

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



**DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE
CLENBUTEROL Y AMBROXOL EN JARABES PARA LA TOS POR MEDIO DE
CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.**

José Roy Morales Coronado

Químico

Guatemala, agosto de 2017

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



**DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE
CLENBUTEROL Y AMBROXOL EN JARABES PARA LA TOS POR MEDIO DE
CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.**

Informe de tesis

Presentado por:

Br. José Roy Morales Coronado

Para optar al título de

Químico

Guatemala, agosto de 2017

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
M.A. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreina Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carol Andrea Betancourt Herrera	Vocal V

ACTO QUE DEDICO

A DIOS:

Por todo, por todo.

A mi madre:

Por ser ejemplo de fortaleza, lucha, perseverancia y ética. Sin sus consejos, amor y sabias palabras no sería la persona que soy, ni habría llegado a donde llegué.

A Gaby, Rafa y Davidcito:

Porque son mi pilar e inspiración para ser un mejor hombre día con día.

AGRADECIMIENTO

A la USAC: “*Conspicua en todo el Orbe*” por ser mi casa de estudios, en sus pasillos aprendí academia, amistad, lealtad y trabajo arduo, me dio la oportunidad de crecer y ayudar a los demás.

A mis amigos: Por ser mis compañeros de lucha día con día, por ayudarme y siempre ser compinches en las aventuras dentro y fuera de la universidad, Gracias Álvaro, Jorge, Erick, Fayver, Renato, Max, Rony.

Al Lic. Jorge García: por todas las oportunidades ayuda y consejos. Es ejemplo de lo que un profesional y padre debe ser.

A Oswaldo Martinez: por ser mi guía en este mar llamado Tesis y mucho más.

A mis compañeros de trabajo: Aroldo y Luisa por ser siempre solidarios y amigos y consejeros.

Al Lic. Danilo: por enseñarme con ejemplo de lo que debe ser una autoridad, padre y amigo.

Al Dr Carlos Alvarado por siempre confiar en mí, ser amigo y defensor de causas justas.

Al Dr Oscar Cobar: por darme siempre consejos oportunos y ser un amigo sincero.

A Paulina de la Fuente: por demostrarme lo que es el amor y ser mi motorcito para seguir.

Al Personal de Bienestar Estudiantil: en especial al Dr Porres, Dr Morataya y Dr Catalán, Luis, Any, Sandrita por permitirme seguir aportando al crecimiento de la Universidad.

Al Departamento de Química General: en especial a la licenciada Cordón, licenciada Mirian, licenciada Coto, Vilmita por permitirme conocer la docencia y porque son más amigos que compañeros.

Contenido

I.	Resumen	1
II.	Introducción	2
III.	Marco teórico	3
1.	Clenbuterol	3
2.	Ambroxol	3
3.	Técnica a aplicar: cromatografía líquida de alta resolución	3
4.	Detección UV-Visible.....	4
5.	Parámetros de evaluación del método	5
a)	Exactitud	5
b)	Límite de cuantificación	5
c)	Linealidad.....	5
d)	Precisión intermedia.....	6
e)	Repetibilidad o precisión del sistema.....	6
f)	Rango	6
g)	Robustez.....	6
IV.	Antecedentes.....	8
V.	Justificación	9
VI.	Objetivos.....	10
1.	General	10
2.	Específicos.....	10
VII.	Hipótesis.....	11
VIII.	Materiales y Métodos	12
1.	Universo	12
2.	Muestra	12
3.	Recursos	12
a)	Humanos.....	12
b)	Materiales	12
4.	Métodos	13
a)	Implementación del método.....	13

b)	Procedimiento para el análisis cromatográfico	14
c)	Evaluación de la metodología	15
IX.	Resultados	18
1.	Ruido.....	18
2.	Exactitud	18
3.	Repetibilidad o precisión del sistema.....	19
4.	Precisión intermedia	19
5.	Linealidad.....	20
6.	Rango	21
7.	Robustez.....	21
X.	Discusión de resultados	22
XI.	Conclusiones	24
XII.	Recomendaciones	25
XIII.	Bibliografía	26

I. Resumen

Los jarabes mucolíticos son ampliamente utilizados en el tratamiento de enfermedades respiratorias, un tipo en especial son los mucolíticos compuestos por ambroxol y clenbuterol que son utilizados por sus propiedades mucolíticas y expectorantes, aunque ambos compuestos activos son utilizados en concentraciones muy diferentes uno de otro.

En la actualidad este tipo de productos deben tener controles de calidad estrictos y confiables, los cuales están regulados por la Oficina Guatemalteca de Acreditación –OGA-. Estos controles se utilizaron en la presente investigación para proponer un solo análisis para este tipo de jarabes, se establecieron las condiciones cromatográficas adecuadas, composición de fase móvil, flujo y temperaturas. Sin embargo esto no fue posible debido a que un compuesto, el clenbuterol no fue posible detectarlo por medio de la metodología propuesta.

Luego se evaluaron los parámetros propuestos siendo para el ambroxol: La desviación de 2,25 (fuera del criterio), precisión intermedia fue de 4×10^{-14} (fuera del rango de aceptación), repetibilidad o precisión del sistema fue 0,3, (dentro del criterio de aceptación); linealidad cuyo coeficiente de regresión fue de 0,998 por lo que se considera lineal, el rango fue de 80 % al 120 % de la concentración del ambroxol, es decir de 0,06 a 0,09 g/mL además el método es robusto para cambio de temperatura con una desviación estandar de 0,6 % dentro del criterio de aceptación para un cambio de $\pm 5^{\circ}\text{C}$, pero no lo es para el cambio de flujo ya que la desviación estándar fue de 14% mayor que el criterio de aceptación que es de 2 %.

El método planteado después de varias modificaciones no es adecuado para evaluar el clenbuterol y el ambroxol ya que no cumplen con todos los criterios según las políticas COGUANOR, por lo que no es un método adecuado para la evaluación de este tipo de jarabes.

II. Introducción

Los jarabes para la tos son ampliamente utilizados en la sociedad guatemalteca y son desarrollados para aliviar los síntomas de congestión del tracto respiratorio. Los principios activos son clenbuterol y ambroxol por lo que en la presente investigación se desarrolla una metodología en cromatografía líquida de alta resolución con detector ultra violeta visible para separar y cuantificar dichos principios activos, de una formulación farmacéutica tipo jarabe.

En la actualidad las exigencias de calidad hacen que la evaluación de productos farmacéuticos necesite ser sustentada con base documental y estadística, como herramienta de competencia de mercado, además el adecuado respaldo documental y estadístico que hacen posible la utilización del método para laboratorios nacionales e internacionales de calidad.

Por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución se pretendía separar los analitos propuestos, clenbuterol y ambroxol, se logró la separación pero no la cuantificación con los criterios mínimos establecidos.

Para determinar que el método propuesto no cumplió las exigencias nacionales se evaluó el método mediante parámetros establecidos por la Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR) en la política OGA-GEC-016 "Política de Selección y Validación de Métodos de Ensayo", siendo estos: exactitud, precisión intermedia, repetibilidad o precisión del sistema, linealidad, límite de cuantificación, rango y robustez.

III. Marco teórico

1. Clenbuterol

El clenbuterol es un fármaco broncodilatador (Sigma Aldrich 2015) indicado para el tratamiento de enfermedades respiratorias. En personas que padecen de desórdenes respiratorios como asma se emplea como medicamento para facilitarles la respiración, es considerado agente dopante en diferentes disciplinas deportivas.

2. Ambroxol

El ambroxol (trans-4-(2-amino-3,5-dibromobencilamino)ciclohexano) es un fármaco que se utiliza como expectorante y mucolítico en los procesos en los que se requiere aumentar la fluidez de las secreciones del tracto respiratorio, como sucede en el asma bronquial, diferentes tipos de bronquitis aguda, crónica, bronquitis espasmódica, asma bronquial, bronquiectasia, neumonía, bronconeumonía, rinitis, sinusitis, atelectasia por obstrucción mucosa, traqueostomía, en el pre y posquirúrgico de pacientes geriátricos. (Vademécum de Genéricos Intercambiables, 2008)

“El ambroxol en su forma de clorhidrato, tiene conocidas acciones secretolíticas, secretora y estimulante del sistema surfactante a nivel bronquial, lo que permite disminuir la adhesividad de las secreciones de moco y mejorar el transporte de estas secreciones a nivel bronquial”. (Carranza Díaz, 2010, pág. 18)

El clorhidrato de ambroxol se absorbe completamente después de su administración vía oral, tiene una vida media de 9 a 10 horas, este se metaboliza en el organismo formando varios metabolitos que se eliminan vía renal y biliar. (Carranza Díaz, 2010)

3. Técnica a aplicar: cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía se especializa en la separación de sustancias, esta consta de dos partes principales, una fase móvil y una fase estacionaria. Este sistema produce que el líquido (fase móvil) lleva a la mezcla a resolver en íntimo contacto con la fase estacionaria. Las dos fases se eligen de forma que los componentes se distribuyan de distinto modo entre la fase móvil y la fase estacionaria. Los componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria se mueven con rapidez, esta diferencia de movilidad constituye el principio fundamental de la cromatografía, y hace que los componentes se separen

en bandas o zonas que pueden analizarse de forma cualitativa o cuantitativa. (Skoog, Holler, & Nieman, 2001, pág. 817).

La fase estacionaria es el corazón de las separaciones y afecta la selectividad, capacidad y eficacia del método.

La columna para HPLC consta de dos partes: el relleno y el soporte. Para este fin el soporte debe ser resistente a altas presiones y a los efectos químicos de la fase móvil. El relleno que normalmente se utiliza para la fase reversa es de tipo C-18 y C-8, formadas ambas por grupos no polares unidos a sílice. Son tres las variables que se modifican para las columnas:

- Tamaño de la partícula: Es la variable que determina el número de platos teóricos, y el más común es de 3-5 μ ; partículas más pequeñas producen una superficie mayor y mejor separación lo que se traduce en mejor eficacia y resolución, aunque conlleva al aumento de la presión.
- Diámetro interno: Este parámetro se relaciona con la cantidad de muestra que puede trabajar la columna, además de influir en el flujo y en la sensibilidad. A mayor diámetro interno, mayor capacidad de carga y mayor capacidad de flujo, pero mayor dilución del pico disminuyendo la sensibilidad.
- Longitud: Este se relaciona con la eficacia de separación así como con la velocidad de la separación. (María, 2010)

La fase móvil debe ser idealmente no corrosiva con el equipo, de alta pureza, baja viscosidad y toxicidad y compatibles con el detector, además de solubilizar a los compuestos de la muestra.

4. Detección UV-Visible

La mayoría de equipos HPLC utilizan como detectores UV-VIS, porque permiten la determinación de un gran número de compuestos, por su fácil manejo y relativo bajo coste. Además posee características muy atractivas como buena sensibilidad, gran rango dinámico y no es destructivo.

Esta medición se fundamenta según la interacción entre la radiación UV-VIS y la materia, es el fenómeno de absorción de la radiación, el cual es interpretado por el equipo en forma de cromatogramas y el descrito por la ley de Beer-Lambert. (Skoog, Holler, & Nieman, 2001, pág. 824)

Los detectores de absorción UV-VIS pueden ser de tres tipos:

- Longitud de onda fija: Son los de diseño más simple y consta de una lámpara de mercurio de baja presión, que emite una radiación monocromática de 254 nm.
- Longitud de onda variable: Son los más versátiles. La lámpara puede ser de wolframio, xenón o deuterio, que trabajan en el rango de 190-650 nm, y

poseen un monocromador, con lo que se puede utilizar solo una longitud de onda deseada.

- Arreglo de diodos (DAD): Conduce la luz mediante un sistema de diodos alineados, con lo que registra el espectro completo de cada soluto que pasa por el detector. (Skoog, Holler, & Nieman , 2001, pág. 824)

5. Parámetros de evaluación del método

a) Exactitud

“Se refiere al grado de concordancia entre el valor aceptado como valor verdadero convencional, o un valor de referencia y el valor encontrado” (Oficina Guatemalteca de Acreditación, 2007, pág. 11).

La exactitud se evalúa por tres estándares, preparados al 80 %, 100 % y 120 % , evaluando cada uno por triplicado. Para que la exactitud sea aceptada la RSD de los datos debe ser menor a 2 % y la recuperación debe ser entre 96 % y 104 %.

b) Límite de cuantificación

Concentración mínima de analito en la matriz de una muestra que puede ser cuantificada con una exactitud y precisión aceptable bajo condiciones analíticas específicas. (Oficina Guatemalteca de Acreditación, 2007, pág. 11).

El límite de cuantificación será el nivel inferior de la linealidad.

c) Linealidad

“Capacidad de un método analítico para generar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito o valor del parámetro de la muestra, dentro de un rango”. (Oficina Guatemalteca de Acreditación, 2007, pág. 11).

La linealidad se mide en 5 puntos, de concentración de 80 %, 90 %, 100 %, 110 % y 120 %, cada una se inyectara tres veces y el criterio de aceptación será: el valor de r^2 debe ser mayor de 0.990.

d) Precisión intermedia

“Se refiere al grado de concordancia entre los valores de una serie de ensayo repetidos, utilizando una muestra homogénea, variando distintas condiciones dentro del mismo laboratorio”. (Oficina Guatemalteca de Acreditación, 2007, pág. 13)

Este se realiza por dos personas distintas, en las mismas condiciones preparando un estándar combinado de concentración 100 % haciendo 10 inyecciones de cada uno. El criterio de aceptación es que el coeficiente de variación debe ser menor al 2 %.

e) Repetibilidad o precisión del sistema

El grado de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mesurando, realizadas en las mismas condiciones de medición. (Oficina Guatemalteca de Acreditación, 2007, pág. 21).

Esta se realizará haciendo 10 mediciones de una misma muestra en un mismo día, siendo aceptado si tiene un coeficiente de variación menor al 2 %

f) Rango

“Intervalo entre el valor máximo y mínimo de la concentración del analito el parámetro de la muestra, para el cual ha sido demostrado que el nivel de precisión, exactitud y linealidad del método de análisis es adecuado”. (Oficina Guatemalteca de Acreditación, 2007, pág. 13).

El límite inferior del rango es el límite de cuantificación, mientras que el límite superior es aquel valor concentrado que cumpla los valores de linealidad y repetibilidad, por triplicado.

g) Robustez

“Capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método, provee una indicación de su confiabilidad en condiciones de uso normales”. (Oficina Guatemalteca de Acreditación, 2007, pág. 14).

Las variables a determinar son: cambio de flujo y cambio de temperatura. En la primera se prepara un estándar al 100 %, se inyecta por triplicado con flujo de 0,9 mL/minuto, luego se inyecta por triplicado a 1,1 mL/minuto. Para ser aceptado el valor de la desviación relativa entre ambas debe ser menor al 2 %. Para el cambio de temperatura correr el estándar al 100 %, inyectando tres veces, con el horno a

20 °C y a 30 °C. Para ser aceptado el valor de la desviación debe ser menor al 2 %.

(Oficina Guatemalteca de Acreditación, 2007, pág. 24)

IV. Antecedentes

La literatura sobre cromatografía líquida de alta resolución es variada y abundante, en el ámbito internacional, su uso está muy extendido en la industria en general, y es una herramienta primaria en el análisis de fármacos. En Guatemala se han publicado investigaciones sobre algunos trabajos y determinación de analitos en diferentes compuestos, la mayoría son de la facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y constituyen trabajos de tesis.

En el Laboratorio de Producción de Medicamentos (LAPROMED) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia se desarrolló un trabajo de graduación que consistió en validar el método de análisis del clorhidrato de ambroxol en un jarabe, y se determinó que el método cumple con los parámetros propuestos. El método utilizado fue por espectroscopia UV-VIS. (Carranza Díaz, 2010, pág. 4)

Se investigó sobre la cuantificación de cipermetrina presente en pesticidas de uso doméstico de marcas comerciales, donde se evaluó la especificidad, linealidad, precisión, exactitud, sensibilidad y robustez, y se determinó que la precisión del método no es suficiente, aunque sí posee buena linealidad, se concluyó que la metodología no es válida para un rango de cipermetrina de 1,00 mg/mL a 2,100 mg/mL. (Ramazzini, 2008, pág. 4)

En la investigación sobre cuantificación de vitaminas en margarinas, se buscó un método que llenará el vacío sobre la cuantificación simultánea de vitamina A y E en margarinas, y se logró proponer un método para la determinación de vitamina A. (García R. , 2008, pág. 4)

V. Justificación

Las exigencias de los mercados y las buenas prácticas de manufactura para asegurar la calidad de los medicamentos son cada vez mayores. Esta demanda en la calidad, así como la necesidad de optimizar los procesos productivos, han hecho necesario que se dispongan de métodos analíticos rápidos, fiables y a un costo accesible. (OGA, 2004)

Actualmente el desarrollo de métodos analíticos respaldados por suficientes datos de laboratorio así como una estadística bien documentada es una herramienta de competencia de mercado siendo además en muchas ocasiones una obligación que los laboratorios estatales y laboratorios privados deben cumplir.

El ambroxol y clenbuterol son utilizados como mezcla para el tratamiento broncodilatador y mucolítico. También son usados en el tratamiento de enfermedades que provocan cambios en la producción y alteraciones en el transporte de secreciones, asma bronquial, etc. En Guatemala estos medicamentos son producidos por varias empresas farmacéuticas y vendidos dentro del territorio nacional por lo que se hace necesario que se cuente con una metodología adecuada para la cuantificación de ambos agentes activos. En ninguna de las publicaciones recientes de la Farmacopea de Estados Unidos USP, Farmacopea Europea y la Farmacopea Mexicana se cuenta con metodología para cuantificar ambos principios activos en un solo análisis. La información que se encuentra en internet es limitada y no presenta datos concretos, Por lo anterior es necesario encontrar un método el cual permita separar y cuantificar utilizando los parámetros de evaluación de la legislación nacional y que sea de una forma rápida, eficaz y viable. (EP, 2011, p. 1221)(FEUM, 2004, p. 1010).

Las decisiones que se toman en un laboratorio se basan en los datos que se obtienen con un método analítico, de esto la necesidad que los laboratorios demuestren que sus métodos analíticos son confiables. El desarrollo del método así como su análisis estadístico, junto a otras actividades de calidad, permiten mostrar a los laboratorios que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables.

Los métodos que se utilicen en el laboratorio, ya sea procedentes de fuentes bibliográficas o desarrollados en el laboratorio, deben ser evaluados por procesos estadísticos como exactitud, precisión, precisión intermedia, repetibilidad o precisión del sistema, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, rango, especificidad y robustez, estos parámetros se utilizaron según la política OGA-GEC-016 "Política de selección y validación de métodos de ensayo". La estadística es la herramienta principal para soportar el proceso de desarrollo de un método que permitirá tomar decisiones sobre el método. (OGA, 2004).

VI. Objetivos

1. General

Desarrollar un método para la cuantificación de ambroxol y clenbuterol presentes en jarabes para la tos por medio de cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta visible.

2. Específicos

- a) Analizar por medio de cromatografía líquida de alta resolución los principios activos clenbuterol y ambroxol que se encuentran presentes en la preparación farmacéutica jarabe para la tos, evaluadas con la proporción de fase móvil propuesta.
- b) Evaluar el cumplimiento del método propuesto con los parámetros de exactitud, precisión intermedia, repetibilidad o precisión del sistema, linealidad, límite de cuantificación, rango y robustez que indica la Oficina Guatemalteca de Acreditación según la política OGA-GEC-016 .

VII. Hipótesis

La metodología propuesta para la determinación de la concentración de clenbuterol y ambroxol en conjunto, presentes en una preparación farmacéutica de tipo jarabe por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cumple con los parámetros de exactitud, precisión intermedia, repetibilidad o precisión del sistema, linealidad, límite de cuantificación, rango y robustez establecidos por la política OGA-GEC-016.

VIII. Materiales y Métodos

1. Universo

El método propuesto por HPLC para la determinación de concentración de ambroxol y clenbuterol que se le determinará exactitud, precisión intermedia, repetibilidad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, rango y robustez cromatográfica.

2. Muestra

Presentaciones farmacéuticas tipo jarabe conteniendo ambroxol y clenbuterol

3. Recursos

a) Humanos

Autor : José Roy Morales Coronado
Asesores: Lic. Oswaldo Martínez, Lic. Jorge García
Personal de empresa RGH, S.A.

b) Materiales

- **Recursos institucionales**

Empresa RGH, S.A.

- **Instrumentos y equipo**

- Balanza analítica Sartorius (0.0001)
- Equipo de filtración para solventes y filtros de membrana
- Cromatógrafo para Cromatografía Líquida de Alta Resolución HITACHI Lachrom Elite.
- Bomba: HITACHI Lachrom Elite L-2130
- Automuestreador: HITACHI Lachrom EliteL-2200
- Detector: HITACHI modeloLachrom Elite L-2400
- Horno: HITACHI modelo Lachrom Elite L-2350

- Columna: RP-18: puerospher star RP-18 e (5 μ m)
- **Cristalería**
 - Matraz aforado de 10, 50 y 100 mL.
 - Vaso de precipitados de 50, 100 y 250 mL
 - Varilla de vidrio
 - Pipetas volumétricas de 0,5, 1, 2, 3, 5 y 10 mL
 - Viales con septos
- **Reactivos**
 - Acetonitrilo HPLC Isocratico Lichrosolv (Merck)
 - Agua para cromatografía Licrosolv (Merck)
 - Patrón primario clenbuterol 99,5 %
 - Patrón primario ambroxol 99,5
 - Ácido trifluoroacético p.a. (Merck)
 - Fosfato monobásico de potasio p.a. (Merck)

4. Métodos

a) Implementación del método

- **Diseño de investigación:**

La determinación de clenbuterol y ambroxol en una presentación farmacéutica de jarabe por medio de un método desarrollado en el laboratorio corresponde a una investigación experimental de tipo descriptiva, en la que se realizarán las mediciones tanto de patrones primarios de clenbuterol y de ambroxol, así como de estos compuestos en las presentaciones farmacéuticas de jarabe, determinando el grado de adecuación del método. El grado de aceptación se evaluará por medio de distintos parámetros: exactitud, precisión, repetibilidad, linealidad, límite de cuantificación, rango y robustez.

- **Condiciones cromatográficas**

Probar las condiciones cromatográficas que se describen a continuación:

Fase Móvil: Metanol-ácido trifluoroacético (2,8 mM) (70:30) pH= 2,55 columna RP-18: purospher start RP-18 e (5 μ m)

Flujo: 1 mL por minuto

Detector: Ultravioleta a 246 nm

Temperatura del horno: 20,0 °C

(Grzegorz Bazylak & Nagels, 2002)

b) Procedimiento para el análisis cromatográfico

- **Preparación de buffer pH 3:**

Pesar 0,319 g de ácido trifluoroacético, disolver y llevar a 1 L en agua HPLC, concentración 2,8 mM.

- **Preparación de la fase móvil**

Mezclar 30 mL de Buffer pH 3 con 70 mL de metanol HPLC.

TABLA 1 Acondicionamiento de columna

Tiempo	%Metanol HPLC	%Buffer pH 3
0	0	0
10	100	0
20	70	30
50	70	30

Fuente: Elaboración propia.

- **Preparación de soluciones patrón**

- Preparación de estándar de clenbuterol clorhidrato:

Pesar 0,63 mg de estándar de clenbuterol clorhidrato, disolver y llevar a 100 mL con fase móvil.

- Preparación del estándar de ambroxol clorhidrato

Pesar 0,83 mg de estándar de ambroxol clorhidrato, disolver y llevar a 100 mL con fase móvil. (Grzegorz Bazylak & Nagels, 2002, pág. 892)

- **Preparación de estándar combinado:**

Pesar 0,63 mg de estándar de clenbuterol clorhidrato y 0,83 mg de estándar de ambroxol clorhidrato, disolver y llevar a 100 mL con fase móvil.

- Preparación de la muestra
- Disolver 1 mL de muestra y llevar a 10 mL con fase móvil.

c) Evaluación de la metodología

- **Exactitud:**

Obtener la recuperación y la desviación estándar relativa de tres estándares, preparados al 80, 100 y 120 % de concentración, evaluando cada uno por triplicado. La desviación estándar relativa o porcentaje de coeficiente de variación (RDS) de todas las mediciones se obtiene utilizando la siguiente fórmula:

$$\% RSD = \frac{s * 100}{X}$$

Donde "X" es el promedio de todas las mediciones y s es la desviación típica. Luego obtener el promedio de todos los porcentajes de recuperación (R) y someter los datos a una prueba de hipótesis de t de Student, con dos colas y con un nivel de significancia del 5 %. Siendo la hipótesis nula (H0): $\mu = 100 \%$ y la hipótesis alterna (Ha): $\mu \neq 100 \%$.

Los criterios de aceptación serán:

- Porcentaje de recuperación: 96,0 a 104 % (Farmacopea, 2013)
- Según: $t = X_m * \left(\frac{vn}{s}\right)$ Donde t es la prueba de significancia, X_m es la media aritmética, n es el número de determinaciones por muestra y s es la desviación estándar.
- Coeficiente de variación menor a 2,0 % (Farmacopea, 2013).

- **Repetibilidad:**

Realizar 10 mediciones por un mismo analista en un mismo día y evaluar el coeficiente de variación.

Para que el método tenga una repetibilidad aceptable, el coeficiente de variación de las medidas debe ser menor al 2 % (Farmacopea, 2013).

- **Precisión intermedia:**

Realizar el mismo ensayo en las mismas condiciones por dos analistas y preparando un estándar por cada muestra el mismo día.

Preparar un estándar de concentración 100 % e inyectarlo 10 veces.

Criterio de aceptación

Coeficiente de variación (C.V.) menor al 2,0 % entre los resultados de ambos analistas. (Farmacopea, 2013).

Calcularlo de la siguiente manera

$$C.V. = \frac{S}{Xm} * 100 \%$$

Donde C.V. es el coeficiente de variación, S la desviación estándar y Xm la media aritmética

- **Linealidad**

Se preparan cinco soluciones estándar que tengan concentraciones de 80, 90, 100, 110 y 120 ppm de la concentración esperada para las muestras, utilizando fase móvil como solvente.

Hacer tres inyecciones de cada solución. Obtener el área de las inyecciones de cada solución y graficar contra la concentración de cada una, obteniendo así la curva de calibración. Luego determinar la ecuación lineal, y sus componentes: la pendiente y el intercepto de la curva de calibración así como el coeficiente de determinación r^2 mediante un análisis de regresión lineal simple.

Evaluar dos parámetros:

- El valor de r^2 : establece la cantidad de variación en función de la variabilidad total y ese valor debe ser mayor a 0,990 para ser aceptado.
- El análisis de varianza con un nivel de significancia del 5 %, se utiliza para determinar si la ecuación lineal obtenida anteriormente es significativa (Miller, 2002).

Los criterios de aceptación serán:

- El coeficiente de variación menor a 2,0 % (Farmacopea, 2013).
- El coeficiente de determinación mayor a 0,9800.
- Análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 5 %.

- **Límite de cuantificación**

El límite de cuantificación será el nivel inferior de la linealidad.

- **Robustez**

Se escogen dos parámetros principales como el cambio de flujo y cambio en la temperatura de la columna durante el análisis.

Cambio de Flujo: preparar una muestra por triplicado estableciendo el flujo 0,9 mL/min. Hacer tres inyecciones y determinar la concentración promedio y la desviación estándar relativa. Luego cambiar el flujo subiendo este a 1,1 mL/min. Hacer tres inyecciones y determinar la concentración promedio y desviación estándar relativa. Para que el método sea robusto en un cambio

de flujo, la desviación estándar relativa entre las medidas de los dos valores obtenidos debe ser menor al 2 %.

Cambio en la temperatura: preparar una muestra por triplicado estableciendo la temperatura del horno a 20 °C. Hacer tres inyecciones y determinar la concentración promedio y la desviación estándar relativa. Luego cambiar la temperatura del horno subiéndola a 30 °C. Hacer tres inyecciones y determinar la concentración promedio y desviación estándar relativa. Para que el método sea robusto en un cambio de temperatura, la desviación estándar relativa entre las medidas de los dos valores obtenidos debe ser menor al 2 %.

- **Rango**

Para determinar el rango de una metodología primero se determina el límite de cuantificación y este se toma como el inicio del rango del método. Para obtener el límite superior del rango se preparan soluciones de 175, 200, 225, 250 % .

Se inyecta por triplicado cada solución, evaluando la linealidad y repetibilidad de cada solución antes de inyectar la siguiente. El límite superior del rango está dado por la última concentración que cumpla con los requisitos de linealidad y repetibilidad.

IX. Resultados

1. Ruido

TABLA 2 TEST DE RUIDO EN LINEA BASE.

RMS
<50

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

2. Exactitud

TABLA 3 EXACTITUD AMBROXOL

Resumen Ambroxol	Area	% Recuperación
120	62698560	98,36
120	62361825	97,83
120	61193524,2	96,00
100	64938791	101,87
100	63772468	100,04
100	62527717	98,09
80	60708837,5	95,24
80	61441565	96,38
80	61060682,5	95,79
promedio	62300441,1	97,73
RSD	2,2251986	2,2251986

Fuente: experimental Laboratorio RGH.S.A.

TABLA 4 EXACTITUD CLENBUTEROL

Resumen: Ambroxol	Área	%recuperación
120	No detectada	No detectada
120	No detectada	No detectada
120	No detectada	No detectada
100	No detectada	No detectada
100	No detectada	No detectada
100	No detectada	No detectada
80	No detectada	No detectada
80	No detectada	No detectada
80	No detectada	No detectada
promedio	No detectada	-----
RSD	-----	-----

Fuente: experimental Laboratorio RGH.S.A.

3. Repetibilidad o precisión del sistema

TABLA 5 REPETIBILIDAD AMBROXOL

Ambroxol	
Número de inyecciones	10
Media Área del pico	51080270,4
Desviación estandar relativa	1,51 %

Fuente: Experimental Laboratorio RGH, S.A.

TABLA 6: REPETIBILIDAD CLENBUTEROL

Resumen	
Número de inyecciones	10
media Área del pico	ND
Desviación estandar relativa	0

Fuente: Experimental Laboratorio RGH.S.A.

4. Precisión intermedia

TABLA 7: PRECISIÓN INTERMEDIA AMBROXOL:

	Analista uno	Analista dos
Área	66078676	51578894
	65425893	51603404
	66160139	50623338
	65837486	50744075
	66265042	50374689
	66858310	50203234
	67662867	52684570
Promedio	66326916,1	50801047
Desviación estándar	1,10308371	1,737751681
Promedio ambos analistas	58563981,6	
Desviación estándar total	13,5422603	

Fuente: Experimental Laboratorio RGH.S.A.

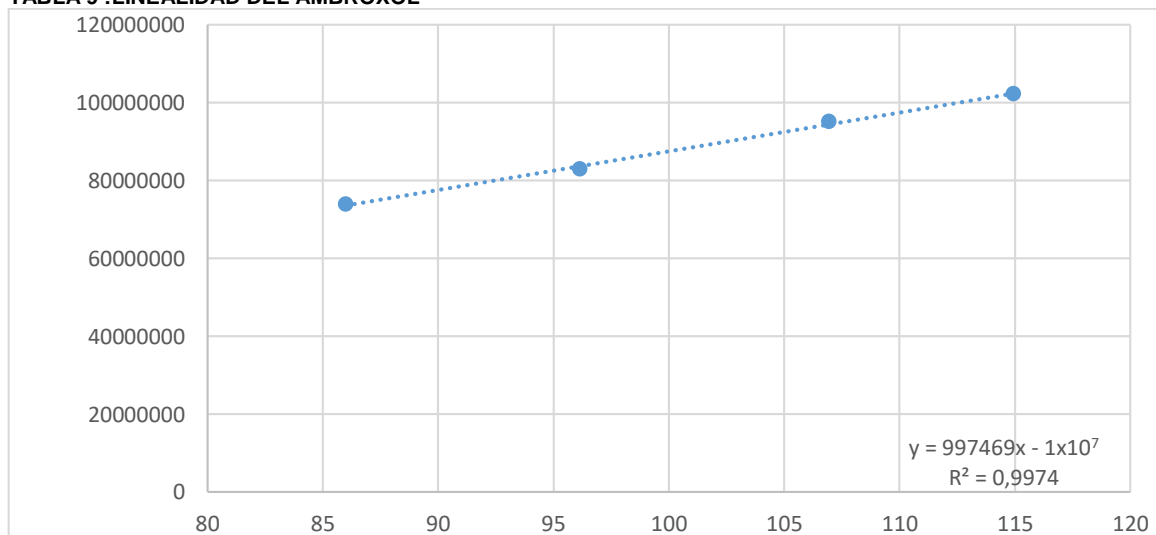
TABLA 8: PRESICIÓN INTERMEDIA

GRUPOS	CUENTA	SUMA	PROMEDIO	VARIANZA
COLUMNA 1	8	53061532	66326916	4,58828 $\times 10^{11}$
COLUMNA 2	8	40861325	51076656	6,80398 $\times 10^{11}$
ANÁLISIS DE VARIANZA				
ORIGEN DE LAS VARIACIONES	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>
ENTRE GRUPOS	9,30282 $\times 10^{14}$	1	9,30282 $\times 10^{14}$	1633,18237 9
DENTRO DE LOS GRUPOS	7,97458 $\times 10^{12}$	14	5,69613 $\times 10^{11}$	
TOTAL	9,38256 $\times 10^{14}$	15		
PROBABILIDAD "P"	<i>Valor crítico para F</i>			
6.73679X10⁻¹⁶	4,600109937			

Fuente: datos experimentales, RGH.S.A.

5. Linealidad

TABLA 9 :LINEALIDAD DEL AMBROXOL



Fuente: datos experimentales, RGH.S.A.

TABLA 10: ESTADISTICA DE LINEALIDAD

Coeficiente de determinación r^2	0,9974
Coeficiente de correlación r	0,98914401
Pendiente	958900
Intercepto	10000000
Valor p	0,001
Error estándar	907031

Fuente: Tabla 10 linealidad.

6. Rango

El rango de aplicación que se tomará será el de la linealidad, es decir del 90% al 120 %

7. Robustez

TABLA 11 ROBUSTEZ PARA CAMBIO DE TEMPERATURA AMBROXOL

promedio área a 20 °C	87460366,67
promedio área a 30 °C	88301582,67
Desviación estandar	0,676858149
Promedio ambas temperaturas	87880974,67

Fuente: Experimental Laboratorio RGH.S.A.

TABLA 12 ROBUSTEZ PARA CAMBIO DE FLUJO AMBROXOL:

promedio flujo 0,9	97808081,33
promedio flujo 1,1	79706158
promedio ambos flujos	88757119,67
desviación estándar	14,42137013

Fuente: Experimental Laboratorio RGH,S.A.

X. Discusión de resultados

Se determinó por medio de preparación de estándares separados que la mejor proporción de la fase móvil a usar debería ser 70 % etanol y 30 % de buffer de ácido trifluoroacético 2,8 mM, con la que se obtuvo buena separación y tiempos de retención aceptables, en una corrida de 10 minutos, luego se utilizó la mezcla de estándares (clenbuterol y ambroxol) para la verificación de la fase móvil, la respuesta de clenbuterol no se pudo observar por lo que se procedió a adicionar clenbuterol, para hacerlo 100 veces más concentrado, hasta 200 ppm para mejorar respuesta en el cromatograma.

La determinación de clenbuterol y ambroxol en jarabes mucolíticos no se pudo hacer debido a que el clenbuterol en los jarabes comerciales no es detectable por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en los parámetros propuestos. Es decir que no se puede decir que la señal dada por el analito clenbuterol se puede distinguir del ruido. Determinando que la metodología empleada no aplica para la cuantificación de clenbuterol.

La longitud de onda del detector se eligió en base al clenbuterol ya que a 246 nm es la mejor señal para respuesta individual al clenbuterol, ya que este se encuentra en menor cantidad en el jarabe. Esta fue además probada con un estándar combinado enriquecido con clenbuterol donde se obtuvo una buena separación.

La cuantificación de ambroxol en jarabe mucolítico por medio de HPLC utilizando la metodología propuesta, es un método no exacto, ya que la desviación estándar de los resultados utilizando concentraciones de +/- 20 % tuvo una desviación estándar de 2,22 %, lo cual sobrepasa el criterio de aceptación propuesto (Farmacopea, 2013). Ver tabla 3 Exactitud Ambroxol.

La cuantificación de ambroxol en jarabe mucolítico por medio de HPLC es repetible, ya que al inyectar 10 veces en iguales condiciones se obtuvo un coeficiente de variación de 1,51 % según se puede ver en la tabla 5 por lo cual es aceptable según los criterios propuestos.

La cuantificación de ambroxol en jarabe mucolítico por medio de HPLC no cumple con el parámetro de precisión intermedia, ya que el coeficiente de variación de ambas medidas hechas por dos analistas diferentes es 13,5 % mucho mayor que el criterio establecido como válido que no debe ser superior al 2 % según se puede ver en la Tabla 7: Precisión Intermedia Ambroxol

El límite inferior de la linealidad fue tomado como límite de cuantificación del ambroxol, siendo este un método lineal desde el 90 % (se desechó el parámetro del 80 % porque al incluirlo el método ya no es lineal) ya que cumple con los criterios

de aceptación propuestos, con un coeficiente de regresión lineal (r^2) de 0,9974 y una probabilidad P de 0,001.

Se decidió utilizar el rango de linealidad para ambroxol en jarabe de 90 % al 120 % como el utilizado en las prueba con estándares.

El método propuesto resultó cumplir con el parámetro para robustez de cambios de temperatura en el horno, ya que al cambiar el flujo en un 10 % (desde 0,9 mL/minuto y a 1,1 mL/minuto), la desviación estándar fue de 0,68 % en áreas, menor al criterio de aceptación, pero el método resultó no ser robusto para el cambio de temperaturas, ya que la desviación estándar fue de 14 % en este caso. Por lo tanto el método no se considera robusto según los criterios evaluados.

Debido a que algunos de los parámetros no pudieron ser cumplidos con la metodología propuesta el método se considera no válido, para cuantificar ambos productos, tampoco se considera válido para la cuantificación individual de ninguno de los dos analitos. La razón principal es la diferencia de concentración en que se encuentran ambos compuestos, además la metodología propuesta no logro una respuesta adecuada para el clenbuterol, por lo que no se considera adecuada para medir concentraciones de clenbuterol menores a 0,24 mg por cada 100 mL (que corresponde al 120 % de concentración)

XI. Conclusiones

1. La metodología propuesta no puede utilizarse como método para la cuantificación de ambroxol y clenbuterol en jarabes para la tos.
2. La metodología propuesta y analizada en el presente trabajo no es adecuada para concentraciones de clenbuterol en jarabe, menores a 0,24 mg/100 mL.
3. La metodología evaluada para ambroxol no cumple con los parámetros de exactitud, precisión intermedia ni robustez.
4. La metodología evaluada para el ambroxol cumple con los parámetros de repetibilidad, linealidad.

XII. Recomendaciones

1. Realizar los ensayos para la cuantificación de ambroxol y clenbuterol por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando detectores más sensibles.
2. Realizar los ensayos para la cuantificación de ambroxol y clenbuterol por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en un equipo y laboratorio que tengan control de temperatura y luz, ya que el clenbuterol es sensible a ambas variables.
3. Realizar la cuantificación por medio de otra técnica analítica, como por ejemplo la cromatografía de gases.

XIII. Bibliografía

- Carranza Díaz, S. P. (2010). Validación del Método analítico de cuantificación para Clorhidrato de ambroxol jarabe en el laboratorio de producción de medicamentos - LAPROMED-. *Tesis de Grado*.
- Ermer, J. (2005). *Method validation in Pharmaceutical Analysis*. Germany: Wiley-VCH.
- Farmacopea. (2013). *Farmacopea de los Estados Unidos de América*. Rockville.
- García, A. J. (2014). *Desarrollo de una nueva metodología para la cuantificación de ibuprofeno, Dextrometofano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y ácido ascórbico presentes en preparaciones farmaceuticas por medio de cromatografía líquida de alta resolución*. Guatemala.
- García, R. (2008). *Validación de un método para a cuantificación simultanea de vitaminas A y E en margarinas por cromatografía líquida de alta resoución*. Guatemala .
- Grzegorz Bazylak, & Nagels, L. (2002). Simultaneous high-throughput determination of clenbuterol, ambroxol and bromhexine in pharmaceutical formulation by HPLC with potentiometric detection. *Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis, Elseiver*.
- María, G. (2010). *Desarrollo y evaluación de estrategias analíticas para la caracterización de compuestos bioactivos en alimentos funcionales*. Granada.
- Miller, N. (2002). *Estadística y quiometría para química anlítica"*. Madrid: Pearson Education.
- Oficina Guatemalteca de Acreditación. (2007). *Política de selección y validación de métodos de ensayo*. Guatemala.
- Ramazzini. (2008). *Validación de un método de cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de cipermetrina presente en pesticidas de uso doméstico de marcas comerciales*. Guatemala.
- Skoog, D., Holler, F., & Nieman, T. (2001). *Principios de análisis intrumental* (quinta ed.). Madrid: McGraw-Hill.
- Skoog, W. H. (1990). *Fundamentos de Química analítica*. México : Thomson 2005.
- Vademécum de Genéricos Intercambiables*. (2008). Mexico DF: Thomson PLM.

Anexo I

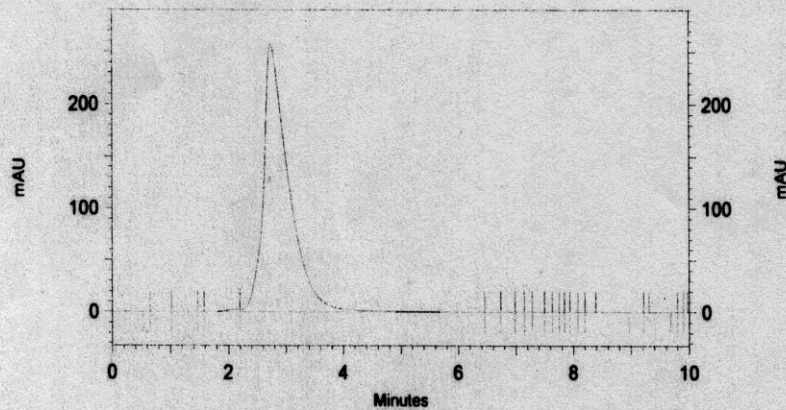
RGH, S.A

Fecha: 15 de febrero de 2016

Trabajo de Tesis: Roy Morales

Método: Determinación de Ambroxol y Clembuterol
Analista: Br. Roy Morales

Cromatograma



Realizado en instalaciones laboratorio RGH, S.A.

Anexo II

RGH, S.A.

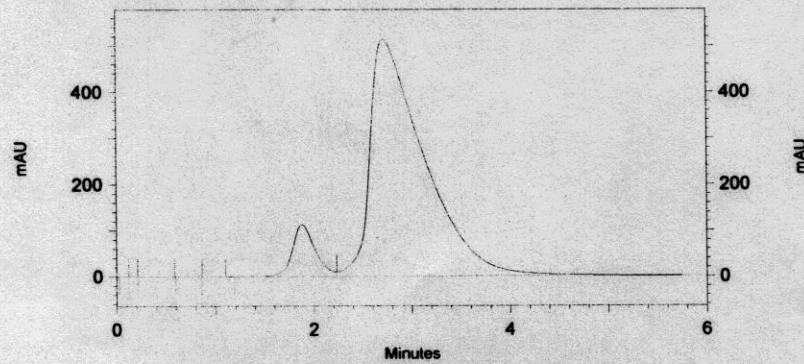
Fecha: 16 de febrero de 2016

Trabajo de Tesis: Roy Morales

Método: Determinación de Ambroxol y Clembuterol

Analista: Roy Morales

Cromatograma



Realizado en instalaciones laboratorio RGH, S.A.

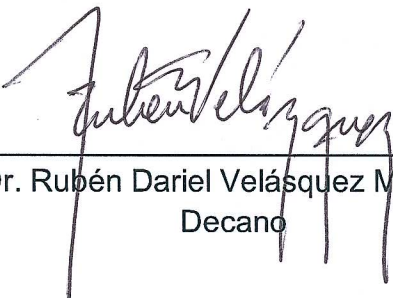

Br José Roy Morales Coronado
Tesista


Lic. Oswaldo Martínez
Asesor


Lic. Jorge García
Asesor


M.A. Irma Nohemí Orozco Godínez
Directora




Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda
Decano