

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

E. A. P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Desarrollo y validación de un método analítico para la
cuantificación por HPLC de clenbuterol clorhidrato en
solución oral-gotas, y análisis comparativo de
productos comercializados en el Perú**

TESIS

para optar al título profesional de Químico Farmacéutico

AUTORES

Elvis Edison Leyva Minaya

Fernando Pérez Cáceres

ASESORA

Norma Angélica Carlos Casas

Lima-Perú

2009

A DIOS:

Por su infinita misericordia, por darnos la vida, cuidarnos y hacer posible la realización de este trabajo y poder cumplir nuestros anhelos y la de nuestros queridos padres.

A Él con profundo agradecimiento y amor.

TESISTAS

*Nuestro sincero agradecimiento a la Mg. Norma
Carlos Casas por su generosa dirección,
asesoramiento y valiosos consejos en la realización
del presente trabajo.*

A mis padres: ELEODORA Y JULIO

Que me dieron la vida y han estado siempre conmigo en todo momento apoyándome y brindándome todo su amor, gracias por darme una carrera. Los quiero mucho y este trabajo es por ustedes.

A mis hermanos MICHAEL Y OMAR

Gracias por estar conmigo, por sus consejos y su gran apoyo, los quiero mucho.

A mis sobrinas: VALERIA Y CAMILA

Por ser estímulo para mi superación y poder brindarles lo mejor, las quiero mucho pequeñas.

Mi gratitud a toda mi familia por su incondicionalidad, aliento y generosidad.

ELVIS

Doy gracias a mis padres HILARIO y MARCOSA

Por su apoyo, confianza y consejos, quienes con su dedicación y sacrificio hicieron posible la culminación de mis estudios.

A mi hermana MERCEDES

Por su apoyo constante y como estímulo a la superación y progreso para lograr las mejores metas.

Mi gratitud a toda mi familia por su incondicionalidad, aliento y generosidad.

FERNANDO

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio Farmacéutico S.J. Roxfarma S.A., por brindarnos las facilidades para la realización del presente trabajo.

A todos nuestros amigos de trabajo que siempre estuvieron dándonos su apoyo y que hicieron posible la culminación del presente trabajo, en especial a Giovanna y Henry; gracias por todo.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

SUMMARY

I. INTRODUCCIÓN	1
II. GENERALIDADES	3
2.1 Calidad en la Industria Farmacéutica	3
2.1.1 Calidad	3
2.1.2 Administración de la Calidad en la Industria Farmacéutica	3
2.1.3 Garantía de la Calidad	3
2.1.3.1 Buenas Prácticas de Manufactura (GMP)	4
2.1.3.2 Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP)	4
2.2 Validación	4
2.2.1 Concepto	4
2.2.2 Importancia	5
2.2.3 Tipos de validación	5
2.2.4 Validación de Métodos Analíticos	5
a) Importancia	6
b) Inicio de una Validación	6
c) Plan Maestro de Validación	6
2.2.5 Desarrollo de un Método Analítico	7
2.2.6 Parámetros de Validación de Métodos Analíticos	8
2.2.7 Datos requeridos para la Validación de un Método Analítico	11
2.3 Análisis Instrumental	13
2.3.1 Cromatografía Líquida de Alta Presión	13
2.4. Propiedades Físicas, Químicas y Farmacológicas del analito	14
2.4.1 Clenbuterol Clorhidrato	14
PARTE EXPERIMENTAL	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1 . Equipos, materiales y reactivos	16
3.2 Desarrollo del método analítico	17
3.2.1. Elección del tipo de cromatografía líquida a utilizar	17

3.2.2. Elección del detector	18
3.2.3. Elección de la fase móvil y la fase estacionaria	18
3.2.4. Técnica analítica desarrollada	19
3.3 Validación del método analítico	21
3.3.1. Adecuación del Sistema Cromatográfico.	21
3.3.2. Parámetros desarrollados en la validación.	22
3.3.3. Selectividad	22
3.3.4. Linealidad	28
3.3.5. Exactitud	32
3.3.6.. Precisión	35
3.3.7. Robustez	36
3.4 Análisis Comparativo	36
IV. RESULTADOS	37
4.1 Adecuación del Sistema Cromatográfico	37
4.2 Linealidad	38
4.3 Exactitud	44
4.4 Precisión	47
4.4.1 Repetibilidad	47
4.4.2 Precisión intermedia	50
4.5 Robustez	51
4.6 Análisis Comparativo con otros productos	51
V. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	53
VI. CONCLUSIONES	58
VII. RECOMENDACIONES	59
VIII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
IX. ANEXOS	63

RESUMEN

El análisis por Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC) de productos farmacéuticos es una necesidad y es de uso rutinario. Esta técnica evita minimiza los errores que conllevan a situaciones de riesgo al usuario, garantizando que el contenido en el producto sea el correcto. La validación es un proceso establecido que obtiene pruebas documentadas y demostrativas para que un método de análisis sea lo suficientemente fiable y reproducible para producir un resultado previsto dentro de los intervalos definidos. La validación de un método analítico es un requisito necesario para cumplir con las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y así asegurar la calidad del medicamento.

La Técnica Analítica desarrollada y propuesta en el presente trabajo plantea la cuantificación por el método de HPLC de un producto farmacéutico que contiene Clenbuterol Clorhidrato solución oral gotas. En el cual se procedió a la validación del método de análisis evaluando los parámetros que indican las obras oficiales, como son: selectividad, linealidad, precisión, exactitud y robustez. Posteriormente, se elaboró el Protocolo de validación del método de análisis, para lo cual se contó con el diseño experimental y los procedimientos estadísticos, concluyéndose así que el método analítico propuesto es selectivo, lineal, preciso, reproducible y exacto; comprobándose así su validez.

PALABRAS CLAVE: Validación, Método Analítico, Cromatografía Líquida de Alta Performance, Clenbuterol Clorhidrato.

SUMMARY

The Analysis by High Precision Liquid Chromatography (HPLC) of pharmaceuticals is a necessity and is routinely used. This technique avoids minimizes errors that lead to situations of risk to the user, ensuring that the contents in the product is correct. Validation is a process established that evidence obtained to document and demonstrate an analytical method is sufficiently reliable and reproducible to produce an intended result within the defined intervals. The analytical method validation is a necessary requirement to comply with Good Manufacturing Practices (GMP) and thus ensure the quality of the product.

The analytical technique developed and proposed in this paper discusses the quantification by HPLC of a pharmaceutical product containing Clenbuterol Hydrochloride oral solution drops. In which we proceeded to validate the analysis method evaluating the parameters that indicate the official works, such as: selectivity, linearity, precision, accuracy and robustness. Subsequently developed the Protocol for validation of analytical method, for which they received the experimental design and statistical procedures, concluding that the proposed analytical method is selective, linear, accurate, reproducible and accurate; see that they are valid.

KEYWORDS: Validation, Analytical Method, High Performance Liquid Chromatography, Clenbuterol Hydrochloride.

I. INTRODUCCIÓN

Una de las características más importantes de toda empresa es la calidad de sus productos, ya que de esto dependerá su prestigio, así como el desarrollo económico y crecimiento de la misma. Así mismo una de las herramientas con las que se cuenta para asegurar la calidad de sus productos y procedimientos es la validación de los métodos analíticos, por lo cual, la adopción de uno nuevo, debe estar soportado por suficientes datos de laboratorio y una bien documentada información

El análisis por HPLC, de productos farmacéuticos son una necesidad y de uso rutinario. Este método evita errores que conllevan a situaciones de riesgo al usuario, garantizando que la dosis prescrita llegue al paciente en la cantidad apropiada.

La rutina de laboratorio reduce repeticiones analíticas y facilita mayor rapidez en los análisis que adecuadamente validadas dan confiabilidad a los resultados. La validación de métodos analíticos se fundamenta en la determinación de diversos parámetros, que se aplican de acuerdo con la categoría a la que pertenezcan.

La validación en si proporciona un alto grado de confianza y seguridad del método analítico y se realiza con carácter obligatorio cuando se desarrolla un nuevo procedimiento, ya que permite asegurar que el método propuesto hace lo que debe que hacer.

Para el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura (GMP) la validación es un requisito indispensable que está establecido por las agencias reguladoras y libros oficiales. La validación es parte integral del desarrollo de un método de análisis, puesto que sin fiabilidad de los resultados analíticos es imposible asegurar que un medicamento cumple con las especificaciones exigidas, además, contribuye a garantizar la calidad y asegurar las propiedades de calidad de un producto terminado. La calidad de los resultados analíticos debe estar amparada mediante la fiabilidad y reproducibilidad del método analítico utilizado en su obtención y esta demostración debe estar debidamente documentada con el detalle de la preparación de las muestras efectuadas y datos obtenidos.

Conscientes de la importancia del tema, entidades de carácter oficial como la FDA, OMS, USP, ICH además de las farmacopeas europeas concuerdan en la ineludible necesidad de la validación de los procesos analíticos.

Hoy en día la validación es un tema que muestra un interés creciente en la Industria Farmacéutica debido al mayor énfasis que a puesto la industria en años recientes en los temas de Aseguramiento de la Calidad y mejora de la productividad. La validación, por tanto, forma parte importante en un programa de Aseguramiento de la Calidad y es fundamental para una eficiente operación de producción.

En el presente trabajo se realizó el desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación por HPLC de Clenbuterol Clorhidrato en Solución Oral gotas, debido a no encontrarse un método para este producto en obras oficiales. El desarrollo del trabajo se realizó en Laboratorio Farmacéutico Roxfarma S.A.

II. GENERALIDADES

2.1 CALIDAD EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

2.1.1 CALIDAD

Según la International Organization for Standardization (ISO): Es el conjunto de propiedades y características de un producto, proceso o servicio que le confiere la aptitud de satisfacer las necesidades y las expectativas del cliente. (ISO 8402-1986).

2.1.2 ADMINISTRACIÓN DE LA CALIDAD

Se define como el aspecto de la función administrativa que determina y pone en práctica la Política de la Calidad es decir la orientación y las intenciones generales de un organismo en lo que respecta a calidad, en la forma como lo expresan y lo autorizan las autoridades superiores de dicho organismo.

Sus elementos básicos son los siguientes:

- a) Sistema de Calidad que comprende la estructura, procedimientos, procesos y recursos.
- b) Garantía de la Calidad, concepto que involucra las medidas que se adoptan para asegurar que el producto satisface determinadas condiciones de calidad.

Los conceptos de Garantía de la Calidad, Buenas Prácticas de Manufactura (GMP), Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) y Control de Calidad, constituyen aspectos de la administración de la calidad y se relacionan entre sí. ⁽²¹⁾

2.1.3 GARANTÍA DE LA CALIDAD

Es el conjunto de medidas que se adoptan con el fin de asegurar que los productos farmacéuticos sean de la calidad requerida para el uso al que están destinados. Por lo tanto, Garantía de la Calidad incorpora las Buenas Prácticas de Manufactura (GMP) y otros conceptos; incluyendo aquellos que van más

allá del alcance de estos lineamientos, tales como el diseño y el desarrollo del producto.⁽²¹⁾

2.1.3.1 BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA (GMP)

Son el conjunto de normas que tanto la Industria Farmacéutica como la Cosmética ponen en práctica con el fin de asegurar la calidad de los productos que fabrican, debiendo para ello tomar las medidas necesarias a través de procesos estandarizados.

Establecen que todas las operaciones, procesos, métodos o técnicas deben ser estrictas o reguladas y deben ser cumplidas y supervisadas por profesionales con la suficiente responsabilidad.

2.1.3.2 BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO (GLP)

Son normas y procedimientos de operaciones oficiales considerados como requerimientos mínimos para promover la calidad e integridad de un producto, nacen de la necesidad de contar con datos analíticos de confianza y un seguimiento de todo el proceso, para poder juzgar sobre la seguridad de un producto.⁽²⁾

Las GLP pretenden asegurar la calidad y validez de los datos de los análisis. Además, facilita el comportamiento adecuado del estudio, promueve su exacto y completo reporte de los medios por los cuales se puede verificar la integridad de los mismos.⁽²⁾

2.2 VALIDACIÓN

2.2.1 CONCEPTO

Se define como el establecimiento de pruebas documentadas que aportan un alto grado de seguridad de que un proceso planificado se efectuará uniformemente en conformidad con los resultados previstos especificados. Los estudios de validación son aplicables a las pruebas analíticas, los equipos, los sistemas y servicios de establecimientos (como aire, agua, vapor) y procesos (como el de fabricación, limpieza, esterilización, llenado estéril, liofilización, etc.).⁽¹⁷⁾

2.2.2 IMPORTANCIA

- Asegura que el producto elaborado cumple en forma consistente y repetitiva con sus especificaciones y atributos de calidad.
- Ayuda a cumplir los objetivos de productividad establecidos.
- Permite disminuir los costos de proceso. ⁽²²⁾

2.2.3 TIPOS DE VALIDACIÓN

a) Validación Prospectiva

Es la que se realiza sobre un proceso antes de que sea implementado, el cual puede darse para la fabricación de nuevos productos, cuando hay cambios fundamentales en un proceso o cuando se incorpora un equipo o sistema para uso. ^{(18) (22)}

b) Validación Retrospectiva

Es la que se realiza sobre el análisis de ensayos ya elaborados, en la cual se revisa y analiza con métodos estadísticos los parámetros físicos y los resultados analíticos de por lo menos 10 a 30 consecutivos, no debiendo existir cambios en la formulación, modificaciones sustanciales de equipo o instalaciones, ni cambios en el método de ensayo. ^{(18) (22)}

c) Validación Simultánea

Es la que se produce cuando es imposible completar la validación antes de la puesta en el mercado del producto farmacéutico. Se da si sólo se ha producido un limitado número de lotes o si los lotes no se producen frecuentemente o tal vez si la fabricación se ha producido con modificaciones y las pruebas demuestran que los parámetros estén conformes. ⁽²²⁾

d) Revalidación

Se realiza cuando un método validado ha sido modificado en alguno de los pasos del procedimiento establecido, o se ha variado alguno de los instrumentos, reactivo o material empleado originalmente, y se realiza en periodos establecidos. ^{(2) (22)}

2.2.4 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Es el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con alto grado de seguridad, a la obtención

de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos. ^{(2) (3)}

El laboratorio deberá validar:

- Métodos no estandarizados.
- Métodos no diseñados o desarrollados internamente.
- Métodos estandarizados usados fuera del alcance propuesto.
- Ampliaciones o modificaciones de métodos estandarizados.
- Cuando se realizan algunos cambios en los métodos no estandarizados ya validados, se debe documentar la influencia de tales cambios y, si es necesario, se debe efectuar una nueva validación. ^{(2) (3) (29)}

a) IMPORTANCIA

- Se demuestra que los métodos son adecuados a los análisis propuestos en las condiciones descritas, ya que la validación es la herramienta que permite obtener las pruebas documentales al respecto.
- Se trabaja con métodos que ofrecen confianza y seguridad en los resultados, lo cual a su vez minimiza el número de fallas y repeticiones permitiendo un importante ahorro de costos.
- Trabajar con métodos validados permite no sólo el conocimiento del método analítico sino también cumplir con las exigencias legales (GMP), con el fin de asegurar la calidad y eficacia del producto. ^{(2) (3) (29)}

b) INICIO DE UNA VALIDACIÓN

La validación empieza en la planificación, formalizada usualmente a través de un plan maestro de validación (PMV).

- Esta planificación incluye prever la realización de todas las instancias de calibración, mantenimiento, capacitación, desarrollo de documentos, etc., que corresponda, antes de comenzar con las actividades de validación propiamente dichas. ^{(18) (22) (29)}

c) PLAN MAESTRO DE VALIDACIÓN (PMV)

Desarrollo planificado y sistemático de todas las actividades relacionadas que atañe al establecimiento en su totalidad y en el que se describe que equipos, sistemas, métodos y procedimientos habrán de validarse y cuando lo serán. En el documento deberá de especificarse la forma de presentación necesaria para

cada documento de validación (IQ, OQ, PQ en el caso de equipos y sistemas; validación de procesos; validación de métodos analíticos) e indicar que tipo de información deberá reflejarse en cada momento.

El plan maestro de validación indicará también porque y cuando se efectuarán las revalidaciones, ya sea después de hacerse modificaciones o cambios en la ubicación de equipos o sistemas, cambios de los procesos o equipos usados en la fabricación, o cambios en los métodos de valoración o equipos utilizados en las pruebas. ^{(18) (22) (29)}

2.2.5 DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO

No existe una guía oficial que indique la secuencia de experimentos analíticos necesarios para el desarrollo de un método, ya que esto depende del método en si mismo. No obstante el desarrollo lógico de un método analítico transcurre en diferentes fases.

a) Características de Practicabilidad

Han de evaluarse los parámetros de practicabilidad del método analítico: precisión exigible, sensibilidad deseable, grado de selectividad, tiempo, costo, tamaño de la muestra, cualificación del personal, tipo de equipo e instrumentación, condiciones de seguridad, etc.

b) Características de Idoneidad

La puesta a punto del método analítico incluye desde los primeros estudios de tanteo con patrones, hasta la utilización del método en muestras reales que garanticen el buen funcionamiento del sistema en el momento del análisis.

c) Características de Fiabilidad

Esta última etapa permitirá conocer las características de fiabilidad del método para su aplicación rutinaria. Dichas características son las que demuestran la capacidad de un método analítico para mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación. ^{(2) (3)}

En el caso de métodos desarrollados para análisis por HPLC se recomiendan los pasos generales que se observan en la Figura 1

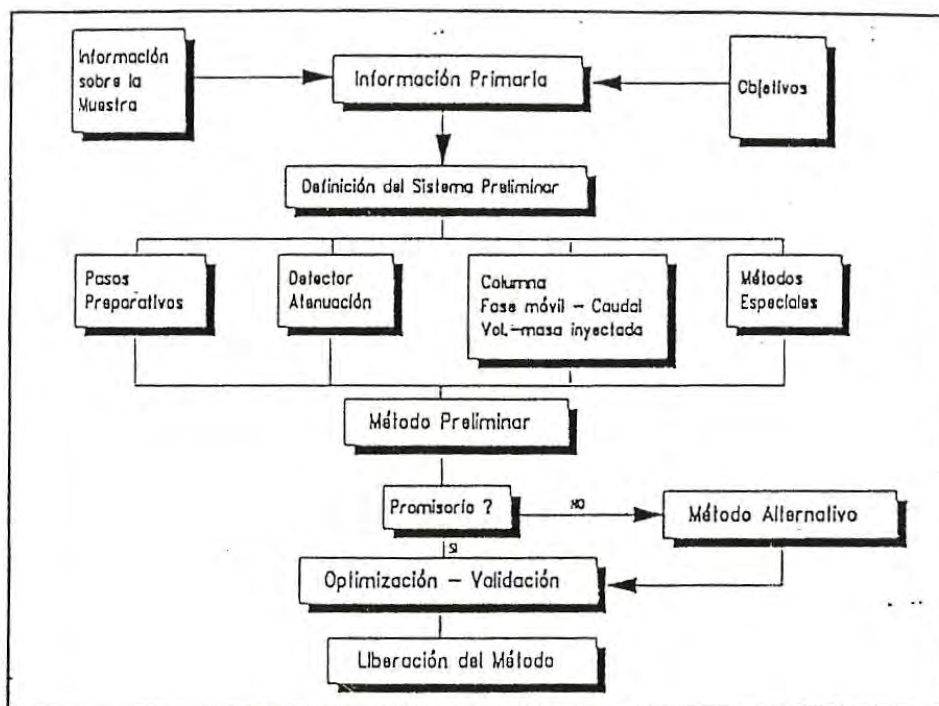


Figura N° 1: Pasos en el desarrollo de método por HPLC

2.2.6 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

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

a) SELECTIVIDAD

Capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultánea o separadamente los analitos de interés, de formas inequívocas, en presencia de otras sustancias químicas que pueden estar presentes en la muestra.

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 que grado la respuesta del método es únicamente proporcionada por el analito, sin interferencias de otras sustancias relacionadas con el de una u otra forma.

(2) (3)

b) LINEALIDAD Y RANGO

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

Siempre que sea posible se buscará una respuesta de tipo lineal que facilitará su trazado, interpolación e interpretación.

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. ^{(2) (3)}

c) PRECISIÓN

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. ^{(2) (3)}

La precisión engloba diferentes tipos de estudio:

c.1) Repetibilidad

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

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

Uno de los factores que más puede 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. ^{(2) (3)}

c.2) Precisión Intermedia

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

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. ^{(2) (3)}

c.3) Reproducibilidad

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

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. ^{(2) (3) (28)}

d) EXACTITUD

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado. 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 esta 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. ^{(2) (3) (28)}

e) LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

e1) Límite de Detección (LD)

Se entiende por límite de detección la mínima cantidad del analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar bajo dichas condiciones experimentales. El límite de detección es por tanto un término sólo cualitativo. En ambos términos se encuentra un rango de

concentraciones en las que si bien no puede cuantificarse el analito en cuestión con razonable certeza, si puede detectarse su presencia sin incurrir en falsos positivos. ^{(2) (3) (28)}

e) Límite de Cuantificación (LC)

Se entiende por límite de cuantificación de dicho método, la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo las condiciones experimentales descritas, con una adecuada precisión y exactitud. El límite de cuantificación es por lo tanto un término cuantitativo. ^{(2) (3)}

f) ROBUSTEZ

La robustez de un método analítico es la medida de su capacidad para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando idea de su fiabilidad “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, susceptible de producirse durante su utilización. ^{(2) (3) (28)}

g) IDONEIDAD DEL SISTEMA

El test de idoneidad del sistema (system suitability test) consiste en un conjunto de ensayos que permitan comprobar en el momento de la utilización del método, que el sistema (analista, reactivos e instrumentos) es adecuado para llevar acabo la determinación para la que se ha establecido y validado dicho método. Por lo tanto, el test de idoneidad del sistema se ha de entender como parte integrante del procedimiento de análisis y requisito previo a su realización. ^{(2) (3) (28)}

2.2.7 DATOS REQUERIDOS PARA LA VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO

Los métodos analíticos descritos varían desde determinaciones analíticas complejas hasta la evaluación subjetiva de ciertas características, para los cuales se requieren diferentes esquemas de validación. Las categorías de métodos analíticos más comunes son las siguientes:

Categoría I. Incluye los métodos analíticos para la cuantificación de los componentes mayoritarios de las materias primas o de los principios activos (incluyendo conservadores) en productos farmacéuticos.

Categoría II. Incluye los métodos analíticos empleados para la determinación de impurezas en materias primas o productos de degradación en los productos farmacéuticos. Estos métodos incluyen valoraciones cuantitativas y ensayos de límites.

Categoría III. Incluye métodos analíticos para la determinación de las características de desempeño (Ej., disolución, liberación de principios activos) de un producto farmacéutico.

Categoría IV. Ensayo de identificación de producto farmacéutico.

Para cada categoría de análisis, se necesita diferente información analítica.

En la tabla N° 1 se indica los elementos que normalmente se requieren para cada una de estas categorías. ⁽²⁸⁾

TABLA N° 1: REQUISITOS PARA LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS SEGÚN SU CATEGORÍA.

Características de desempeño Analítico	Ensayos Categoría I	Ensayos Categoría II		Ensayos Categoría III	Ensayos Categoría IV
		Cuantificación	Prueba de límite		
Exactitud	Si	Si	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Sí	*	Si
Límite de detección	No	No	Si	*	No
Límite de cuantificación	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No
Rango	Si	Si	*	*	No

* puede requerirse, mientras dependa de la naturaleza de la prueba específica.

2.3 ANÁLISIS INSTRUMENTAL

2.3.1 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN

a) Conceptos Generales

La cromatografía se ha desarrollado para llegar a ser el principal método de separación de especies químicas estrechamente relacionadas. ⁽²⁶⁾

Según define la IUPAC, “La cromatografía es un método, usado primariamente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra es móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel, puede ser extendida como una capa o distribuida como una película, etc. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa”.

Se basa en la partición de solutos entre dos fases: La fase estacionaria y la fase móvil, la separación ocurre por migración de los analitos en mezclas a diferentes velocidades.

La velocidad de migración está gobernada por diferentes interacciones entre un soluto (conducido por un líquido en movimiento) y el absorbente (sólido o líquido).

En el caso más simple un cromatógrafo líquido estará constituido por:

- Un reservorio de solvente que alimenta al sistema con la fase móvil.
- Un sistema que permite la introducción de la muestra: el inyector.
- Un sistema para forzar el pasaje de la muestra y la fase móvil a través de la columna: la bomba.
- Un sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna: el detector.
- Un sistema de registro de los datos provenientes del detector. La señal del detector es siempre analógica y puede ser utilizada tal cual por un registrador gráfico o por un integrador, o digitalizada, para que pueda ser interpretada y procesada por una computadora.

b) Calibración del Equipo HPLC

Actividad destinada a demostrar que un instrumento de medida produce resultados dentro de los límites de error establecido y comparable a los obtenidos con un sistema de referencia en un rango apropiado de medidas.

La calibración forma parte de la calificación, se aplica a comprobar y documentar el funcionamiento del instrumento tanto en el ámbito modular como del sistema completo.

La calificación del instrumento HPLC consta de las siguientes etapas:

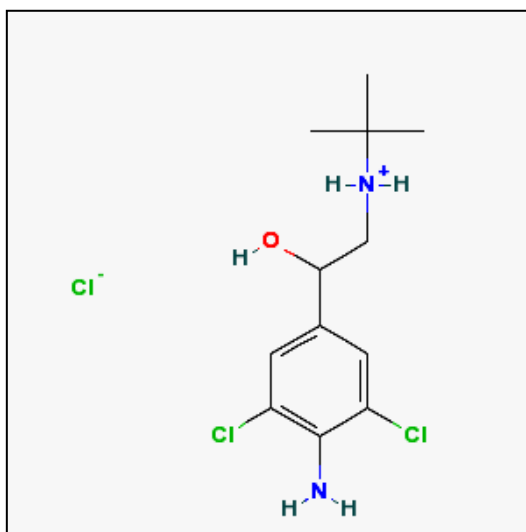
- Calificación de instalación.
- Calificación de Operación.
- Calificación de desempeño.
- Calificación de mantenimiento. ⁽²⁴⁾

2.4. PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y FARMACOLÓGICAS DEL ANALITO

2.4.1 CLENBUTEROL CLORHIDRATO

a) PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

Fórmula estructural:



Nombre Químico: [2-(4-amino-3,5-dicloro-fenol)-2-hidroxi-etil]-tert-butil-azanium clorhídrico

Fórmula Molecular: C₁₂H₁₉Cl₃N₂O

Peso Molecular: 313.65106 [g/mol]

Solubilidad: Soluble en agua y en etanol (96 por ciento); ligeramente soluble en acetona.

Características: Polvo cristalino blanco a amarillo pálido. Funde a aproximadamente 173 °C, con descomposición.⁽²²⁾

b) PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

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

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

Se fija en un 50% a las proteínas plasmáticas y en lo que respecta a su eliminación, el 87% de la dosis se excreta por vía urinaria en un periodo superior a las 86 horas siguientes a la administración.

Extrapolando el tiempo de eliminación puede considerarse que prácticamente el 100% se elimina por vía urinaria. Mediante la administración de dosis múltiples se determinó que el 75% de la sustancia original permanece inalterada y que sólo una pequeña parte se metaboliza.

Los metabolitos conocidos carecen de toxicidad y se eliminan por vía renal.⁽⁸⁾

PARTE EXPERIMENTAL

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

Se contaron con equipos y materiales debidamente calibrados y/o calificados. Los reactivos que se usaron, fueron de alta pureza, especificados para Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC).

*** Equipos:**

- Balanza Analítica OHAUS AR2140. Rango: 0 – 210 g; Precisión: \pm 0.01 mg.
- Bomba de Vacío Buchi.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Performance (HPLC) Agilent Technologies AT-1100 VWD, equipado con los siguientes módulos:
Bandeja, Bomba Cuaternaria G1310A, Inyector automático G1313A, Horno de columna G1316A, Detector VWD G1314A, Desgasificador G1379A, Unidad de Control en Proceso (CPU), Monitor, Teclado.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Performance (HPLC) Agilent Technologies 1200 DAD RID, equipado con los siguientes módulos:
Bandeja, Bomba Cuaternaria G1310A, Inyector automático G1329A, Horno de columna G1316A, Detector VWD G1315D, Detector RID G1362A Desgasificador G1322A, Unidad de Control en Proceso (CPU), Monitor, Teclado.
- Baño Ultrasonido Branson 3510R -DHT.
- Potenciómetro Beckman PHI 310.

*** Materiales:**

- Beakers de 50 mL, 100 mL, 1000 mL
- Espátulas
- Filtros de 0.5 μ m
- Matraz aforados de 50 mL, 100 mL, 500 mL, 1000 mL, 2000 mL
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL, 500 mL, 1000 mL
- Papel metálico
- Papel Glacine

- Papel parafina
- Papel toalla
- Pipetas graduadas de 3 mL, 4 mL 5 mL y 10 mL
- Pipetas volumétricas de 3 mL, 4 mL y 5 mL y 10 mL
- Pissetas
- Probetas graduadas de 100 mL, 250 mL y 500 mL
- Viales de 5 mL

*** Reactivos:**

- Formato de amonio grado P.A.
- Agua, grado HPLC
- Ácido fórmico, grado P.A.
- Acetonitrilo, grado HPLC

Estándar de referencia de Clenbuterol Clorhidrato

- Potencia :	99,34 (t/c)
- Lote:	4704723001
- Fecha de fabricación:	2007/04
- Fecha de vencimiento:	2011/04
- Proveedor:	Chemo S.A.
- Origen:	China
- Análisis:	MP – 368/07

3.2 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

3.2.1. ELECCIÓN DEL TIPO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA A UTILIZAR

Se tuvo en cuenta los siguientes parámetros:

- Peso molecular del principio activo.
- Solubilidad del principio activo.

Cuando el analito tiene peso molecular menor de 2000 daltons el método más usado es el de fase reversa.

3.2.2. ELECCIÓN DEL DETECTOR

Para elegir el tipo de detector y longitud de onda adecuada se realizó un barrido espectral de 200-900 nm. con la ayuda de un equipo con detector de arreglo de Diodos, en la cual el analito de interés es detectado desde la longitud de onda de 230-260 nm . Se seleccionó la longitud de onda de 254nm, debido a que en esta longitud de onda, el analito de interés presentó una de las mayores absorbancias y se evidencio mejor línea de base en el cromatograma desarrollado.

3.2.3. ELECCIÓN DE LA FASE MÓVIL Y FASE ESTACIONARIA

Se inició el desarrollo del método usando como fase estacionaria una columna C 8 de 150 x 4.6 mm y de 5 micras, y como componentes de la fase móvil se utilizó acetonitrilo como modificador orgánico y un tampón (pH 2.0 – 4.) como componente acuoso, el tampón utilizado es la sal de formato de amonio. (pH 3,10 aprox.) Se elige estas condiciones como partida de inicio debido a que en este rango de pH se obtiene análisis reproducibles de compuestos ionizable.

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

Para mejorar la resolución se empezó a realizar ajustes en el pH, eligiendo esta opción debido a que es la menos complicada a comparación del cambio de fase estacionaria y cambios en la proporción de los componentes de la fase móvil.

De las diversas pruebas de modificación de pH que se realizó, se determinó que en el pH 2.7 del componente acuoso de la fase móvil se obtiene una buena resolución del analito (Clenbuterol Clorhidrato) en la muestra problema.

Se procedió a optimizar el tiempo de retención modificando una característica física (longitud) y una característica química (tamaño de partícula) de la fase estacionaria con la cual se obtuvo un menor tiempo de retención de 12 min.

3.2.4. TÉCNICA ANALÍTICA DESARROLLADA

Condiciones cromatográficas:

Columna:	ZORBAX Eclipse XDB – C8 de 4,6 x 75-mm que contiene un empaque de 3.5 µm
Sistema:	Isocrático
Fase Móvil:	Solución Buffer formato de amonio: Acetonitrilo (90:10) ajustado a pH 2,7 ± 0,1
Flujo:	1,0 mL / minuto
Volumen de Inyección:	50 µL
Longitud de Onda:	254 nm
Temperatura:	40°C

Preparación de la Fase Móvil:

- Preparación de la Solución Buffer formato.

Disolver 0,6306 g de formato de amonio y llevar a 1000 mL con agua, ajustar a pH 2,7 ± 0,1 con ácido fórmico QP.

- Fase móvil

Preparar una mezcla Acetonitrilo: Buffer formato pH 2,7 ± 0,1, (10:90), Se filtro a través de membrana de 0,5 µm o fina porosidad y desgasificar.

Preparación de las Soluciones de Trabajo:

Preparación del estándar de referencia (concentración final: Clenbuterol clorhidrato 0,001 mg/mL)

Disolver 25 mg de Clenbuterol clorhidrato RS, exactamente pesados, en un matraz aforado de 100 mL, y se diluyó con agua a volumen, y se mezcló. Se transfirió 2,0 mL de la solución anterior a un matraz aforado de 100 mL, y se diluyó con agua a volumen, y se mezcló. (Solución A).

Se transfirió 10 mL de la solución A, a un matraz aforado de 50 mL, y se diluyó con fase móvil a volumen, y se mezcló, Se filtro una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- μ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

Preparación de la muestra (concentración final: Clenbuterol clorhidrato 0,001 mg/mL)

Se transfirió 5 mL de solución oral gotas exactamente medidos a un matraz aforado de 25 mL y completar a volumen con fase móvil, y se mezcló. Se filtro una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- μ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

Especificaciones

Presentación: Solución Oral Gotas

Contiene Clenbuterol clorhidrato: Cantidad declarada: 0.005mg / mL

Límites: 0,0045 mg / mL – 0,0055 mg / mL
(90,0 % – 110,0 %)

Cálculos

Los cálculos que se aplicaron para la determinación de los principios activos en la muestra se realizaron siguiendo la fórmula tal cual se detalla:

$$\text{(mg /mL) Clenbuterol clorhidrato:} = \frac{A_{mp} \times W_{st} \times 2 \times 10 \times P_{st} \times 25}{A_{st} \times 100 \times 100 \times 50 \times V_{mp}}$$

Donde:

A_{mp} : Área bajo la curva del pico de Clenbuterol clorhidrato, obtenida con la solución muestra problema.

A_{st} : Área promedio bajo la curva del pico de Clenbuterol clorhidrato, obtenida con la solución estándar de referencia.

W_{st} : Peso de Clenbuterol clorhidrato estándar de referencia, expresado en miligramos.

P_{st}: Potencia de Clenbuterol clorhidrato estándar de referencia, expresado en porcentaje de droga tal cual.

V_{mp}: Volumen de muestra problema a 25°C ± 0,5°C expresado en mL.

3.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Se desarrolló a validación del método analítico siguiendo estrictamente el Procedimiento de Operación Estándar (SOP) del Laboratorio Farmacéutico S.J. Roxfarma S.A.

3.3.1. ADECUACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Este proceso se realizó inyectando sucesivamente la solución estándar de referencia, con lo cual comprobamos el funcionamiento del sistema: bombeo, inyector, horno, columna y detector, mediante la determinación de los siguientes parámetros cromatográficos, conforme a la técnica de análisis. ⁽³⁾

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
REPETIBILIDAD -Tiempo de retención	RSD < 2,0 %
-Áreas	RSD < 2,0 %
PARÁMETROS COMATOGRÁFICOS Platos teóricos	Mínimo 1000
Factor de cola	Máximo 2,0

Tabla N° 2: Adecuación del sistema cromatográfico

3.3.2 PARÁMETROS DESARROLLADOS EN LA VALIDACIÓN

PRUEBAS EFECTUADAS	ESPECIFICACIONES
LINEALIDAD	
Recta de regresión	$y = bx + a$
Coeficiente de correlación (r)	$\geq 0,995$
Coeficiente de determinación (r^2):	$\geq 0,990$
Coeficiente de variación de los factores de respuesta (f):	$\leq 5,0\%$
Coeficiente de variación de la pendiente (s^2b):	$\leq 2,0\%$
PRECISIÓN	
Repetibilidad	
Coeficiente de variación (CV)	$\leq 3,0\%$
Precisión Intermedia	
Coeficiente de variación (CV)	$\leq 5,0\%$
EXACTITUD	
Porcentaje de recuperación	97,0% - 103,0%
t_{exp}	$< t_{tablas}$ para $p=0.05$
SELECTIVIDAD	
Lectura del placebo	$\leq 0,5\%$ de la lectura del analito
ROBUSTEZ	
Los resultados no deben variar significativamente al alterar una de las condiciones del sistema.	

Tabla Nº 3: Parámetros desarrollados en la validación

3.3.3. SELECTIVIDAD

Se determinó la capacidad del método analítico de medir el contenido de Clenbuterol Clorhidrato sin interferencia de parte de los excipientes presentes.

- El volumen de inyección que se utilizó fue de 50 μ L.
- Se realizó una inyección por cada muestra.
- El tiempo de corrida por cada inyección fue de 30 minutos.

La preparación de las muestras, así como la concentración de cada una de las soluciones que se usaron son las que se indican a continuación:

MUESTRAS QUE SE INYECTARON	CONCENTRACIÓN UTILIZADA
Clenbuterol Clorhidrato estándar	0,001mg/mL
Ambroxol clorhidrato	1,5 mg/mL
Metilparabeno	0,4 mg/mL
Propilparabeno	0.04 mg/mL
Sorbitol 70%	6,04 mg/mL
Glicerina	21,2 mg/mL
Propilenglicol	4,0 mg/mL
Sodio citrato	0.0545 mg/mL
Acido cítrico	0.160 mg/mL
Sacarina sódica	0.020 mg/mL
Esencia de anís hidrosoluble	0.040 mg/mL

Tabla N° 4: Concentración de las soluciones usadas para el análisis de selectividad

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

a. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE RETENCIÓN:

La determinación del tiempo de retención de Clenbuterol Clorhidrato se realizó inyectando estándares de referencia por separado, para identificar cada uno de ellos.

Luego se inyectaron todos los excipientes que componen la fórmula maestra, verificando de esta manera si hubo o no interferencias, con los tiempos de retención del analito.

Solución Estándar de Referencia:

Clenbuterol Clorhidrato RS:

Se transfirieron aproximadamente 25 mg de Clenbuterol Clorhidrato RS a un matraz aforado de 100 mL, se completó a volumen con Agua HPLC y se mezcló. Se transfirió 2,0 mL de la solución anterior a un matraz aforado de 100mL, se diluyó con Agua y se mezcló.(solución A). Se transfirió 10 mL de la solución A un matraz aforado de 50 mL, se diluyó con fase móvil a volumen, y se mezcló. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- μ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

Excipientes de la fórmula maestra:

Ambroxol clorhidrato:

Se transfirieron aproximadamente 30 mg de Ambroxol Clorhidrato, a un matraz aforado de 20 mL, se completó a volumen con fase móvil y se mezcló. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- μ m o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

Metilparabeno:

Se transfirieron aproximadamente 20 mg de Metilparabeno, a un matraz aforado de 50 mL, se completó a volumen con fase móvil y se mezcló. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- μ m o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

Propilparabeno:

Se transfirieron aproximadamente 20 mg de Propilparabeno, a un matraz aforado de 50 mL, se completó a volumen con fase móvil y se mezcló. Se transfirió 5 ml de la solución anterior a un matraz aforado de 50 mL, se completó a volumen con fase móvil y se mezcló. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- μ m o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

Sorbitol 70%

Se transfirieron aproximadamente 604 mg de sorbitol 70% a un matraz aforado de 100 mL, se completó a volumen con fase móvil y se mezcló. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- μ m o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado

Glicerina:

Se transfirieron aproximadamente 1060 mg de glicerina, a un matraz aforado de 50 mL, se completó a volumen con fase móvil y se mezcló. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- μ m o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

Propilenglicol:

Se transfirieron aproximadamente 200 mg de propilenglicol, a un matraz aforado de 50 mL, se completó a volumen con fase móvil y se mezcló. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- μ m o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

Sodio citrato:

Se transfirieron aproximadamente 54,5 mg de sodio citrato, a un matraz aforado de 50 mL, se completó a volumen con fase móvil y se mezcló. Se transfirió 5 ml de la solución anterior a un matraz aforado de 100 mL, se completó a volumen con fase móvil y se mezcló. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- μ m o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

Ácido cítrico:

Se transfirieron aproximadamente 16 mg de ácido cítrico, a un matraz aforado de 100 mL, se completó a volumen con fase móvil y se mezcló. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- μ m o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

Sacarina sódica:

Se transfirieron aproximadamente 20 mg de sacarina sódica, a un matraz aforado de 50 mL, se completó a volumen con fase móvil y se mezcló. Se transfirió 5 ml de la solución anterior a un matraz aforado de 100 mL, se completó a volumen con fase móvil y se mezcló. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- μ m o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

Esencia de Anís hidrosoluble:

Se transfirieron 20 mg de esencia de anís hidrosoluble, a un matraz aforado de 50 mL, se completó a volumen con fase móvil y se mezcló. Se transfirió 5 ml de la solución anterior a un matraz aforado de 50 mL, se completó a volumen con fase móvil y se mezcló. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- μ m o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

b. DETERMINACIÓN DE PICOS DE EXCIPIENTES EN EL PLACEBO

Se determinó inyectando la solución placebo.

Placebo reciente:

Se transfirieron 5 mL de placebo reciente a un matraz aforado de 25 mL, se mezcló y se llevó a volumen con fase móvil. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5 μ m o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

c. DETERMINACIÓN DE PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN

Para el caso del Clenbuterol Clorhidrato por no contar con su posible producto de degradación se sometió a una degradación forzada (tratamiento con hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, peróxido de hidrógeno, luz UV y calor) el producto terminado.

Solución madre:

Se transfirieron 25 mg de Clenbuterol Clorhidrato RS a un matraz aforado de 50 mL, se completó a volumen con agua y se mezcló. Se transfirió 2 mL de la

solución anterior a un matraz aforado de 100 mL, se completó con agua y se mezcló.

c.1. TRATAMIENTO CON HIDRÓXIDO DE SODIO AL 20%

Clenbuterol Clorhidrato estándar degradado 1

Se transfirieron 5 mL de placebo y 5 mL de la solución madre a un beaker de 100 mL, se adicionó 5 mL de hidróxido de sodio al 20% y 5 mL de agua, se llevó a baño de vapor por 20 minutos y se dejó enfriar. Se transfirió el líquido resultante a un matraz aforado de 25 mL, se completó a volumen con fase móvil y se mezcló. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- μm o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

c.2. TRATAMIENTO CON ÁCIDO CLORHÍDRICO QP

Clenbuterol Clorhidrato estándar degradado 2

Se transfirieron 5 mL de placebo y 5 mL de la solución madre a un beaker de 100 mL, se adicionó 1 mL de ácido clorhídrico QP y 5 mL de agua, se llevó a baño de vapor por 20 minutos y se dejó enfriar. Se transfirió la solución resultante a un matraz aforado de 25 mL, se completó a volumen con fase móvil y se mezcló.

Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- μm o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

c.3. TRATAMIENTO CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO 10 Volúmenes

Clenbuterol Clorhidrato estándar degradado 3

Se transfirieron 5 mL de placebo y 5 mL de la solución madre a un beaker de 100 mL, se adicionó 1 mL de peróxido de hidrógeno 10 volúmenes y 5 mL de agua, se llevó a baño de vapor por 20 minutos y se dejó enfriar. Se transfirió el líquido resultante a un matraz aforado de 25 mL, se completó a volumen con fase móvil y se mezcló.

c.4. TRATAMIENTO CON LUZ UV

Clenbuterol Clorhidrato estándar degradado 4

Se transfirieron 5 mL de placebo y 5 mL de la solución madre a un beaker de 100 mL, se expuso a la luz ultravioleta 254 nm por 30 minutos.

Se transfirió a un matraz aforado de 25 mL y se completó a volumen con fase móvil, se mezcló. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- μ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

c.5. TRATAMIENTO CON CALOR

Clenbuterol Clorhidrato estándar degradado 5

Se transfirieron 5 mL de placebo y 5 mL de la solución madre a un beaker de 100 mL, se adicionó 10 mL de agua y se llevo a baño de vapor por 2 horas, y se dejó enfriar. Se transfirió el líquido resultante a un matraz aforado de 25 mL, se completó a volumen con fase móvil y se mezcló.

Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- μ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

d. DETERMINACIÓN DE PICOS Y TIEMPOS DE RETENCIÓN EN MUESTRA

Producto Terminado:

Se transfirieron 5,0 mL del producto terminado a un matraz aforado de 25 mL, se mezcló y se llevo a volumen con fase móvil. Se filtro una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5 μ m o fina porosidad descartando los primeros 10 mL del filtrado.

3.3.4. LINEALIDAD

La linealidad se determinó empleando soluciones de trabajo, en un rango de cinco concentraciones (50%; 75%; 100%; 125%; 150%), siendo el 100% la concentración final de 0,001 mg / mL de Clenbuterol clorhidrato, que corresponden a la concentración final de la muestra en el ensayo.

Se prepararon tres soluciones madres a partir de las cuales se obtuvieron las soluciones finales de trabajo.. Por cada solución madre se realizó cinco diluciones.

SOLUCIONES MADRES:

Solución Madre 1:

Se transfirió 24.7 mg de Clenbuterol clorhidrato RS, a un matraz aforado de 100 mL, se disolvió y se completo a volumen con agua HPLC, se mezcló.

Solución Madre 2:

Se transfirió 26,2 mg de Clenbuterol clorhidrato RS, a un matraz aforado de 100 mL, se disolvió y se completo a volumen con agua HPLC, se mezcló.

Solución Madre 3:

Se transfirió 25,7 mg de Clenbuterol clorhidrato RS, a un matraz aforado de 100 mL, se disolvió y se completo a volumen con agua HPLC, se mezcló.

SOLUCIONES DE TRABAJO:

Soluciones al 50% (0,0005mg/mL Clenbuterol clorhidrato):

Se tomo 2,0 mL de la Solución Madre 1, exactamente medido, a un matraz aforado de 100 mL y se completó a volumen con agua HPLC, se mezcló. Se transfirió 5,0 mL de la Solución anterior, exactamente medido, a un matraz aforado de 50 mL y se completó a volumen con fase móvil Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro 0,5- μ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

Se procedió de la misma manera con la solución madre 2 y 3.

Soluciones al 75% (0,00075mg/mL Clenbuterol clorhidrato):

Se tomo 3,0 mL de la Solución Madre 1, exactamente medido, a un matraz aforado de 100 mL y se completó a volumen con agua HPLC, se mezcló. Se transfirió 5,0 mL de la Solución anterior, exactamente medido, a un matraz aforado de 50 mL y se completó a volumen con fase móvil Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro 0,5- μ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado. Se procedió de la misma manera con la solución madre 2 y 3.

Soluciones al 100% (0,001mg/mL Clenbuterol clorhidrato):

Se tomo 4,0 mL de la Solución Madre 1, exactamente medido, a un matraz aforado de 100 mL y se completó a volumen con agua HPLC, se mezcló. Se transfirió 5,0 mL de la Solución anterior, exactamente medido, a un matraz aforado de 50 mL y se completó a volumen con fase móvil Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro 0,5- μ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

Se procedió de la misma manera con la solución madre 2 y 3.

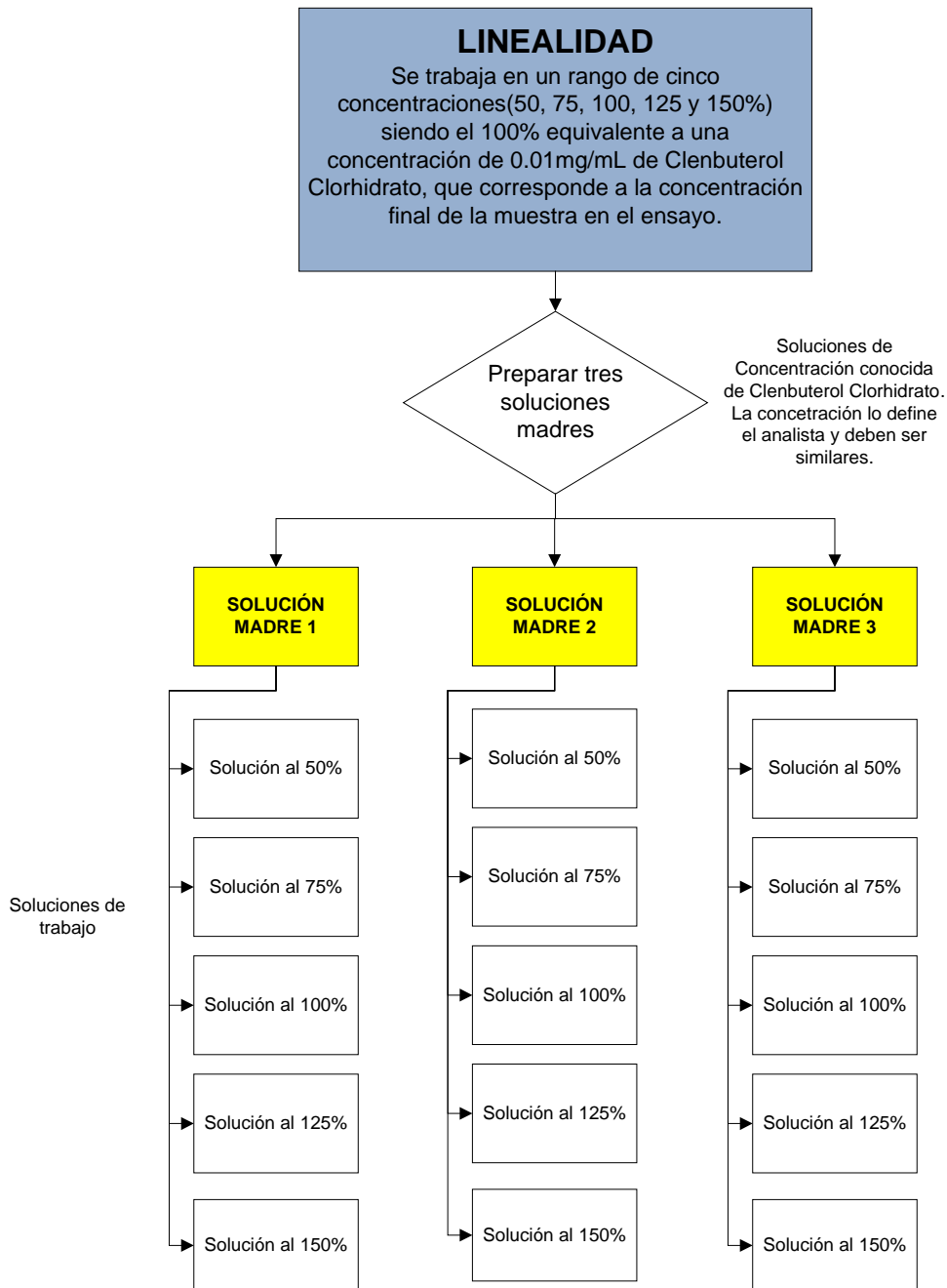
Soluciones al 125% (0,00125mg/mL Clenbuterol clorhidrato):

Se tomo 5,0 mL de la Solución Madre 1, exactamente medido, a un matraz aforado de 100 mL y se completó a volumen con agua HPLC, se mezcló. Se transfirió 5,0 mL de la Solución anterior, exactamente medido, a un matraz aforado de 50 mL y se completó a volumen con fase móvil Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro 0,5- μ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

Se procedió de la misma manera con la solución madre 2 y 3.

Soluciones al 150% (0,00150mg/mL Clenbuterol clorhidrato):

Se tomo 3,0 mL de la Solución Madre 1, exactamente medido, a un matraz aforado de 50 mL y se completó a volumen con agua HPLC, se mezcló. Se transfirió 5,0 mL de la Solución anterior, exactamente medido, a un matraz aforado de 50 mL y se completó a volumen con fase móvil Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro 0,5- μ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado. Se procedió de la misma manera con la solución madre 2 y 3.



Flujograma 1: Desarrollo de la linealidad

3.3.5. EXACTITUD

Se prepararon tres soluciones madres, a partir de las cuales se realizaron las soluciones de lectura dentro del rango a estudiar (50%; 100%; 150%), obteniéndose 9 determinaciones por cada solución de lectura.

Asimismo se preparó el placebo con todos los excipientes, excepto los analitos a determinar. Sobre dicho placebo se añadieron cantidades conocidas del analito a determinar en los tres niveles de concentración.

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES MADRES

Solución Madre 1:

Se transfirió 25,2 mg de Clenbuterol clorhidrato RS, a un matraz aforado de 100 mL, se disolvió y se completo a volumen con agua HPLC, se mezcló.

Solución Madre 2:

Se transfirió 25,4 mg de Clenbuterol clorhidrato RS, a un matraz aforado de 100 mL, se disolvió y se completo a volumen con agua HPLC, se mezcló.

Solución Madre 3:

Se transfirió 26,1 mg de Clenbuterol clorhidrato RS, a un matraz aforado de 100 mL, se disolvió y se completo a volumen con agua HPLC, se mezcló.

PREPARACIÓN DEL PLACEBO

El placebo se preparó siguiendo las instrucciones de fabricación del producto farmacéutico piloto, se añadieron todos los excipientes a excepción de los principios activos.

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE LECTURA

Soluciones al 50% (0,0005mg/mL Clenbuterol clorhidrato):

Se transfirió 2,0 mL de la Solución Madre 1, exactamente medido, a un matraz aforado de 100 mL y se completó a volumen con agua HPLC, se mezcló. Se transfirió 5,0 mL de la Solución anterior, exactamente medido, a un matraz

aforado de 50 mL, se añadió 5.0 mL de placebo y se completó a volumen con fase móvil. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro 0,5- μ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

Se procedió de la misma manera con la solución madre 2 y 3.

Soluciones al 100% (0,001mg/mL Clenbuterol clorhidrato):

Se transfirió 4,0 mL de la Solución Madre 1, exactamente medido, a un matraz aforado de 100 mL y se completó a volumen con agua HPLC, se mezcló. Se transfirió 5,0 mL de la Solución anterior, exactamente medido, a un matraz aforado de 50 mL, se añadió 5.0 mL de placebo y se completó a volumen con fase móvil. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro 0,5- μ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

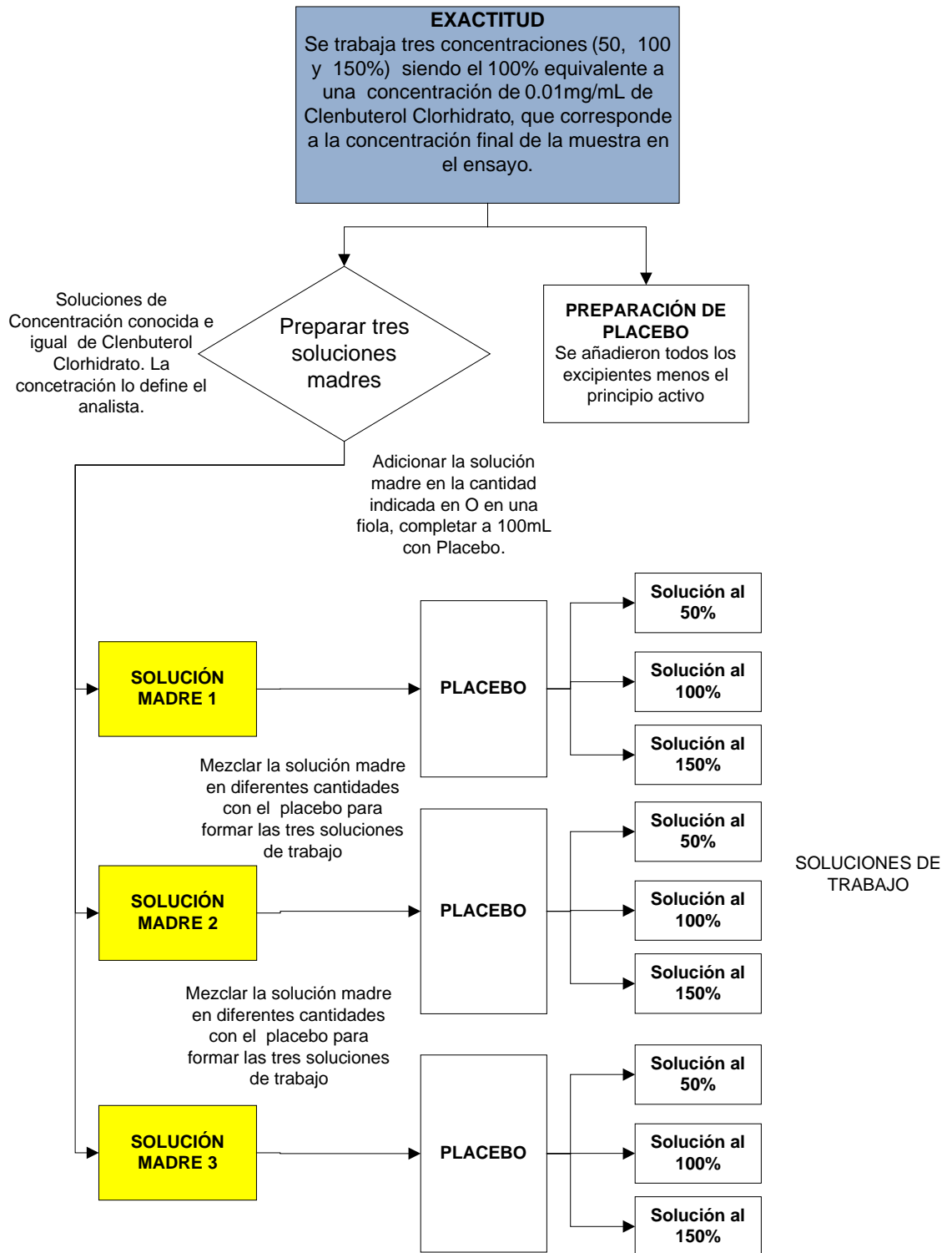
Se procedió de la misma manera con la solución madre 2 y 3.

Soluciones al 150% (0,00150mg/mL Clenbuterol clorhidrato):

Se transfirió 3,0 mL de la Solución Madre 1, exactamente medido, a un matraz aforado de 50 mL y se completó a volumen con agua HPLC, se mezcló. Se transfirió 5,0 mL de la Solución anterior, exactamente medido, a un matraz aforado de 50 mL, se añadió 5.0 mL de placebo y se completó a volumen con fase móvil. Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro 0,5- μ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

Se procedió de la misma manera con la solución madre 2 y 3.

- El ensayo de recuperación se realizó inyectando por triplicado las soluciones de lectura para cada nivel, obteniéndose 27 determinaciones por cada analito.
- Los analitos se determinaron en cada muestra utilizando el mismo método analítico a evaluar y se calculó la recuperación.



Flujograma 2: Desarrollo de la exactitud

3.3.6. PRECISIÓN

El estudio de la precisión se realizó siguiendo el método analítico desarrollado para el producto. Se realizaron 3 precisiones, las cuales fueron desarrolladas en días diferentes, y cada precisión fue realizada a 3 niveles de concentración (75%, 100%, 125%) tomadas dentro del rango de linealidad y por triplicado.

Además los ensayos de precisión se realizaron utilizando las muestras del lote piloto y dos soluciones estándar de referencia, para dos niveles de concentración tomados dentro del rango de la linealidad, cada solución de estándar y muestra se inyectaron por triplicado.

Preparación de las soluciones de trabajo

Preparación del estándar de referencia:

Se transfirieron aproximadamente 25 mg de Clenbuterol Clorhidrato RS a un matraz aforado de 100 mL, se completó a volumen con Agua HPLC y se mezcló. Se transfirió 2,0 mL de la solución anterior a un matraz aforado de 100mL, y se diluyó con Agua y se mezcló.(solución A). Se transfirió 10 mL de la solución A un matraz aforado de 50 mL, y se diluyó con fase móvil a volumen, y se mezcló Se filtró una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- μ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

Preparación de la solución muestra:

* Al 75%:

Se transfirió 3 mL de solución oral gotas exactamente medidos a un matraz aforado de 20 mL y completar a volumen con fase móvil, y se mezcló. Se filtro una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- μ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

* Al 100%:

Se transfirió 5 mL de solución oral gotas exactamente medidos a un matraz aforado de 25 mL y completar a volumen con fase móvil, y se mezcló. Se filtro una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- μ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

* AI 125%

Se transfirió 5,0 mL de solución oral gotas exactamente medidos a un matraz aforado de 20 mL y completar a volumen con fase móvil, y se mezcló. Se filtro una porción de esta solución a través de un filtro de 0,5- μ m o fina porosidad, descartando los primeros 10 mL del filtrado.

3.3.7. ROBUSTEZ

La Robustez se realizó variando el equipo utilizado para el análisis. Para el ensayo en cada equipo se utilizó dos soluciones estándar de referencia, para dos niveles de concentración dentro del rango de la linealidad y 3 muestras del lote piloto, cada solución estándar y muestra se inyectaron por triplicado.

3.4. ANÁLISIS COMPARATIVO

El estudio del análisis comparativo se realizó siguiendo el método analítico desarrollado para el producto; se trabajó con muestras de 2 laboratorios diferentes.

Para el análisis de cada producto se prepararon 3 muestras y se utilizó 2 soluciones estándar de referencia para dos niveles de concentración tomados dentro del rango de la linealidad. Cada solución estándar y muestra se inyectó por triplicado.

IV. RESULTADO

4.1 ADECUACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

CUADRO N° 1: PARÁMETROS Y CRITERIOS DE ADECUACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO DEL EQUIPO

PARÁMETRO DE ADECUACIÓN	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO
REPETIBILIDAD -Tiempo de retención	RSD < 2,0 %	0,02%
-Áreas	RSD < 2,0 %	0,26
PARÁMETROS COMATOGRÁFICOS		
Platos teóricos	Mínimo 1000	3660
Factor de cola	Máximo 2,0	0,86

4.2 LINEALIDAD

4.2.1. DETERMINACIÓN DE LA PROPORCIONALIDAD Y DE LA LINEALIDAD

CUADRO N° 2 - RESULTADOS Y CÁLCULOS OBTENIDOS DEL ESTUDIO DE LINEALIDAD EN LA VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DESARROLLADA PARA EL ANÁLISIS DE CLENBUTEROL CLORHIDRATO EN SOLUCIÓN ORAL GOTAS.

x (g/mL)	y (Área)	xy	x ²	y ²	
0.00049074	11.69605	0.005740	0.00000024	136.79751	
0.00052054	12.35570	0.006432	0.00000027	152.66340	
0.00051061	12.13504	0.006196	0.00000026	147.25920	
0.00073611	17.41431	0.012819	0.00000054	303.25831	
0.00078081	18.57193	0.014501	0.00000061	344.91658	
0.00076591	18.03775	0.013815	0.00000059	325.36055	
0.00098148	23.08330	0.022656	0.00000096	532.83859	
0.00104108	24.66888	0.025682	0.00000108	608.55364	
0.00102122	24.20541	0.024719	0.00000104	585.90171	
0.00122685	28.69314	0.035202	0.00000151	823.29628	
0.00130135	30.73209	0.039993	0.00000169	944.46136	
0.00127652	30.13290	0.038465	0.00000163	907.99166	
0.00147222	34.67990	0.051056	0.00000217	1202.69546	
0.00156162	37.12758	0.057979	0.00000244	1378.45695	
0.00153182	36.15821	0.055388	0.00000235	1307.41639	
Σ	0.01521889	359.69219	0.41064	0.00001738	9701.86759
P	0.00101459	23.97948			

Σ = Sumatoria; P = Promedio

Fórmula para hallar b:

$$b = \frac{\sum(x-x)(y-y)}{\sum(x-y)^2} = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} = 23553$$

Fórmula para hallar a:

$$a = y - bx = \frac{\sum y - b \sum x}{n} = 0.0832$$

Ecuación:

$$y = bx + a$$

$$y = 23553 x + 0.0832$$

Para la interpretación estadística de la regresión lineal utilizamos el coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación.

A) COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (r)

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

$$r = 0.999907$$

En las tablas de r , para $n-2$ grados de libertad (en este caso $15-2 = 13$), el valor obtenido 0.999987 supone una correlación positiva con una probabilidad superior al 99,9 % (significativa al uno por mil) ya que $r(13, 0,001) = 0,760$.

B) COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (r^2)

$$r^2 = 0.999813$$

La variable independiente explica un 99,99 % de la varianza total de y .

4.2.2. TEST DE LINEALIDAD

CUADRO N° 3 - RESULTADOS Y CÁLCULOS OBTENIDOS DEL COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE LOS FACTORES DE RESPUESTA (f) DE LINEALIDAD EN LA VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DESARROLLADA PARA EL ANÁLISIS DE CLENBUTEROL CLORHIDRATO EN SOLUCIÓN ORAL GOTAS.

x (g/mL)	y (A)	f (y/x)	Promedio	s	s ²
0.00049074	11.69605	23834	23779	50	2485
0.00052054	12.35570	23736			
0.00051061	12.13504	23766			
0.00073611	17.41431	23657	23664	118	13809
0.00078081	18.57193	23785			
0.00076591	18.03775	23551			
0.00098148	23.08330	23519	23639	104	10823.545
0.00104108	24.66888	23695			
0.00102122	24.20541	23703			
0.00122685	28.69314	23388	23536	129	16576
0.00130135	30.73209	23615			
0.00127652	30.13290	23606			
0.00147222	34.67990	23556	23645	115	13199.16653
0.00156162	37.12758	23775			
0.00153182	36.15821	23605			

Media de f:

$$f = 23653$$

Desviación estándar de f:

$$St = 120$$

Coeficiente de variación de f:

$$(s/f) \times 101 = 0.51$$

En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente. Coeficientes de variación superiores al 5,0 % indican falta de linealidad.

Test de Cochran

$$G_{\text{tabla}} (\alpha=0,05; k=5; n=3) = 0.6838$$

$$G_{\text{exp}} = \frac{s^2_{\text{máx}}}{s^2_1 + s^2_2 + s^2_3 + s^2_4 + s^2_5} = \frac{16576}{56892} = 0.2913$$

Al ser $G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}}$, significa que las varianzas de las concentraciones son homogéneas, es decir, que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados

TEST DE LINEALIDAD DE LA PENDIENTE: b

Varianza

$$s_{y,x}^2 = \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n-2} = 0.0155 \quad s_{y,x} = 0.1243$$

$$s_b^2 = \frac{s_{y,x}^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} = 7968 \quad s_b = 89 \quad s_b \text{ rel. (\%)} = \frac{s_b \times 100}{b} = 0.38$$

Límites de confianza

$$b \pm t s_b = 23553 \pm 2.160 \times 153474$$

$$b \pm t s_b = 23553 \pm 193$$

El valor 2.160 es el valor de t para 15-2=13 grados de libertad y P=0,05 (intervalo de confianza del 95 %).

Test de t

$$t_{\text{exp}} = \frac{|b|}{s_b} = \frac{23553}{89} = 263.854$$

$t_{\text{exp}} > t_{\text{tablas}}$ incluso para P = 0,001 (0,1 %).

Este valor tan alto indica que la probabilidad de ser $b \neq 0$ es muy elevada, superior al **99,9 %**.

Si fuera $b = 0$ significaría que la recta es paralela al eje de las abscisas y no habría regresión.

4.2.3. TEST DE PROPORCIONALIDAD

- **Significación estadística de la varianza del término independiente a (Hipótesis nula: a = 0)**

Varianza

$$s_a^2 = s_b^2 \frac{\sum X^2}{n} = 0.0092 \qquad s_a = 0.0961 \qquad s_a \text{ rel. (\%)} = \frac{s_a \times 100}{a} = 115.52$$

Límites de confianza

$$a \pm \frac{t}{s_a} = 0.0832 \pm 2.160 \times 12637$$

$$a \pm \frac{t}{s_a} = 0.0832 \pm 0.2075514551568 \qquad (\text{Entre } 9294 \text{ y } 63886)$$

Como estos límites no incluyen el cero (0), el método analítico presenta sesgo, es decir, no se cumple la condición de proporcionalidad.

El valor 2.160 es el valor de t para 15-2=13 grados de libertad y P=0,05 (intervalo de confianza del 95 %).

Test de t

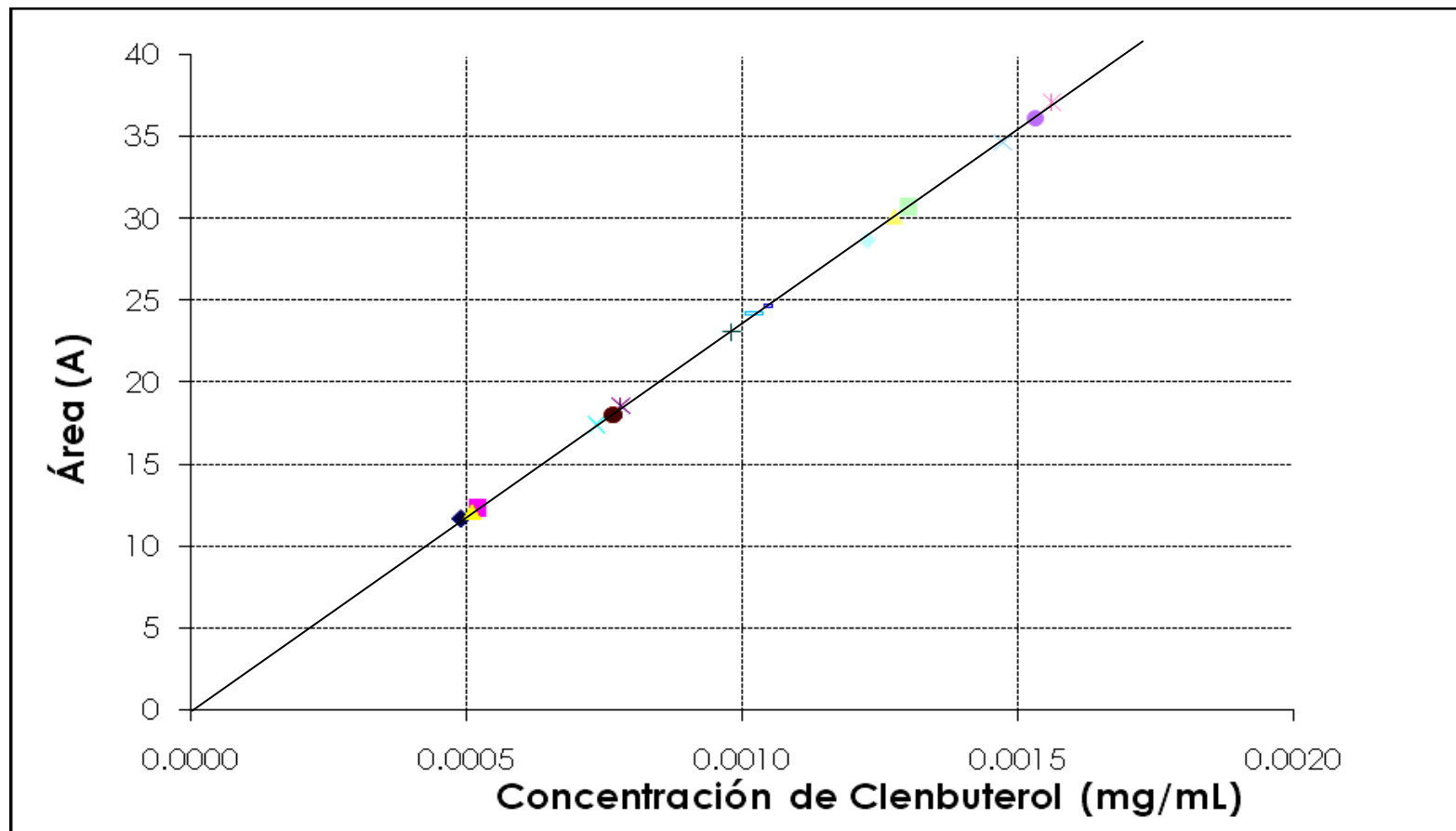
$$t_{\text{exp}} = \frac{|a|}{s_a} = \frac{0.0832}{0.0961} = 0.8657$$

$$t_{\text{exp}} > t_{\text{tablas}}$$

Este valor indica que la probabilidad de ser a ≠ 0 es muy elevada, mayor al **90,0** %.

Si a = 0, significa que la recta pasa por el origen de las coordenadas.

GRÁFICO N° 3 - REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA LINEALIDAD EN LA VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DESARROLLADA PARA EL ANÁLISIS DE CLENBUTEROL CLORHIDRATO EN SOLUCIÓN ORAL GOTAS.



4.3 EXACTITUD

CUADRO N° 4 – DETERMINACIÓN DE LA EXACTITUD MUESTRAS DE CONCENTRACIONES DIFERENTES DE LA SOLUCIÓN MADRE 1 EN LA VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DESARROLLADA PARA EL ANÁLISIS DE CLENBUTEROL CLORHIDRATO EN SOLUCIÓN ORAL GOTAS.

% REAL	% HALLADO	% PROMEDIO	s	% PROMEDIO ± s	s ²
52.05	52.27 52.18 52.05	52.16	0.11	52.16 ± 0.11	0.01
104.11	103.62 104.05 103.67	103.78	0.23	103.78 ± 0.23	0.05
156.16	155.61 155.57 155.50	155.56	0.06	155.56 ± 0.06	0.00

Test de Igualdad de Varianzas (Test G de Cochran):

$$G_{\text{exp}} = \frac{s_{\text{máx}}^2}{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2} = \frac{0.05}{0.07} = 0.7790$$

$$G_{\text{tabla}} (P=0,05; K=3; n=3) = 0.8709$$

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

Porcentaje de Recuperación (Test t de Student):

% REAL	% RECUP.	% PROMEDIO
52.05	100.41	100.21
	100.23	
	99.99	
104.11	99.53	99.68
	99.94	
	99.58	
156.16	99.65	99.62
	99.62	
	99.58	
	99.84	
	0.33	
	0.33	

$$t_{\text{exp}} = \frac{|100 - R| \sqrt{n}}{CV} = \frac{|100 - 100.51| \sqrt{9}}{0.33} = 1.494$$

$$t_{\text{tabla}} (P=0,05; GL=9-1=8) = 2.306$$

Al ser $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$ no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100, confirmando que el método es exacto.

CUADRO N° 5 – DETERMINACIÓN DE LA EXACTITUD DE VARIAS MUESTRAS DE CONCENTRACIONES DIFERENTES CONOCIDAS DE LA SOLUCIÓN MADRE 2 EN LA VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DESARROLLADA PARA EL ANÁLISIS DE CLENBUTEROL CLORHIDRATO EN SOLUCIÓN ORAL GOTAS.

% REAL	% HALLADO	% PROMEDIO	s	% PROMEDIO ± s	s ²
51.26	51.69 51.40 51.17	51.42	0.26	51.42 ± 0.26	0.07
102.52	102.78 101.72 102.21	102.24	0.53	102.24 ± 0.53	0.28
153.78	155.21 154.18 154.28	154.56	0.56	154.56 ± 0.56	0.32

Test de Igualdad de Varianzas (Test G de Cochran):

$$G_{\text{exp}} = \frac{s_{\text{máx}}^2}{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2} = \frac{0.32}{0.67} = 0.4774$$

$G_{\text{tabla}} (P=0,05; K=3; n=3) = 0.8709$

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

Porcentaje de Recuperación (Test t de Student):

% REAL	% RECUP.	% PROMEDIO
51.26	100.85	100.32
	100.28	
	99.83	
102.52	100.25	99.72
	99.22	
	99.70	
153.78	100.93	100.51
	100.26	
	100.33	
	100.18	
	0.41	
	0.41	

$$t_{\text{exp}} = \frac{|100 - R| \sqrt{n}}{CV} = \frac{|100 - 100.30| \sqrt{9}}{0.41} = 1.349$$

$t_{\text{tabla}} (P=0,05; GL=9-1=8) = 2.306$

Al ser $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$ no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100, confirmando que el método es exacto.

CUADRO N° 6 – DETERMINACIÓN DE LA EXACTITUD DE VARIAS MUESTRAS DE CONCENTRACIONES DIFERENTES CONOCIDAS DE LA SOLUCIÓN MADRE 3 EN LA VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DESARROLLADA PARA EL ANÁLISIS DE CLENBUTEROL CLORHIDRATO EN SOLUCIÓN ORAL GOTAS.

% REAL	% HALLADO	% PROMEDIO	s	% PROMEDIO ± s	s ²
52.05	52.73	52.49	0.24	52.49 ± 0.24	0.06
	52.25				
	52.49				
104.11	104.65	105.02	0.36	105.02 ± 0.36	0.13
	105.05				
	105.36				
156.16	154.52	154.77	0.24	154.77 ± 0.24	0.06
	155.00				
	154.79				

Test de Igualdad de Varianzas (Test G de Cochran):

$$G_{\text{exp}} = \frac{s_{\text{máx}}^2}{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2} = \frac{0.13}{0.24} = 0.5248$$

$$G_{\text{tabla}} (P=0,05; K=3; n=3) = 0.8709$$

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

Porcentaje de Recuperación (Test t de Student):

% REAL	% RECUP.	% PROMEDIO
52.05	101.30	100.84
	100.38	
	100.84	
104.11	100.53	100.88
	100.90	
	101.21	
156.16	98.95	99.11
	99.26	
	99.12	
		100.28
		1.01
		1.01

$$t_{\text{exp}} = \frac{|100 - R| \sqrt{n}}{CV} = \frac{|100 - 100.39| \sqrt{9}}{1.01} = 0.820$$

$$t_{\text{tabla}} (P=0,05; GL=9-1=8) = 2.306$$

Al ser $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$ no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100, confirmando que el método es exacto.

4.4 PRECISIÓN

4.4.1 REPETIBILIDAD

CUADRO N° 7 - RESULTADOS OBTENIDOS POR EL ANALISTA 1 DURANTE EL ESTUDIO DE LA REPETIBILIDAD EN LA VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DESARROLLADA PARA EL ANÁLISIS DE CLENBUTEROL CLORHIDRATO EN SOLUCIÓN ORAL GOTAS. El análisis fue desarrollado en las mismas condiciones operativas.

	CONCENTRACIÓN %		
	D1	D2	D3
M1	100.51	101.07	102.15
M2	100.96	100.71	101.91
M3	101.04	100.84	101.33
X	100.83	100.87	101.80
DE	0.29	0.18	0.42
DER	0.28	0.18	0.41

Límite de Confianza Individual (95 %):

				$x \pm ts$	$t =$	4.303	(P=0.05)
					$n =$	3	
LC Ind. D1	=	100.83	±	4.303	x	0.29	
LC Ind. D1	=	100.83	±	1.23			
LC Ind. D1	=	99.60	-	102.07			
LC Ind. D2	=	100.87	±	4.303	x	0.18	
LC Ind. D2	=	100.87	±	0.78			
LC Ind. D2	=	100.09	-	101.65			
LC Ind. D3	=	101.80	±	4.303	x	0.42	
LC Ind. D3	=	101.80	±	1.81			
LC Ind. D3	=	99.98	-	103.61			

Límite de Confianza de la Media (95 %):

				$x \pm ts/\sqrt{n}$	$t =$	4.303	(P=0.05)
					$n =$	3	
LC Med. D1	=	100.83	±	4.303	x	0.29	/ 1.73
LC Med. D1	=	100.83	±	0.71			
LC Med. D1	=	100.12	-	101.55			
LC Med. D2	=	100.87	±	4.303	x	0.18	/ 1.73
LC Med. D2	=	100.87	±	0.45			
LC Med. D2	=	100.42	-	101.32			
LC Med. D3	=	101.80	±	4.303	x	0.42	/ 1.73
LC Med. D3	=	101.80	±	1.05			
LC Med. D3	=	100.75	-	102.84			

x = Promedio

s = Desviación estándar

t = Valor de "t" en tablas para "n-1" grados de libertad, con una significancia del 95 %

cv = Coeficiente de variación

n = Número de determinaciones

CUADRO N° 8 - RESULTADOS OBTENIDOS POR EL ANALISTA 2 DURANTE EL ESTUDIO DE LA REPETIBILIDAD EN LA VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DESARROLLADA PARA EL ANÁLISIS DE CLENBUTEROL CLORHIDRATO EN SOLUCIÓN ORAL GOTAS. El análisis fue desarrollado en las mismas condiciones operativas.

	CONCENTRACIÓN %		
	D1	D2	D3
M1	101.03	100.74	102.05
M2	101.11	100.62	101.56
M3	100.52	100.43	101.30
X	100.89	100.60	101.64
DE	0.32	0.16	0.38
DER	0.32	0.16	0.37

Límite de Confianza Individual (95 %):

				$x \pm ts$	$t =$	4.303	(P=0.05)
					$n =$	3	
LC Ind. D1	=	100.89	±	4.303	x	0.32	
LC Ind. D1	=	100.89	±	1.38			
LC Ind. D1	=	99.51	-	102.26			
LC Ind. D2	=	100.60	±	4.303	x	0.16	
LC Ind. D2	=	100.60	±	0.68			
LC Ind. D2	=	99.91	-	101.28			
LC Ind. D3	=	101.64	±	4.303	x	0.38	
LC Ind. D3	=	101.64	±	1.64			
LC Ind. D3	=	100.00	-	103.28			

Límite de Confianza de la Media (95 %):

					$x \pm ts/\sqrt{n}$	$t =$	4.303	(P=0.05)
						$n =$	3	
LC Med. D1	=	100.89	±	4.303	x	0.32	/	1.73
LC Med. D1	=	100.89	±	0.80				
LC Med. D1	=	100.09	-	101.68				
LC Med. D2	=	100.60	±	4.303	x	0.16	/	1.73
LC Med. D2	=	100.60	±	0.39				
LC Med. D2	=	100.20	-	100.99				
LC Med. D3	=	101.64	±	4.303	x	0.38	/	1.73
LC Med. D3	=	101.64	±	0.95				
LC Med. D3	=	100.69	-	102.58				

x = Promedio

s = Desviación estándar

t = Valor de "t" en tablas para "n-1" grados de libertad, con una significancia del 95 %

cv = Coeficiente de variación

n = Número de determinaciones

CUADRO N° 9 - RESULTADOS OBTENIDOS POR EL ANALISTA 3 DURANTE EL ESTUDIO DE LA REPETIBILIDAD EN LA VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DESARROLLADA PARA EL ANÁLISIS DE CLENBUTEROL CLORHIDRATO EN SOLUCIÓN ORAL GOTAS. El análisis fue desarrollado en las mismas condiciones operativas.

Analista: Analista (A3)

Resultados:

	CONCENTRACIÓN %		
	D1	D2	D3
M1	102.12	100.49	102.00
M2	102.30	100.63	101.38
M3	101.24	100.58	101.61
X	101.89	100.57	101.66
DE	0.57	0.07	0.31
DER	0.56	0.07	0.31

Límite de Confianza Individual (95%):

				$x \pm ts$	$t =$	4.303	(P=0.05)
					$n =$	3	
LC Ind. D1	=	101.89	±	4.303	x	0.57	
LC Ind. D1	=	101.89	±	2.44			
LC Ind. D1	=	99.45	-	104.33			
LC Ind. D2	=	100.57	±	4.303	x	0.07	
LC Ind. D2	=	100.57	±	0.29			
LC Ind. D2	=	100.27	-	100.86			
LC Ind. D3	=	101.66	±	4.303	x	0.31	
LC Ind. D3	=	101.66	±	1.35			
LC Ind. D3	=	100.31	-	103.01			

Límite de Confianza de la Media (95 %):

				$x \pm ts/\sqrt{n}$	$t =$	4.303	(P=0.05)
					$n =$	3	
LC Med. D1	=	101.89	±	4.303	x	0.57	/ 1.73
LC Med. D1	=	101.89	±	1.41			
LC Med. D1	=	100.48	-	103.30			
LC Med. D2	=	100.57	±	4.303	x	0.07	/ 1.73
LC Med. D2	=	100.57	±	0.17			
LC Med. D2	=	100.40	-	100.73			
LC Med. D3	=	101.66	±	4.303	x	0.31	/ 1.73
LC Med. D3	=	101.66	±	0.78			
LC Med. D3	=	100.88	-	102.44			

x = Promedio

s = Desviación estándar

t = Valor de "t" en tablas para "n-1" grados de libertad, con una significancia del 95 %

cv = Coeficiente de variación

n = Número de determinaciones

4.4.2 PRECISIÓN INTERMEDIA

CUADRO N°10 – RESULTADOS OBTENIDOS DEL ESTUDIO DE LA PRECISIÓN INTERMEDIA DURANTE LA VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DESARROLADA PARA EL ANÁLISIS DE CLENBUTEROL CLORHIDRATO EN SOLUCIÓN ORAL GOTAS. El estudio fue desarrollado por tres analistas cuyo trabajo fue realizado en tres días diferentes

Estadística x Analista	Concentración (%)			Estadística x Día		
	Día 1	Día 2	Día 3	x	s	cv
A1	100.83	100.87	101.80	101.17	0.55	0.54
A2	100.89	100.60	101.64	101.04	0.54	0.53
A3	101.89	100.57	101.66	101.37	0.71	0.70
x	101.20	100.68	101.70	Estadística General	x	101.19
s	0.60	0.17	0.09		s	0.54
cv	0.59	0.16	0.09		cv	0.53

De acuerdo a los resultados obtenidos se determinó los límites de confianza individual y límites de Confianza de la Media.

Límite de Confianza Individual (95 %):

$$x \pm ts \quad t = 2.305 \quad (P=0.05)$$

$$n = 9$$

LC Ind.	=	101.19	±	2.305	x	0.54
LC Ind.	=	101.19	±	1.25		
LC Ind.	=	99.95	-	102.44		

Límite de Confianza de la Media (95 %):

$$x \pm ts/\sqrt{n} \quad t = 2.305 \quad (P=0.05)$$

$$n = 9$$

LC Med.	=	101.19	±	2.305	x	0.54	/	3.00
LC Med.	=	101.19	±	0.42				
LC Med.	=	100.78	-	101.61				

- x = Promedio
- s = Desviación estándar
- Coeficiente de
- cv = variación
- n = Número de determinaciones
- t = Valor de "t" en tablas para "n-1" grados de libertad, con una significancia del 95 %

4.5 ROBUSTEZ

CUADRO N° 11- RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE ROBUSTEZ DURANTE LA VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DESARROLADA PARA EL ANÁLISIS DE CLENBUTEROL CLORHIDRATO EN SOLUCIÓN ORAL GOTAS. Para esta prueba se utilizó dos equipos diferentes los cuales fueron Agilent 1200 y Agilent 1100

EQUIPOS	Contenido de Clenbuterol Clorhidrato (%)				DE	DER
	M1	M2	M3	Promedio		
Agilent 1200	101.87	102.07	102.59	101.58	0.3708	0.3650
Agilent 1100	101.21	101.14	101.34	102.92	0.0994	0.0966
PROMEDIO				102.25		
DE				0.9475		
DER				0.9267		

4.6 ANÁLISIS COMPARATIVOS CON OTROS PRODUCTOS

CUADRO N° 12 – RESULTADO DEL ANÁLISIS DE CONTENIDO DE CLENBUTEROL CLORHIDRATO EN EL PRODUCTO CLENBUDILAT SOLUCIÓN ORAL GOTAS

Productos Similares	Muestras M	Numero de Inyecciones	Área por Inyección	Estadística	Porcentaje St1	Porcentaje St2
CLENBUDILAT SOL ORAL GOTAS	M1	1	24.14	X = 23.7560367	104.07519	103.1910821
		2	23.48337	DE = 0.34217094		103.6331361
		3	23.64474	DER = 1.44035363		
	M2	1	23.53796	X = 23.51148	103.003787	102.1287809
		2	23.32856	DE = 0.17122265		102.5662841
		3	23.66792	DER = 0.72825125		
	M3	1	22.98045	X = 23.37196	102.39255	101.5227362
		2	23.43523	DE = 0.36402244		101.9576433
		3	23.7002	DER = 1.5575178		

CUADRO N° 13 – RESULTADO DEL ANALISIS DE CONTENIDO DE CLENBUTEROL CLORHIDRATO EN EL PRODUCTO MUCOSOLVAN SOLUCIÓN ORAL GOTAS

Productos Similares	Muestras M	Numero de Inyecciones	Área por Inyección	Estadística			Porcentaje St1	Porcentaje St2
				X	=			
MUCOSOLBAM SOLUCIÓN ORAL GOTAS	M1	1	23.64318	X	=	23.68141	103.748251	102.86692
		2	23.73573	DE	=	0.04832744		103.3075854
		3	23.66532	DER	=	0.20407333		
	M2	1	23.57882	X	=	23.4534467	102.749543	101.8766966
		2	23.275	DE	=	0.15871116		102.31312
		3	23.50652	DER	=	0.67670719		
	M3	1	23.94503	X	=	23.57754	103.293196	102.4157312
		2	23.35755	DE	=	0.32031293		102.8544637
		3	23.43004	DER	=	1.35855112		

CUADRO N° 14 – RESULTADOS DEL ANALISIS COMPARATIVO DE PRODUCTOS COMERCIALIZADOS EN EL PERÚ QUE CONTIENEN CLENBUTEROL CLORHIDRATO EN LA PRESENTACIÓN SOLUCIÓN ORAL GOTAS.

PRODUCTO	CONTENIDO DE CLENBUTEROL CLORHIDRATO (%)				DE	DER
	M1	M2	M3	PROMEDIO		
CLENBUDILAT	103.63	102.57	101.96	102.72	0.8450	0.8227
MUCOSOLBAN	103.31	102.31	102.85	102.82	0.5005	0.4868

V. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

DESARROLLO DEL METODO ANALÍTICO

En el presente trabajo se desarrolló una técnica analítica por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para la cuantificación de Clenbuterol Clorhidrato en solución oral gotas, la cual no figura en ninguna obra oficial; como se sabe éste tipo de análisis presenta mayores ventajas en relación a otros métodos como son los volumétricos y espectrofotométricos.

Para determinar las mejores condiciones cromatográficas se efectuaron diferentes ensayos en relación al tipo de fase estacionaria, proporción de los componentes de la fase móvil y pH de la fase móvil.

Considerando estas condiciones de trabajo se procedió a la validación del método desarrollado.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

SELECTIVIDAD

El método analítico nos permite obtener picos Cromatográficos de Clenbuterol Clorhidrato con tiempos de retención similares, tanto para el estándar como para la muestra.

Tiempo de retención del Estándar: 11.39

Tiempo de Retención de la Muestra: 11.19

El análisis de placebo nos demuestra que ningún excipiente interfiere con los picos de los principios activos, como tampoco se ha detectado la presencia de productos de degradación de clenbuterol clorhidrato al realizar el análisis del

principio activo sometido a estrés para que generen los compuestos potencialmente interferentes

LINEALIDAD

El coeficiente de correlación lineal (**r**) fue de: 0.999907

En la tabla de significación de “r”, para n-2 grados de libertad, el valor obtenido supone una correlación positiva con una probabilidad superior al 99,9% (significativa al 1 por mil) ya que $r(13,0,001) = 0.760$

El coeficiente de determinación (**r**²) fue de 0.999813 Lo que significa que la variable independiente explica un 99.99% de la varianza total de “y”.

Al aplicar el test de linealidad en el cuadro N° 3 , el coeficiente de variación de los factores de respuesta (f) fue de 0.51, lo que demuestra que los factores de respuestas son semejantes entre si y cercanos al valor de la pendiente.

Aplicando el test de Cochran se obtuvo un valor de **G**_{exp} = 0.2913 vs **G**_{tabla} = 0.6838⁽²⁾

Al ser **G**_{exp} < **G**_{tabla}, significa que las varianzas de las concentraciones son homogéneas, que el factor de concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

Se demuestra que la pendiente de la recta de regresión es estadísticamente distinta de cero, al realizar la aplicación del test de hipótesis nula (b=0) y obtenerse un valor **t**_{exp} = 263. 854 y **t**_{tabla} = 2.160 (valor de t para n-2 grados de libertad y un intervalo de confianza de 95%).⁽²⁾

Al ser **t**_{exp} > **t**_{tabla} significa que la probabilidad de ser $b \neq 0$ es muy elevada, incluso superior al 99,9% Si fuera $b = 0$ significaría que la recta es paralela al eje de las abscisas y no hay regresión.

Para el caso del test de proporcionalidad los límites de confianza para el intercepto van desde (615 – 5673) como estos límites no incluyen al cero el método presenta sesgo y aplicando el test de “t” y obtener un “t” experimental de 0,8657 menor del t_{tabla} que es 2,160, nos demuestra que no cumple el test de proporcionalidad por lo que sería necesario interpolar el resultado del análisis de cualquier muestra entre al menos dos estándares uno superior y otro inferior y de esta manera se obvia el sesgo del método.

EXACTITUD

Se evaluó el porcentaje de recuperación. Del cuadro N° 4 , al aplicar el test de igualdad de varianzas (test G de Cochran) para determinar si el factor concentración tiene alguna influencia en los resultados, se obtuvo un valor $G_{\text{exp}} = 0.7790$ vs $G_{\text{tabla}} (0.05,3,3) = 0.8709$ ⁽²⁾

Donde k = número de grupos y n = número de determinaciones por grupo.

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

Asimismo el porcentaje de recuperación que se obtuvo fue satisfactorio (media = 99.84 %), para confirmar se aplicó el test de Student cuyos resultados fueron $t_{\text{exp}} = 1.494$ vs $t_{\text{tabla}} = 2.306$.⁽²⁾

Al ser $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$ no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100 confirmándose que el método es exacto.

PRECISIÓN

Precisión intermedia

Para el estudio de la precisión intermedia se evaluaron los efectos causados al variar una serie de factores. Típicos factores que se estudiaron fueron el día y los analistas. Obteniéndose los siguientes resultados del cuadro N° 10.

Coeficiente de Variación (CV) = 0.53

Límite de confianza individual (95%): $x \pm ts = 99.95\% - 102.44\%$

Límite de confianza de la media (95%) = $x \pm ts/\sqrt{n} = 100.78\% - 101.61\%$

Siendo el valor de $t = 2.305$

Los límites de confianza de los resultados individuales indican que el 95% de los resultados estuvieron entre 99.95% - 102.44%.

Los límites de confianza de la media indican que el contenido medio del principio activo del producto terminado se encuentra con una probabilidad del 95% entre 100.78% - 101.61%.

Repetibilidad:

El estudio de Repetibilidad se efectuó sobre una serie de alicuotas de una muestra homogénea por el mismo instrumento y el mismo analista. Obteniéndose los siguientes resultados del cuadro N° 7 correspondientes al analista 1.

Coeficiente de variación (CV) = 0.58

Límite de confianza individual (95%): $x \pm ts$

Los límites de confianza de los resultados individuales indican que el 95% de los análisis de principio activo, en el caso de producto terminado, estuvieron por día entre:

LC individual D1 = 99.60% - 102.07%

LC individual D2 = 100.09% - 101.65%

LC individual D3 = 99.98% - 103.61%

Límite de confianza de la media (95%): $x \pm ts / \sqrt{n}$

Los límites de confianza de la media indican que el contenido medio del principio activo en el producto terminado se encontró por día, con una probabilidad del 95% entre:

LC media D1 = 100.12% - 101.55%

LC media D2 = 100.42% - 101.32%

LC media D3 = 100.75% - 102.84%

ROBUSTEZ

Se obtuvieron resultados que no varían significativamente con el que se trabaja a condiciones normales, obteniéndose una desviación estándar de 0.9475.

ANÁLISIS COMPARATIVO

En los productos *CLENBUDILAT* y *MUCOSOLBAN* los resultados obtenidos del analito Clenbuterol Clorhidrato tienen similar tiempo de retención que el estándar y la concentración se encuentran cercanos al valor declarado por los fabricantes como se observa en el cuadro N° 14.

Tiempo de Retención del Clenbuterol Clorhidrato:

Estándar: 11.39

Producto Propio: 11.19

Clenbudilat Solución Oral Gotas: 11.42

Mucosolbam Solución oral gotas: 11.18

VI. CONCLUSIONES

- ❖ El método desarrollado es selectivo; ya que no se detectó interferencia con la matriz, ni con los productos de degradación.
- ❖ El método es lineal en el intervalo de concentración del 50 % hasta 150 % de la muestra, siendo el 100% igual a 0,001mg/mL de Clenbuterol.
- ❖ El método es exacto ya que su capacidad analítica de dar resultados lo más cercano al valor real queda demostrado al no haber diferencia significativa entre la recuperación media de 100,30% y el 100%.
- ❖ El método es preciso, ya que el grado de concordancia que existe entre las pruebas, nos permite obtener resultados repetitivos y reproducibles.
- ❖ La validación del presente método analítico solo es aplicable a la formulación del producto mencionado en el Anexo 1.
- ❖ El método es robusto para el parámetro de cambio de equipos, ya que no hay diferencia significativa con los resultados obtenidos trabajando a las condiciones cromatográficas establecidas.
- ❖ Se demuestra la aplicabilidad del método para otros productos similares comercializados en el Perú, ya que se obtuvo resultados muy cercanos al valor declarado.

VII. RECOMENDACIONES

- ❖ La validación de métodos analíticos es una de las medidas universalmente reconocidas como parte necesaria de todo sistema completo de Garantía de Calidad en química analítica y es un componente esencial que debe ser implementado para producir datos analíticos fiables.
- ❖ La utilización del método de análisis para la solución oral gotas Clenbuterol 0.001mg/mL debe estar acorde a la Técnica Analítica desarrollada y al Protocolo de Validación emitido, cualquier modificación en el método analítico significa una revalidación de dicho proceso.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Arthur H. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients, American Pharmaceutical Association Washington, DC Third Edition 2000.
2. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). Validación de Métodos Analíticos. Barcelona, Marzo 2001.
3. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). Validación de Métodos Analíticos, Comisión de Normas de la Correcta Fabricación y Control de Calidad, Sección Catalana, España, 2001.
4. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). Guía de Protocolos de Validación de Procesos no estériles, Comisión de Normas de Correcta Fabricación y Control de Calidad, Sección Centro, España, 2001.
5. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). Validación de Procesos de Producción, Formas No estériles, España, 2001.
6. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). Validación de Métodos de Limpieza, Sección Catalán, Barcelona, Noviembre 1994
7. British Pharmacopeia 2005, Volumen I, Páginas: 518 – 519 (Clenbuterol Clorhidrato)
8. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas (DEF). Editorial PLM 17^a Edición, Lima, 2008.
9. García R. Validación del método de valoración de la Clorfenamina Maleato presentación jarabe, por HPLC y análisis comparativo de productos

comercializados en el país. [Tesis] Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos 2000.

10. Gestión de Calidad; Garantía permanente de la Calidad [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://www.tecservice.com.ar>. Acceso: Febrero 2008.

11. Gessner G. Hawley, Diccionario de Química y productos Químicos, Editorial Omega S.A. Barcelona, 2da edición.

12. Goodman & Gilman, Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, Editorial Mc Graw – Hill Interamericana, 9^{na} Edición, México 1998.

13. Guía de la Organización Mundial de la salud (OMS) sobre los requisitos de las Buenas Prácticas de manufactura (BPM). Segunda parte: Validaciones, Ginebra 1998.

14. Guía para Validar Métodos y Tópicos Relacionados [Sitio en Internet] Disponible en: <http://www.analitica.cl>. Acceso: Enero 2008.

15. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for human use. Text on Validation of Analytical Procedures Q2A. Switzerland, Octubre 1994.

16. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for human use. Validation of Analytical Procedures: Methodology Q2B. Switzerland, Noviembre 1996.

17. Manual de Buenas Prácticas de Manufactura, DIGEMID. Lima – Perú, Diciembre 1999.

18. Protocolo de Validación de Métodos analíticos para la Cuantificación de Fármacos [Sitio en Internet] disponible en: <http://www.sld.cu>. Acceso: Marzo 2008.

19. Quattrochi O., Abelaria de Andrizzi S., Laba R., Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica. Bases de la Separación. Capítulo 3, Desarrollo de Métodos. Capítulo 11, Validación de Métodos Analíticos. Capítulo 12. Argentina 1992.
20. Silva G.. Validación del método de valoración de Glimepiride presentación comprimido de 4 mg. por el método de cromatografía líquida de alta performance HPLC. [Tesis] Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos 2004.
21. Skoog D., West D., Química analítica, Editorial Mc GRAW – HILL, Capítulo 18 “Métodos Cromatográficos”, 4ta Edición México 1994.
22. The Merck Index; an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Tenth Edition 1983. Baltimore.
23. United States Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia 31 ed. January, 2008. p. 2748-2751. Baltimore.
24. Validación de Métodos Analíticos [Sitio en Internet] Disponible en <http://www.genium.udistrital.edu.com>. Acceso: Diciembre 2008
25. Zaravia G. Desarrollo y validación de una técnica analítica de dosaje de Fenilpropanolamina clorhidrato, Clorfenamina maleato y Cafeína en tabletas por el método de HPLC. [Tesis] Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos 2004.

IX. ANEXOS

CONTENIDO:

ANEXO 1: Fórmula con la que se desarrolló la Validación del Método Analítico.

ANEXO 2: Flujoograma de Validación de Técnicas Analíticas.

ANEXO 3: Cromatogramas obtenidos en la Validación.

- **Figura N° 1** - Cromatograma del Estándar de Clenbuterol Clorhidrato.
- **Figura N° 2** - Cromatograma del Estándar de Clenbuterol Clorhidrato
- **Figura N° 3** - Cromatograma del placebo
- **Figura N° 4** - Cromatograma de la Fase Móvil
- **Figura N° 5** - Cromatograma del Muestra de una solución al 75 %
- **Figura N° 6** - Cromatograma del Muestra de una solución al 100 %
- **Figura N° 7** - Cromatograma del Muestra de una solución al 125 %
- **Figura N° 8** - Cromatograma del estándar de Clenbuterol Clorhidrato analizado en el equipo Agilent 1100
- **Figura N° 9** - Cromatograma de la muestra analizado en el equipo Agilent 1200
- **Figura N° 10** - Cromatograma de la muestra de Clenbudilat
- **Figura N° 11** - Cromatograma de la muestra de Clenbudilat

- **Figura N° 12** - Cromatograma de la muestra de Mucosolban

ANEXO 4: Significados de abreviaturas y símbolos.

ANEXO 1: FÓRMULA CON LA QUE SE DESARROLLO LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

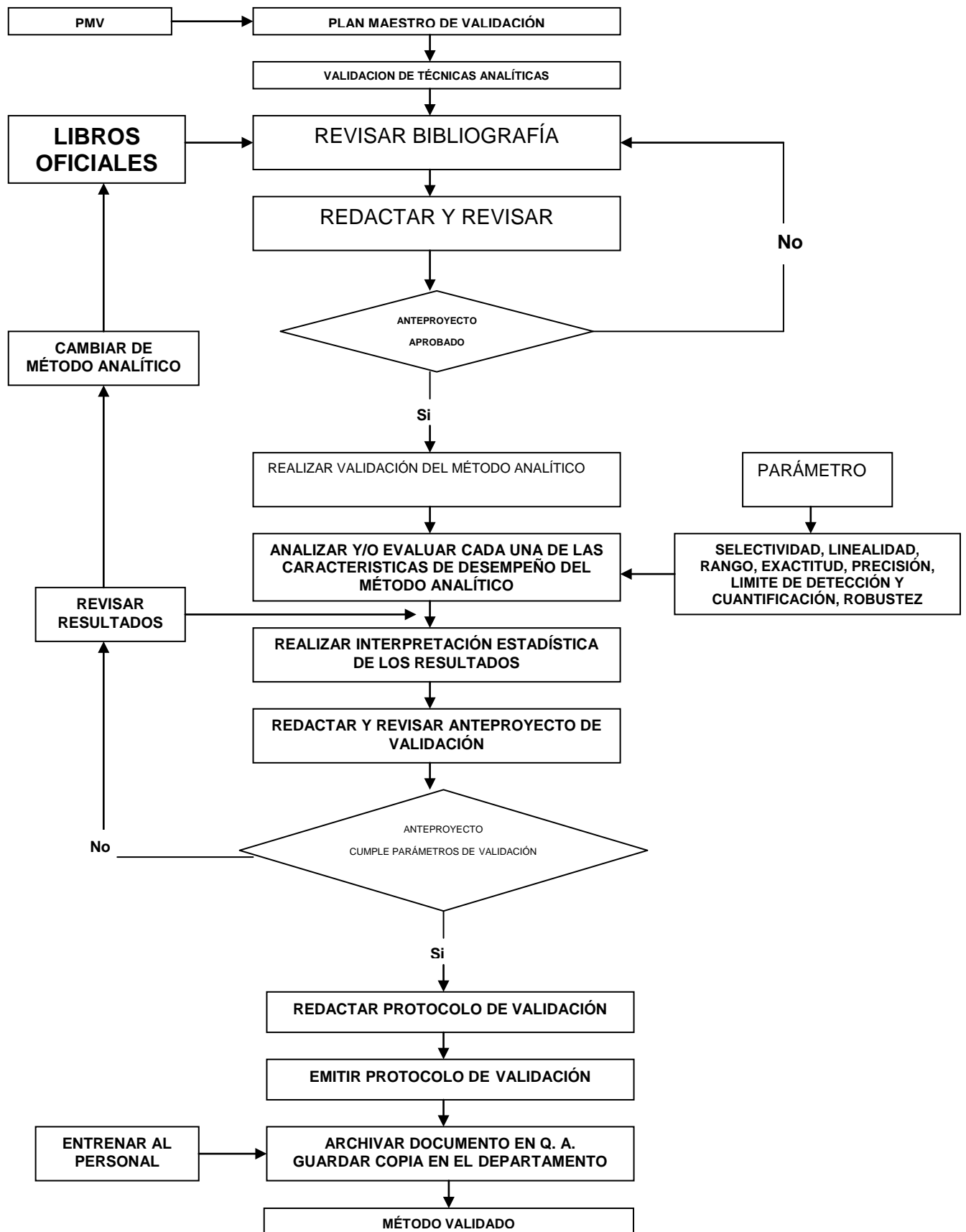
PRODUCTO: Clenbuterol Clorhidrato

FORMA FARMACÉUTICA: Solución oral gotas

LOTE ESTÁNDAR:

DESCRIPCIÓN	LOTE ESTÁNDAR x 8 L	
	CANTIDAD	UNIDAD
Clenbuterol clorhidrato	0.4	g
Ambroxol clorhidrato	0.6	Kg
Metilparabeno	0.16	Kg
Prpilparabeno	0.016	Kg
Sorbitol 70%	24.16	Kg
Glicerina	8.48	Kg
Propilenglicol	1.6	Kg
Sodio citrato	0.0218	Kg
Acido cítrico	0.064	Kg
Sacarina sódica	0.008	Kg
Esencia de anís hidrosoluble	0.016	Kg
Agua purificada c.s.p.	80	Kg

ANEXO 2: FLUJOGRAMA DE VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS



ANEXO 3: CROMATOGRAMAS OBTENIDOS EN LA VALIDACIÓN

Figura N° 1 - Cromatograma del Estándar de Clenbuterol Clorhidrato

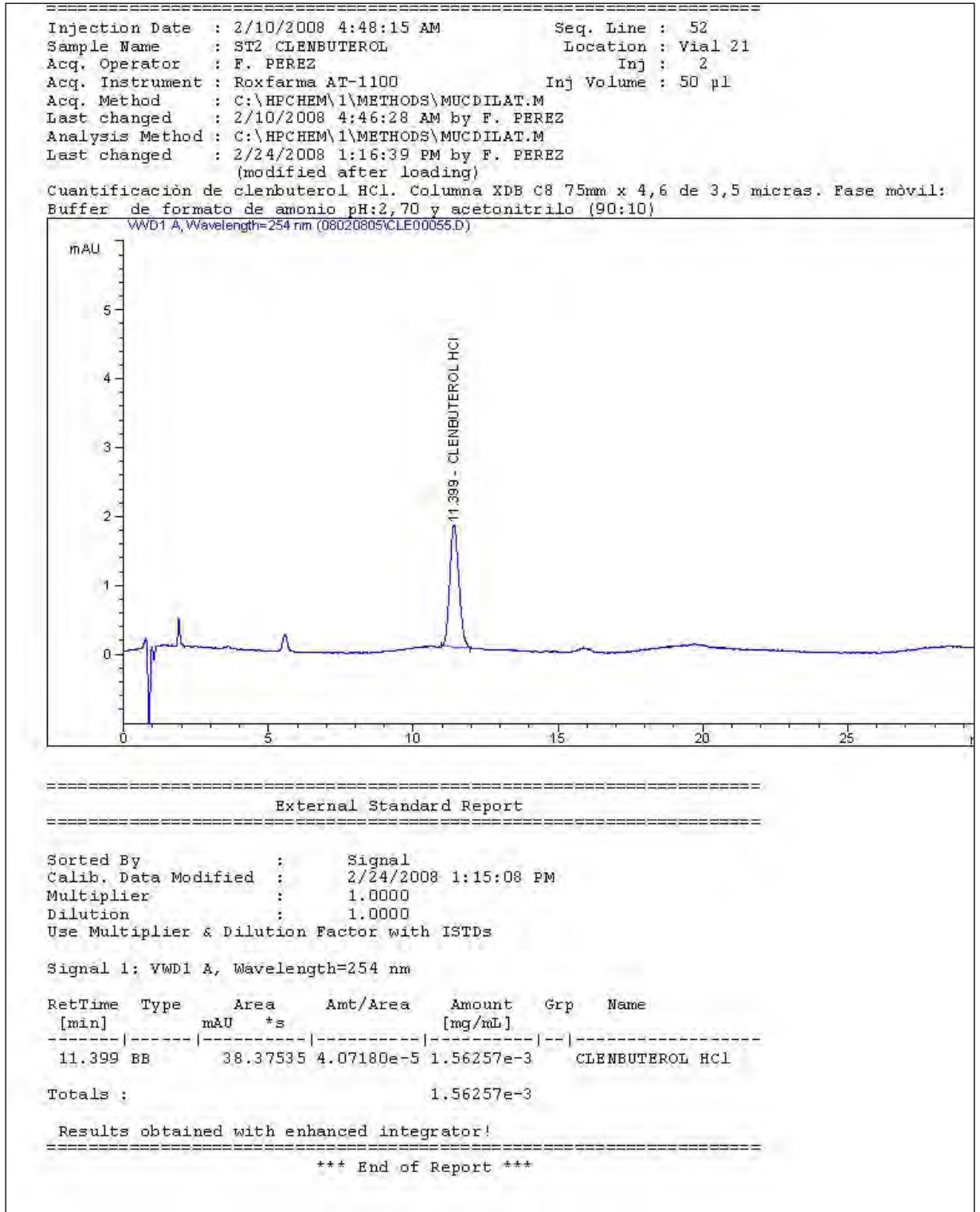


Figura N° 2 - Cromatograma del Estándar de clenbuterol Clorhidrato.

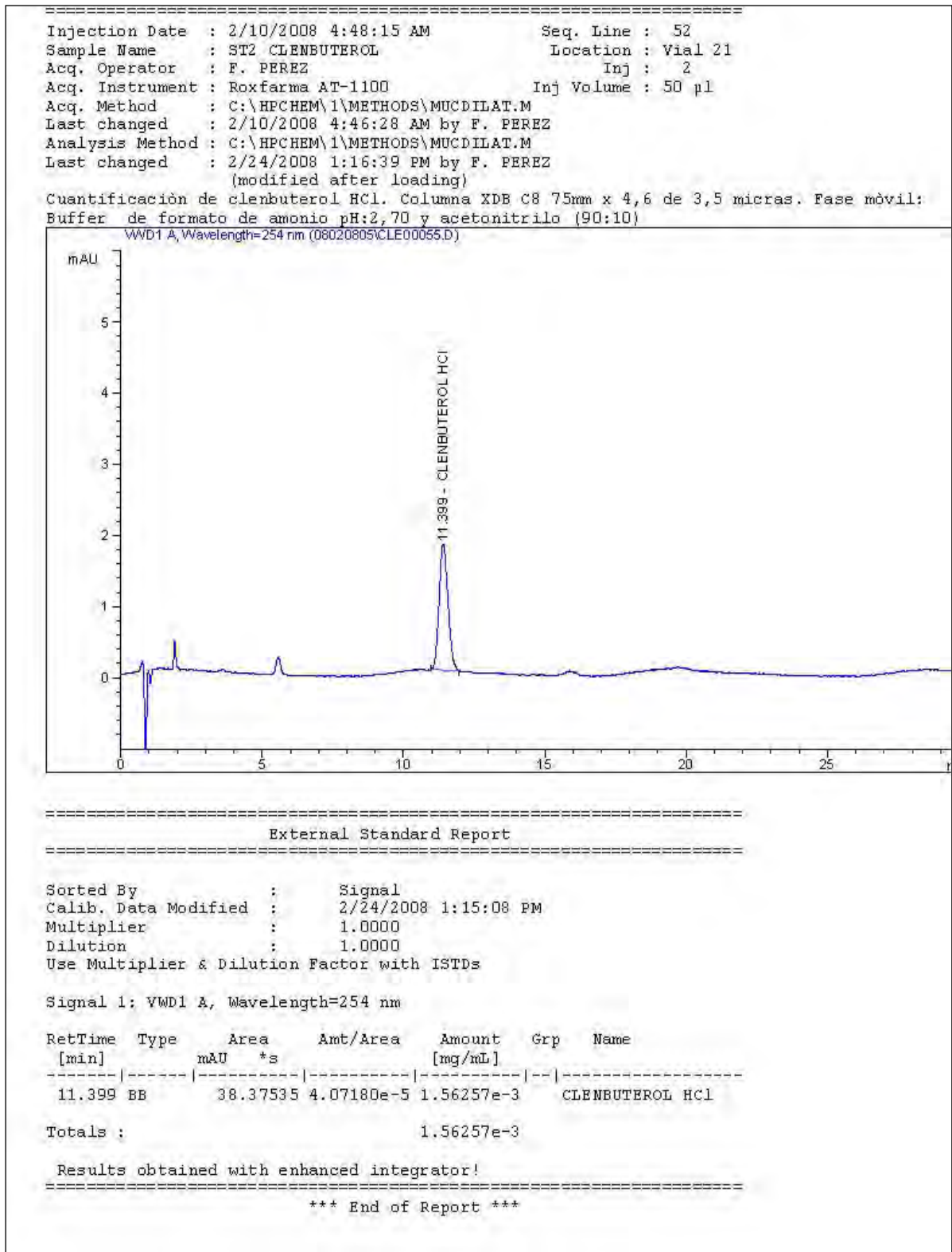


Figura N° 3 - Cromatograma del placebo

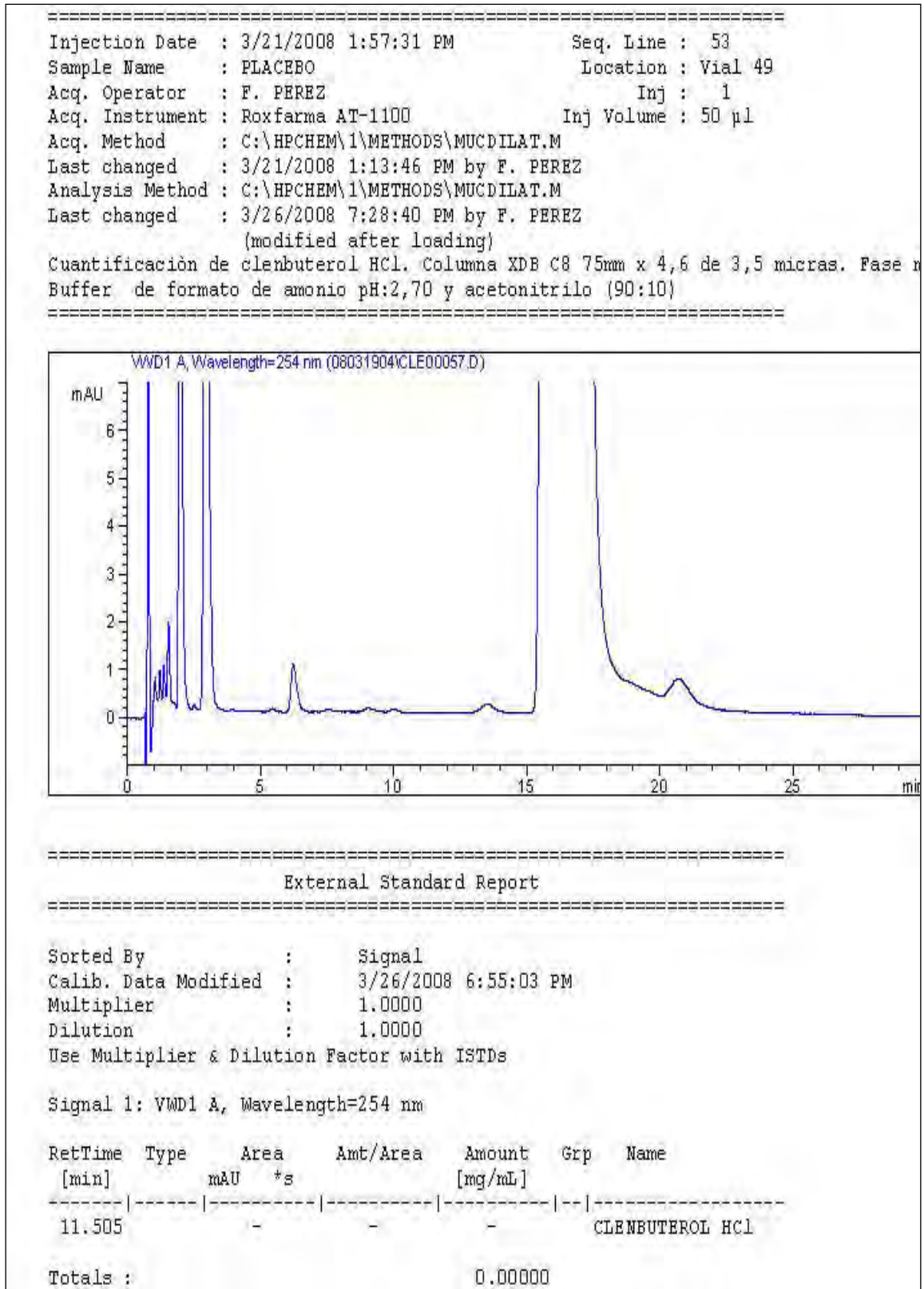


Figura N° 4 - Cromatograma de la Fase Móvil

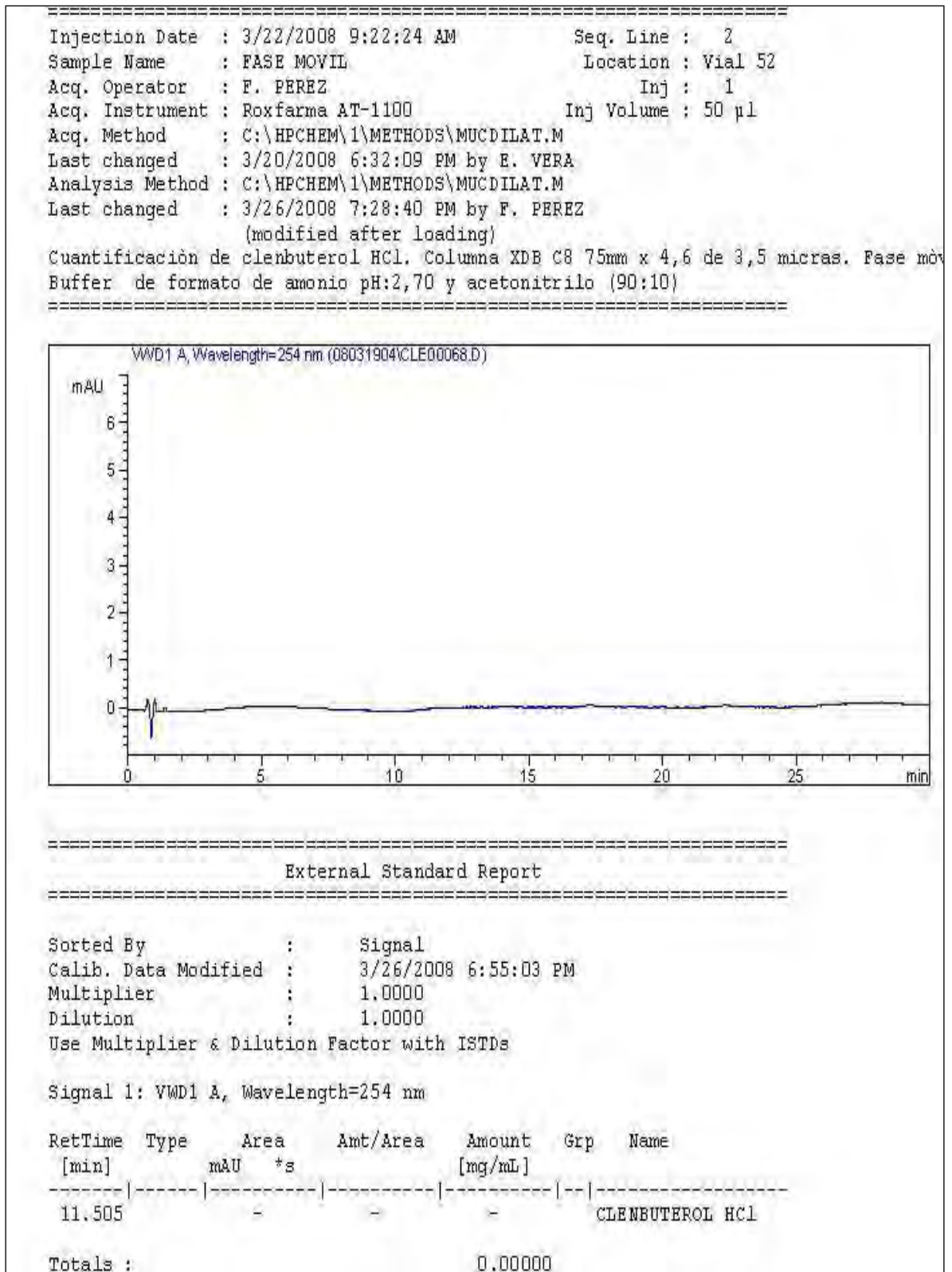


Figura N° 5 - Cromatograma del Muestra de una solución al 75 %

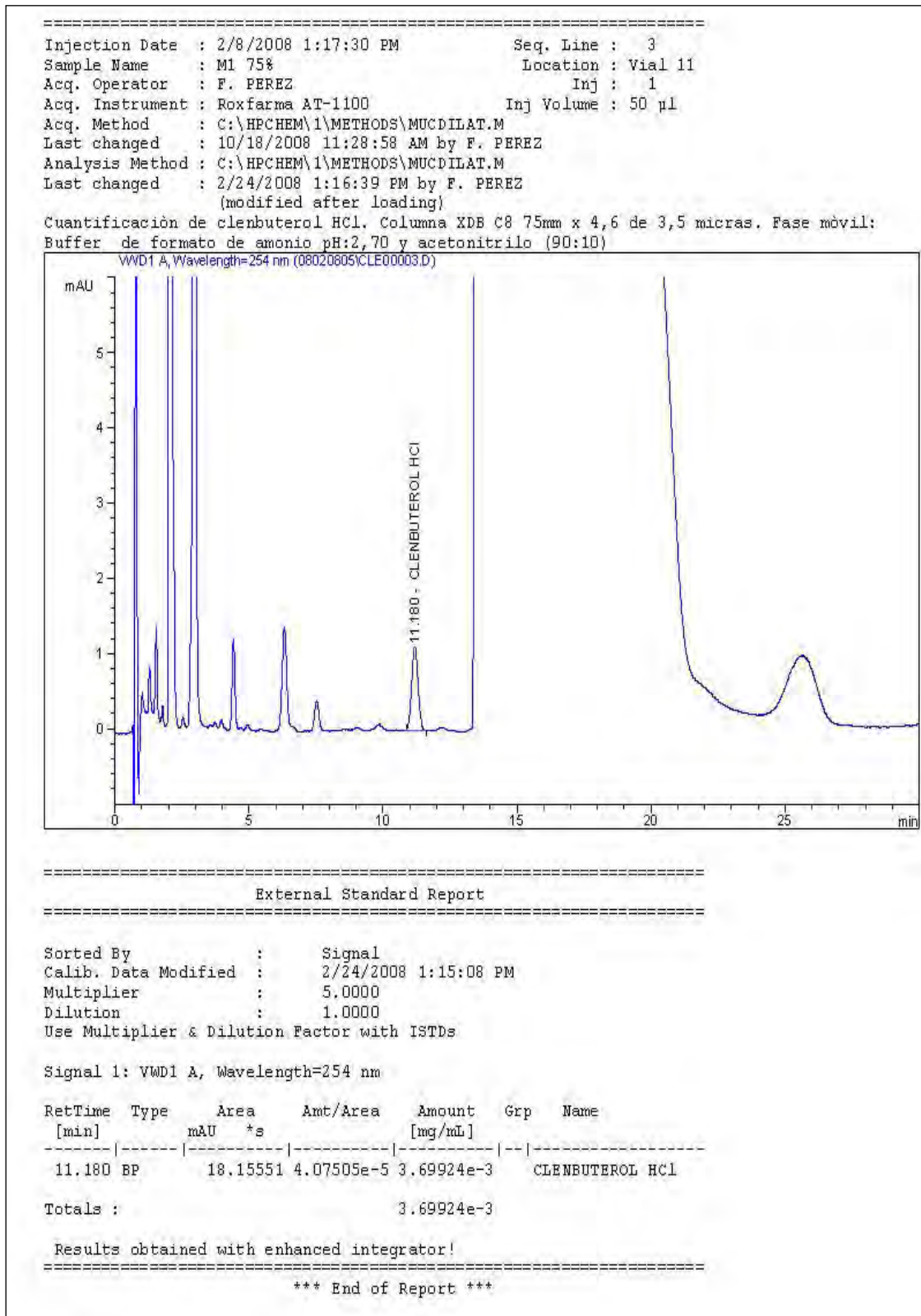


Figura N° 6 - Cromatograma del Muestra de una solución al 100 %

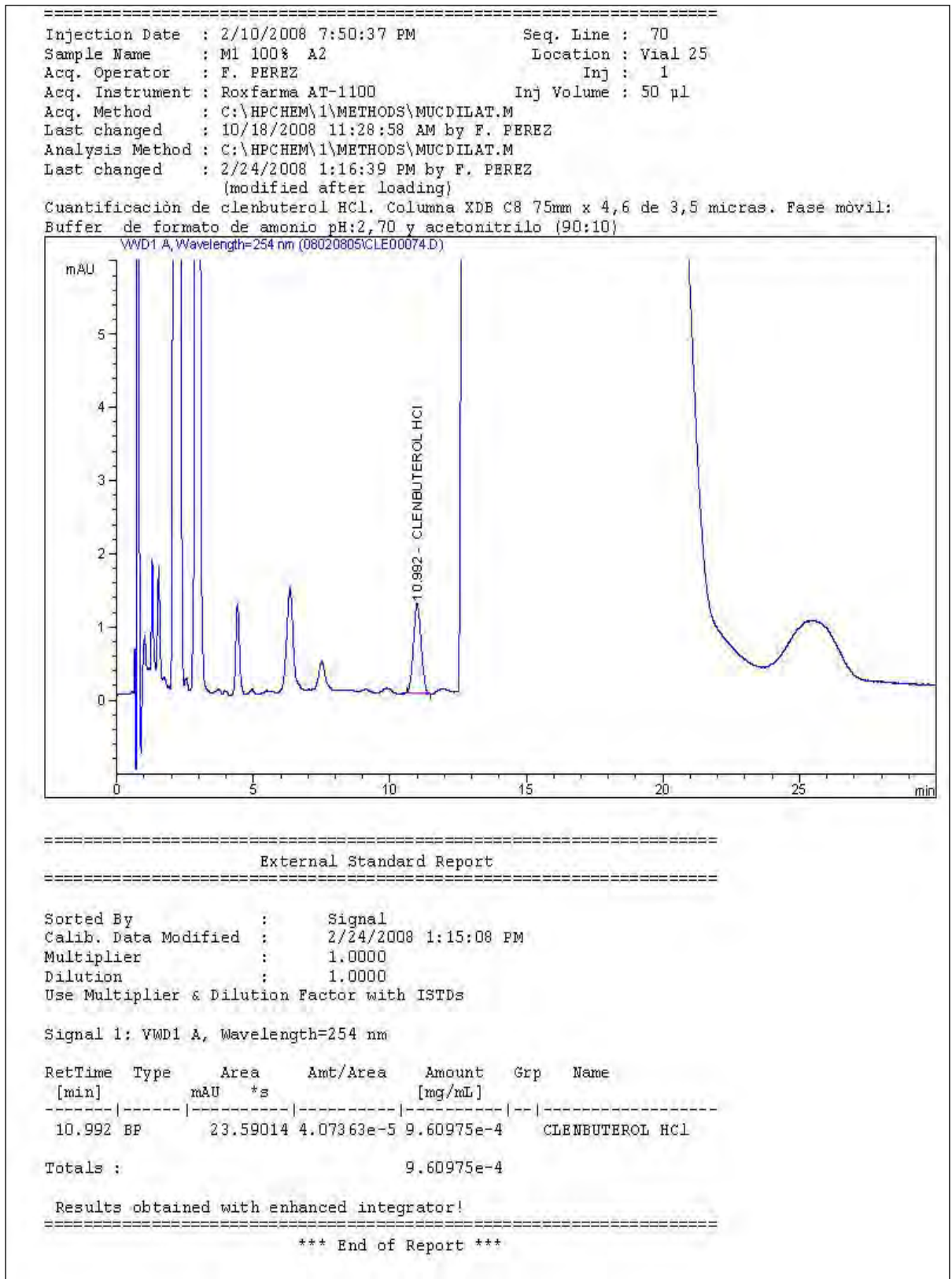


Figura N° 7 - Cromatograma del Muestra de una solución al 125 %

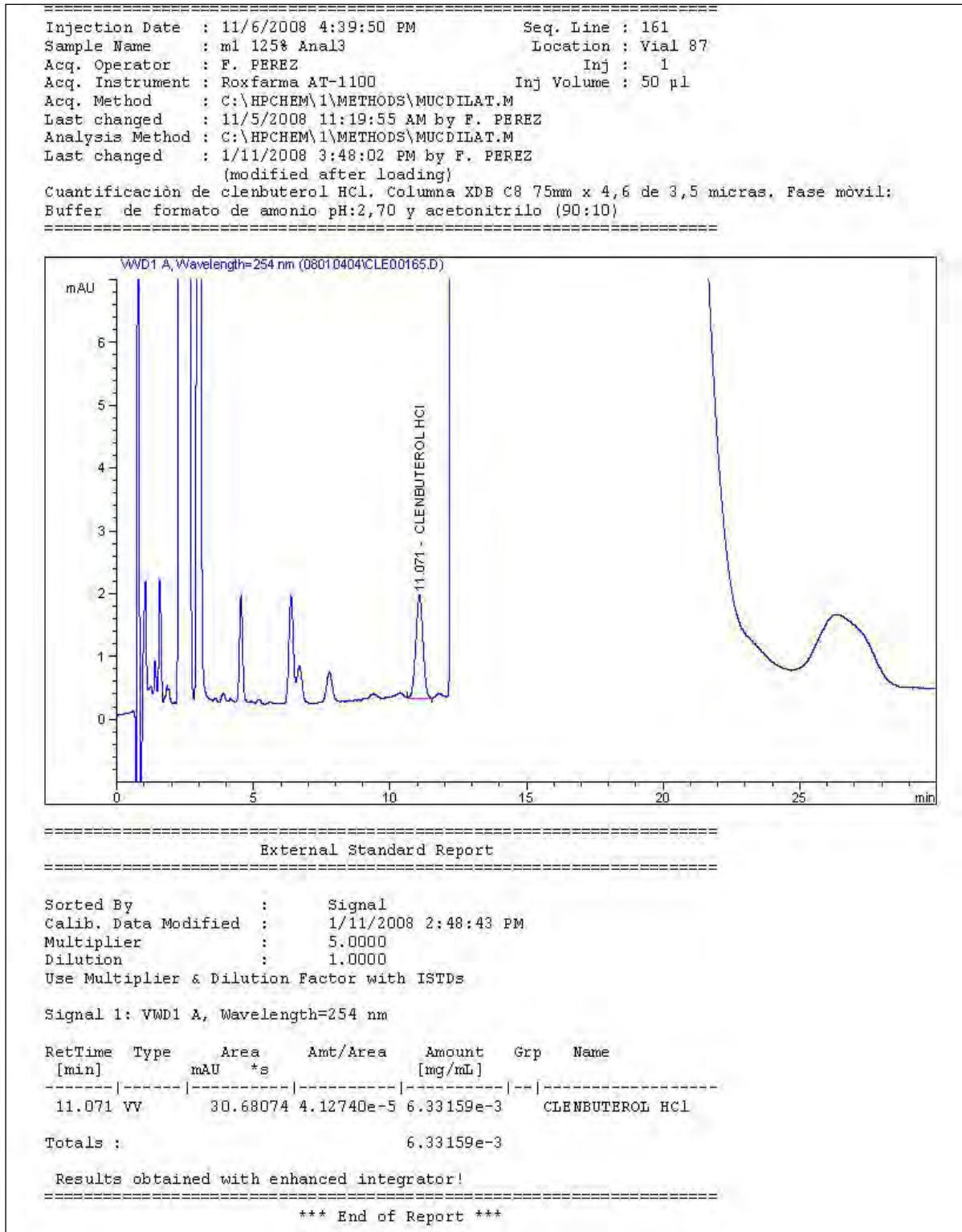


Figura N° 8 - Cromatograma del estándar de Clenbuterol Clorhidrato analizado en el equipo Agilent 1100

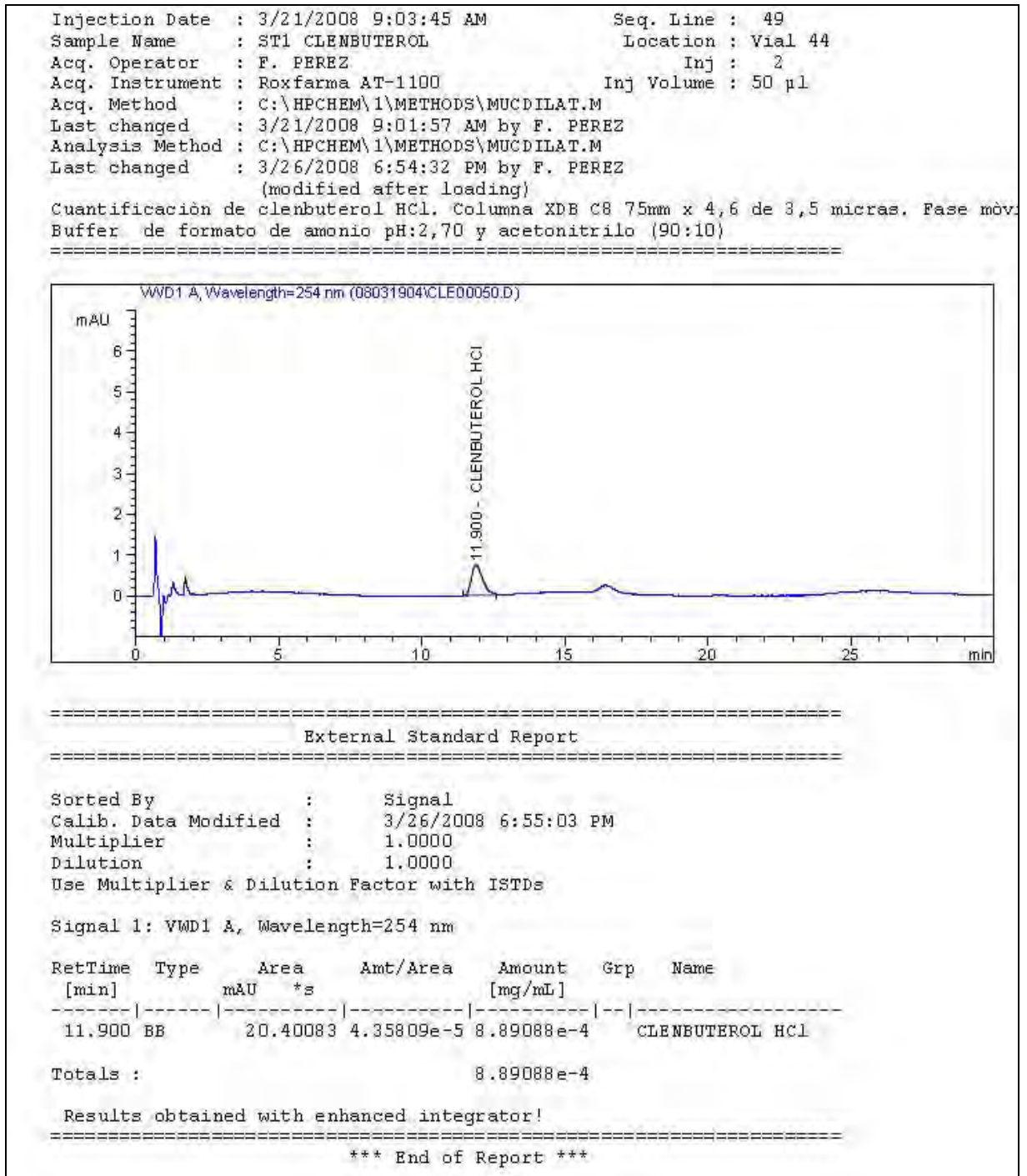


Figura N° 9 - Cromatograma de la muestra analizado en el equipo Agilent

1200

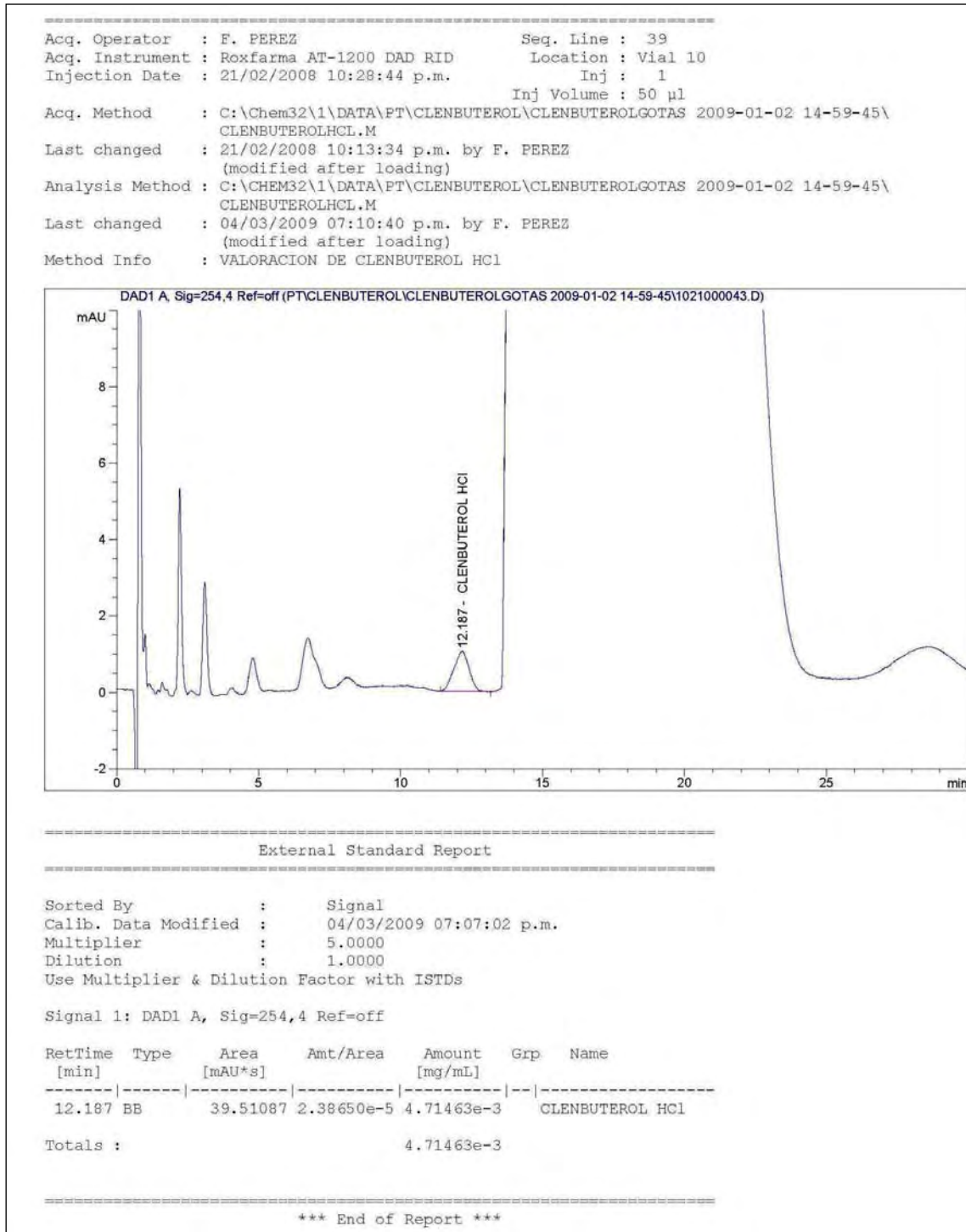


Figura N° 10 - Cromatograma de la muestra de Clenbudilat

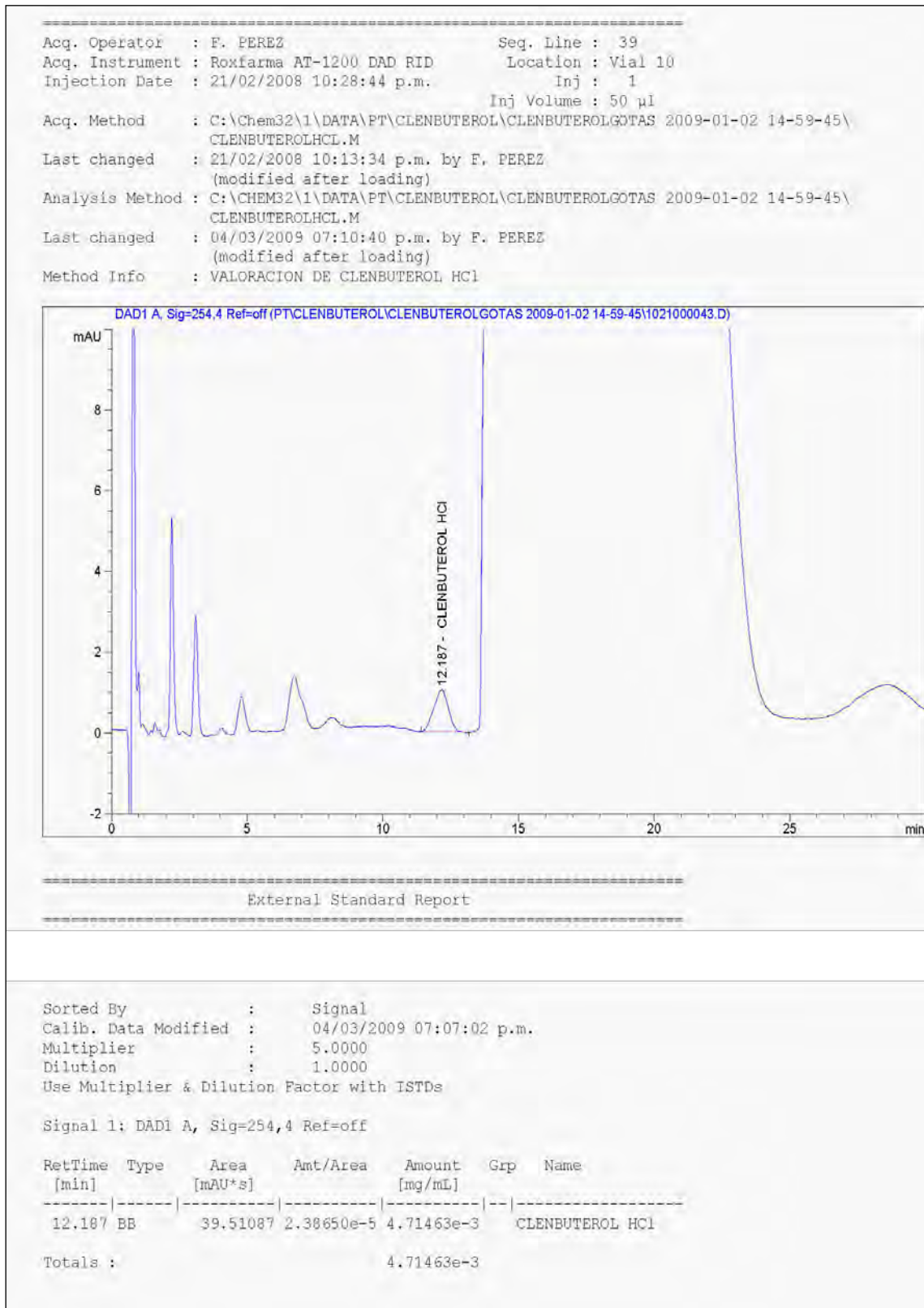


Figura N° 11 – Cromatograma de la muestra de Clenbudilat

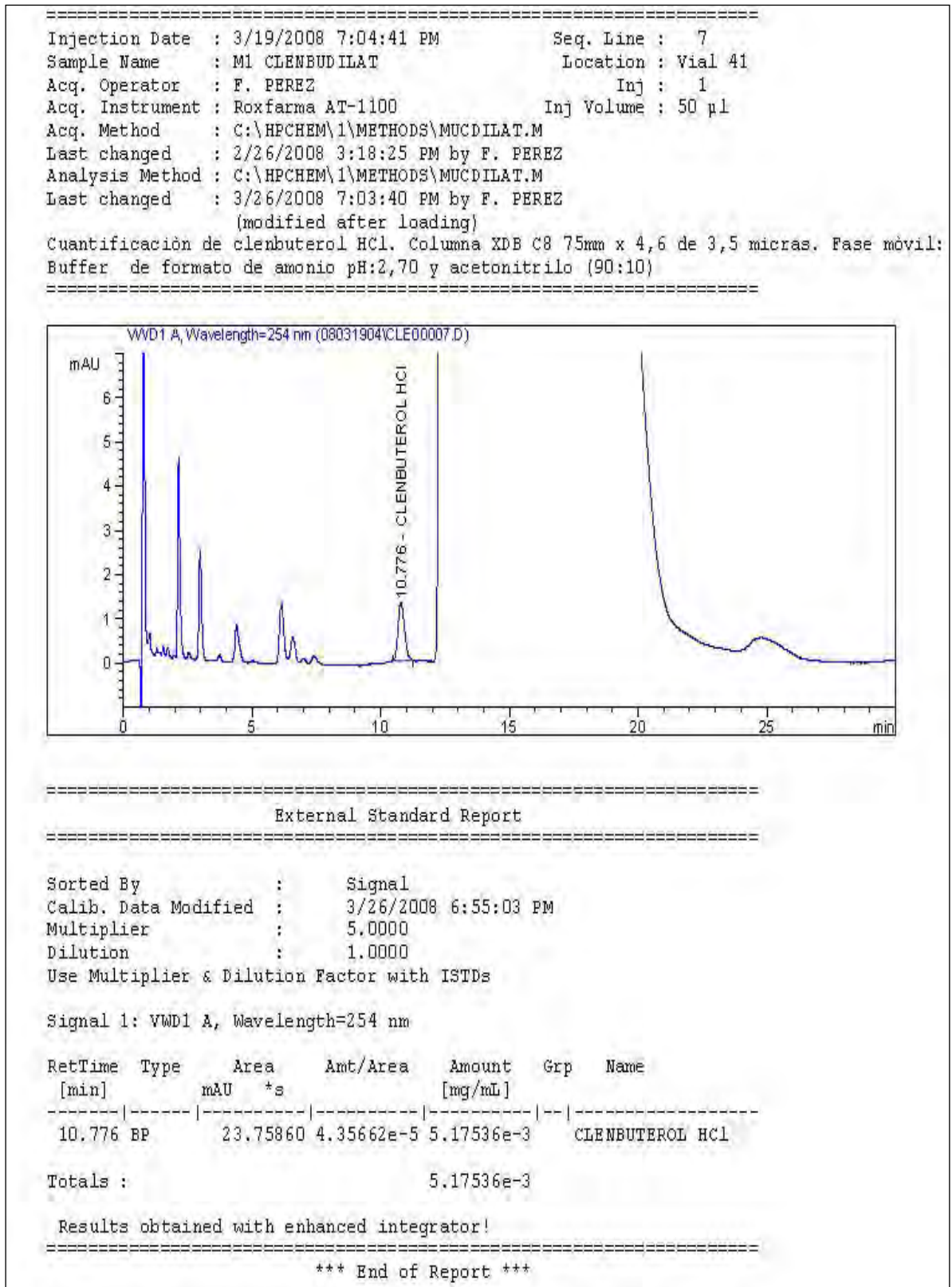
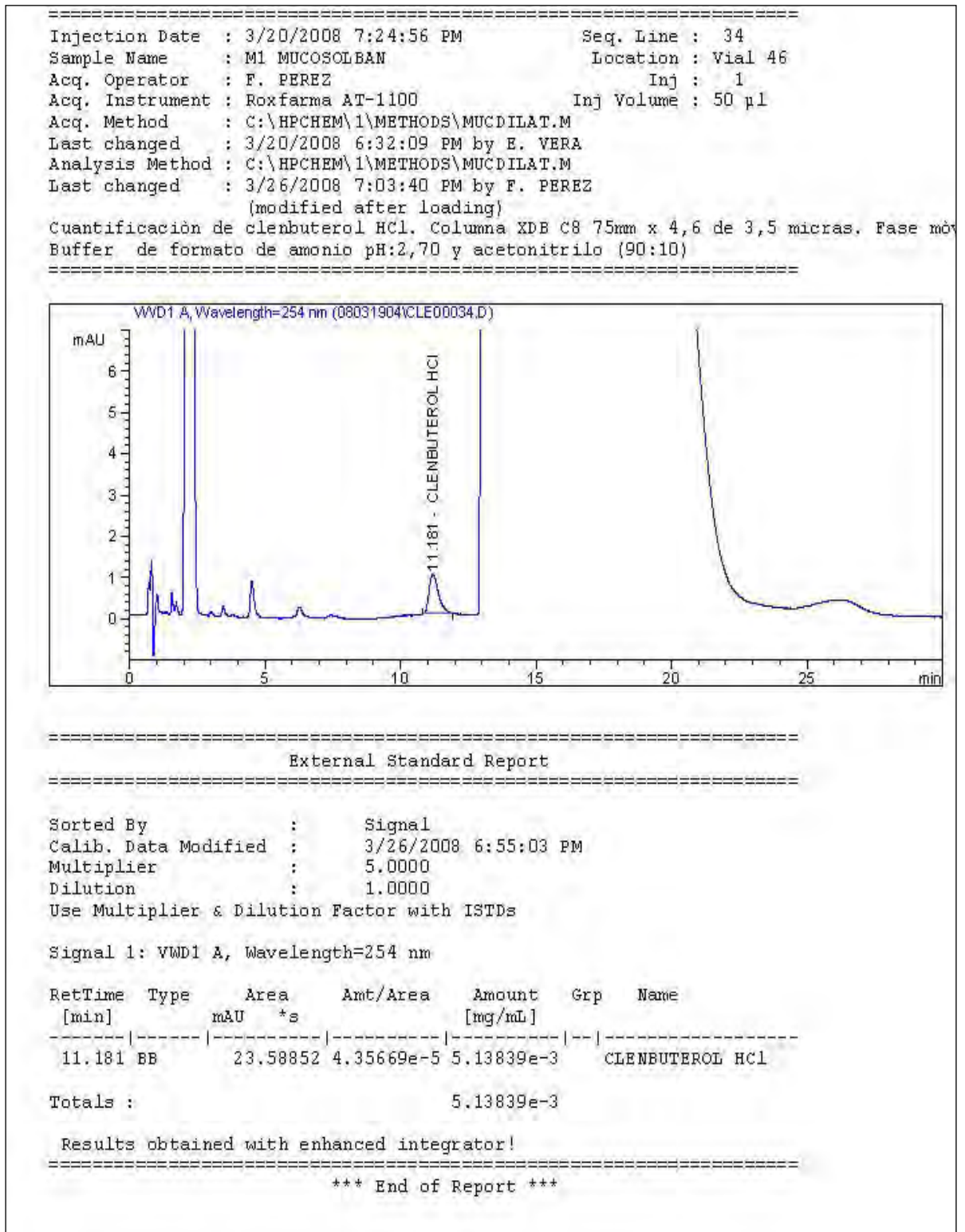


Figura N° 12 - Cromatograma de la muestra de Mucosolban



ANEXO 4: SIGNIFICADOS DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

a	Termino independiente de la recta de regresión
b	Pendiente de la recta regresión o curva de calibración
f	Factor de respuesta
gl	Grados de libertad
K'	Factor de capacidad
n	Tamaño de la muestra
r	Coeficiente de correlación
r²	Coeficiente de determinación
s(DE)	Desviación estándar de una muestra
s²	Varianza de una muestra
Sx	Desviación estándar de la muestra
t	Test estadístico de Student
tr	Tiempo de retención de un analito
t_o	Tiempo muerto
x	variable independiente (valor nominal)
y	Variable dependiente (valor experimental)
ŷ	Valor estimado o calculado de la variable dependiente
AOAC	Association of Official Analytical chemist
ASTM	American Society for Testing and Materials
BPL (GLP)	Buenas Practicas de Laboratorio
CV(CV%)	Coeficiente de variación
FDA	Food and Drug Administration
G	Test estadístico de la prueba de homogeneidad de varianza de cochran
GMP (BPM)	Buenas Practicas de Manufactura
GALP	Buenas Practicas de laboratorio automatizado
HPLC	Cromatografía líquida de alta Performance
IC (LC)	Intervalo de confianza
ICH	International conference of Harmonisation
ISO	International Organization for Standarizacion
IUPAC	International Union of Pure and Applied chemistry
ID	Calificación del diseño

IQ	Calificación de Instalación
K'	Numero de grupos
LC	Limite de cuantificación
LD	Limite de detección
MQ	Calificación de mantenimiento
M1,2,3	Muestra 1,2,3
n	Numero de platos teóricos
PQ	Calificación de operación
OMS	Organización Mundial de salud
PMV	Plan Maestro de Validaciones
PQ	Calificación de desempeño
R(R%)	Porcentaje de recuperación
Rs	Resolución (Cromatografía)
R1,2,3	Resultado 1,2,3
SOP	Procedimiento de Operación estándar
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
UV	Ultravioleta
VL	Validación de limpieza
VP	Validación de proceso
VT	Validación de técnica
w	Anchura de pico cromatográfico