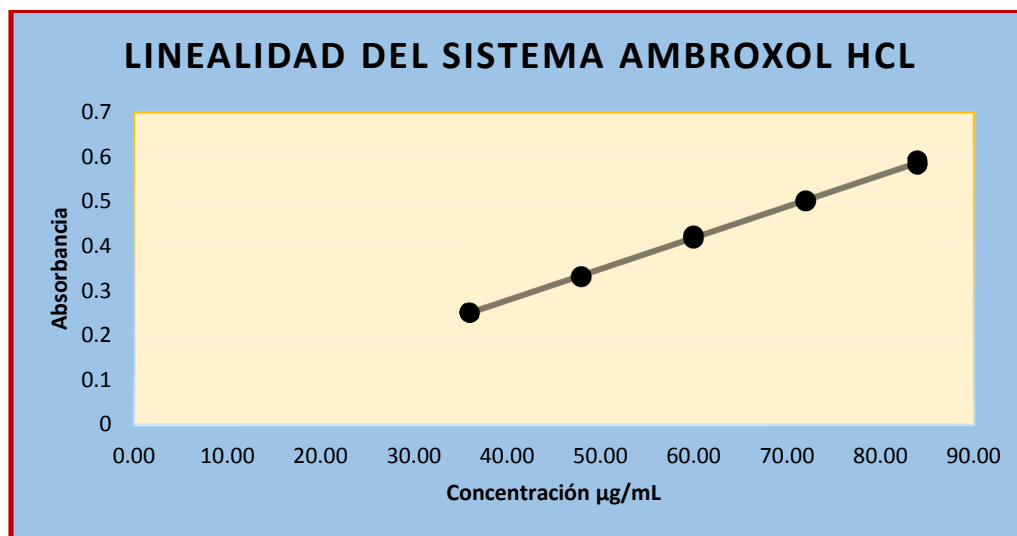


Tabla No. 4: Resultados para la determinación del Test de Cochran.

TEST DE COCHRAN							
X (Conc. µg/ mL)	Y Abs	f(Y/X)	Media	S	S²	S² Máx	G exp
35,97	0,2509	0,0070	0,0070	2,78009 E-06	7,72893 E-12	2,99511 E-09	0,5222
35,97	0,2511	0,0070					
35,97	0,2510	0,0070					
47,96	0,3323	0,0069	0,0069	6,01908 E-06	3,62293 E-11		
47,96	0,3323	0,0069					
47,96	0,3318	0,0069					
59,96	0,4225	0,0070	0,0070	5,18444 E-05	2,68784 E-09		
59,96	0,4232	0,0071					
59,96	0,4175	0,0070					
71,95	0,5015	0,0070	0,0070	2,89321 E-06	8,37068 E-12		
71,95	0,5016	0,0070					
71,95	0,5012	0,0070					
83,94	0,5828	0,0069	0,0070	5,47276 E-05	2,99511 E-09		
83,94	0,5843	0,0070					
83,94	0,5914	0,0070					



Tabla No. 5: Análisis de los residuales:

Observación	Pronóstico para Y	Residuos	promedio de los residuos
1	0,2504	0,0005	0,0006
2	0,2504	0,0007	
3	0,2504	0,0006	
4	0,3344	-0,0021	-0,0022
5	0,3344	-0,0021	
6	0,3344	-0,0026	
7	0,4184	0,0041	0,0027
8	0,4184	0,0048	
9	0,4184	-0,0009	
10	0,5023	-0,0008	-0,0009
11	0,5023	-0,0007	
12	0,5023	-0,0011	
13	0,5863	-0,0035	-0,0001
14	0,5863	-0,0020	
15	0,5863	0,0051	

Gráfico N° 2: Análisis de los residuales para Ambroxol HCl (Linealidad Sistema)



Tabla No. 6: Análisis de varianza.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	0,2115	0,21149595	27001,0633	5,9158E-23
Residuos	13	0,0001	0,00000783		
Total	14	0,2116			



	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95 %	Superior 95 %
Intercepto	-0,00139436	0,00265474	-0,5252	0,60826323	-0,00712956	0,00434085
Pendiente	0,00700104	4,2606E-05	164,32	5,9158E-23	0,00690899	0,00709308

Tabla No. 7: ANOVA

FUENTE	GL	SC	Variancia	Fo	Ft
REGRESION	1	0,2115	0,21150	27001,0633	4,67
Residuo	13	0,0001	0,00001		
Falta de ajuste	3	0,0000	0,00001	2,1584	3,71
Error exp	10	0,0001	0,00001	0,789067463	
Total	14	0,2116	0,01511		

Tabla No. 8: Resumen Linealidad del Sistema:

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
Coeficiente de variación	$< 2\%$	0.6176 %
Coeficiente de correlación (r)	≥ 0.999	$r = 0.9998$
Coeficiente de determinación (r^2)	≥ 0.998	$r^2 = 0.9995$
Test de Cochran	$G_{exp} < G_{tabla} (0.68)$	0.5222
Intervalo de confianza para el intercepto	El intervalo debe incluir el valor de cero	Intercepto = -0.00139436 (-0.00712956 a 0.00434085)
Intervalo de confianza para la pendiente	El intervalo no debe incluir el valor de cero	Pendiente = 0.00700104 (0.00690899 a 0.00709308)
Prueba t para la pendiente	$t_{exp} > t_{tabla} (2.1604)$	164.32
Prueba t para el intercepto	$t_{exp} < t_{tabla} (2.1604)$	-0.5252
Análisis de varianza ANOVA	$F_{1exp} > F_{1tabla} (4.67)$ $F_{2exp} < F_{2tabla} (3.71)$	27001.06 2.1584
Gráfico de residuales	La distribución de los puntos debe ser aleatoria y no debe reflejar ninguna tendencia	La distribución de los puntos es aleatoria y no refleja ninguna tendencia



Análisis de resultados para la linealidad del sistema:

Al realizar una curva de calibración para la cuantificación de Ambroxol Clorhidrato, se obtuvo una representación gráfica lineal para el rango de concentraciones de 36 $\mu\text{g/mL}$ a 84 $\mu\text{g/mL}$ con un coeficiente de determinación $r^2 = 0.9995$ mayor a 0.998, lo que demuestra que existe correlación entre la concentración y la respuesta del analito. El coeficiente de determinación en base al valor obtenido demuestra la alta significancia estadística de la relación entre las variables x e y (absorbancia vs. concentración).

Para verificar la linealidad, se calculó el CV de los factores respuesta obteniendo un valor de 0.6176%, el cual por debajo del criterio de aceptación establecido ($\text{CV} < 2\%$), lo que exhibe la poca variación de las respuestas obtenidas; quedó establecido que la pendiente de la recta de regresión es significativamente distinta de cero mediante la prueba t de Student siendo el valor de t experimental mayor que el valor crítico establecido para n-2 grados de libertad ($t_{\text{exp}} = 164.32$, $t_{\text{tab}} = 2.1604$), así mismo se calcularon los intervalos de confianza para la pendiente no incluyendo estos el cero (0.00690899 a 0.00709308).

La proporcionalidad entre la concentración del analito y las absorbancias obtenidas, se demostró mediante la aplicación de la prueba t de Student para el intercepto de la recta. El t experimental es menor al t de tabla, para n-2 grados de libertad, y un nivel de significancia del 95% ($t_{\text{exp}} = -0.5252$, $t_{\text{tab}} = 2.1604$), por lo tanto, la variable independientemente es significativamente distinta de cero, así como los intervalos de confianza incluyen al cero (-0.00712956 a 0.00434085).

Se estudió la homogeneidad de las varianzas en los datos obtenidos aplicando el test de Cochran, donde G calculado es de 0.5222 y es menor al $G_{\text{tab}} (\alpha=0.05, k=5, n=3) = 0.68$, demostrando así que el factor concentración no tiene influencia significativa en la variabilidad de los resultados.



En la representación gráfica de los residuales, la distribución de los puntos no refleja ninguna tendencia, lo que indica que los supuestos del modelo de regresión lineal se cumplen.

Mediante el análisis de varianza (ANOVA) se comprobó que $F_{\text{exp}} > F_{\text{tablas}}$ ($F_{\text{exp}} = 27001.06$; $F_{\text{tab}} = 4.67$) lo que demuestra la existencia de una pendiente distinta de cero y a su vez $F_{2\text{exp}} < F_{2\text{tablas}}$ ($F_{2\text{exp}} = 2.1584$; $F_{2\text{tab}} = 3.71$), reflejando la linealidad entre los resultados obtenidos.

6.3.2 Linealidad del método

Para la determinación experimental de la linealidad del método se obtuvieron los resultados presentados a continuación:

Tabla No. 9: Cálculos para la ecuación de la recta

X (Conc. $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Y Abs	XY	X ²	Y ²	F(y/x)
35,97	0,2685	9,6579	1293,8409	0,0721	0,0075
35,97	0,2686	9,6615	1293,8409	0,0721	0,0075
35,97	0,2682	9,6472	1293,8409	0,0719	0,0075
47,96	0,3556	17,0546	2300,1616	0,1265	0,0074
47,96	0,356	17,0738	2300,1616	0,1267	0,0074
47,96	0,3562	17,0834	2300,1616	0,1269	0,0074
59,96	0,4474	26,8261	3595,2016	0,2002	0,0075
59,96	0,4474	26,8261	3595,2016	0,2002	0,0075
59,96	0,4513	27,0599	3595,2016	0,2037	0,0075
71,95	0,5348	38,4789	5176,8025	0,2860	0,0074
71,95	0,5344	38,4501	5176,8025	0,2856	0,0074
71,95	0,5353	38,5148	5176,8025	0,2865	0,0074
83,94	0,6233	52,3198	7045,9236	0,3885	0,0074
83,94	0,6233	52,3198	7045,9236	0,3885	0,0074
83,94	0,6301	52,8906	7045,9236	0,3970	0,0075
Promedio					0,0075
S					3,2204E-05
CV					0,4322%



Tabla No. 10: Resultados del análisis de regresión lineal del Método:

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,9998
Coeficiente de determinación R ²	0,9997
R ² ajustado	0,9997
Error típico	0,0022
Observaciones	15

Gráfico N° 3: Curva de regresión lineal para Ambroxol HCl

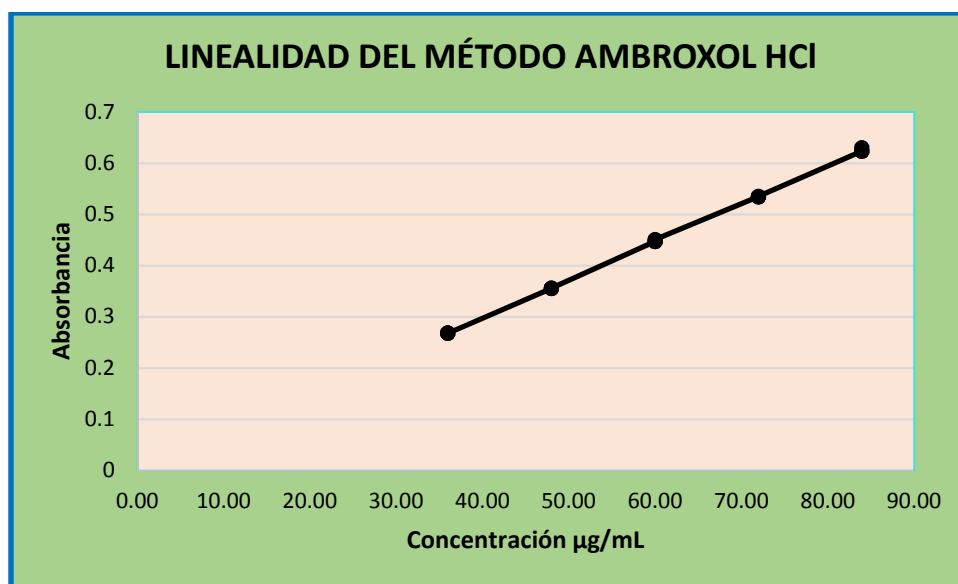




Tabla No. 11: Resultados para la determinación del Test de Cochran

TEST DE COCHRAN						
Concentración (µg/ mL)	f(y/X)	promedio	S	S²	S² máx	G exp
35,97	0,0075	0,0075	5,7872E-06	3,3492E-11	2,1876E-09	0,5895
35,97	0,0075					
35,97	0,0075					
47,96	0,0074	0,0074	6,37E-06	4,0577E-11		
47,96	0,0074					
47,96	0,0074					
59,96	0,0075	0,0075	3,7553E-05	1,4102E-09		
59,96	0,0075					
59,96	0,0075					
71,95	0,0074	0,0074	6,2672E-06	3,9278E-11		
71,95	0,0074					
71,95	0,0074					
83,94	0,0074	0,0075	4,6771E-05	2,1876E-09		
83,94	0,0074					
83,94	0,0075					

Tabla No. 12: Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos	promedio de los residuos
1	0,2681	0,0004	0,0004
2	0,2681	0,0005	
3	0,2681	0,0001	
4	0,3574	-0,0018	-0,0014
5	0,3574	-0,0014	
6	0,3574	-0,0012	
7	0,4467	0,0007	0,0020
8	0,4467	0,0007	
9	0,4467	0,0046	
10	0,5360	-0,0012	-0,0012
11	0,5360	-0,0016	
12	0,5360	-0,0007	
13	0,6253	-0,0020	0,0003
14	0,6253	-0,0020	
15	0,6253	0,0048	



Gráfico N° 4: Análisis de residuales para Ambroxol Clorhidrato (Linealidad Método)



Tabla No. 13: Análisis de varianza.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	0,23932448	0,23932448	48425,237	1,3292E-24
Residuos	13	0,00006425	4,9421E-06		
Total	14	0,23938873			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepto	0,00017659	0,00210872	0,08374276	0,93453678	-0,0043790	0,0047322
Pendiente	0,00744741	3,3843E-05	220,057349	1,3292E-24	0,00737429	0,00752052

Tabla No. 14: ANOVA

FUENTE	GL	SC	Variancia	Fo	Ft
REGRESION	1	0,2393	0,23932	48425,2370	4,67
Residuo	13	0,0001	0,00000		
Falta de ajuste	3	0,0000	0,00001	1,8090	3,71
Error exp	10	0,0000	0,00000	0,842684247	
Total	14	0,2394	0,01710		



Tabla No. 15: Resumen Linealidad del Método:

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
Coeficiente de variación	$< 3\%$	0.4322 %
Coeficiente de correlación (r)	≥ 0.999	$r = 0.9998$
Coeficiente de determinación (r^2)	≥ 0.998	$r^2 = 0.9997$
Test de Cochran	$G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}} (0.68)$	0.5895
Intervalo de confianza para el intercepto	El intervalo debe incluir el valor de cero	Intercepto = 0.00017659 (-0.0043790 a 0.0047322)
Intervalo de confianza para la pendiente	El intervalo no debe incluir el valor de cero	Pendiente = 0,00744741 (0.00737429 a 0.00752052)
Prueba t para la pendiente	$t_{\text{exp}} > t_{\text{tabla}} (2.1604)$	220.0573
Prueba t para el intercepto	$t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}} (2.1604)$	0.08374
Análisis de varianza ANOVA	$F_{1\text{exp}} > F_{1\text{tabla}} (4.67)$	48425.2370
	$F_{2\text{exp}} < F_{2\text{tabla}} (3.71)$	1.8090
Gráfico de residuales	La distribución de los puntos debe ser aleatoria y no debe reflejar ninguna tendencia	La distribución de los puntos es aleatoria y no refleja ninguna tendencia

Análisis de resultados para la linealidad del método:

Al realizar una curva de calibración para la cuantificación de Ambroxol Clorhidrato, se obtuvo una representación gráfica lineal para el rango de concentraciones de 36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 84 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con un coeficiente de determinación $r^2 = 0.9997$ mayor a 0.998, lo que demuestra que existe correlación entre la concentración y la respuesta del analito. El coeficiente de determinación en base al valor obtenido demuestra la alta significancia estadística de la relación entre las variables x e y (absorbancia vs. concentración).



Para verificar la linealidad, se calculó el CV de los factores respuesta obteniendo un valor de 0.4322 %, el cual por debajo del criterio de aceptación establecido ($CV < 3\%$), lo que exhibe la poca variación de las respuestas obtenidas; quedó establecido que la pendiente de la recta de regresión es significativamente distinta de cero mediante la prueba t de Student siendo el valor de t experimental mayor que el valor crítico establecido para n-2 grados de libertad ($t_{exp} = 220.05$, $t_{tab} = 2.1604$), así mismo se calcularon los intervalos de confianza para la pendiente no incluyendo estos el cero (0.00737429 a 0.00752052).

La proporcionalidad entre la concentración del analito y las absorbancias obtenidas, se demostró mediante la aplicación de la prueba t de Student para el intercepto de la recta. El t experimental es menor al t de tabla, para n-2 grados de libertad, y un nivel de significancia del 95% ($t_{exp} = 0.08374$, $t_{tab} = 2.1604$), por lo tanto, la variable independientemente es significativamente distinta de cero, así como los intervalos de confianza incluyen al cero (-0.0043790 a 0.0047322).

Se estudió la homogeneidad de las varianzas en los datos obtenidos aplicando el test de Cochran, donde G calculado es de 0.5895 y es menor al $G_{tab} (\alpha=0.05, k=5, n=3) = 0.68$, demostrando así que el factor concentración no tiene influencia significativa en la variabilidad de los resultados.

En la representación gráfica de los residuales, la distribución de los puntos no refleja ninguna tendencia, lo que indica que los supuestos del modelo de regresión lineal se cumplen.

Mediante el análisis de varianza (ANOVA) se comprobó que $F_{1exp} > F_{1tablas}$ ($F_{1exp} = 48425.2370$; $F_{1tab} = 4.67$) lo que demuestra la existencia de una pendiente distinta de cero y a su vez $F_{2exp} < F_{2tablas}$ ($F_{2exp} = 1.8090$; $F_{2tab} = 3.71$), reflejando la linealidad entre los resultados obtenidos.



6.4. PRECISIÓN

Para determinar la precisión se evaluó la repetibilidad instrumental y la repetibilidad del método; así como la precisión intermedia del sistema y la precisión intermedia del método. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

6.4.1. Repetibilidad Instrumental

Tabla No. 16: Resultados de repetibilidad instrumental para Ambroxol Clorhidrato

Réplicas	Absorbancia
1	0,4201
2	0,4207
3	0,4206
4	0,4201
5	0,4203
6	0,4198
7	0,4194
8	0,4189
9	0,4198
10	0,4194
Promedio	0,41991
Desviación	0,000566569
CV	0,134926203%

Análisis de Resultados: El coeficiente de variación calculado para la repetibilidad del sistema instrumental es menor al 1% lo cual indica que el sistema no representa una variabilidad significativa para la obtención de los resultados en las condiciones descritas por este método.



6.4.2. Repetibilidad del método

Tabla No. 17: Resultados de repetibilidad del método de Ambroxol Clorhidrato

Muestra	Abs	Conc. Teórica (µg/ mL)	Abs. Idoneidad	Conc. Calculada (µg/ mL)	% Recuperado
1	0,2706	36	0,42089	38,5466	107,07
	0,2697	36	0,42089	38,4184	106,71
	0,2700	36	0,42089	38,4612	106,83
PROMEDIO					106,87 %
S					0,1833
CV					0,1715 %
IC individual					(106,17 % -107,73 %)
IC promedio					(106,50 % -107,40 %)
2	0,4424	60	0,42089	63,0194	105,0323
	0,4424	60	0,42089	63,0194	105,0323
	0,4414	60	0,42089	62,8769	104,7948
PROMEDIO					104,9531 %
S					0,1371
CV					0,1306 %
IC individual					(104,44 % -105,62 %)
IC promedio					(104,69 % -105,37 %)
3	0,6191	84	0,42089	88,1901	104,9882
	0,6206	84	0,42089	88,4038	105,2426
	0,6202	84	0,42089	88,3468	105,1747
PROMEDIO					105,1351 %
S					0,1317
CV					0,1252 %
IC individual					(104,64 % -105,78 %)
IC promedio					(104,88 % -105,54 %)

Análisis de Resultados: El coeficiente de variación calculado para cada nivel de concentración es $< 2 \%$, indicando así que no hay variabilidad significativa a causa del método para la obtención de resultados. Los intervalos de confianza individual y global están dentro de los intervalos calculados, por lo cual el método es preciso al repetir el ensayo bajo las mismas condiciones operativas.



6.4.3. Precisión Intermedia del Sistema

Tabla No. 18: Absorbancias de la Precisión intermedia del sistema (Día 1):

DÍA	SOLUCIÓN	ANALISTA 1	ANALISTA 2	ABSORBANCIA IDONEIDAD	CONC. PATRON (µg/ mL)
1	1	0,4256	0,4153	0,42089	59,9552
		0,4252	0,4153	0,42089	59,9552
		0,4260	0,4148	0,42089	59,9552
	2	0,4135	0,4115	0,42089	59,9552
		0,4134	0,4119	0,42089	59,9552
		0,4144	0,4111	0,42089	59,9552
	3	0,4201	0,4142	0,42089	59,9552
		0,4195	0,4146	0,42089	59,9552
		0,4196	0,4153	0,42089	59,9552

Tabla No. 19: % Recuperado de la Precisión intermedia del sistema (Día 1):

DÍA	SOLUCIÓN	CONC. (µg/ mL) Analista 1	CONC. (µg/ mL) Analista 2	% R Analista 1	% R Analista 2
1	1	60,6261	59,1589	101,12	98,67
		60,5692	59,1589	101,02	98,67
		60,6831	59,0877	101,21	98,55
	2	58,9025	58,6176	98,24	97,77
		58,8883	58,6746	98,22	97,86
		59,0307	58,5606	98,46	97,67
	3	59,8427	59,0022	99,81	98,41
		59,7572	59,0592	99,67	98,51
		59,7714	59,1589	99,69	98,67
PROMEDIO				99,72%	98,31%
S				1,2207	0,4178
CV				1,2242%	0,4250%
Promedio % R de ambos analistas				99,01%	
S % R de ambos analistas				1,1434	
CV % R de ambos analistas				1,1548%	



Tabla N°. 20: Absorbancias de la precisión intermedia del sistema (Día 2):

DÍA	SOLUCIÓN	ANALISTA 1	ANALISTA 2	ABSORBANCIA IDONEIDAD	CONC. PATRON (µg/ mL)
2	1	0,4158	0,4143	0,42089	59,9552
		0,4155	0,4151	0,42089	59,9552
		0,4158	0,4150	0,42089	59,9552
	2	0,4175	0,4149	0,42089	59,9552
		0,4178	0,4154	0,42089	59,9552
		0,4167	0,4160	0,42089	59,9552
	3	0,4154	0,4149	0,42089	59,9552
		0,4155	0,4150	0,42089	59,9552
		0,4146	0,4151	0,42089	59,9552

Tabla No. 21: % Recuperado de la precisión intermedia del sistema (Día 2):

DÍA	SOLUCIÓN	CONC. (µg/ mL) ANALISTA 1	CONC. (µg/ mL) ANALISTA 2	% R ANALISTA 1	% R ANALISTA 2
2	1	59,2301	59,0165	98,79	98,43
		59,1874	59,1304	98,72	98,62
		59,2301	59,1162	98,79	98,60
	2	59,4723	59,1019	99,19	98,58
		59,5150	59,1732	99,27	98,70
		59,3583	59,2586	99,00	98,84
	3	59,1732	59,1019	98,70	98,58
		59,1874	59,1162	98,72	98,60
		59,0592	59,1304	98,51	98,62
PROMEDIO				98,85%	98,62%
S				0,2498	0,1074
CV				0,2526%	0,1089%
Promedio %R de ambos analistas				98,74%	
S %R de ambos analistas				0,2223	
CV %R de ambos analistas				0,2251%	



Tabla No. 22: Absorbancias de la precisión intermedia del sistema (Día 3):

DÍA	SOLUCIÓN	ANALISTA 1	ANALISTA 2	ABSORBANCIA IDONEIDAD	CONC. PATRON
3	1	0,4182	0,4149	0,42089	59,9552
		0,4173	0,4146	0,42089	59,9552
		0,4182	0,4157	0,42089	59,9552
	2	0,4163	0,4199	0,42089	59,9552
		0,4161	0,4215	0,42089	59,9552
		0,4156	0,4211	0,42089	59,9552
	3	0,4246	0,4241	0,42089	59,9552
		0,4243	0,426	0,42089	59,9552
		0,4241	0,4238	0,42089	59,9552

Tabla No. 23: % Recuperado de la precisión intermedia del sistema (Día 3):

DÍA	SOLUCIÓN	CONC. (µg/ mL) ANALISTA 1	CONC. (µg/ mL) ANALISTA 2	% R ANALISTA 1	% R ANALISTA 2
3	1	59,5720	59,1019	99,36	98,58
		59,4438	59,0592	99,15	98,51
		59,5720	59,2159	99,36	98,77
	2	59,3014	59,8142	98,91	99,76
		59,2729	60,0421	98,86	100,14
		59,2016	59,9851	98,74	100,05
	3	60,4837	60,4125	100,88	100,76
		60,4409	60,6831	100,81	101,21
		60,4125	60,3697	100,76	100,69
PROMEDIO				99,65%	99,83%
S				0,9023	1,0084
CV				0,9054%	1,0101%
Promedio %R de ambos analistas				99,74%	
S %R de ambos analistas				0,9329	
CV %R de ambos analistas				0,9354%	

Tabla No 24: Resultados Globales de la Precisión intermedia del Sistema.

Promedio Global	99,16 %
S Global	0,9469
CV Global	0,9549 %



Análisis de Resultados: Se efectuó una serie de análisis sobre la misma muestra a la concentración nominal pero en diferentes condiciones operativas (diferentes días y distintos analistas). Se calculó el CV por día y analista, obteniéndose un valor inferior al 2 % y para el CV global (0.9549%) un valor menor al 3% lo que indica que los resultados del método no varían al variar las condiciones operativas del sistema.

6.4.4. Precisión intermedia del método

Tabla No. 25: Absorbancias de la precisión intermedia del método (Día 1):

DÍA	MUESTRA	ANALISTA 1	ANALISTA 2	ABSORBANCIA IDONEIDAD	CONC. PATRON (µg/ mL)
1	1	0,4438	0,4381	0,42089	59,9552
		0,4422	0,4383	0,42089	59,9552
		0,4435	0,4384	0,42089	59,9552
	2	0,4452	0,4373	0,42089	59,9552
		0,4443	0,4373	0,42089	59,9552
		0,4452	0,4369	0,42089	59,9552
	3	0,4429	0,4368	0,42089	59,9552
		0,4425	0,4369	0,42089	59,9552
		0,4437	0,4362	0,42089	59,9552

Tabla No. 26: % Recuperado de la precisión intermedia del método (Día 2):

DÍA	MUESTRA	CONC.(µg/ mL) ANALISTA 1	CONC. (µg/ mL) ANALISTA 2	% R ANALISTA 1	% R ANALISTA 2
1	1	63,2187	62,8768	105,36	104,79
		62,9908	62,9765	104,98	104,96
		63,1760	63,1617	105,29	105,26
	2	63,4181	62,9480	105,69	104,91
		63,2899	62,9053	105,42	104,84
		63,4181	62,9623	105,69	104,93
	3	63,0905	62,7629	105,15	104,60
		63,0335	62,6631	105,05	104,43
		63,2045	62,7059	105,34	104,50
PROMEDIO				105,34%	104,80%
S				0,2552	0,2579



CV	0,2422 %	0,2461 %
Promedio %R de ambos analistas	105,07 %	
S %R de ambos analistas	0,3702764	
CV %R de ambos analistas	0,3523948 %	

Tabla No. 27: Absorbancias de la precisión intermedia del método (Día 2):

DÍA	MUESTRA	ANALISTA 1	ANALISTA 2	ABSORBANCIA IDONEIDAD	CONC. PATRON (µg/ mL)
2	1	0,4414	0,4496	0,42089	59,9552
		0,4421	0,4497	0,42089	59,9552
		0,4434	0,4495	0,42089	59,9552
	2	0,4419	0,4503	0,42089	59,9552
		0,4416	0,4500	0,42089	59,9552
		0,4420	0,4501	0,42089	59,9552
	3	0,4406	0,4505	0,42089	59,9552
		0,4399	0,4513	0,42089	59,9552
		0,4402	0,4505	0,42089	59,9552

Tabla No. 28: % Recuperado de la precisión intermedia del método (Día 2):

DÍA	MUESTRA	CONC.(µg/ mL) ANALISTA 1	CONC.(µg/ mL) ANALISTA 2	% R ANALISTA 1	% R ANALISTA 2
2	1	62,8768	64,0449	104,79	106,74
		62,9765	64,0591	104,96	106,76
		63,1617	64,0307	105,26	106,71
	2	62,9480	64,1446	104,91	106,90
		62,9053	64,1019	104,84	106,83
		62,9623	64,1161	104,93	106,86
	3	62,7629	64,1731	104,60	106,95
		62,6631	64,2871	104,43	107,14
		62,7059	64,1731	104,50	106,95
PROMEDIO				104,80 %	106,87 %
S				0,2579	0,1338
CV				0,2461 %	0,1252 %
Promedio % R de ambos analistas				105,84 %	
S % R de ambos analistas				1,0826	
CV % R de ambos analistas				1,02280 %	



Tabla No. 29: Absorbancias de la precisión intermedia del método (Día 3):

DÍA	MUESTRA	ANALISTA 1	ANALISTA 2	ABSORBANCIA IDONEIDAD	CONC. PATRON (µg/ mL)
3	1	0,4422	0,4436	0,42089	59,9552
		0,4423	0,4438	0,42089	59,9552
		0,4422	0,4439	0,42089	59,9552
	2	0,4461	0,4487	0,42089	59,9552
		0,4465	0,4486	0,42089	59,9552
		0,4465	0,4484	0,42089	59,9552
	3	0,4494	0,4510	0,42089	59,9552
		0,4500	0,4525	0,42089	59,9552
		0,4500	0,4519	0,42089	59,9552

Tabla No. 30: % Recuperado de la precisión intermedia del método (Día 3):

DÍA	MUESTRA	CONC.(µg/ mL) ANALISTA 1	CONC.(µg/ mL) ANALISTA 2	% R ANALISTA 1	% R ANALISTA 2
3	1	62,9908	63,1902	104,98	105,31
		63,0050	63,2187	105,00	105,36
		62,9908	63,2329	104,98	105,38
	2	63,5463	63,9167	105,91	106,52
		63,6033	63,9025	106,00	106,50
		63,6033	63,8740	106,00	106,45
	3	64,0164	64,2443	106,69	107,07
		64,1019	64,4580	106,83	107,43
		64,1019	64,3725	106,83	107,28
PROMEDIO				105,91%	106,37%
S				0,7806	0,8363
CV				0,7370%	0,7862%
Promedio %R de ambos analistas				106,14%	
S %R de ambos analistas				0,818746105	
CV %R de ambos analistas				0,771344473%	

Tabla No. 31: Resultados Globales de la precisión intermedia del Método.

Promedio Global	105,68%
S Global	0,9175
CV Global	0,8682%



Análisis de Resultados: Se efectuó una serie de análisis sobre la misma muestra a la concentración nominal pero en diferentes condiciones operativas (diferentes días y distintos analistas). Se calculó el CV por día y analista, obteniéndose un valor inferior al 2 % y para el CV global (0.8682%) un valor menor al 3% lo que indica que los resultados del método no varían al variar las condiciones operativas descritas por el método.

6.5. EXACTITUD

Tabla No. 32: Resultados de la determinación de la exactitud

SOLUCIÓN	RÉPLICAS	CONC. TEÓRICA (µg/ mL)	ABS	ABS IDONEIDAD	CONC. PRÁCTICA (µg/ mL)	% R base 100 %
1	1	35,97	0,25560	0,42089	36,4098	101,2140
	2	35,97	0,25570	0,42089	36,4241	101,2536
	3	35,97	0,25560	0,42089	36,4098	101,2140
2	1	59,96	0,41000	0,42089	58,4039	97,4126
	2	59,96	0,40940	0,42089	58,3184	97,2700
	3	59,96	0,40950	0,42089	58,3327	97,2938
3	1	83,94	0,58960	0,42089	83,9877	100,0600
	2	83,94	0,59000	0,42089	84,0446	100,1279
	3	83,94	0,58900	0,42089	83,9022	99,9582
PROMEDIO						99,5338%
S						1,73408
CV						1,7422%



Tabla No. 33: Resultados de t exp y G exp para evaluar la exactitud

%R	media	S	CV (%)	Varianza
101,2140	101,2273	0,0229	0,0226	0,0005
101,2536				
101,2140				
97,4126	97,3255	0,0764	0,0785	0,0058
97,2700				
97,2938				
100,0600	100,0488	0,0854	0,0854	0,0073
100,1279				
99,9582				

VAR MAX	G. exp	G tab	T exp	T tab
0,00729624	0,5344	0,8709	0,8027	2,306

Análisis de Resultados para la Exactitud: Se determinó el Coeficiente de Variación (1.7422%) el cual es menor al 2 % y el porcentaje recuperado del principio activo fue de 99.53% el cual se encuentra entre el rango establecido (97-103%) con respecto a lo declarado en las especificaciones lo que indica que el método es exacto para la cuantificación de Ambroxol Clorhidrato.

Se calculó el valor de Gexp el cual corresponde a $0.5344 < G_{tab} (0.8709)$, lo cual indica que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados y que el método empleado es exacto para el fin propuesto.

La t de student calculada (0.8027) es menor al valor de t de tabla (2.306), verificando así que no hay diferencia significativa entre la recuperación media del principio activo y el 100% de este por lo que la exactitud del método es correcta.



6.6. ROBUSTEZ.

Tabla No. 34: Resultados de las absorbancias obtenidas en los ensayos de la robustez.

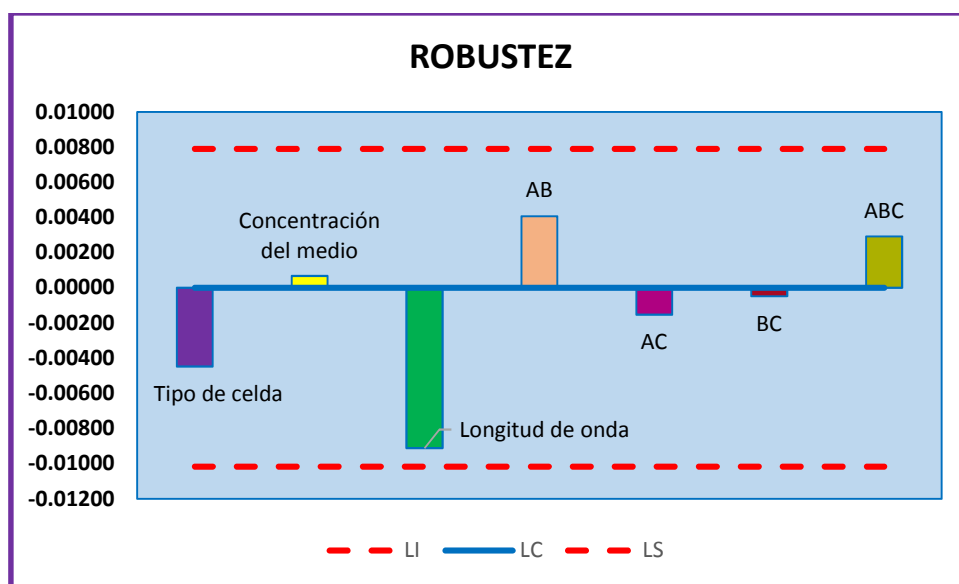
Ensayo Número	A (Celda)	B (Medio)	C (λ nm)	Abs	Promedio Abs
1	A	0,08 N	308	0,4185	0,4185
				0,4190	
				0,4180	
2	B	0,08 N	308	0,4138	0,4144
				0,4150	
				0,4143	
3	A	0,12 N	308	0,4183	0,4185
				0,4191	
				0,4180	
4	B	0,12 N	308	0,4170	0,4167
				0,4167	
				0,4165	
5	A	0,08 N	312	0,4120	0,4143
				0,4142	
				0,4168	
6	B	0,08 N	312	0,4002	0,4013
				0,4013	
				0,4025	
7	A	0,12 N	312	0,4073	0,4075
				0,4073	
				0,4078	
8	B	0,12 N	312	0,4092	0,4085
				0,4078	
				0,4084	



Tabla No. 35: Resultados de las influencias de los factores y sus interacciones en el estudio de la robustez.

B0	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
0,4185	-0,4185	-0,4185	-0,4185	0,4185	0,4185	0,4185	-0,4185
0,4144	0,4144	-0,4144	-0,4144	-0,4144	-0,4144	0,4144	0,4144
0,4185	-0,4185	0,4185	-0,4185	-0,4185	0,4185	-0,4185	0,4185
0,4167	0,4167	0,4167	-0,4167	0,4167	-0,4167	-0,4167	-0,4167
0,4143	-0,4143	-0,4143	0,4143	0,4143	-0,4143	-0,4143	0,4143
0,4013	0,4013	-0,4013	0,4013	-0,4013	0,4013	-0,4013	-0,4013
0,4075	-0,4075	0,4075	0,4075	-0,4075	-0,4075	0,4075	-0,4075
0,4085	0,4085	0,4085	0,4085	0,4085	0,4085	0,4085	0,4085
0,41246250	-0,00447	0,00068	-0,00913	0,00408	-0,00153	-0,00048	0,00293
Promedio Influencias							-0,00113
Desviación estándar							0,00452
2S							0,00904

Gráfico N° 5: Influencia de los factores y sus interacciones en la robustez del método





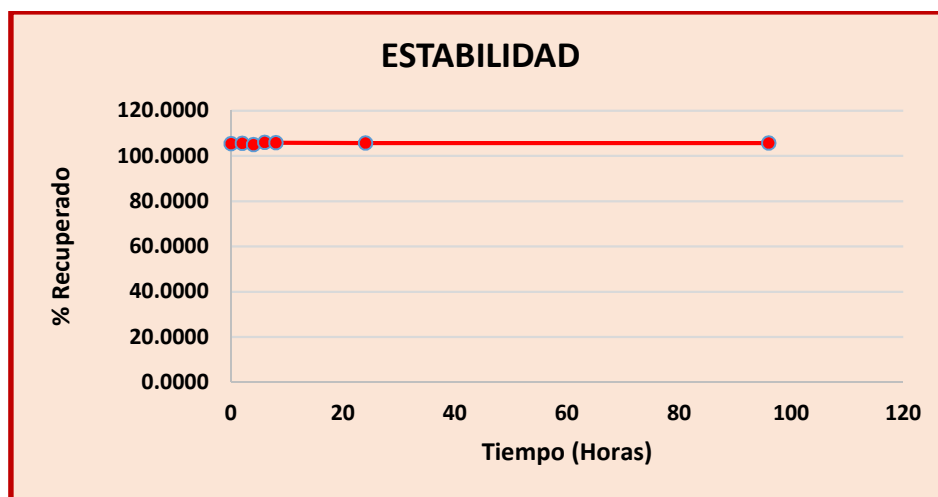
Análisis de Resultados: La influencia de los factores evaluados en los ensayos y sus interacciones no supera el límite inferior y superior a dos veces la desviación estándar, tal como se refleja en el gráfico, de modo que se deduce que el método tiene la capacidad para permanecer inalterado ante pequeñas y deliberadas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando así fiabilidad durante su empleo de rutina.

6.7. ESTABILIDAD DE LA SOLUCIÓN ANALÍTICA

Tabla No. 36: % Recuperado de Ambroxol Clorhidrato en la solución analítica.

Tiempo (Horas)	% Recuperado
0	105,4423
2	105,5965
4	105,0538
6	105,9744
8	105,8313
24	105,6681
96	105,4534

Gráfico N° 6: Estabilidad de la solución analítica de Ambroxol Clorhidrato



Análisis de Resultados: El porcentaje recuperado de la solución muestra almacenada se encuentra dentro del rango ± 1 % del porcentaje recuperado inicial, lo que indica que las soluciones permanecen estables en las condiciones de almacenamiento determinadas en el método.



VII. CONCLUSIÓN

Se validó el método analítico por la técnica espectrofotométrica UV-VIS para cuantificar Ambroxol Clorhidrato jarabe 15 mg/ 5 mL, describiéndose la metodología analítica empleada mediante el protocolo de validación en el cual se detalla cada paso a seguir.

El método respondió satisfactoriamente a cada uno de los parámetros de desempeño establecidos en el Reglamento Técnico Centroamericano para la categoría de prueba a la cual pertenece (categoría I), demostrando que la metodología analítica para la cuantificación de Ambroxol Clorhidrato, por espectrofotometría UV-visible, es selectiva, exacta, precisa, y lineal, por lo cual se tiene la certeza que los resultados obtenidos son confiables dentro de las condiciones descritas en este documento y por ello se establece que el método analítico para cuantificación de Ambroxol Clorhidrato jarabe del Laboratorio de Producción de Medicamentos “Mauricio Díaz Müller” es válido ya que cumple con los parámetros establecidos.

El método tiene la capacidad de permanecer inalterado ante las pequeñas variaciones introducidas en la metodología, las cuales son susceptibles de producirse durante su utilización, proporcionando resultados válidos.

Las soluciones analíticas son estables bajo las condiciones analíticas descritas en este documento, durante el periodo de tiempo establecido (96 Horas).



VIII. RECOMENDACIONES

1. Controlar las condiciones ambientales establecidas para el ambiente de trabajo, de modo que se asegure que factores externos no puedan influir en la estabilidad de las soluciones.
2. Efectuar la verificación de las balanzas al inicio de cada jornada para garantizar la obtención de pesos exactos.
3. Analizar el Clorhidrato de Ambroxol jarabe bajo las condiciones de trabajo establecidas en la metodología.
4. Rotular cada una de las soluciones y reactivos utilizados durante la realización de cada uno de los análisis de modo que se eviten confusiones entre sustancias y a la vez garantizar el cumplimiento de las BPL.
5. Determinar la Reproducibilidad para el método de cuantificación de Clorhidrato de Ambroxol jarabe entre Laboratorios en un futuro, debido a que no fue contemplado dicho parámetro en ésta Validación.
6. Utilizar el equipo con su calibración correspondiente para darle certeza a la Validación.



IX. BIBLIOGRAFIA

1. A.E.F.I. Validación de Métodos Analíticos. Asociación Española De Farmacéuticos De La Industria. A.E.F.I. 2001.
2. Ayres, Gilbert H./ Quantitative chemical analysis, New York: Harper & Row, ix, 726p.
3. Chapman KG. A suggested validation lexicon. Pharmaceutical Technology 1983; 7: 51-57.
4. Clelia Guadalupe Quiroz Larios. Validacion de un método analítico para la determinación de Clenbuterol y Ambroxol en jarabe por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). 2004. Universidad Nacional Autonoma de Nicaragua; facultad de ciencias químicas.
5. Edwards C. Validation of solid dosage forms, the FDA view. Drug Development and Industrial Pharmacy 1989; 15 (6&7): 11191133.
6. E.R. Rugama Narvaez y C. A. Silva Oliva. Validacion de un método analitico por espectrofotometria ultraviolet-visible para el ensayo de disolucion de tabletas de Metocarbamol elaboradas por Laboratotio PANZYMA. León, 2003.
7. FARMACOPEA MEXICANA.
8. Guide lines on General Principles of process Validation. Food & Drug Administration. May 1987.
9. Jesus Flores. (1988), Farmacologia Humana, Septa edición. Barcelona, España: MASSON S.A.
10. Mexico. Secretaria de Salud. Comision Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 9na edición. 2008. Pag 335-338.
11. Nash R. Process validation for solid dosage forms. Pharmaceutical Technology 1979; 3 (June): 105-107.
12. Neal C. Back to the basics. A philosophical overview. Journal of Validation Technology 1997; 3 (3): 281-283.
13. Normas de Correcta Fabricación de medicamentos. Vol IV. Oficina de publicaciones oficiales de las Comunidades Europeas. Luxemburgo. 1992.



14. Reynolds J.E.F. Martindale The Extra Pharmacopeia. Twenty-ninth Edition. The pharmaceutical Press. London. 1989. Pag 904.
15. RTCA 11.03.39: 06. Productos Farmacéuticos. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS MEDICAMENTOS.
16. RTCA 11.03.42:07. Reglamento Técnico Centroamericano. Productos Farmaceuticos Medicamentos De Uso Humano: BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA PARA LA INDUSTRIA FARMACEUTICA
17. RTCA 11.03.59:11. Reglamento Técnico Centroamericano. Productos Farmacéuticos Medicamentos Para Uso Humano: REQUISITOS DE REGISTRO SANITARIO.
18. Sevilla Bonilla Arelys Jossefina. Validación de famotidine de 40 mg tablet por especyrofotometria ultraviolet visible (UV-VIS), UNAN-León,
19. Skepnek E. FDA validation and certification. The righth way. STP Pharma Pratiques 1991; 1 (6): 641-646.
20. Susana Paola Carranza Diaz. Validacion del método analítico de cuantificación de clorhidrato de ambroxol jarabe en el Laboratorio de Produccion de Medicamentos - LAPROMED. Universidad de San Carlos de Guatemala; facultad de ciencias químicas. 2010.
21. Totzlaff Rf, Sheperd. RE, Loblan AJ. The validation story: perspectives on the systematic GMP inspection approach and validation development. Pharmaceutical Technology 1993; (march): 100-116.
22. USP 36: Farmacopea de los Estados Unidos de América. NF 31. Volumen 1. The United States Pharmacopeial Convention 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852, Estados Unidos de América. 2013.
23. W. C. Bowman y M. J. Rand, (1984), farmacología, Bases bioquímicas y patológicas, aplicaciones clínicas. Segunda edición. México, D. F: interamericana.



X. ANEXOS

ANEXO No 1: Valores críticos de F para un contraste de una cola (P=0.05)

v_2	v_1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.9	245.9	248.0
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45
3	10.13	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.786	8.745	8.703	8.660
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.912	5.858	5.803
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.678	4.619	4.558
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.000	3.938	3.874
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.575	3.511	3.445
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.687	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.284	3.218	3.150
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.073	3.006	2.936
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.913	2.845	2.774
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.788	2.719	2.646
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.687	2.617	2.544
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.604	2.533	2.459
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.534	2.463	2.388
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.475	2.403	2.328
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.425	2.352	2.276
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.381	2.308	2.230
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.342	2.269	2.191
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378	2.308	2.234	2.155
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.278	2.203	2.124

v_1 = número de grados de libertad del numerador y v_2 = número de grados de libertad del denominador.



ANEXO No 2: Valores críticos de F para un contraste de dos colas (P=0.05)

ν_2	ν_1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20
1	647.8	799.5	864.2	899.6	921.8	937.1	948.2	956.7	963.3	968.6	976.7	984.9	993.1
2	38.51	39.00	39.17	39.25	39.30	39.33	39.36	39.37	39.39	39.40	39.41	39.43	39.45
3	17.44	16.04	15.44	15.10	14.88	14.73	14.62	14.54	14.47	14.42	14.34	14.25	14.17
4	12.22	10.65	9.979	9.605	9.364	9.197	9.074	8.980	8.905	8.844	8.751	8.657	8.560
5	10.01	8.434	7.764	7.388	7.146	6.978	6.853	6.757	6.681	6.619	6.525	6.428	6.329
6	8.813	7.260	6.599	6.227	5.988	5.820	5.695	5.600	5.523	5.461	5.366	5.269	5.168
7	8.073	6.542	5.890	5.523	5.285	5.119	4.995	4.899	4.823	4.761	4.666	4.568	4.467
8	7.571	6.059	5.416	5.053	4.817	4.652	4.529	4.433	4.357	4.295	4.200	4.101	3.999
9	7.209	5.715	5.078	4.718	4.484	4.320	4.197	4.102	4.026	3.964	3.868	3.769	3.667
10	6.937	5.456	4.826	4.468	4.236	4.072	3.950	3.855	3.779	3.717	3.621	3.522	3.419
11	6.724	5.256	4.630	4.275	4.044	3.881	3.759	3.664	3.588	3.526	3.430	3.330	3.226
12	6.554	5.096	4.474	4.121	3.891	3.728	3.607	3.512	3.436	3.374	3.277	3.177	3.073
13	6.414	4.965	4.347	3.996	3.767	3.604	3.483	3.388	3.312	3.250	3.153	3.053	2.948
14	6.298	4.857	4.242	3.892	3.663	3.501	3.380	3.285	3.209	3.147	3.050	2.949	2.844
15	6.200	4.765	4.153	3.804	3.576	3.415	3.293	3.199	3.123	3.060	2.963	2.862	2.756
16	6.115	4.687	4.077	3.729	3.502	3.341	3.219	3.125	3.049	2.986	2.889	2.788	2.681
17	6.042	4.619	4.011	3.665	3.438	3.277	3.156	3.061	2.985	2.922	2.825	2.723	2.616
18	5.978	4.560	3.954	3.608	3.382	3.221	3.100	3.005	2.929	2.866	2.769	2.667	2.559
19	5.922	4.508	3.903	3.559	3.333	3.172	3.051	2.956	2.880	2.817	2.720	2.617	2.509
20	5.871	4.461	3.859	3.515	3.289	3.128	3.007	2.913	2.837	2.774	2.676	2.573	2.464

ν_1 = número de grados de libertad del numerador y ν_2 = número de grados de libertad del denominador.



ANEXO No 3: Nivel de significación de la prueba de Cochran ($\alpha=0.05$)

v	k (n° de grupos)												
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	30
1	0.9985	0.9669	0.9065	0.8412	0.7808	0.7271	0.6798	0.6385	0.6020	0.5410	0.4709	0.3894	0.2929
2	0.9750	0.8709	0.7679	0.6838	0.6161	0.5612	0.5157	0.4775	0.4450	0.3924	0.3346	0.2705	0.1980
3	0.9392	0.7977	0.6841	0.5981	0.5321	0.4800	0.4377	0.4027	0.3733	0.3264	0.2758	0.2205	0.1593
4	0.9057	0.7457	0.6287	0.5441	0.4803	0.4307	0.3910	0.3584	0.3311	0.2880	0.2419	0.1921	0.1377
5	0.8772	0.7071	0.5895	0.5065	0.4447	0.3974	0.3595	0.3286	0.3029	0.2624	0.2195	0.1735	0.1237
6	0.8534	0.6771	0.5598	0.4783	0.4184	0.3726	0.3362	0.3067	0.2823	0.2439	0.2034	0.1602	0.1137
7	0.8332	0.6530	0.5365	0.4564	0.3980	0.3535	0.3185	0.2901	0.2666	0.2299	0.1911	0.1501	0.1061
8	0.8159	0.6333	0.5175	0.4387	0.3817	0.3384	0.3043	0.2768	0.2541	0.2187	0.1815	0.1422	0.1002
9	0.8010	0.6167	0.5017	0.4241	0.3682	0.3259	0.2926	0.2659	0.2439	0.2098	0.1736	0.1357	0.0958
10	0.7880	0.6025	0.4884	0.4118	0.3568	0.3154	0.2829	0.2568	0.2353	0.2020	0.1671	0.1303	0.0921
16	0.7341	0.5466	0.4366	0.3645	0.3135	0.2756	0.2462	0.2226	0.2032	0.1737	0.1429	0.1108	0.0771
36	0.6602	0.4748	0.3720	0.3066	0.2612	0.2278	0.2022	0.1820	0.1655	0.1403	0.1144	0.0879	0.0604
144	0.5813	0.4031	0.3093	0.2513	0.2119	0.1833	0.1616	0.1446	0.1308	0.1100	0.0889	0.0675	0.0457
∞	0.5000	0.3333	0.2500	0.2000	0.1667	0.1429	0.1250	0.1111	0.1000	0.0833	0.0667	0.0500	0.0333

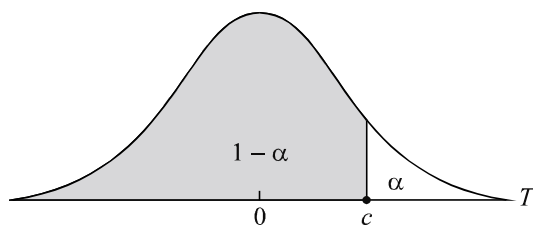


ANEXO No 4: Tabla t-Student dos colas

<i>Valor de t para un intervalo de confianza de</i>	<i>90%</i>	<i>95%</i>	<i>98%</i>	<i>99%</i>
<i>Valor crítico de t para valores de P de número</i>	<i>0.10</i>	<i>0.05</i>	<i>0.02</i>	<i>0.01</i>
<i>de grados de libertad</i>				
1	6.31	12.71	31.82	63.66
2	2.92	4.30	6.96	9.92
3	2.35	3.18	4.54	5.84
4	2.13	2.78	3.75	4.60
5	2.02	2.57	3.36	4.03
6	1.94	2.45	3.14	3.71
7	1.89	2.36	3.00	3.50
8	1.86	2.31	2.90	3.36
9	1.83	2.26	2.82	3.25
10	1.81	2.23	2.76	3.17
12	1.78	2.18	2.68	3.05
14	1.76	2.14	2.62	2.98
16	1.75	2.12	2.58	2.92
18	1.73	2.10	2.55	2.88
20	1.72	2.09	2.53	2.85
30	1.70	2.04	2.46	2.75
50	1.68	2.01	2.40	2.68
∞	1.64	1.96	2.33	2.58



ANEXO No 5: Valores críticos de la distribución *t*-Student una cola.



Área de una cola								
<i>gl</i>	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	0.025	0.01	0.005
1	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657
2	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925
3	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841
4	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604
5	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032
6	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707
7	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499
8	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355
9	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250
10	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169
11	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106
12	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055
13	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012
14	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977
15	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947
16	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921
17	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898



18	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878
19	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861
20	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845
21	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831
22	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819
23	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807
24	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797
25	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787
26	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779
27	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771
28	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763
29	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756
30	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750
40	0.681	0.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704
60	0.679	0.848	1.046	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660
120	0.677	0.845	1.041	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617
∞	0.674	0.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576



ANEXO No. 6: Formulario

1. $CV = \frac{s}{\bar{x}} * 100$

2. $s = \sqrt{\frac{\sum(X - \bar{X})^2}{(n - 1)}}$

3. $b = \frac{\sum(Xi - \bar{X})(Yi - Ypro)}{\sum(Xi - \bar{X})^2}$

4. $a = Ypro - b * \bar{X}$

5. $x^2 = \frac{1}{c} * [2.30026 * (x * 10gS^2 - \sum Vi * 10gSi^2)]$

6. $C = \frac{\sum (\frac{1}{Vi} - \frac{1}{\bar{V}})}{3 * (k - 1)}$

7. $S^2 = \frac{\sum Vi * Si^2}{V}$

8. Cálculo de t experimental:

$$t_{exp} = |100 - Xprom| * \sqrt{n} / CV$$

9. Cálculo de Fisher:

$$F_{exp} = \frac{S^2a}{S^2b}$$

10. Regresión.

$$\sum(\hat{Y} - Ypro)^2$$



11. Residual.

$$\Sigma(\hat{Y} - Y)^2$$

12. Falta de Ajuste.

$$\Sigma(Y_{proj} - \hat{Y})^2$$

13. Error experimental.

$$\Sigma(\hat{Y} - Y)^2 - \Sigma(Y_{proj} - \hat{Y})^2$$

14. Varianza de regresión.

$$\frac{\text{regresión}}{gl}$$

15. Varianza residual.

$$\frac{\text{residual}}{gl}$$

16. Varianza de Falta de ajuste.

$$\text{falta de ajuste} / gl$$

17. Varianza de error experimental.

$$\frac{EE}{gl}$$

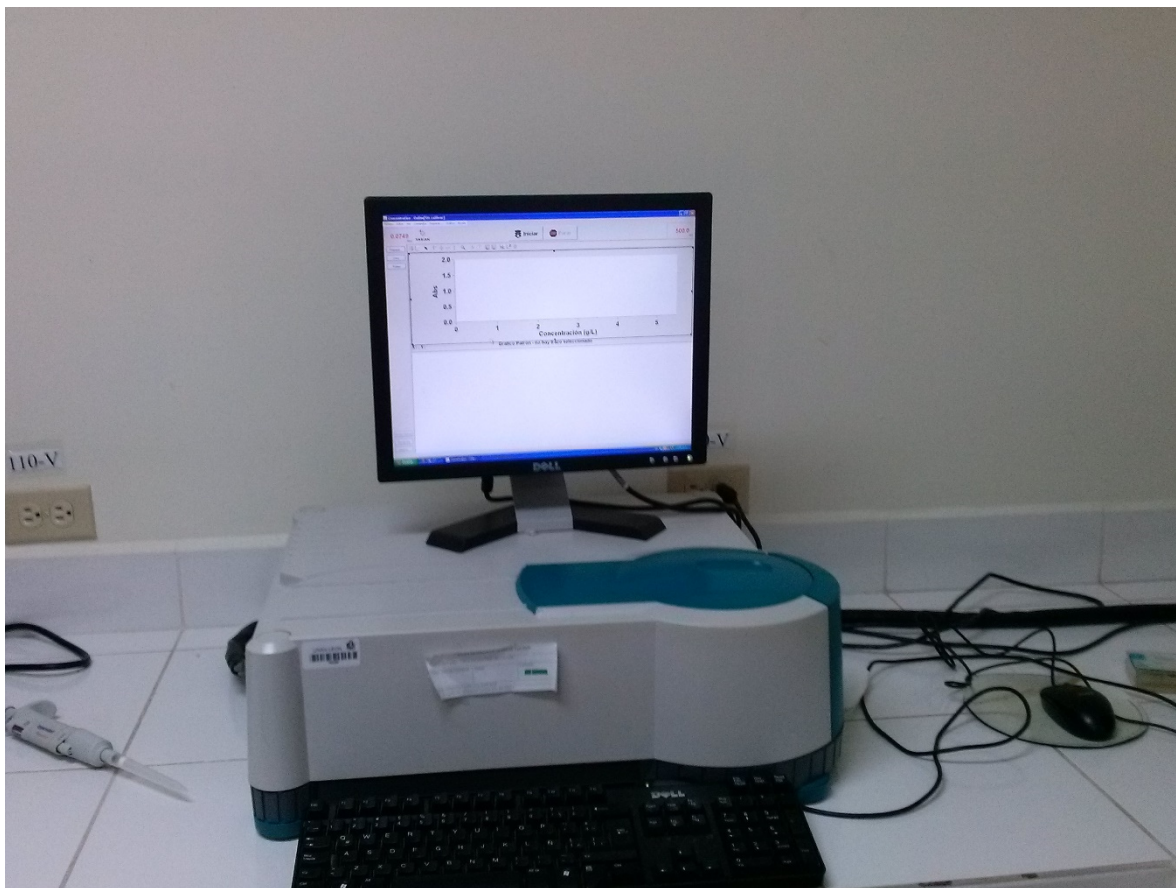
18. Calculo de F1 y F2.

$$F1 = \frac{V_{regresion}}{V_{residual}}$$

$$F2 = \frac{V_{falta de ajuste}}{V_{error exp}}$$



Anexo No. 7: Espectrofotómetro utilizado en el estudio:





Anexo No. 8: Área donde se realizó la validación :



Anexo No. 9: Área de balanzas:





Anexo No. 10: Resultados verificación de balanzas:

DIA	PESO PROMEDIO (g)	DESVIACIÓN ESTANDAR
1	50.0000	0.0000632456
2	49.9998	0.0000547772
3	50.0001	0.0000408248
4	50.0000	0.0000000000
5	50.0001	0.0000347772
6	50.0001	0.0000408248
7	50.0000	0.0000000000
8	50.0000	0.0000547772
9	49.9999	0.0000308248
10	50.0000	0.0000000000



Anexo No. 11:

Anexo 11.1: Características organolépticas del jarabe de Ambroxol Clorhidrato 15 mg/ 5mL

Aspecto: Líquido claro, homogéneo.

Color: Incoloro

Olor: Vainilla

Sabor: Vainilla

Anexo 11.2: Características organolépticas del Placebo de jarabe de Ambroxol Clorhidrato.

Aspecto: Líquido claro, homogéneo.

Color: Incoloro

Olor: Vainilla

Sabor: Vainilla.