

1182ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



**CARRERAS PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

**“DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO
POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA
RESOLUCION PARA LA DETERMINACION DE
AMBROXOL EN UNA SOLUCION ORAL”**

TRABAJO ESCRITO

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

GLORIA ALICIA VALENCIA VELARDE

MEXICO, D.F., 1995

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente Prof.: GERARDO BAZAN NAVARRETE

Vocal Prof.: MARIA LUISA FLORES GARCIADIEGO

Secretario Prof.: GUILLERMO MOLINA GOMEZ

1er. suplente Prof.: ALEJANDRO LIEDO GALINDO

2do. suplente Prof.: NORMA TRINIDAD GONZALEZ MONZON


SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIOS GROSSMAN, S. A .

ASESOR DEL TEMA:


M. en C. Guillermo Molina Gómez.

SUSTENTANTE:


Gloria Alicia Valencia Velarde.

A tí
Te pedí **TODO**
para disfrutar de la vida,
y me diste **VIDA**
para disfrutar de todo.
Por permitirme existir, ser y crear.
GRACIAS

A la memoria de mí **PADRE**
el único héroe real,
que he conocido.

A mí **MADRE** ...
*"Sí tienes una madre todavía,
da gracias a Dios que te ama tanto
que no todo mortal cantar podría,
dicha tan grande ni placer tan santo".*
MAMA no tengo palabras ...
para agradecer
tantos años de lucha.
GRACIAS por tus oraciones.

Con amor y ternura a mi hija
MA. FERNANDA
MI TROFEO A LA VIDA.
GRACIAS a tí,
sentí a Dios en mi corazón.
GRACIAS por renovarme las fuerzas
para salir adelante.
GRACIAS por ser la esperanza
de un mejor mañana.

A mi "**GRAN FAMILIA**",
A todos y cada uno de ustedes
que han reído y llorado conmigo
mis fracasos y mis triunfos.
Con especial cariño y admiración a
Lucy (mi muñeca), Miguel, Rocío y
(la pequeña) Gaby.
Porque a pesar de todo,
crecieron fuertes.
GRACIAS Hermanos, los amo.

A mi asesor y amigo Guillermo Molina
por su colaboración y apoyo
en la realización de este trabajo.

Con mucho cariño y admiración
a mi Maestra y amiga Tere Reguero
por contribuir en mi formación universitaria.
GRACIAS.

A mis compañeras y amigas del 2 para la 1
Angie, Marcela, Irma y Grace.
Por su compañía, apoyo y bellos recuerdos.
GRACIAS.

A mis compañeros de entonces,
mis amigos de siempre!
Q.F.B Héctor Ocampo
Dr. Rafael Saavedra
Q.F.B Misael González
Q.F.B José Segura
Dr. Félix Huerta
GRACIAS por estar conmigo.

A mi amigo "el Doc" Javier Rovalo,
gracias por escucharme y alentarme
en momentos difíciles
GRACIAS por no dejarme perder la sonrisa.
GRACIAS por creer en mí.

A la memoria del Q.F.B Santiago Maza
Por su amistad y consejos
GRACIAS.

**Con especial cariño,
mi agradecimiento a Raúl Alexander
por tantos años de colaboración y leal amistad,
que me han ayudado a crecer
como persona y profesionalista.
GRACIAS por tu incondicional apoyo.**

**A mis buenos compañeros y amigos
Reyna, Lily y Miguel
quienes me han brindado su valiosa amistad
y me han permitido contar con el apoyo
de sus apreciables familias GRACIAS.**

**A todos aquellos que desinteresadamente
me han brindado su amistad y
me han impulsado a seguir adelante GRACIAS.**

INDICE

I. INTRODUCCION	3
II. GENERALIDADES	4
1. MONOGRAFIA	5
2. CROMATOGRAFIA	13
3. ANALISIS ESTADISTICO	21
3.1 CONCEPTOS	21
3.2 INVESTIGACIONES EXPERIMENTALES	24
(ANALISIS DE VARIANZA)	
4. VALIDACION	27
III. PARTE EXPERIMENTAL	30
1. DESARROLLO DEL METODO	30
2. VALIDACION DEL METODO	35
IV. RESULTADOS	51
V. CONCLUSIONES	61
ANEXO I	64
ANEXO II	66
ANEXO III	68
VI. BIBLIOGRAFIA	95

I INTRODUCCIÓN

La Industria Farmacéutica está especialmente interesada en el desarrollo de nuevos productos, lo que lleva a su vez al desarrollo de métodos analíticos y a la validación de los mismos, es decir, el método debe verificarse para determinar su efectividad.

Existen dos razones importantes para la validación de métodos. La primera y más importante es que la validación del procedimiento es una parte integral del sistema de Control de Calidad de productos que tienen que ver con la salud y que requieren de métodos analíticos apropiados. La segunda razón es que las Prácticas Adecuadas de Manufactura (PAM's) requieren los procedimientos validados.

Así pues, la validación del método puede definirse como el proceso por el cual queda establecido por estudios de laboratorio que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. Por lo tanto debemos realizar un diseño de experimentos que nos permita corroborar que el método a desarrollar queda validado. Así pues, la estadística interviene en la Investigación Experimental como parte integral del método científico y estos métodos invariablemente conducen al empleo de técnicas de la estadística; es aconsejable que los investigadores se familiaricen con las técnicas y conceptos básicos de esta ciencia tan útil, lo que hará más eficientes las investigaciones. Una de las técnicas analíticas que permiten desarrollar métodos confiables y altamente específicos es la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR). Aquí se presenta el desarrollo y validación del método analítico por CLAR para la determinación del Clorhidrato de Ambroxol que se utiliza como expectorante y broncodilatador.

El desarrollo del método se realizó tomando en cuenta las propiedades fisicoquímicas del compuesto y la validación se hizo con la medición de parámetros analíticos, utilizando como herramienta métodos estadísticos con los que se corroboró que el método desarrollado y validado es eficaz como método de control y como método indicador de estabilidad para lo cual fue creado.

II GENERALIDADES

1 MONOGRAFÍA

Nombres químicos

Ambroxol (clorhidrato de)

Trans - 4 - (2 - amino - 3, 5 - dibromobencilamino) ciclohexanol.

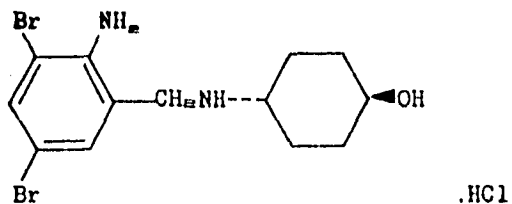
4 - [[[2 - Amino - 3, 5 - dibromofenil) - metil]amino]ciclohexanol.

N - (trans - p - hidroxíciclohexil) - (2 - amino - 3, 5 - dibromobencil)amina.

Sinónimos

N - A 872 Cl, Mucosolvan.

Fórmula desarrollada



Fórmula Molecular

C₁₃ H₁₉ Br₂ Cl N₂O

Peso molecular

414,6

Aspecto

Polvo blanco cristalino, libre de partículas extrañas.

Solubilidad

Ligeramente soluble en cloroformo y agua (1 parte de soluto en 100 a 1000 partes de disolvente), donde las partes de disolvente son aproximadamente de 300 y 250 respectivamente.

Poco soluble en etanol y metanol (1 parte de soluto en 30 a 100 partes de disolvente) aproximadamente 100 y 50 partes de disolvente respectivamente.

Prácticamente insoluble en acetona (1 parte de soluto en más de 10,000 partes de disolvente).

Soluble en ácido acético glacial (1 parte de soluto en 10 a 30 partes de disolvente).

Valor de pH

Este fluctúa de 4 - 6, se determina de la siguiente forma:

Suspender 1. g de la sustancia a examinar en 10 mL de agua destilada, agitar durante 20 minutos, filtrar y medir el pH de la fase acuosa. Realizar la determinación conforme a la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

Punto de fusión

Este se encuentra alrededor de 235°C - 240°C.

Ensayos de Identidad

-Espectro de absorción Infrarrojo:

El espectro de absorción infrarrojo de una dispersión de la muestra en bromuro de potasio (1 mg / 300 mg). Presenta los picos principales o máximos a: 1602, 1031, 1074, 1548, 1122, 857 cm^{-1} .

-Espectro de absorción Ultravioleta:

Preparar una solución de muestra al 0.025% en solución 0.1 N de ácido clorhídrico. Realizar un barrido espectrofotométrico de 360 a 220 nm, usando como blanco solución 0.1 N de ácido clorhídrico. La solución presenta un máximo de absorción a alrededor de 244 nm y su coeficiente de extinción a 244 nm es aproximadamente, 237.

-Cromatografía en capa delgada:

Las condiciones para realizar la cromatografía son las mismas que en ensayo de pureza, sólo que la preparación de la solución prueba y la de comparación son a la misma concentración (al 1% en metanol). Presentando ambas preparaciones el mismo valor de R_f y la misma intensidad de color en la mancha.

Ensayos de Pureza

-Cromatografía en capa delgada:

Solución de prueba: Solución de Ambroxol al 1% en metanol.

Solución de comparación: Soluciones de Ambroxol desde 0.001% hasta 0.01% en metanol.

Placa: Placa preparada de gel de sílice 60 F 254 (Merk).

Eluyente: n-hexano:acetato de etilo:propanol-1:amoníaco conc. (70:20:10:1).

Método: Sin saturación de cámara, a 20°C y bajo humedad atmosférica relativa del 50%.

Tiempo recorrido: Aproximadamente 1 hora.

Cantidad a aplicar: 1 mL de cada una de las soluciones recién preparadas de prueba y de comparación.

Revelado: Luz UV de 254 nm.

Interpretación: A Rf aproximadamente de 0.4 es visible el Ambroxol. Pueden aparecer impurezas con mayor o menor valor Rf, pero su concentración total no deberá ser mayor a 1%.

-Metales pesados:

Plomo y hierro

No debe tener más de 20 ppm.

-Preparación de soluciones:

Solución amortiguadora de acetato:

Disolver 25.0 g de acetato amónico en 25 mL de agua, agregar 38.0 mL de solución al 25% de ácido clorhídrico y ajustar el pH de la solución si es necesario hasta 3.5 (con solución de 2 N de ácido clorhídrico o solución 6 N de hidróxido de amonio). Diluir con agua hasta 100.0 mL.

Solución de sulfuro sódico: Disolver 12.0 g de sulfuro sódico en 25 mL de agua y llevar a 100 mL con glicerina (aprox. al 87 % P/P).

Solución madre de plomo:

Disolver 159.9 mg de nitrato de plomo (II) [Pb(NO₃)₂] en agua y llevar a 100 mL, conservar en frasco ámbar y refrigeración.

Solución estándar de plomo:

Diluir 1.0 mL de solución madre de plomo a 100 mL con agua. Cada mL de esta solución contiene 10 mg de Pb²⁺⁺, esta solución debe prepararse el día de su uso. (Solución R).

Solución de ensayo:

En crisol de porcelana colocar 2 g de la muestra a ser examinada, humedecer con 2 mL de ácido sulfúrico RA, preincinerar (bajo una campana de extracción) con precaución, aumentando lentamente la temperatura hasta 500°C, calcinar a 500°C hasta la aparición de ceniza generalmente blanca, enfriar el crisol y adicionar al residuo 20. mL de ácido nítrico RA y 5 gotas de ácido sulfúrico RA: Quemar con precaución hasta que desaparezcan los vapores blancos. Calcinar totalmente en una mufla a 500°C. Dejar

enfriar, agregar 5 mL de solución amortiguadora de acetato, cubrir el crisol con un vidrio de reloj y digerir en un baño de vapor por 5 minutos, filtrar cuantitativamente en un matraz volumétrico de 20 mL, lavar con 5 mL de solución amortiguadora de acetato enfriar y llevar al volumen con agua. (Solución P).

Procedimiento:

Transferir 10.0 mL de solución P a un tubo de comparación Nessler, agregar 2 gotas de solución de sulfuro sódico. La coloración desarrollada al cabo de 2 minutos no deberá ser más intensa que la de una solución de referencia preparada simultáneamente en la siguiente forma: Transferir 2.0 mL de solución P a un tubo de comparación Nessler, agregar 5.0 mL de solución amortiguadora de acetato, 1.0 mL de solución R, 2.0 mL de agua y 2 gotas de solución de sulfuro sódico.

-Contenido de agua (Karl Fisher):

No debe ser más de 1.0%.

Pesar alrededor de 1.0 g de muestra. Realizar la determinación conforme a la referencia número (5).

-Pérdida por secado:

No debe ser más del 1.0%.

Pesar con exactitud aproximadamente 1.0 g de sustancia y secar a 105°C a una presión de 10 mbar, hasta peso constante. Proceder como se indica en la referencia número (5).

-Residuo de la ignición:

En un crisol de porcelana que está a peso constante pesar con exactitud, aproximadamente 1.0 de sustancia, agregar 2.0 mL de ácido sulfúrico RA. quemar con precaución bajo una campana hasta que los vapores blancos desaparezcan, incinerar en una mufla a 800°C hasta peso constante.

Estabilidad

La muestra es estable en solución acuosa a temperatura ambiente.

Valoración

-Valoración potenciométrica con ácido perclórico:

Pesar con exactitud aproximadamente 150 - 200 mg de sustancia y disolver en 2 mL de ácido fórmico, agregar 40 mL de ácido acético glacial y 40 mL de anhídrido acético. Valorar con solución 0.1 N de ácido perclórico (en ácido acético glacial). Preparar un blanco de determinación y hacer la corrección necesaria. Cada mL de solución de 0.1 N de ácido perclórico es equivalente a 41.46 mg de Ambroxol.

Cálculos:

La relación usada es:

$$\% \text{ de Ambroxol} = (x-y) * F * 41.46 * 100 / \text{peso de la muestra (mg)}.$$

-Valoración potenciométrica con nitrato de plata:

Pesar con exactitud alrededor de 150 - 200 mg de sustancia, disolver en 200 mL de agua con adición de 2 gotas de ácido nítrico concentrado y se valora con solución de nitrato de plata 0.1 N. Se determina además el consumo de la prueba en blanco.

$$\% \text{ de Ambroxol} = (x-y) * F * 41.46 * 100 / \text{peso de la muestra (mg)}$$

Donde:

x = consumo de la prueba (mL)

y = consumo de la prueba en blanco (mL)

F = factor de la solución de ácido perclórico

Farmacodinamia

Estimula al sistema lisosomal de las células productoras de moco, mejorando así la función respiratoria en los procesos agudos y crónicos que cursan con retención de secreciones y broncospasmo, ya que facilita la limpieza bronquial al fluidificar las secreciones viscosas y adherentes al tiempo que incrementa la frecuencia vibratoria del epitelio ciliar. Por su efecto broncodilatador altamente selectivo, suprime el broncospasmo, los estertores y la disnea.

Farmacocinética

La absorción es buena después de la administración oral, pero sufre considerable metabolismo por efecto del primer paso, incluyendo conjugación con ácido glucurónico o sulfato. El Ambroxol, es un metabolito activo del bromhexine. Alrededor del 70% de una dosis oral, es excretado en orina en 24 horas como metabolito y menor que el 1% como fármaco libre.

Usos

Es recomendado en todo tipo de procesos broncopulmonares que cursan con aumento de la viscosidad y adherencia del moco, en los que es necesario mantener libre de secreciones el aparato respiratorio: bronquitis aguda, bronquitis crónica, bronquitis asmático, bronquitis espasmódica, asma bronquial, rinitis, sinusitis, otitis media, neumonías, bronconeumonía, atelectasia por obstrucción mucosa traqueostomía y pre y postoperatorio, particularmente en cirugía geriátrica. Proteinosis alveolar, fibrosis quística, silicosis, enfermedad de la membrana hialina.

Toxicidad

A la fecha no se han reportado casos de intoxicación en el ser humano. No presenta efectos adversos en mucosa gástrica.

Dosis

Presentación:

Solución en frasco de 100 mL, que contiene 0.3 g de clorhidrato de ambroxol.

Adultos:

Los dos o tres primeros días del tratamiento, 2 cucharaditas (10 mL) tres veces por día, luego 1 cucharadita (5 mL) tres veces por día.

Niños mayores de 5 años:

Una cucharadita (5 mL), dos a tres veces por día.

Niños de 2 a 5 años:

Media cucharadita (2.5 mL), tres veces por día.

Niños hasta 2 años:

Media cucharadita (2.5 mL), dos veces al día.

2 CROMATOGRAFÍA

La cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases: una de ellas es la fase estacionaria, mientras la otra se mueve por percolación a través de ésta llamada fase móvil.

Los procesos cromatográficos tienen lugar como resultado de repetidas adsorciones y desorciones durante el movimiento de los componentes de la muestra a lo largo de la fase estacionaria, alcanzándose la separación gracias a las diferencias en los coeficientes de distribución de los distintos componentes de la muestra.

Se utiliza fase estacionaria como término general para denominar cualquiera de las diferentes formas en que puede usarse, puede estar empaquetada en una columna, extendida en forma de capa, etcétera. La fase móvil puede ser gaseosa o líquida. En la cromatografía gaseosa la fase móvil es un gas, mientras en la cromatografía líquida, que es la que nos ocupa es un líquido.

Existen muchas maneras de clasificar la cromatografía líquida en columna. Basándose en la naturaleza de la fase estacionaria en los procesos de separación pueden enumerarse cuatro tipos:

Cromatografía de adsorción.- La fase estacionaria es adsorbente, la separación se basa en repetidas etapas de adsorción-desorción.

Cromatografía de partición.- La separación no se basa en adsorción sino en la verdadera partición entre la fase móvil y la fase estacionaria.

Cromatografía de intercambio iónico.- La fase estacionaria tiene una superficie cargada iónicamente, con carga contraria a la de la muestra. Esta técnica se usa casi exclusivamente con muestras iónicas o ionizables. Cuanto mayor sea la carga de la muestra, más fuertemente será atraída hacia la superficie iónica y, por tanto, más tiempo tardará en ser eluida. A la fase móvil se le añade un contra-ión como son las sales sódicas de los ácidos penta, hexa y heptansulfónico y el ión perclorato para separa cationes y bases y para separa aniones y ácido el ion tetraalquilamonio. El pH y la polaridad se utilizan para controlar el tiempo de elución.

El empaque más utilizado en la cromatografía de par iónico es el de fase enlazada con grupo terminal de octadecilsilano con tamaño de partícula pequeño (5 micras).

Cromatografía de exclusión.- Se rellena la columna con un material que posea poros de dimensiones comprendidas entre ciertos límites, con lo que la muestra es retenida o filtrada según sea su tamaño molecular.

En la cromatografía de exclusión las moléculas de soluto se separan según su tamaño real en el disolvente contenido tanto en los poros de las partículas del empaque (gel), como en los espacios intersticiales que existen entre dichas partículas; eluyendo primero las de mayor tamaño y quedando retenidas durante un tiempo más prolongado aquellas que sí penetran en los poros.

En cuanto a los dos primeros tipos, no siempre puede asegurarse cual de los procesos implicados (adsorción o reparto) desempeña el papel más importante. Por esta razón, en la práctica se definen dos o más tipos, según sea la polaridad relativa de las dos fases: Cromatografía en fase normal y cromatografía en fase inversa.

En la cromatografía en fase normal, la fase estacionaria es de naturaleza fuertemente polar y la fase móvil el apolar. Entre los empaques utilizados están: el gel de sílice y las fases enlazadas con grupos terminales de ciano y amino.

La cromatografía en fase inversa es exactamente a la inversa. La fase estacionaria es de naturaleza apolar, mientras la fase móvil es un líquido polar. Los empaques utilizados son de fases enlazadas con grupos terminales amino, ciano, fenilo y cadenas alquílicas de 8 y 18 C son los que se emplean con mayor frecuencia. Algunas veces se puede modificar la fase móvil para ajustar su polaridad. En fase normal, puede hacerse por adición de una sustancia más polar, en tanto que en fase inversa el aditivo será una sustancia menos polar.

La cromatografía líquida en columna es el método cromatográfico más antiguo, y a su evolución han contribuido científicos de varios países, dando como resultado la cromatografía líquida moderna, mejor conocida actualmente como Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), que en inglés conocemos como HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

Al igual que toda técnica analítica la CLAR tiene ventajas y desventajas que son:

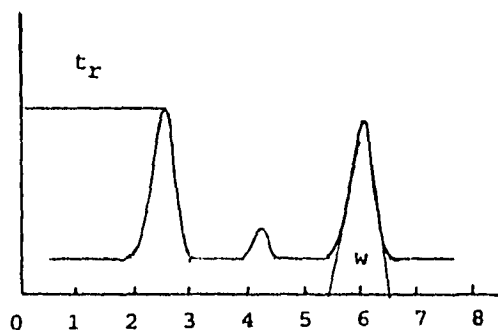
Ventajas	Desventajas
-Velocidad de análisis	-Costo del equipo
-Alta resolución	-Costo de operación
-Resultados cuantitativos	-Costo de mantenimiento
-Buena sensibilidad	-Experiencia indispensable
-Automatización	
-Amplia aplicación	

El Proceso Cromatográfico

Existen tres formas de desarrollar el proceso:

- Elución
- análisis frontal
- desplazamiento.

El método que se usa con mayor frecuencia en estos tipos de cromatografía (gases o líquidos) es la elución. En este caso se introduce una porción pequeña de la muestra a la fase móvil, gas o líquido, la muestra viaja a través de la columna. Los componentes dentro de la columna comienzan a separarse unos de otros en diferentes bandas. Finalmente las bandas eluyen al final de la columna y son medidas por un detector. En la siguiente figura se muestra un cromatograma de elución:



t_r = tiempo de retención
 w = amplitud de la banda

Hay dos constantes que describen la distribución de un componente de la muestra, entre las fases estacionaria y móvil, el coeficiente de partición o distribución (K), que relaciona la concentración de la muestra (x) en las dos fases:

$$K = \frac{\text{Concentración en la fase estacionaria}}{\text{Concentración en la fase móvil}} = \frac{(X)_s}{(X)_m}$$

Y la relación de partición o distribución (K'), conocida como factor de capacidad es un término más conveniente porque representa la relación de cantidad o moles de la muestra (M) en las dos fases. Se define como:

$$K' = \frac{\text{Cantidad en la fase estacionaria}}{\text{Cantidad en la fase móvil}} = \frac{M_s}{M_m}$$

K' se puede relacionar fácilmente con K, puesto que la cantidad es igual a la concentración por el volumen. K' puede ser escrita:

$$K' = \frac{(X)_s V_s}{(X)_m V_m} \quad \text{ó} \quad K' = K \frac{V_s}{V_m}$$

La relación de partición es característica para una columna dada, ya que se incluyen los volúmenes de la fase.

La calidad de una separación viene caracterizada por la resolución Rs entre 2 sustancias de una mezcla, que se puede calcular a partir de los tiempos de retención t_R y la anchura de los picos W medida en la base entre las tangentes del punto de inflexión:

$$R_s = \frac{2(t'_{R2} - t'_{R1})}{W_2 + W_1}$$

El número de platos teóricos N es una medida de la eficiencia de la columna, indica la importancia relativa de los fenómenos que provocan la dispersión de la banda respecto a la retención del compuesto. Algunos factores que afecta a N: el tamaño de la partícula, la distribución del tamaño de la partícula, la forma de dichas partículas. El número de platos teóricos se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$N = 16 \left(\frac{t'_R}{W} \right)^2$$

La altura del plato teórico (H) se calcula como sigue:

$$H = \frac{L}{N} = \frac{L \left(\frac{W}{t'_R} \right)^2}{16}$$

donde L= longitud de la columna

El número de platos teóricos es inversamente proporcional a la altura del plato:

$$N = \frac{L}{H}$$

Y está relacionado con el número de platos efectivos (N_{eff}) a través de los factores de capacidad (K').

$$N_{\text{eff}} = \left[\frac{K'}{K' + 1} \right] \cdot N$$

También relacionado por el tiempo de retención reducido por medio de la siguiente expresión:

$$N_{\text{eff}} = 16 \left(\frac{T_R'}{W} \right)^2$$

A partir de las magnitudes alfa, K' y N se puede deducir una ecuación fundamental cuantitativa para la resolución R_s . Esta relación es de tipo general y vale para cualquier técnica cromatográfica. Sirve como fundamento para la elección de los sistemas de separación:

$$R_s = \frac{1}{4} \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] \left[\frac{K'}{K + 1} \right] \cdot (N_2)^{\frac{1}{2}}$$

1 2 3

donde N_2 = número de platos teóricos para el 2º componente.

Esta ecuación expresa la resolución en términos de selectividad (1), capacidad o retención (2), y de la eficiencia de la columna (3).

Para lograr los mejores resultados de los sistemas cromatográficos, es importante elegir la forma correcta para el desarrollo del análisis. Ver la tabla número 1 del anexo número 2 que se puede emplear para tal fin.

Descripción del equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

El equipo consta de las siguientes partes:

- Depósito de la fase móvil
- Bomba de presión
- Inyector automático o manual
- Columna
- Detector
- Registrador y procesador de datos (computadora)

La columna es la parte del cromatógrafo que más nos interesa, puesto que la resolución de los picos en un sistema cromatográfico está determinada por la separación lograda en la columna.

La fase estacionaria debe ser térmicamente estable y químicamente inerte con la fase móvil y los solutos. La velocidad de separación depende de gran parte del empaque de la columna.

Los requerimientos para los materiales de empaque de las columnas empleadas en Cromatografía de Líquidos incluyen:

- a. Gran superficie de contacto
- b. Una capa fina de adsorbente uniformemente distribuida
- c. Superficie con estructura de fácil acceso para la fase móvil
- d. Estabilidad
- e. Dificultad para ser comprimidos con presiones altas
- f. Dificultad para ser desequilibrados por velocidades de flujo altas.

Los materiales de relleno de columnas pueden ser básicamente de tres tipos:

- a. Gel de sílice
- b. Geles de sílice químicamente modificados en la superficie con grupos orgánicos diferentes y por lo tanto con comportamiento de selectividad específica
- c. Óxido de aluminio

Existen diferentes tipos de adsorbentes en los que las partículas del material de relleno puede ser irregular o esférico, totalmente poroso o superficialmente poroso. El tamaño de partículas puede variar de 5 a 15 micras, lo cual es importante, ya que de ello depende el área de contacto.

Los geles de sílice químicamente modificados en la superficie se encuentran unidos con grupos funcionales C18, fenil, amino y ciano.

Existen empaques especiales para análisis de carbohidratos, triglicéridos y ácidos grasos.

Para cromatografía de intercambio iónico existen columnas con fases unidas que permiten intercambio de aniones, cationes y aniones débiles.

Las columnas pueden tener diferentes longitudes y diámetros, dependiendo de su aplicación. Ver la tabla número 2 en el anexo No. 2, donde muestran algunos rellenos de columnas y sus aplicaciones.

Elección de la fase móvil

Los valores de K' para los solutos se controlan generalmente cambiando la fuerza del eluyente de la fase móvil, o bien variando la fase estacionaria. La combinación de la fase móvil y estacionaria controlan el rango total de los valores de K' del soluto para un sistema particular de Cromatografía de Líquidos.

La fase móvil se puede variar sistemáticamente para optimizar los factores de separación.

Otro factor que hay que tomar en cuenta es la selectividad del disolvente, la cual está dada por sus características químicas (momento dipolo, aceptores o donadores de electrones). La fuerza del disolvente es controlada mediante un P' (polaridad de Snyder). El valor de P' varía entre 2 y 10,2, entre mayor sea este valor, mayor será la polaridad del disolvente.

3 ANALISIS ESTADISTICO

En nuestra sociedad, el progreso puede medirse mediante diversos índices numéricos, los cuales no podríamos describir e interpretar si no es con ayuda de la Estadística. Como Instrumento en la toma de decisiones, la cual desempeña un papel importante en áreas tales como la investigación y el desarrollo, y sirve como guía y control de una amplia variedad de campos.

Dentro de la Industria Farmacéutica tanto ésta, como el gobierno participan en el desarrollo, prueba y certificación de ensayos, concenientes a la seguridad y efectividad de sus productos. Puesto que las situaciones en que hay que tomar decisiones complejas requieren casi siempre de algún tipo de análisis estadístico, nunca se insistirá lo suficiente en la importancia que tiene la estadística inferencial, para el tomador de decisiones.

Así pues, una definición de estadística: es la colección, manejo y representación de los datos, de los cuales se obtendrán inferencias de la población original, comprendiendo la incertidumbre (probabilidad) y la variabilidad de los mismo.

3.1 CONCEPTOS

En los problemas de inferencia estadística, el conjunto de todos los valores en consideración, suele llamarse población o universo. En general, cualquier conjunto de datos cuantificables puede llamarse población si ese conjunto de datos está constituido por todos los valores de interés; y se llama muestra al subconjunto (representativo) de datos de una población.

Para tener información acerca de una población y así tomar una decisión, se requiere de ciertas características numéricas llamadas parámetros poblacionales o simplemente parámetros, los cuales describen propiedades específicas de la población. Puesto que con frecuencia es imposible la determinación del valor exacto de los parámetros de población, las características de una población dada, suele juzgarse observando una muestra representativa de la misma. Las características numéricas de las muestras se llaman estadísticas muestrales o estimadores de los parámetros que describen la población.

Existen tres tipos de medidas para la caracterización de datos:

- Medidas de Tendencia Central
- Medidas de Dispersión
- Medidas de Relación o Asociación

Las medidas de tendencia central son importantes porque la información numérica que nos proporciona, indica la posición central de los datos, esto puede referirse a la media, a la mediana o a la moda, que se definen como:

Moda.- El valor que aparece un mayor número de veces o en forma equivalente, como el punto correspondiente al valor con mayor frecuencia de ocurrir en la característica que se está midiendo.

Mediana.- Es el valor central en un conjunto de valores ordenados según su magnitud.

Media aritmética o promedio.- Se obtiene de la suma de todos los valores considerados, dividida entre el número total de valores de un conjunto.

Las medidas de tendencia central no proporcionan, suficiente información para una adecuada descripción de los datos, porque no toman en cuenta la variabilidad o dispersión. Por ello existen varias formas de medir la dispersión, tomando en cuenta que un buen índice de dispersión requiere ser independiente de la media de los datos y además considerar todas las observaciones.

Las medidas de dispersión más generales son:

La varianza.- Que considera el promedio de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media, y nos sirve para medir la variabilidad de un conjunto de datos. Para describir la variabilidad, en vez de, (o conjuntamente con), la varianza se usa con frecuencia la raíz cuadrada de la varianza, llamada desviación estándar (DE). La cual es por lo general, más conveniente que la varianza para interpretar la variabilidad de un conjunto de datos, ya que está expresada en las mismas unidades que los datos originales.

Coefficiente de Variación (CV):- Se define por la desviación estándar de la muestra, expresada como porcentaje de la media muestral, que nos permite la comparación de grupos que tienen distintas unidades.

Regresión y Correlación:- Frecuentemente en una investigación estamos interesados en estudiar la relación entre dos variables; la naturaleza y grado de relación de las variables puede ser analizada por dos técnicas: Regresión y Correlación. El análisis de regresión es útil para determinar la forma probable de la relación entre las variables (la ecuación que relaciona ambas variables) cuando hay un fenómeno de causa y efecto. El objetivo principal es el de predecir o estimar el valor de una variable (dependiente (Y)) correspondiente al valor dado de la otra variable (independiente (X)). Por lo tanto, debe emplearse el análisis de regresión en situaciones experimentales en las cuales el investigador señala valores a una variable independiente.

El análisis de correlación, por otra parte, consiste en la medición del grado o intensidad de asociación entre los dos variables sin importar cual es causa y cual es efecto. Cuando se puede demostrar que la variación de una variable está de algún modo asociada con la variación de otra, entonces se puede decir que las dos variables están correlacionadas. Una correlación puede ser positiva (cuando al aumentar una variable la otra también aumenta) o negativa (cuando al aumentar una variable la otra disminuye).

3.2 DISEÑO DE INVESTIGACIONES EXPERIMENTALES

INTRODUCCIÓN.- Actualmente podemos decir que una de las personas que ha hecho contribuciones numerosas e importantes a la estadística, además de crear un innovador uso de los métodos estadísticos en Diseños y Análisis Experimentales, fue Sir R. A. Fisher (1890-1962), quien desarrolló el análisis de varianza como método de análisis estadístico inicial en el diseño experimental.

El propósito de cualquier diseño experimental es proporcionar una cantidad máxima de información perteneciente a un problema bajo investigación, la cual debe ser lo más eficientemente posible. Esto es, deberá hacerse todo esfuerzo posible para ahorrar tiempo, dinero, personal y material experimental. Y debe ser tan simple como sea posible.

Metodología

Cuando se hace un diseño de experimentación, en realidad se habla de una investigación estadística, la cual deberá pasar por las siguientes etapas:

- *Planeación
- *Ejecución
- *Evaluación

Planeación.- Se plantean los objetivos, hipótesis y justificación de la investigación, así como los alcances de ésta y el universo de estudio, debiendo señalarse los procedimientos de captación, de elaboración y análisis de la información, seleccionando un posible diseño y un esbozo del informe final.

Ejecución.- Está determinado por el objetivo del experimento, los recursos, la institución y personas que lo vayan a realizar. En esta etapa deberá llevarse a cabo todo lo planeado en la etapa anterior. Sin embargo, como lo planeado suele tener variaciones experimentales, es necesario vigilar ésta para poder dar una selección adecuada y a tiempo solucionar los posibles imprevistos.

Evaluación.- Durante el desarrollo de la investigación debe irse captando información que permita decidir si se está obteniendo un rendimiento razonable de los recursos, y

al final se debe establecer en qué medida se lograron los objetivos de la investigación, y saber cuáles fueron las fallas, para evitarlas, así como los detalles no tomados en cuenta en la planeación para un diseño posterior.

CONCEPTOS BÁSICOS DE EXPERIMENTACIÓN

Es importante conocer los conceptos relacionados con la medición puesto que la finalidad al diseñar un experimento es medir alguna característica de interés.

Tratamiento. Conjunto de condiciones particulares que se aplican a una unidad experimental (equivale a un nivel de factor o combinación de niveles de factores).

Nivel de factor.- Número de valores que toma cada factor bajo estudio.

Factor.- Variable independiente cuyo efecto deseamos conocer o estudiar.

Efecto.- Respuesta del sistema producido por el factor.

Unidad Experimental.- (u. e.) Unidad a la que se aplica un solo tratamiento que consta de uno o más factores. La unidad puede estar formada de uno o más elementos que reciben el tratamiento.

Error Experimental.- Es el fracaso de llegar a resultados idénticos con dos o más u.e. tratadas idénticamente.

Interacción.- Efecto adicional como producto de la influencia combinada de dos o más factores.

Aleatoriedad.- Para asegurar en los modelos o diseños, que los errores en las observaciones están distribuidos sin predilección, es necesario asignar los tratamientos al azar a las u.e. cada vez que se repita el experimento.

Agrupamiento.- Distribución de u.e. homogéneas en grupos a los cuales se les someterá a un solo tratamiento.

Balance.- Distribución de agrupamientos y asignación del tratamiento a las u.e. de manera que el diseño obtenido tenga la configuración balanceada de acuerdo con el número de elementos.

Control Local.- Se refiere a la cantidad de agrupamiento y balance que se aplica sobre las u.e. con la finalidad de hacer el diseño lo más sensible para distinguir cualquier diferencia estadística o significancia.

Modelos Lineales Estadísticos.- Forma simbólica de representar un diseño experimental con características aleatorias que se pueda analizar con métodos estadísticos.

Se considera que la población (conjunto de mediciones), tendrá ciertas características que dependen de los factores constantes y su variabilidad depende de los factores no constantes. La suposición de Fisher, fue que las poblaciones en la mayoría de los casos sigue distribuciones normales donde la media depende de las condiciones constantes y que la varianza depende de las condiciones no constantes.

Así que el experimento es entonces:

1. La selección de variantes bajo estudio.
2. La toma de muestra de las poblaciones.
3. Los cuidados durante una población controlada de las muestras.
4. El análisis estadístico de los resultados para contrastar las preguntas básicas de los experimentos.

ANÁLISIS DE VARIANZA

Las circunstancias hacen necesario diseñar un experimento de tal forma que varias variables o poblaciones puedan estudiarse simultáneamente. Así, hemos visto que es necesario un método más eficiente para comparar las poblaciones. El análisis de varianza (ANDEVA) es el método que necesitamos. El análisis de varianza (ANDEVA) se puede definir como una técnica mediante la cual la variación total presente un conjunto de datos se divide en varios componentes, cada una de las cuales tiene asociada una fuente de variación específica, de manera que en el análisis es posible conocer la magnitud de las contribuciones de cada fuente de variación a la variación total.

4 VALIDACIÓN

El primer objetivo en la Industria Farmacéutica es el de garantizar que los productos que fabrica cumplan con los requisitos de calidad, al menor costo posible; de ahí que el concepto de validación ha tomado gran importancia en la elaboración de medicamentos, ya que ha venido a unir el área productiva con control de calidad.

Existen varias definiciones de validación y todas ellas son operantes debido a que manejan el mismo concepto; una de ellas es:

La validación es una forma de comprobar la efectividad y reproducibilidad de una técnica, operación o proceso.

Otra definición más sencilla es:

Se dice que un proceso, técnica u operación está validado cuando se tiene bajo control.

Son varias las razones por lo que la validación es importante; por mencionar algunas, tenemos que:

1. Por ética profesional.- Tenemos el compromiso moral de fabricar productos de calidad para el sector Salud, pues en nuestras manos está la salud de muchos.
2. Para reducir costos.- Porque el validar es asegurar la calidad a un costo más bajo.
3. Por principios de Aseguramiento de Calidad.
 - 3.1 La calidad, seguridad y efectividad deben diseñarse y construirse en el proceso.
 - 3.2 La calidad no puede ser inspeccionada o analizada en el producto terminado.
 - 3.3 Cada paso del proceso de manufactura debe estar bajo control, para tener la máxima probabilidad de que el producto terminado cumpla con todas las especificaciones de calidad y diseño. Es decir, se debe contar con unas Prácticas Adecuadas de Manufactura.
4. Para establecer una Regulación Sanitaria al respecto.- En los Estados Unidos el gobierno exige que todos los procesos farmacéuticos sean validados. Un requerimiento similar existe en otros países y ahora en México se empieza a oficializar dichos principios y esto dio origen a la creación de un Comité que se ha encargado de redactar Guías Generales de Validación.

Este Comité de Validación fue creado por la Ley General de Insumos para la Salud en colaboración con el Instituto Mexicano del Seguro Social, la Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica, la Asociación Farmacéutica Mexicana y los Expertos Profesionales Nacionales reconocidos por sus trabajos en el área. Debido a que este Comité es de carácter oficial y tiene alta representatividad industrial y gremial, los conceptos mencionados en las Guías Generales de Validación pueden ser usados como marco de referencia para validar procesos de manufactura.

La validación la podemos dividir en:

Validación Retrospectiva

Validación Prospectiva



Validación Retrospectiva.- Es la evidencia documentada, basada en los datos acumulados de producción, análisis y control de que un producto ya en distribución está siendo fabricado con efectividad.

Validación Prospectiva.- Es la evidencia documentada que demuestra, a través de un plan experimental, que las operaciones cumplen consistentemente con el objetivo de su existencia.

Sistema de Revalidación.- Debido a que la validación de un proceso no le da carácter de perpetuidad se deberá contar con un sistema de Aseguramiento de Calidad, el cual advierta la necesidad de una revalidación cada vez que ocurran cambios en la formulación, empaque, manufactura o equipo que pudieran afectar las características del producto. La magnitud de la revalidación dependerá de la naturaleza de los cambios y cómo impactarán en cada una de las etapas de producción que se han calificado.

La validación prospectiva de un proceso requiere de la calificación de cada uno de sus elementos principales y la importancia de éstos resulta relativa de un proceso a otro.

Algunos de estos elementos son:

1. Métodos analíticos.
2. Calibración de Instrumentos.
3. Servicios.
4. Personal.
5. Materias primas y material de empaque
6. Equipo
7. Instalaciones
8. Fases de fabricación
9. Diseño de producto.

En nuestro caso fue la validación de un método analítico. En el laboratorio, los métodos y procedimientos analíticos constituyen el proceso que debe ser controlado. La validación garantiza que la metodología empleada logre producir los mejores resultados analíticos en cada caso específico. Para ello, todas las variables del método deben considerarse como son: especificidad, exactitud, linealidad, precisión, reproducibilidad, repetibilidad, tolerancia y estabilidad de la muestra.

III. PARTE EXPERIMENTAL

1 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

I. Reactivos

- Metanol de alta pureza con especificaciones para cromatografía de líquidos.
- Agua de alta pureza con especificaciones para cromatografía de líquidos.
- Solución de ácido acético al 1%
- AMBROXOL, sustancia de referencia o estándar de trabajo

II. Equipo y Material

- Cartucho radial de 10 cm de longitud y 8 mm de diámetro interno empacado con octadecilsilano, con un tamaño de partícula de 10 micras (Waters o equivalente).
- Cromatógrafo de líquido Waters, equipado con:
 - Módulo de compresión radial.
 - Inyector automático (Waters WISP Mod. 712 o equivalente).
 - Bomba Programable.
 - Detector de UV 254 nm 0.05 U:A: (Waters Mod. 490 o equivalente).
 - Matraces volumétricos de 100 mL
 - Pipetas volumétricas de 1 y 10 mL
 - Sistema de microfiltración para disolventes, membranas:
 - Millipore tipo HVHP 04700 de 0.45 μm para disolventes orgánicos.
 - Millipore tipo HAFT 04700 de 0.45 μm para disolventes acuosos.
 - Baño de ultrasonido.

III. Preparación de Soluciones

1. Solución de referencia (Sol. A).- Transferir alrededor de 30 mg de ambroxol, sustancia de referencia o estándar de trabajo pesados con exactitud, a un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 30 mL de agua. Colocarlo en baño de ultrasonido por 3 minutos, llevar al volumen con agua grado y mezclar bien. Transferir 10 mL exactamente medidos de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100 mL y llevar al volumen con agua (conc. \pm 0.03 mg/mL).

2. Solución Problema.- Realizar por duplicado (Sols. B1 y B2). Transferir 1 mL de la muestra a un matraz volumétrico de 100 mL llevar al volumen con agua y mezclar bien. (conc. \pm 0.03 mg/mL).

IV. Condiciones del equipo

Columna: Cartucho radialpak *m*-Bondapak C18 de 10 cm de longitud x 8 mm d.i.

Fase Móvil: Metanol: solución al 1% de ácido acético (50:50), filtrada y desgasificada

Velocidad de flujo: 1.5 mL por minuto.

Volumen de inyección: 20 mL. Detector: UV 254 nm/0.05 UA

Tiempo de corrida: 10 minutos

V. Procedimiento

1. Equilibrar el equipo a las condiciones de operación hasta obtener una línea base estable.

2. Hacer inyecciones por duplicado de la solución de referencia y del problema, soluciones A, B1 y B2 respectivamente.

3. Una vez concluido el análisis, lavar la bomba y la columna de la siguiente manera:

3.1 Pasar 100 mL de agua previamente filtrada y desgasificada a flujo de 1 mL/min.

3.2 Pasar 100 mL de una mezcla metanol: agua (60:40) previamente filtrada y desgasificada a flujo de 1 mL/min.

VI. Cálculos

Con las áreas o alturas de los picos obtenidos calcular contenido.

$$\text{mg ambroxol / ml} = \frac{A_p}{A_s} \times \frac{P_a}{100} \times \frac{10}{100} \times \frac{100}{1}$$

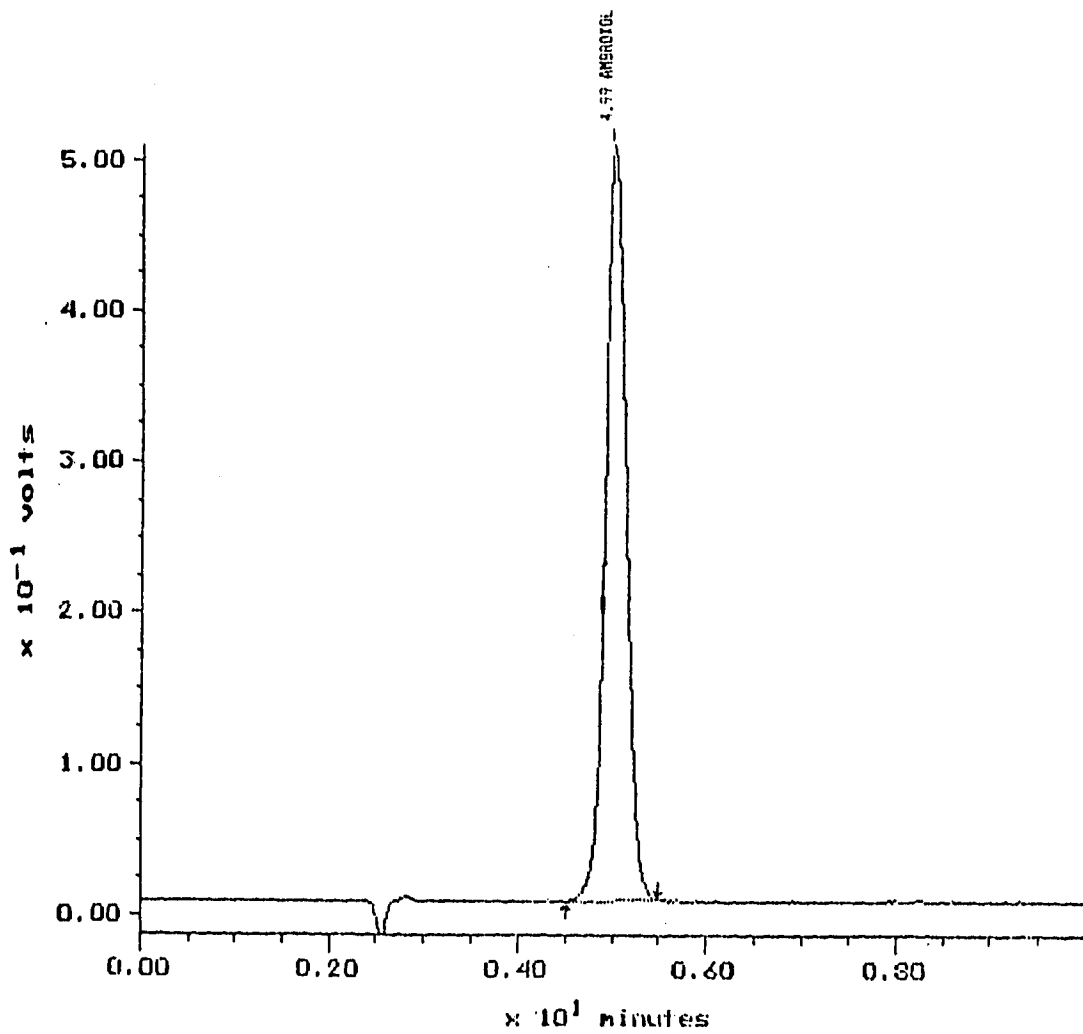
donde:

A_p = Área o altura del pico de ambroxol en la solución problema.

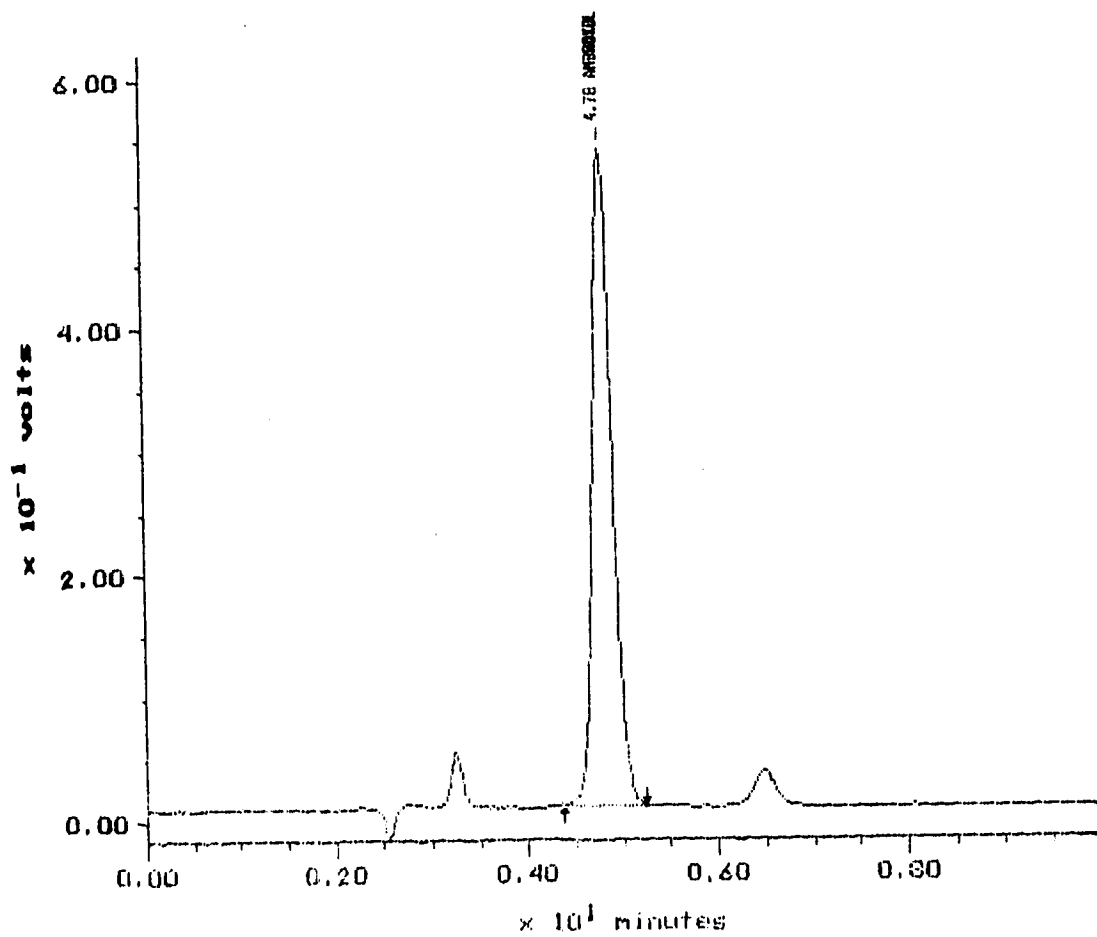
A_s = Área o altura del pico de ambroxol en la solución de referencia

P_a = Peso de la sustancia de referencia de ambroxol en mg.

Los cromatogramas que se presentan a continuación son de una solución de referencia y de una muestra problema:



CROMATOGRAMA DE LA SOLUCION DE REFERENCIA DEL CLORHIDRATO DE AMBROXOL.



CROMATOGRAMA DE MUESTRA PROBLEMA (PRODUCTO TERMINADO).

2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

El método a validar es para aplicar en control de calidad y como indicador de estabilidad, por lo que se realizó con la determinación de los siguientes parámetros analíticos:

- 1) Linearidad y precisión del sistema
- 2) Exactitud y repetibilidad al 100%
- 3) Linearidad del método
- 4) Exactitud del método
- 5) Precisión (Reproducibilidad) del método
- 6) Especificidad del método
(Control de calidad y estabilidad)
- 7) Estabilidad de la muestra

Ver el glosario de términos que se encuentra en el anexo 1.

Definiciones

Linearidad. La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

Intervalo. El intervalo de un método analítico, está definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles de concentración superior e inferior de la sustancia (Incluyendo estos niveles), en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

Exactitud. La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a los que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

Precisión. La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a

diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación. La precisión es una medida del grado de repetibilidad y/o reproducibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

a) Repetibilidad. Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (tiempo analista, aparato, laboratorio, etc.).

b) Reproducibilidad. Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos).

Especificidad. Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

Tolerancia. La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas, tipos de empaque (soporte, fase estacionaria, etc.), sistemas de elución, con diciones ambientales, etc.

Estabilidad de la muestra. Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

Linealidad del Sistema

Se determina, construyendo una curva de calibración (concentración vs. respuesta medida) utilizando cuando menos 5 diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo análisis cuando menos por duplicado para cada dilución.

El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método, para control de calidad y de seguimiento de la estabilidad de un fármaco en una forma farmacéutica, donde deberá estar incluida la concentración seleccionada como 100%. Se considera 100% como la concentración de la muestra en la solución final a analizar, que proporciona la respuesta adecuada dependiendo del método de cuantificación.

Criterio:

$$CV \leq 1.5\%$$

$$r \geq 0.99, r^2 \geq 0.98$$

1) Tabular los resultados en base al siguiente formato:

Concentración de la dilución de la dilución de la solución patrón (x).	El área del pico en cromatogramas es la propiedad medida (y).
---	--

x1	y11, y12.....y1n
x2	y21, y22.....y2n
.	
.	
.	
xt	yt1, yt2.....ytn

t= número de diluciones

n= número de replicaciones (propiedad medida) de cada dilución de la solución patrón.

2) Cálculos preliminares

Se correlaciona la concentración de la dilución de la solución patrón vs. la propiedad medida, obteniendo los siguientes resultados:

m = pendiente

b = intercepto

r = coeficiente de correlación

r^2 = coeficiente de determinación

3) Cálculos preliminares para el coeficiente de variación.

3.1 Calcular para cada punto de la linealidad del sistema el siguiente factor:

$$F = y/x$$

3.2 Calcular la suma de factores (ΣF), la suma de cuadrados de factores (ΣF^2) y la media del factor $\bar{F} = \frac{\Sigma F}{N}$

4. Cálculos finales para el coeficiente de variación:

$$DE = \left[\frac{N(\Sigma F^2) - (\Sigma F)^2}{N(N-1)} \right]^{\frac{1}{2}} \quad CV = \left(\frac{DE}{\bar{F}} \right) \times 100$$

Precisión del sistema

Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema.

Criterio: $CV \leq 1.5 \%$

Linealidad del método

Se determina con placebos adicionados del principio activo (placebos cargados), cada uno de manera independiente, cuando menos a tres diferentes concentraciones, incluyendo el 100%, haciendo los análisis por triplicado de cada concentración.

Las concentraciones de los placebos cargados deben ser las adecuadas para que utilizando el método propuesto, las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema. La amplitud del estudio dependerá del uso y de las aplicaciones del método (control de calidad, estudios de estabilidad, etc.) y deberá llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

Criterio: cantidad adicionada vs. cantidad recuperada:

$$m \cong 1, b \cong 0, r^2 \geq 0.98$$

Para métodos cromatográficos: Los porcentajes recuperados y los CV a cada nivel y los globales de todo el intervalo de la linealidad deben ser:

$$\text{Promedio de recobro} = 98-102\%$$

$$\text{CV} \leq 2\%$$

NOTA.- En métodos cromatográficos este criterio puede variar dependiendo de la forma farmacéutica, de la muestra o de la concentración, como es el caso de los semisólidos y suspensiones donde el intervalo expresado en el promedio de recobro se amplía en 1% y el CV \leq 3%.

1) Tabular los datos en base al siguiente formato:

Placebo cargado con el principio activo.	Concentración obtenida usando el método propuesto.
Cantidad adicionada (x).	Cantidad recuperada (y).
x11, x12,.....x1n	y11, y12,.....y1n
x21, x22,.....x2n	y21, y22,.....y2n
x31, x32,.....x3n	y31, y32,.....y3n
xt-1.....xtn	yt-1.....yt-n

l = número de cantidades adicionadas (concentraciones conocidas)

n = número de replicaciones (cantidad recuperada) por cada cantidad adicionada.

Para proceder a los siguientes cálculos, es necesario que el número de cantidades recuperadas (replicaciones) de cada cantidad adicionada sean equivalentes.

2) Cálculos preliminares:

Correlacionar la cantidad adicionada (x) vs. la cantidad recuperada (y) y obtener m , b y r^2 .

3) Cálculos preliminares para el coeficiente de variación.

3.1 Calcular el porcentaje recuperado (R) para cada cantidad recuperada, con la siguiente ecuación:

$$R = [y/x]100$$

3.2 Calcular la desviación estándar del porcentaje de recobro y el coeficiente de variación.

$$\bar{R} = \frac{(\Sigma R)}{N} \quad DE = \left[\frac{N (\Sigma R^2) - (\Sigma R)^2}{N (N-1)} \right]^{\frac{1}{2}} \quad CV = \left(\frac{DE}{\bar{R}} \right) \times 100$$

Exactitud y repetibilidad al 100%.

Se determina de, cuando menos, 6 placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100%, utilizando el método propuesto. Haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

Criterio para métodos cromatográficos:

Promedio de recobro = 98-102%

CV ≤ 2%.

1) Tabular los resultados del porcentaje recuperado (R), con base al siguiente formato:

R1, R2, R3 ,..., RN

2) Cálculos preliminares:

$$\bar{R} = \frac{(\Sigma R)}{N} \quad DE = \left[\frac{N (\Sigma R^2) - (\Sigma R)^2}{N (N-1)} \right]^{\frac{1}{2}}$$

3) Cálculos finales:

Coefficiente de variación

$$CV = \left(\frac{DE}{\bar{R}} \right) \times 100$$

Precisión (reproducibilidad)

Se determina de una muestra homogénea del producto cercana al 100% de la concentración teórica, analizada cuando menos por 2 analistas, en 2 días diferentes y por triplicado.

Criterio: para métodos cromatográficos.

El CV total debe ser $\leq 2\%$.

Notas:

1.- Dependiendo de la naturaleza de la muestra, el CV puede incrementarse.

2.- Si se requiere(n) establecer la(s) fuente(s) de variación del método (lo cual no constituye un requisito mínimo dentro de la validación). Se necesita una prueba estadística adicional para la prueba de precisión específicamente de la REPRODUCIBILIDAD.

En este caso se evalúo el efecto del analista sobre el método en diferentes días, se está observando el comportamiento del método con dos factores fundamentales.

Un método es Reproducible en cuanto a los factores que se analizan y no en otros.

Para el caso particular del análisis de 2 analistas en 2 días diferentes y con 3 replicaciones cada uno, se realiza en análisis de varianza que se describe a continuación:

El modelo hipotético que representa este caso es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \delta_{j(i)} + \epsilon_{k(ij)}$$

donde:

Y_{ijk} = el ensayo de la sustancia de interés (ambroxol), de la i ésima muestra analizada, por el j ésimo analista, en el k ésimo día.

μ = media poblacional del ensayo de la sustancia de interés (ambroxol), de la muestra.

α_i = efecto del analista en el ensayo

(donde $i = 1 \dots a$).

$\delta_{j(i)}$ = efecto del día anidado en el analista

(donde $j = 1 \dots d$).

$\epsilon_{k(ij)}$ = error del método analítico

(donde $k = 1 \dots r$).

a = número de analistas (donde $a = 2$)

d = número de días (donde d = 2)

r = número de replicaciones (donde r = 3)

El siguiente procedimiento únicamente es aplicable cuando se utilicen 2 días, 2 analistas y 3 determinaciones.

Cuando se utilicen un número distinto de días y/o analistas y/o recobros por analista y día, se sugiere se consulte a un estadístico.

1. Tabular los resultados con base en el siguiente formato:

ANALISTA		
	1	2
D I A	1	Y 211 Y 212 Y 213
	2	Y 221 Y 222 Y 223

2. Cálculos preliminares

y... = y 111 + y 112 + y 113 + y 121 + y 122 + y 123 + y 211 + y 212 + y 213 + y 221 + y 222 + y 223.

Calcular:

$$\bar{Y} = \frac{Y_{...}}{N} \quad DE = \left[\frac{N(\sum Y^2) - (Y_{...})^2}{N(N-t)} \right]^{\frac{1}{2}}$$

donde N = número total de determinaciones (en este caso son 12 determinaciones)

3. Cálculos finales

Coefficiente de variación total.

$$CV = \left[\frac{DE}{\bar{Y}} \right] \times 100$$

4. Para establecer las fuentes de variación del método se realizaron los siguientes cálculos (ver nota 2 pág.42):

Cálculos preliminares:

4.1 Calcular la suma de las combinaciones analista - día

(y_{ij.})

$$y_{11.} = y_{111} + y_{112} + y_{113}$$

$$y_{12.} = y_{121} + y_{122} + y_{123}$$

$$y_{21.} = y_{211} + y_{212} + y_{213}$$

$$y_{22.} = y_{221} + y_{222} + y_{223}$$

4.2 Calcular la suma para cada analista (y_{i..}):

$$y_{1..} = y_{111} + y_{112} + y_{113} + y_{121} + y_{122} + y_{123}$$

$$y_{2..} = y_{211} + y_{212} + y_{213} + y_{221} + y_{222} + y_{223}$$

4.3 Calcular la suma del cuadrado de cada analista en cada día:

$$\sum \sum y_{ij.}^2 = (y_{11.})^2 + (y_{12.})^2 + (y_{21.})^2 + (y_{22.})^2$$

4.4 Calcular las sumas del cuadrado de cada analista en los dos días:

$$\sum y_{i..}^2 = (y_{1..})^2 + (y_{2..})^2$$

4.5 Calcular la suma de cada dato elevado al cuadrado:

$$\sum \sum \sum y_{ijk}^2 = (y_{111})^2 + (y_{112})^2 + (y_{113})^2 + \dots + (y_{221})^2 + (y_{222})^2 + (y_{223})^2$$

4.6 Calcular la suma de cuadrados del analista (SCa), efecto del factor analista, con la siguiente fórmula:

$$SCa = \left(\frac{\sum Y^2_{i..}}{dr} \right) - \left[\frac{Y^2_{...}}{adr} \right]$$

4.7 Calcular la suma de cuadrados del día anidado en el analista (SCd), con la siguiente fórmula:

$$SCd = \left(\frac{\sum \sum Y^2_{ij.}}{r} \right) - \left[\frac{\sum Y^2_{i..}}{dr} \right]$$

4.8 Calcular la suma de cuadrados del error (SCe) con la siguiente fórmula:

$$SCe = (\sum\sum\sum Y^2_{ijk}) - \left[\frac{\sum\sum Y^2_{ij.}}{r} \right]$$

Cálculos finales:

Para verificar la hipótesis correspondiente, calcular la tabla de análisis de varianza (ANAEVA):

fuelle de variacion	grados de libertad	suma de cuadrados	media de cuadrados	F cal
analista (α)	$gla=a-1$	SCa	$MCa=SCa/gla$	Fa
dia (δ)	$gld=(d-1)a$	SCd	$MCd=SCd/gld$	Fd
error (E)	$gle=(r-1)ad$	SCE	$MCE=SCE/gle$	

Donde:

$$Fa = MCa / MCd$$

$$Fd = MCd / MCE$$

Ft = son valores teóricos de la forma :

$$F1 = F(gla,gld), 0.05 \quad \text{y/o} \quad F3 = F(gla,gld), 0.01$$

$$F2 = F(gld,gle), 0.05 \quad \text{y/o} \quad F4 = F(gld,gle), 0.01$$

HIPOTESIS

1) Ho : No importa el efecto del analista en un día determinado

VS

Ha: Si importa el efecto del analista en un día determinado.

2) H_0 : El efecto del día de acuerdo al analista es el mismo, es decir, es reproducible el análisis de acuerdo al día por un mismo analista.

VS

H_a : El análisis no es reproducible de acuerdo al día que se realiza por un mismo analista.

Interpretación de resultados:

1) Criterio de rechazo de la hipótesis 1)

Si $F_a \geq F_t$ El método analítico es reproducible por los analistas.

2) Criterio de rechazo de la hipótesis 2)

Si $F_d \geq F_t$ El método analítico no es reproducible en distintos días por un mismo analista.

Especificidad del método

Con el método propuesto :

1. Analizar placebos del producto (para control de calidad y estabildades).
2. Identificar la respuesta del activo, y si procede, de los excipientes y/o de otras sustancias presentes (para control de calidad y estabildades).
3. En caso de contar con los posibles productos de degradación, preparar muestras con placebo "añadido" de éstos y la sustancia de interés y analizar con el método propuesto.

Si no se cuenta con los productos de degradación, es necesario degradar la muestra bajo diferentes condiciones (para indicadores de estabilidad).

En este caso específico, el placebo y la muestra se expusieron en 4 condiciones diferentes y en diferentes envases que son las siguientes:

Condición	Período	Envases
1) Luz blanca	30 días	plástico y vidrio
2) Luz U.V.	30 días	plástico y vidrio
3) 45 °C	30 días	plástico y vidrio
4) 60 °C	30 días	plástico y vidrio

Con el método propuesto se analizaron muestras de clorhidrato de ambroxol materia prima lote R-40940-020 sometida a las siguientes condiciones: Temperatura ambiente, 37° , 45 ° y humedad relativa durante 3 meses, con la finalidad de evaluar si la materia prima no pierde potencia y/o presenta productos de degradación.

Criterio:

Confirmar que el método desarrollado es capaz de cuantificar la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes.

Tolerancia

La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas, sistemas de elución, tipos de empaque (soporte, fase estacionaria, etc.), condiciones ambientales, etc.

Con el objeto de determinar como afectan en los tiempos de retención del clorhidrato de ambroxol las modificaciones en los parámetros cromatográficos, se trabajo modificando el sistema de elución, es decir la fase móvil en su componente orgánico, el metanol se modifico en $\pm 5\%$ de las condiciones originales.

Fase 1: Original ácido acético al 1% : metanol
(50:50)

Fase 2: + 5% de metanol ácido acético al 1% : metanol
(45:55)

Fase 3: - 5% de metanol ácido acético al 1% : metanol
(55:45)

Con el método propuesto se trabajo con una muestra del lote 2JP231 T.A/15meses.

Estabilidad de la muestra analítica

Se analizaron muestras del producto y se mantuvieron éstas ya preparadas a temperatura ambiente y en refrigeración a 5 °C durante 24 hrs, transcurrido el tiempo se volvieron a analizar, los resultados obtenidos se trabajaron de la siguiente forma:

1. Tabular los resultados con base al siguiente formato y calcular los resultados indicados:

Concentración	Temperatura ambiente y refrigeración/ 24 hrs.			
Inicial	Concentración por cada Condición/tiempo			
	1	2	m
Y1	Y4	Y7	Yn-2
Y2	Y5	Y8	Yn-1
Y3	Y6	Y9	Yn

2. Cálculos preliminares para el intervalo de confianza:

Media	Y0	Y1	Y2	Ym
Varianza	S ² 0	S ² 1	S ² 2	S ² m

Calcular la varianza ponderada para cada condición por tiempo:

$$S^2_{PI} = \frac{2s_0^2 + 2s_1^2}{2(C + 1)}$$

3. Cálculos finales para el intervalo de confianza para cada condición por tiempo:

$$IC = (\overline{Y}_1 - \overline{Y}_0) \pm t^*(rk) [S_{pi}^2 (\frac{2}{3})]^{\frac{1}{2}}$$

donde :

t^* (r_k) = valor de la t de Dunnett con c comparaciones y $r_k=2(c+1)$ grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975.

4. Cálculos preliminares para el coeficiente de variación:

para cada condición/tiempo/muestra, calcular el factor I con la siguiente fórmula:

$$I = \frac{(\text{análisis muestra / condición / tiempo})}{(\text{análisis inicial } i)} \times 100$$

Para cada condición/tiempo, calcular la media del factor I con la siguiente fórmula:

$$\bar{I} = \frac{\sum I \left(\frac{\text{condición}}{\text{tiempo}} \right)}{N}$$

donde :

N = número de muestras por cada condición/tiempo

Criterio:

Para métodos cromatográficos la media del factor (I) debe ser: 98-102 %

IV RESULTADOS

Linealidad del Sistema

1) Tabla de resultados

Concentración en mg/ml (x)	VS	(análisis por duplicado) área del pico (y)	
.0151		205974	207809
.0227		305418	306284
.0302		413061	410789
.0378		514169	518764
.0453		616539	613798

2) Cálculos preliminares

$$m = 123.4056$$

$$b = 13604807.9$$

$$r = 0.9998$$

$$r^2 = 0.9996$$

3) Cálculos preliminares para el CV

$$\bar{F} = 13611597.46$$

4) Cálculos finales para el CV

$$DE = 96214.93$$

$$CV = 0.7068 \%$$

DICTAMEN: Como se encontro que se cumple con los siguientes parámetros:

$$CV \leq 1.5 \% , \quad r \geq 0.99 , \quad r^2 \geq 0.98$$

Se aprueba la linealidad del sistema.

Precisión del sistema

1) Tabla de resultados

410063, 411516, 411028, 411526, 412892, 412235

2) Cálculos preliminares

$$\bar{Y} = 411543.33$$

$$DE = 975.224$$

3) Cálculos finales

$$CV = 0.237 \%$$

DICTAMEN:

Se encontro cumple con el parámetro: $CV \leq 1.5 \%$

Lo que indica que nuestro sistema es preciso.

Linealidad del método

1) Tabla de resultados

<u>cantidad adicionada</u> (x)	<u>(análisis por triplicado)</u> <u>cantidad recuperada</u> (y)		
2.284 2.284 2.284	2.2507	2.2507	2.2936
2.971 2.971 2.971	3.0102	3.0105	3.0127
3.714 3.714 3.714	3.7763	3.7455	3.7824

2) Correlacionar (x) VS (y)

$$m = -0.1263$$

$$b = 1.05063$$

$$r = 0.99953$$

$$r^2 = 0.99906$$

3) Cálculos preliminares para el CV

3.1 Porcentaje recuperado (R) para cada cantidad recuperada

98.54	98.54	100.42
101.31	101.32	101.4
101.67	100.84	101.84

$$\bar{R} = 100.653$$

3.2 Calcular DE del porcentaje de recobro

$$DE = 1.269$$

4) Cálculos finales

$$CV = 1.2613 \%$$

DICTAMEN

Los resultados obtenidos cumplen con los siguientes parámetros:

Cantidad adicionada vs. Cantidad recuperada:

$$m \cong 1, b \cong 0, r^2 \geq 0.98$$

Para métodos cromatográficos:

Los porcentajes recuperados y los CV a cada nivel y los globales de todo el intervalo de la linealidad deben ser:

Promedio de recobro = 98-102%

$$CV \leq 2\%$$

Lo que nos indica que nuestro método es lineal, en el rango de concentraciones probadas.

Exactitud y repetibilidad al 100 %

1) Tabla de resultados (porcentaje recuperado R):

101.31, 101.32, 101.4, 101.14, 101.94, 101.53

2) Cálculos preliminares para el CV

$$\bar{R} = 101.44$$

$$DE = 0.2764$$

3) Cálculos finales

$$CV = 0.2724 \%$$

DICTAMEN

Se cumplió con los siguientes parámetros:

Promedio de recobro = 98-102%

CV ≤ 2%.

Lo que indica que el método es exacto.

Precisión (reproducibilidad)

1) Tabla de resultados

ANALISTA		
	1	2
D I A	1	97.41
		98.21
		99.15
2	100.17	96.94
	98.06	99.03
	97.98	98.83

2) Cálculos preliminares para el CV

$$y_{...} = 1190.536$$

$$y = 99.2113$$

$$DE = 1.68013$$

3) Cálculos finales

$$CV = 1.6935 \%$$

4) Cálculos preliminares para establecer las fuentes de variación del método.

4.1 Suma de combinaciones analista-día

$$y_{11..} = 304.76$$

$$y_{12..} = 296.212$$

$$y_{21..} = 294.77$$

$$y_{22..} = 294.794$$

4.2 Suma para cada analista ($y_{i..}$):

$$y_{1..} = 600.972$$

$$y_{2..} = 589.564$$

4.3 Suma del cuadrado de cada analista en cada día:

$$\sum \sum y^2_{ij..} = 354413.0618$$

4.4 Sumas del cuadrado de cada analista en los dos días:

$$\sum y^2_{i..} = 708753.0549$$

4.5 Suma de cada dato elevado al cuadrado:

$$\sum \sum \sum y^4_{ijk} = 118145.7149$$

4.6 Suma de cuadrados del analista (SCa), efecto del factor analista:

$$SCa = 10.8452$$

4.7 Suma de cuadrados del día anidado en el analista (SCd):

$$SCd = 12.1781$$

4.8 Suma de cuadrados del error (SCe):

$$SCe = 8.0276$$

Cálculos finales

Tabla de análisis de varianza (ANAEVA):

Fuente de variación	grados de libertad	suma de cuadrados	media de cuadrados	F cal
analista (α)	gla= 1	10.8452	10.8452	Fa
dia (δ)	gld= 2	12.1781	6.08905	Fd
error (E)	gle= 8	8.0276	1.00345	

Donde:

$$Fa = 1.7811 \text{ y } F1 = 18.51 \text{ , } F3 = 98.50$$

$$Fd = 6.06812 \text{ y } F2 = 4.46 \text{ , } F4 = 8.65$$

DICTAMEN

Interpretación de resultados:

Fa < F1 No importa el efecto del analista en un día determinado con una alta significancia,

Fd \geq F2 No es reproducible de acuerdo al día con una posibilidad de equivocarse de 5 en 100 veces.

Solo es significativa la verificación estadística, según el día el analista hace mejor su trabajo.

Especificidad del método

Resultados analíticos de la muestra, y el placebo sometidos a diferentes condiciones y en diferentes envases. Y resultados de materia prima sometida a diferentes condiciones en un periodo de 3 meses.

1) Resultados de la muestra:

Condición	Período	Frasco de plástico.	Frasco de vidrio ambar.	Frasco de vidrio transparente.
Luz blanca	30 días	99.0 %		97.92 %
Luz U.V.	30 días	98.5 %	98.3 %	97.5 %
A 45°C	30 días	99.3 %	100.15 %	
A 60°C	30 días	98.98%	94.15 %	

Aspecto de la muestra: Para cualquier condición, cumple con las especificaciones.

Criterio de especificaciones:

Solución incolora o ligeramente amarillenta transparente, sabor dulce ligeramente picante y aroma a frambuesa, libre de de partículas extrañas.

2) Resultados del placebo:

Se pudo comprobar con el método desarrollado, que no existen productos de degradación y/o sustancias relacionadas que interfieran con la cuantificación del ambroxol.

Aspecto del placebo: Para cualquier condición, cumplen con las especificaciones.

Ver cromatogramas para todos los casos en el anexo 3 páginas 68 a 85. .

3) Resultados de la materia prima:

Utilizando una sustancia de referencia, se cuantifico la materia prima obteniendo los siguientes resultados:

- 1) T A /3 meses = 100.34%
- 2) 37°C/3 meses = 99.06%
- 3) 45°C/3 meses = 101.28%
- 4) H.R./3 meses = 101.25%

En ninguna de las muestras de materia prima se observó interferencia o productos de degradación.

Ver cromatogramas en el anexo 3 páginas 88 a 91.

Tolerancia

Se evaluo la reproducibilidad del pico en forma y el tiempo de retención con respecto al pico obtenido con la fase móvil original obteniendo los siguientes resultados:

	Tiempo de retención	forma de pico
Fase 1	4.58 min	normal
Fase 2	3.91 min	normal
Fase 3	5.60 min	normal

Ver cromatogramas en el anexo 3 páginas 92 a 94.

Estabilidad de la muestra analítica

1) Tabla de resultados para cada condición:

Análisis Inicial	Temperatura ambiente a 24 hrs
97.41 %	98.07 %
98.21 %	98.23 %
99.15 %	99.29 %

Análisis Inicial	Refrigeración a 5°C a 24 hrs
96.94 %	98.2 %
99.03 %	97.45 %
98.83 %	97.42 %

2) Cálculos preliminares para el intervalo de confianza

Parámetros	Análisis Inicial	Temperatura ambiente a 24 hrs
X	98.256	98.53
DE	0.8709	0.5414
S ²	0.7585	0.2931

Parámetros	Análisis Inicial	Refrigeración a 5°C a 24 hrs
X	98.265	97.78
DE	1.154	0.384
S ²	0.3317	0.1467

Varianza ponderada para cada condición/tiempo

Temperatura ambiente/ 24 hrs.

$$S^2_{p1} = 0.3505$$

Refrigeración a 5°C / 24 hrs.

$$S^2_{p2} = 0.4928$$

3) Cálculos finales para el IC para cada condición/tiempo

Temperatura ambiente/ 24 hrs.

$$IC = -0.7285 \text{ a } 2.0365$$

Refrigeración a 5°C / 24 hrs.

$$IC = -2.1239 \text{ a } 1.1547$$

4) Cálculos preliminares para el CV

Factor I para temperatura ambiente / 24 hrs

$$I_1 = 100.67$$

$$I_2 = 100.02$$

$$I_3 = 100.14$$

$$I = 100.28$$

Factor I para refrigeración / 24 hrs

$$I_1 = 101.303$$

$$I_2 = 98.407$$

$$I_3 = 98.57$$

$$I = 99.427$$

DICTAMEN: La muestra es estable, cumple con el parámetro

$$I = 98 - 102 \%$$

Los cromatogramas se muestran en el anexo 3 páginas 86 y 87 .

V CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos con los diferentes parámetros calificados, en la validación del método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para la determinación del Clorhidrato de Ambroxol queda establecido, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas para el cual fue diseñado.

Presentación de criterios y resultados

Linealidad del sistema

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado
CV	$\leq 1.5\%$	0.7068%
r	0.99	0.9998
r	0.98	0.9996

Presición del sistema

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado
CV	$\leq 1.5\%$	0.237%

Linealidad del método

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado
m	aprox. 1	-0.1263
b	aprox. 0	1.063
r	0.98	0.9906
% de recobro	98-102 %	100.653 %
CV	$\leq 2\%$	1.2613 %

Exactitud y Repetibilidad al 100%

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado
X	98 - 102 %	101.44 %
CV	$\leq 2\%$	0.27 %

Presición (Reproducibilidad)

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado
CV	≤ 2 %	1.6935 %

Especificidad

Criterios

1. Confirmar que el método desarrollado es capaz de cuantificar la sustancia de interés, sin que exista interferencia de otras sustancias presentes.

Dictamen: Cumple

2. Verificar que los productos de degradación y/o sustancias relacionadas, no interfieran con la cuantificación de la sustancia de interés utilizando el método desarrollado.

Dictamen: Cumple

Por lo tanto, el método propuesto para Clorhidrato de Ambroxol, se considera específico y puede ser utilizado como indicativo de estabilidad.

Tolerancia

Se considera que el método analítico propuesto es tolerante; a la modificación de la fase móvil en su componente orgánico (metanol), pues no hay alteraciones significativas en la forma del pico; ni en el tiempo de retención de la sustancia de interés.

Estabilidad de la muestra

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado
	Temperatura ambiente/ 24 h.	
IC	Incluye el cero	-0.7285 a 2.0365

Factor I 98 - 102 % 100.98 %

Refrigeración a 5°C/ 24 h.

IC	Incluye el cero	-2.1239 a 1.1547
----	-----------------	------------------

Factor I 98 - 102 % 100.98 %

Criterio

La muestra es estable si el IC (Intervalo de confianza) para la diferencia de la media de la muestra, con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto no exceda del $\pm 2\%$.

La muestra probó ser estable a temperatura ambiente después de 24 horas de haber sido preparada. DICTAMEN : cumple.

La muestra en refrigeración a 24 horas después de haber sido preparada.

DICTAMEN : NO CUMPLE

En este caso considero que la muestra tuvo alguna interferencia en refrigeración; por lo que no pudo cumplir con este parámetro y desgraciadamente la muestra a temperatura ambiente se perdió y no se pudo analizar a 48 horas para tener un resultado más, que reforzara la estabilidad de la muestra a temperatura ambiente. Y estos datos a su vez nos dieran un mejor panorama de la estabilidad de la muestra.

No obstante el método analítico probado, cumple para ser utilizado como método analítico de control e indicador de estabilidad.

Así pues, el método analítico probado es lineal, preciso, exacto y específico.

ANEXO 1

Glosario de términos

b = ordenada al origen o intercepto

r = coeficiente de correlación

r² = coeficiente de determinación

CV = coeficiente de variación

IC = intervalo de confianza al 95%

m = pendiente

n = número de replicación

t = número de diluciones o número de cantidades adicionadas

N = número total de determinaciones

S² = varianza muestral

DE = desviación estándar muestral

x = dilución o cantidad adicionada

y = propiedad medida o cantidad recuperada

R = porcentaje recuperado

\bar{R} = promedio aritmético del porcentaje recuperado

t = valor de la distribución t de Student con una probabilidad acumulada de 0.975

t* = valor de la distribución t de Dunnett con una probabilidad acumulada de 0.975

S_p = varianza ponderada

LSIC = Límite superior del intervalo de confianza al 95%

LIIC = Límite inferior del intervalo de confianza al 95%

F = valor de la distribución F de Fisher con una probabilidad acumulada de 0.975

DE_p = Desviación estándar ponderada

gl = grados de libertad

Y... = total de las observaciones

F = factor para cálculos en la linealidad del sistema

i = factor para cálculos en la estabilidad de la muestra

c = número de comparaciones en la prueba de t de Dunnett

S^2_e = varianza del error de regresión

S^2_{dm} = varianza de la diferencia de pendiente

S^2_{do} = varianza de la diferencia de ordenadas

S^2_m = varianza del método

S^2_a = varianza del analista

$S^2_{d/a}$ = varianza del día/analista

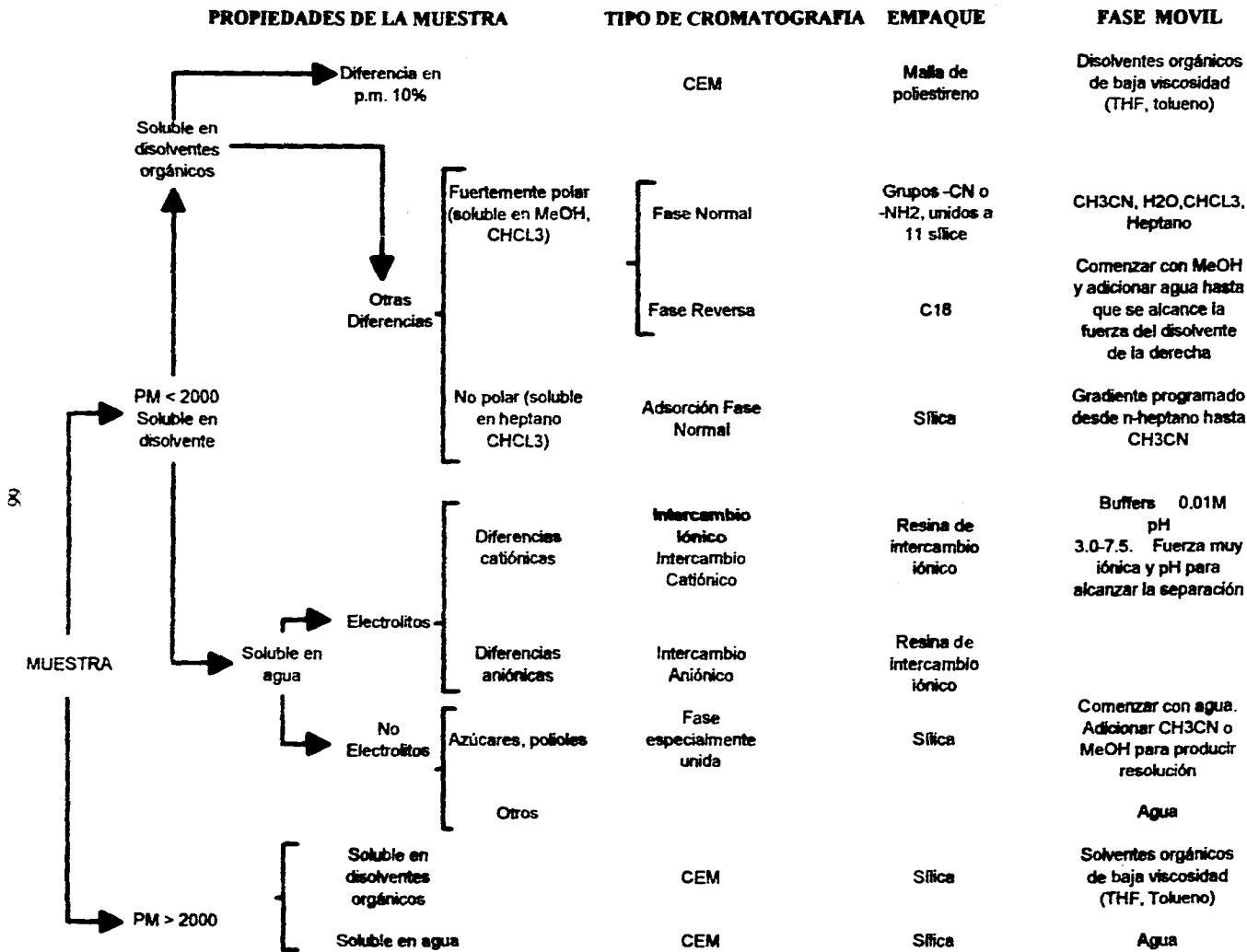
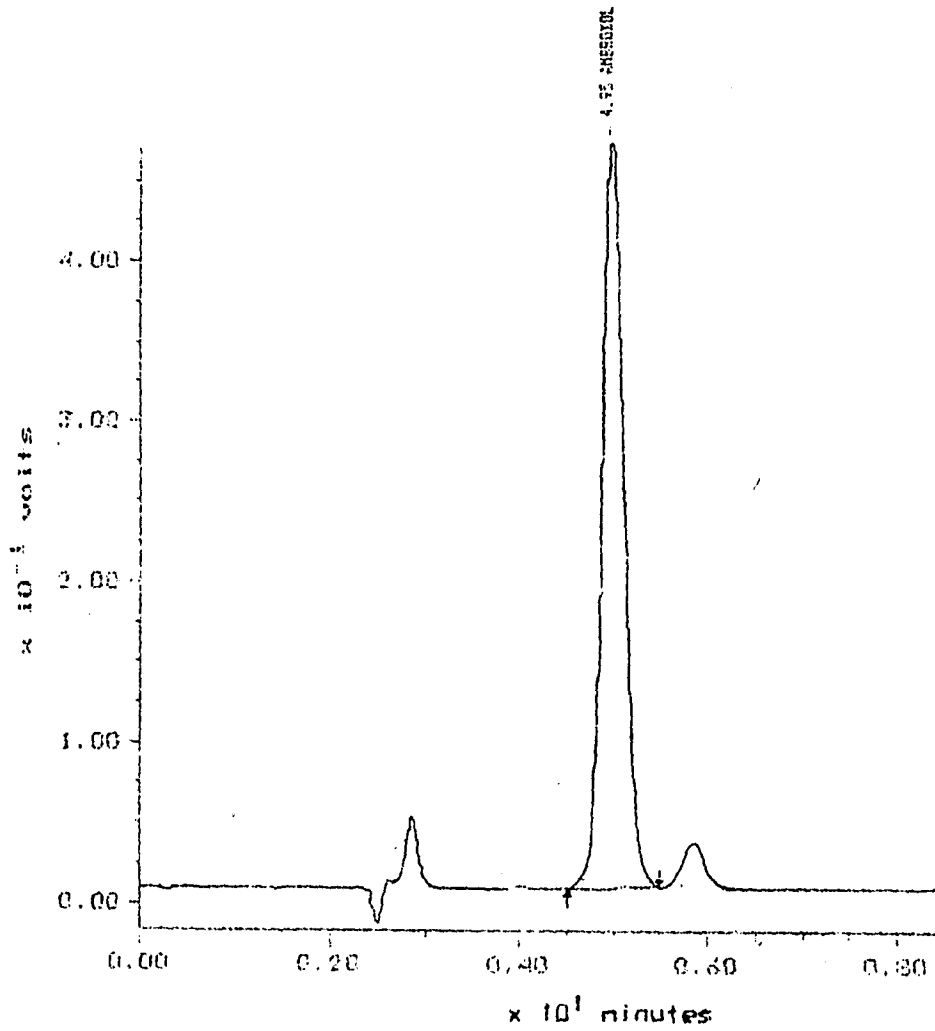


TABLA 1 SISTEMAS CROMATOGRÁFICOS

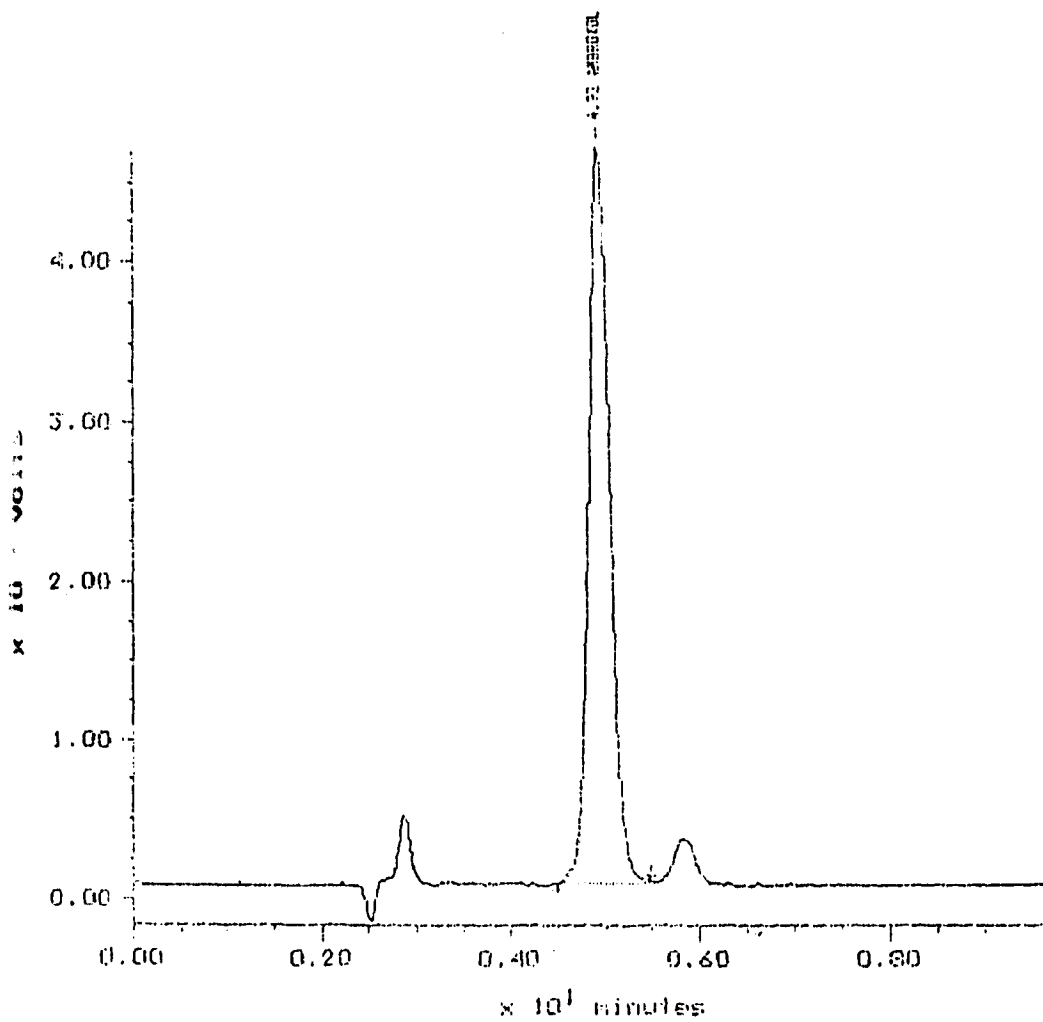
TIPO	FASE ESTACIONARIA		FUNCIONALIZACION	FASES MOVILES	APLICACIONES	
ADSORCION	GEL DE SILICE		OH OH Si - O - Si -	HEXANO, CLOROFORMO, ISOPROPANOL	ETERES, ESTERES, MICOTOXINAS, VITAMINAS LIPOSOLUBLES	
	ALUMINA		Al - O - Al	HEXANO, CLOROFORMO, ISOPROPANOL	AMINAS	
REPARTO	FASE NORMAL	FASES ENLAZADAS	AMINO	-NH ₂	HEXANO, CLOROFORMO, ISOPROPANOL	AZUCARES, ESTEROIDES, NITRODERIVADOS
			CIANO	-CN	HEXANO, CLOROFORMO, ISOPROPANOL	NITRODERIVADOS, AMINOACIDOS
			DIOL	GLICIDOXIETIL- METOXISILANO	Agua, Na ₂ HPO ₄ 0.1M	PROTEINAS, PEPTIDOS, TENSIOACTIVOS ACUOSOS
	FASE INVERSA		RP-2	DIMETILSILANO	AGUA, ACETONITRILLO, METANOL	AMINAS, FENOLES, VITAMINAS HIDROSOLUBLES
			RP-8, C-8	OCTILSILANO	AGUA, ACETONITRILLO, METANOL	CATECOLAMINAS, ESTEROIDES, ACEITES ESENCIALES
			RP-18, ODS	OCTADECILSILANO	AGUA, ACETONITRILLO, METANOL	ANALGESICOS, FTALATOS, AROMATICOS POLINUCLEARES
INTERCAMBIO IONICO	INTERCAMBIADOR FUERTE DE CATIONES		ACIDO SULFONICO	Na ₂ HPO ₄ 0.01-0.1 M	VITAMINAS HIDROSOLUBLES, PURINAS, AMINOACIDOS NUCLEOSIDOS	
	INTERCAMBIADOR FUERTE DE ANIONES		AMONIO CUATERNARIO	Na ₂ HPO ₄ 0.01-0.1 M	NUCLEOTIDOS	
	INTERCAMBIADOR DEBIL DE ANIONES		-NH ₂	H ₃ PO ₄ 0.01-0.05 M	COLORANTES COMESTIBLES CARBOHIDRATOS	
EXCLUSION	GEL ACUOSO		DIVINILBENCENO SULFONADO	AGUA	PROTEINAS, PEPTIDOS, AZUCARES	
	GEL ORGANICO		DIVINILBENCENO	CLOROFORMO, THF	POLIMEROS, GOMAS	
	SILICE DE PORO CONTROLADO		GEL DE SILICE	THF, ALCOHOLES, AGUA	POLIMEROS, COMPUESTOS BIOLOGICOS	
	VIDRIO DE PORO CONTROLADO		VIDRIO POROSO	THF, ALCOHOLES, AGUA	COMPUESTOS BIOLOGICOS	

TABLA 2 RELLENOS DE COLUMNAS (FASES ESTACIONARIAS) Y FASES MÓVILES MÁS HABITUALES

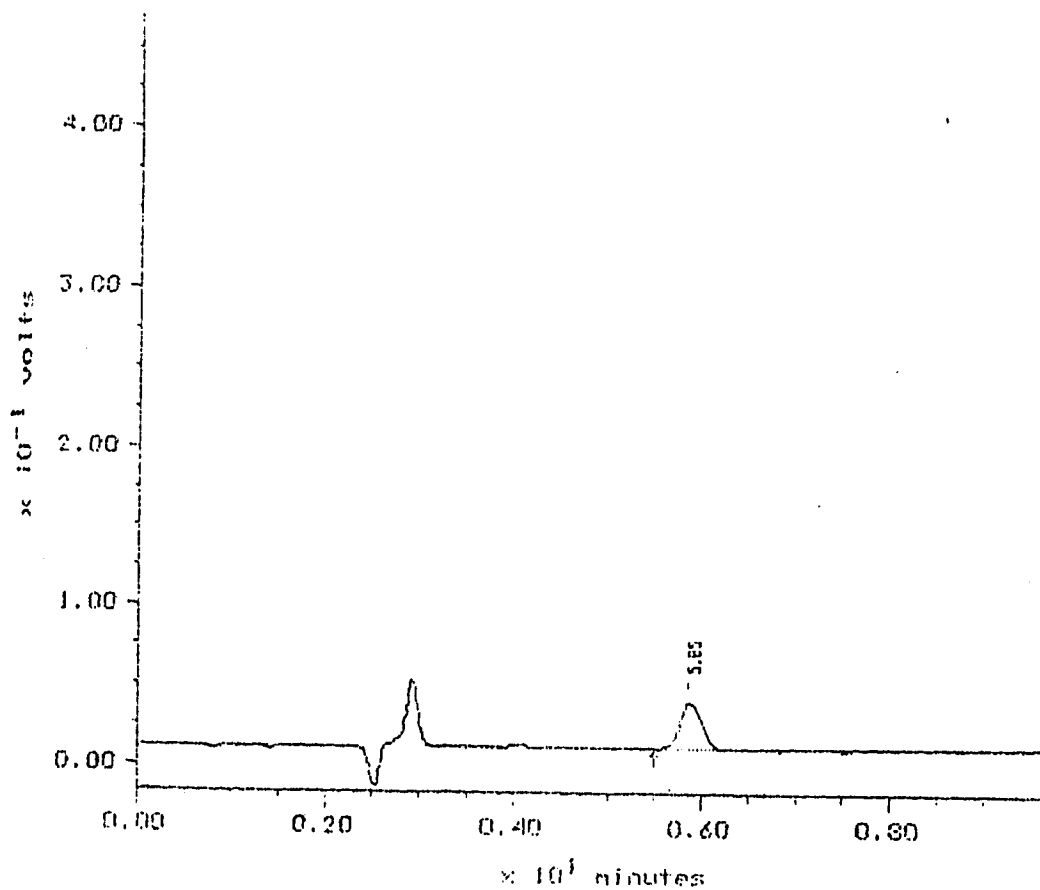
ANEXO 3



CROMATOGRAMA OBTENIDO DE LA MUESTRA SOMETIDA A LUZ BLANCA POR 30 DIAS,
EN FRASCO DE PLASTICO.

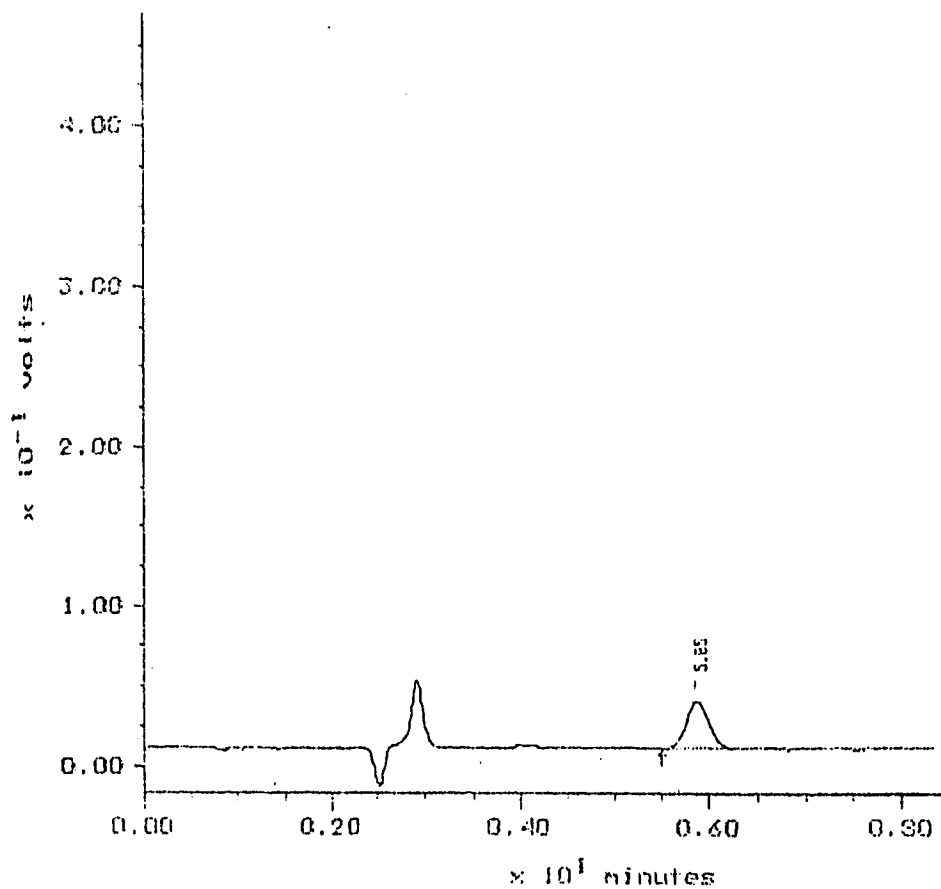


CROMATOGRAMA OBTENIDO DE LA MUESTRA SOMETIDA A LUZ BLANCA POR 30 DIAS,
EN FRASCO DE VIDRIO TRANSPARENTE.



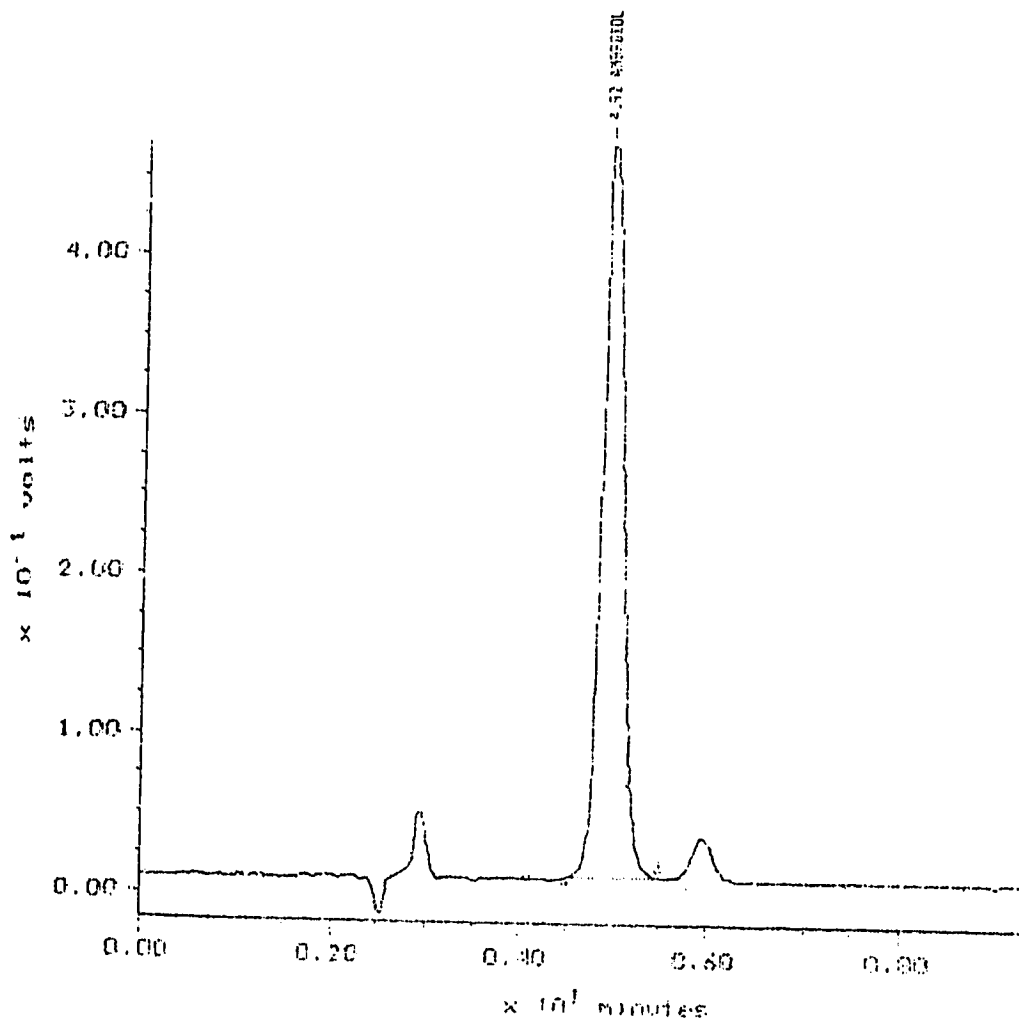
CROMATOGRAMA OBTENIDO DEL PLACEBO SOMETIDO A LUZ BLANCA POR 30 DIAS,
EN FRASCO DE PLASTICO.

FALLA DE ORIGEN



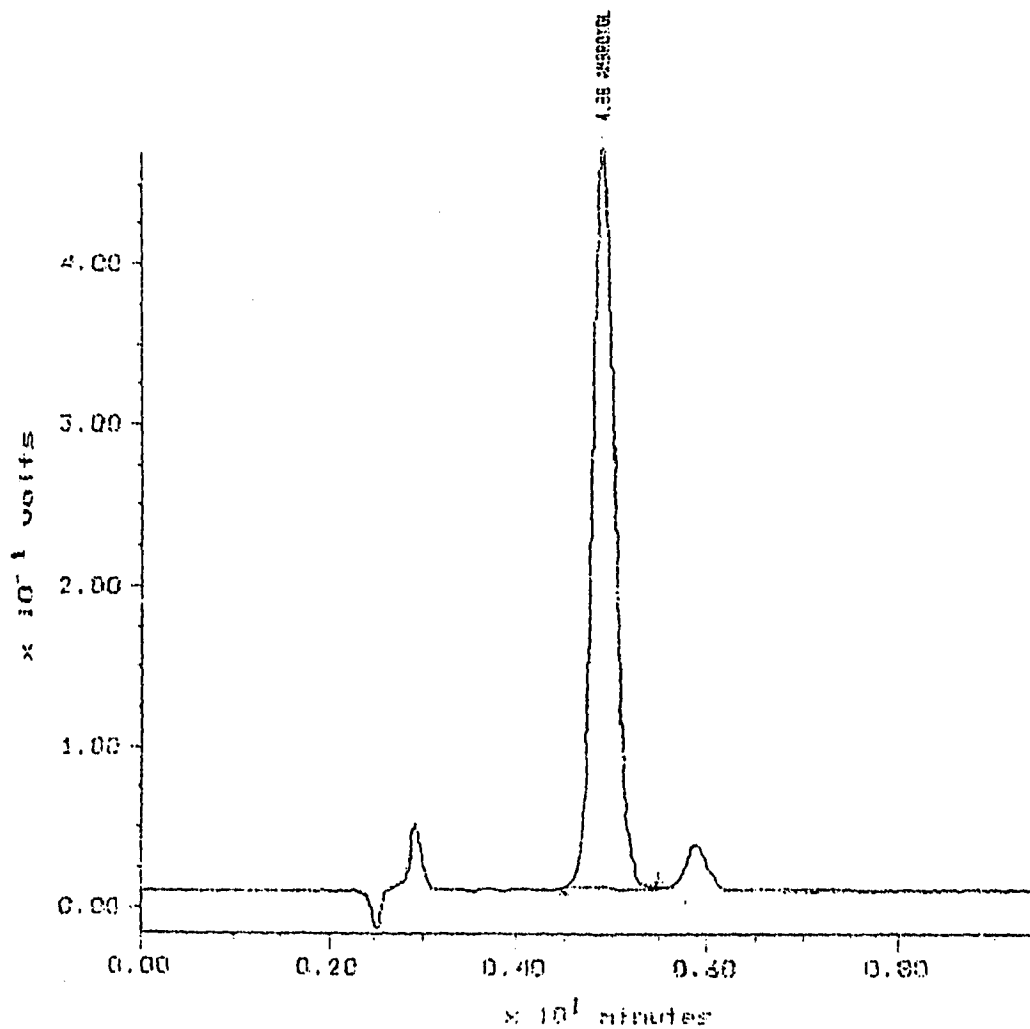
CROMATOGRAMA OBTENIDO DEL PLACEBO SOMETIDO A LUZ BLANCA POR 30 DIAS,
EN FRASCO DE VIDRIO TRANSPARENTE.

FALLA DE ORIGEN



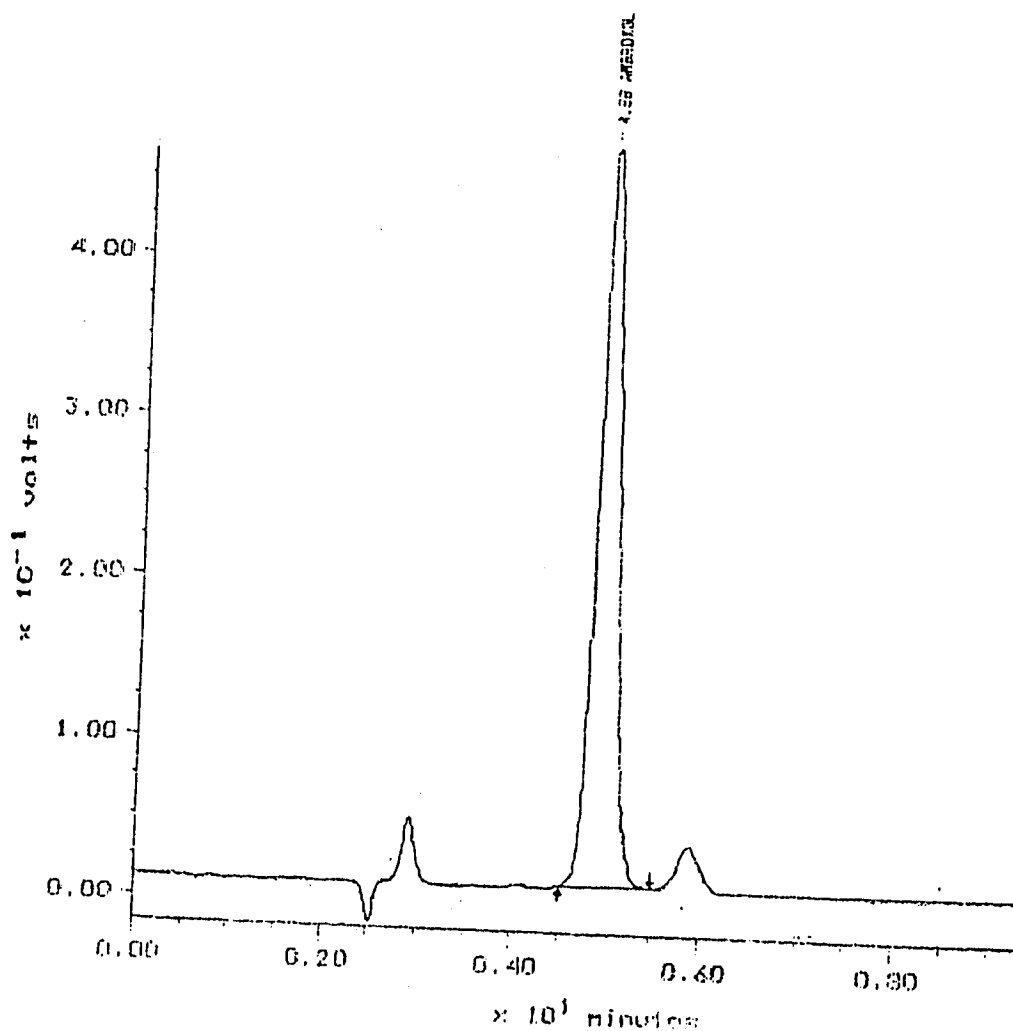
CROMATOGRAMA OBTENIDO DE LA MUESTRA SOMETIDA A LUZ ULTRAVIOLETA POR 30 DIAS, EN FRASCO DE PLASTICO.

FALLA DE ORIGEN



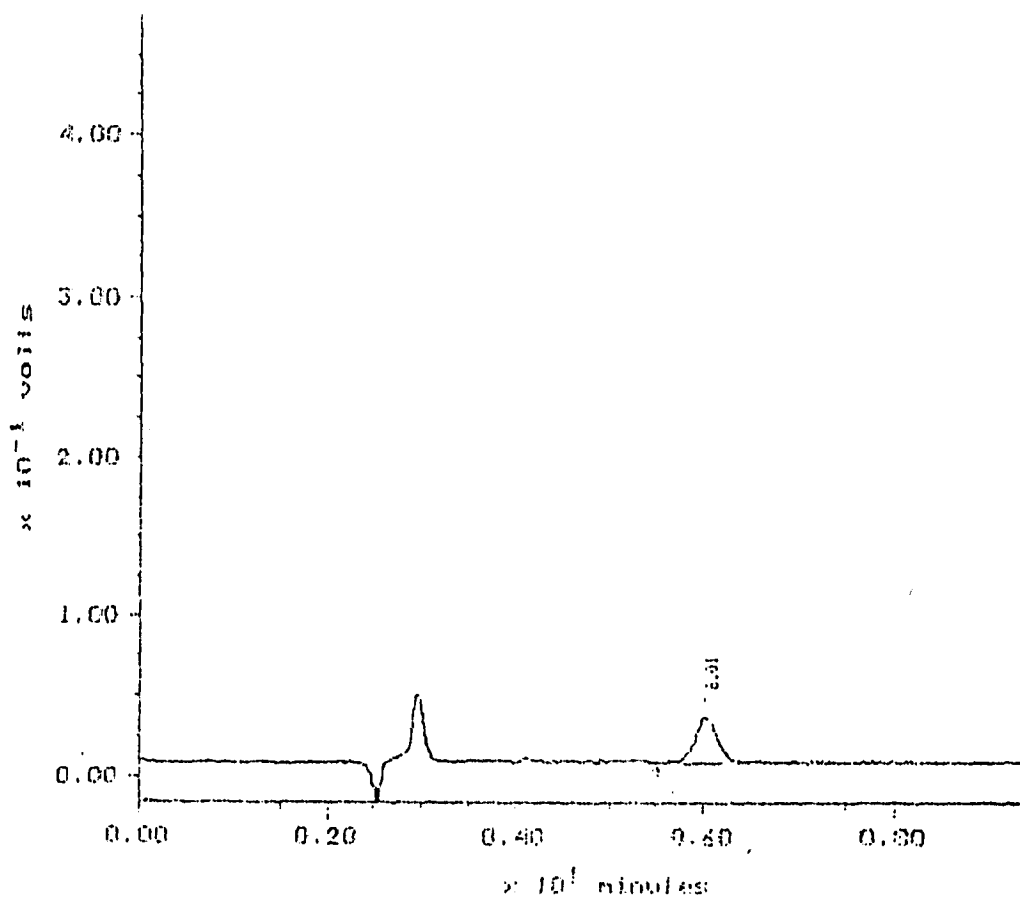
CROMATOGRAMA OBTENIDO DE LA MUESTRA SOMETIDA A LUZ ULTRAVIOLETA POR 30 DIAS, EN FRASCO DE VIDRIO AMBAR.

FALLA DE ORIGEN



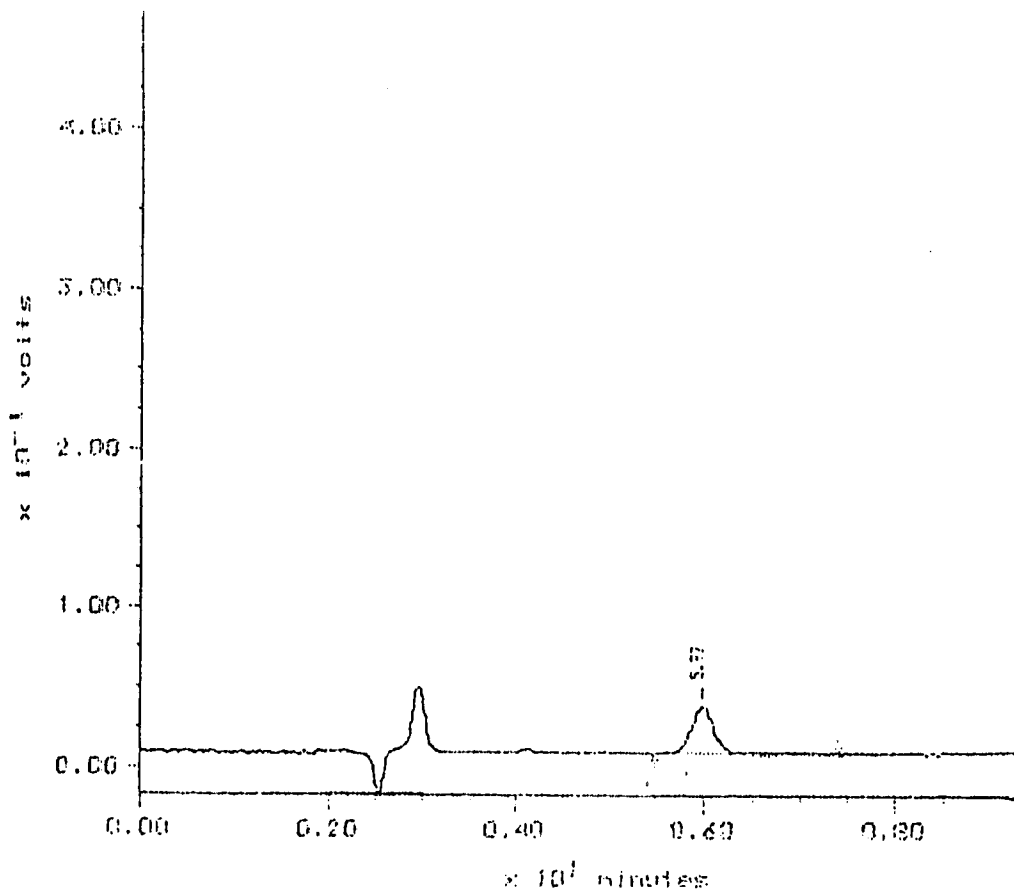
CROMATOGRAMA OBTENIDO DE LA MUESTRA SOMETIDA A LUZ ULTRAVIOLETA POR 30 DIAS, EN FRASCO DE VIDRIO TRANSPARENTE.

FALLA DE ORIGEN



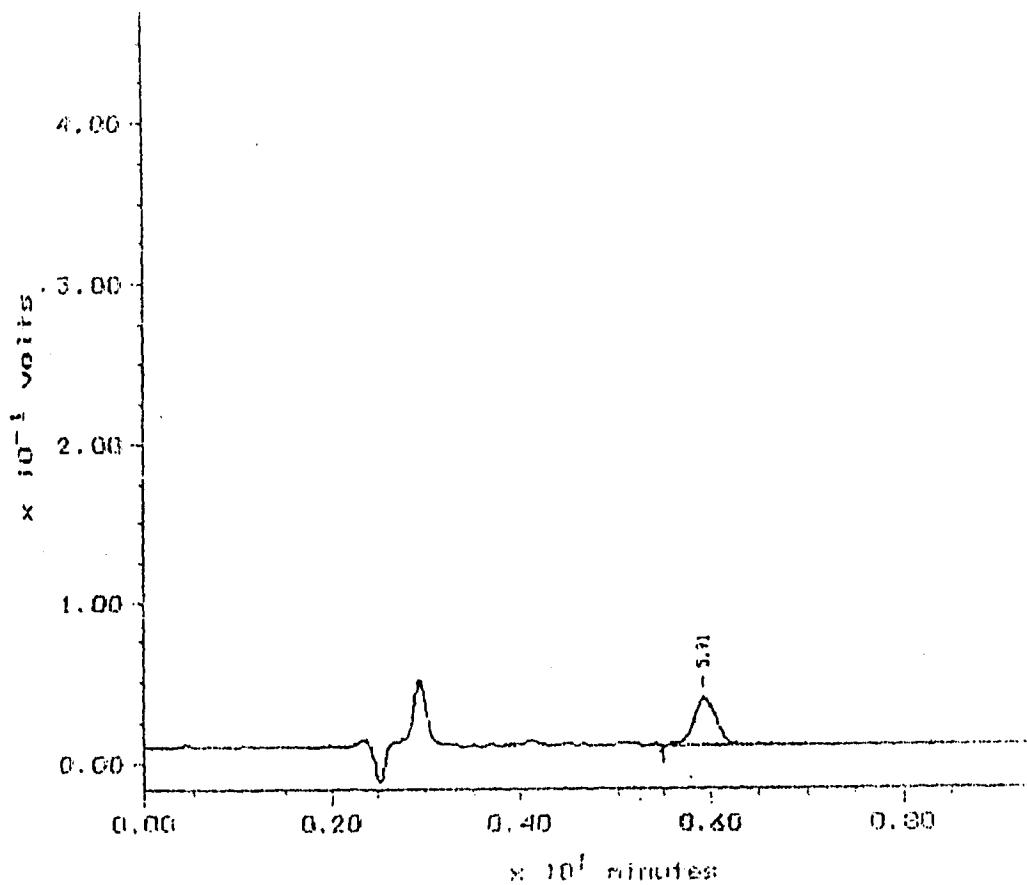
CROMATOGRAMA OBTENIDO DEL PLACEBO SOMETIDO A LUZ ULTRAVIOLETA POR 30 DIAS, EN FRASCO DE PLASTICO.

FALLA DE ORIGEN



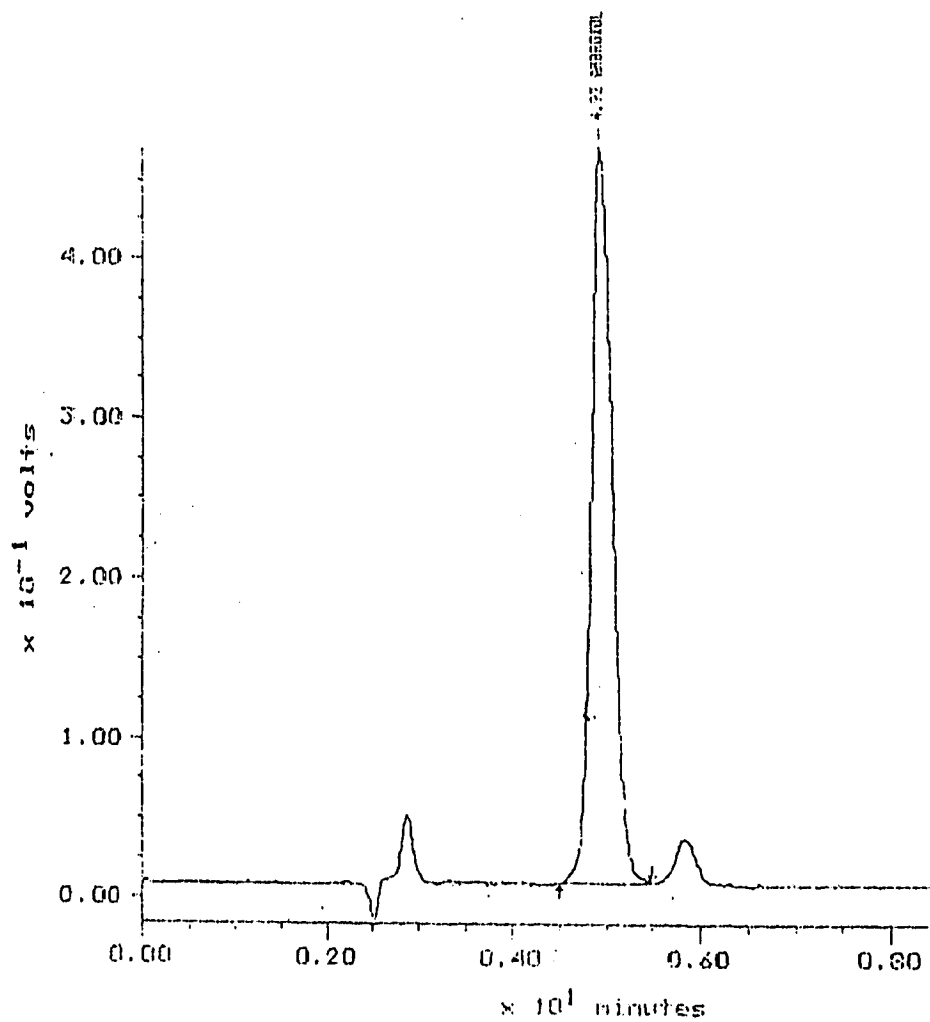
CROMATOGRAMA OBTENIDO DEL PLACEBO SOMETIDO A LUZ ULTRAVIOLETA POR 30 DIAS, EN FRASCO DE VIDRIO AMBAR.

FALLA DE ORIGEN



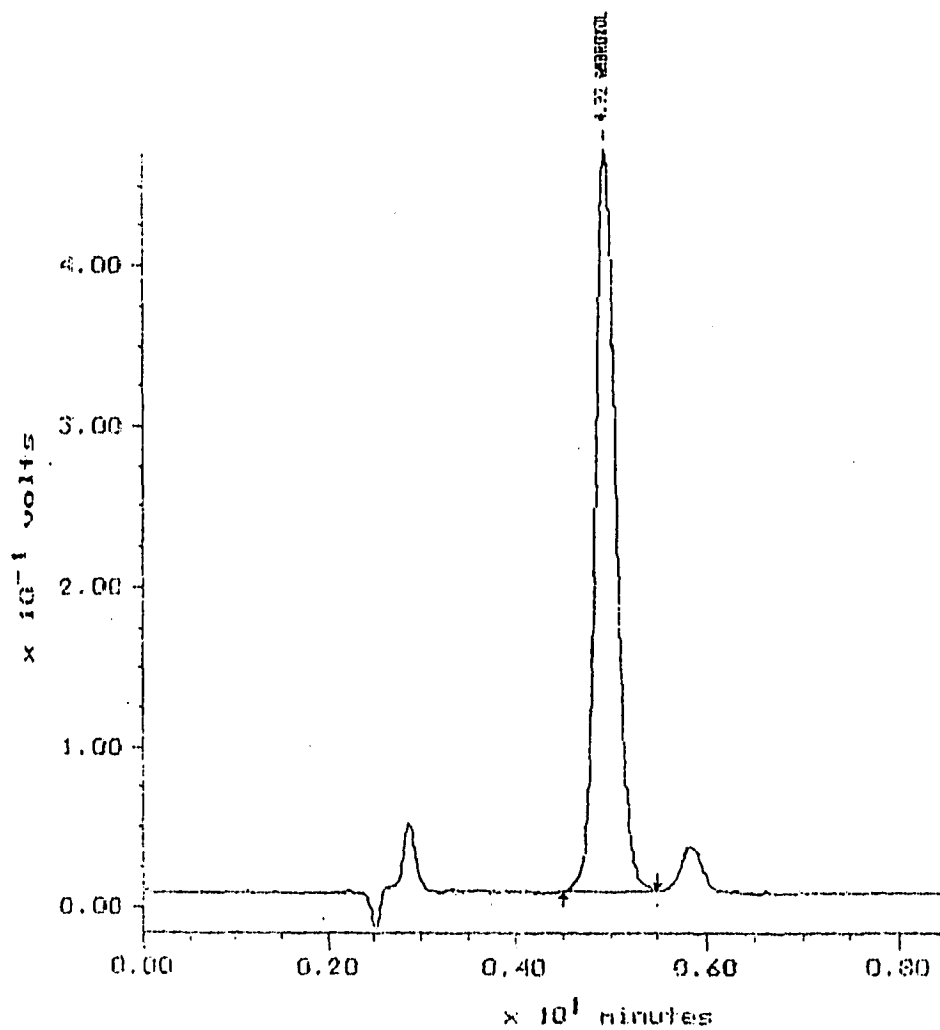
CROMATOGRAMA OBTENIDO DEL PLACEBO SOMETIDO A LUZ ULTRAVIOLETA POR 30 DIAS, EN FRASCO DE VIDRIO TRANSPARENTE.

FALLA DE ORIGEN



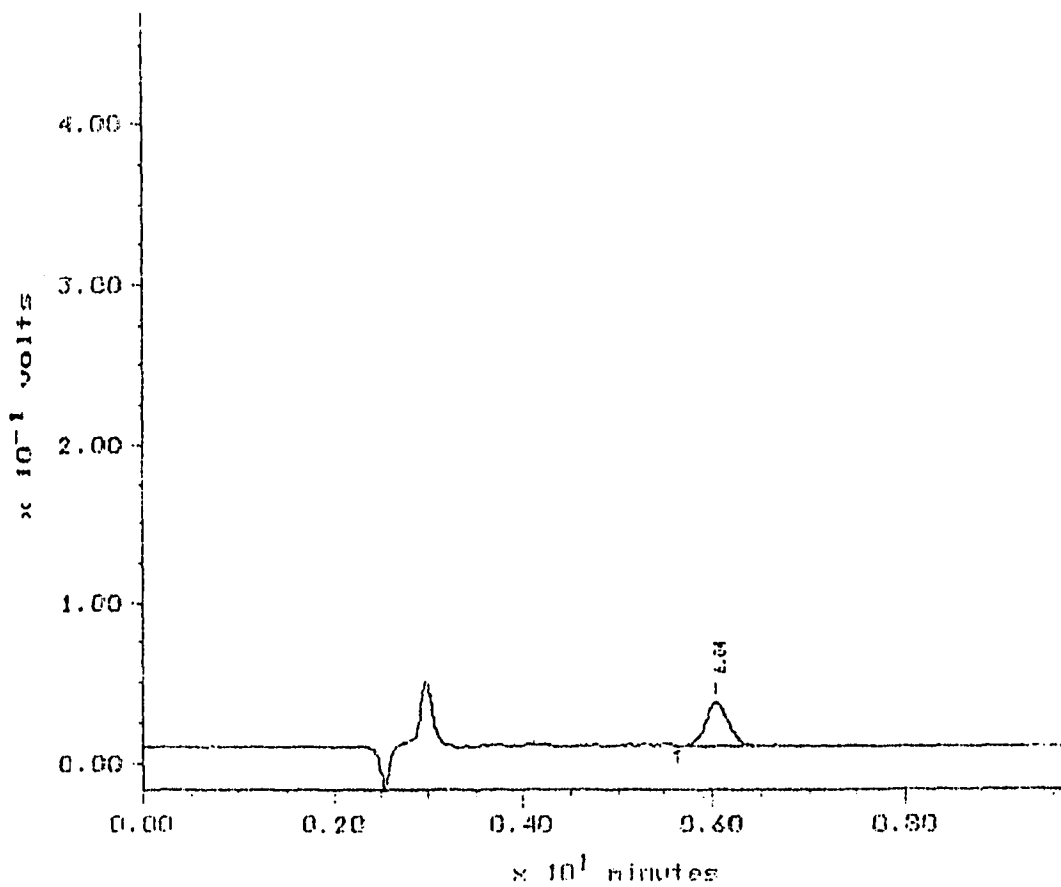
CROMATOGRAMA OBTENIDO DE LA MUESTRA SOMETIDA A 45° C POR 30 DIAS, EN FRASCO DE PLASTICO.

78 FALLA DE ORIGEN



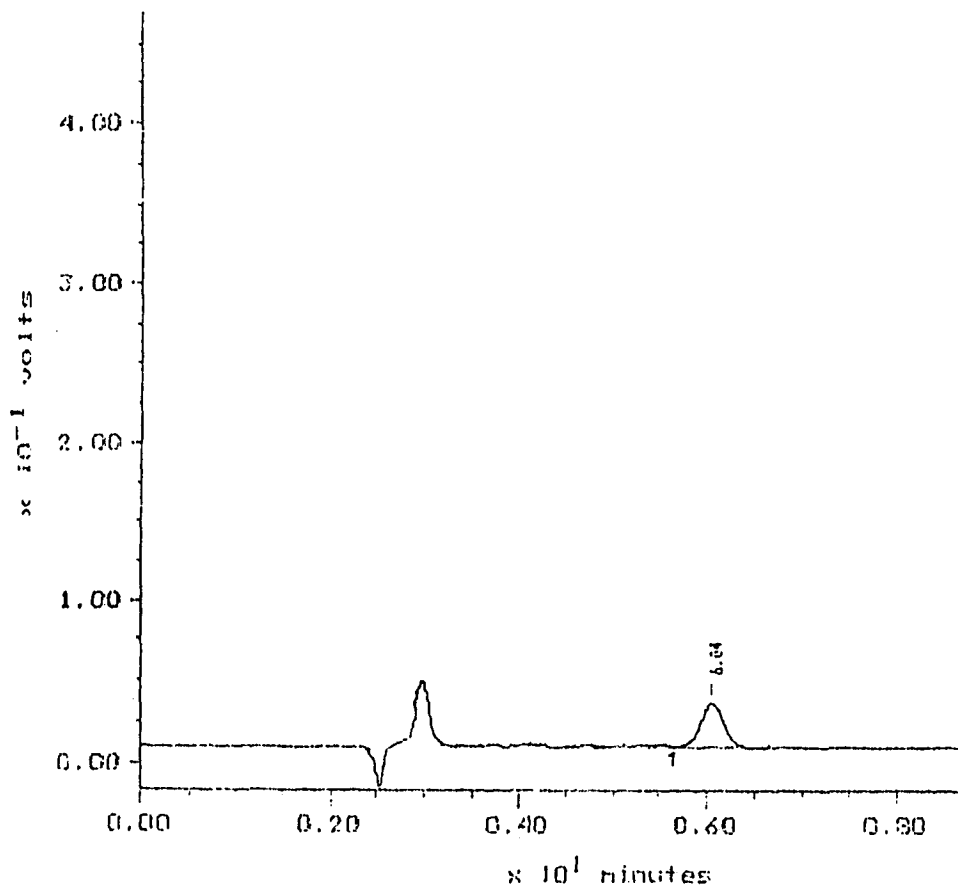
CROMATOGRAMA OBTENIDO DE LA MUESTRA SOMETIDA A 45° C POR 30 DIAS, EN FRASCO DE VIDRIO AMBAR.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

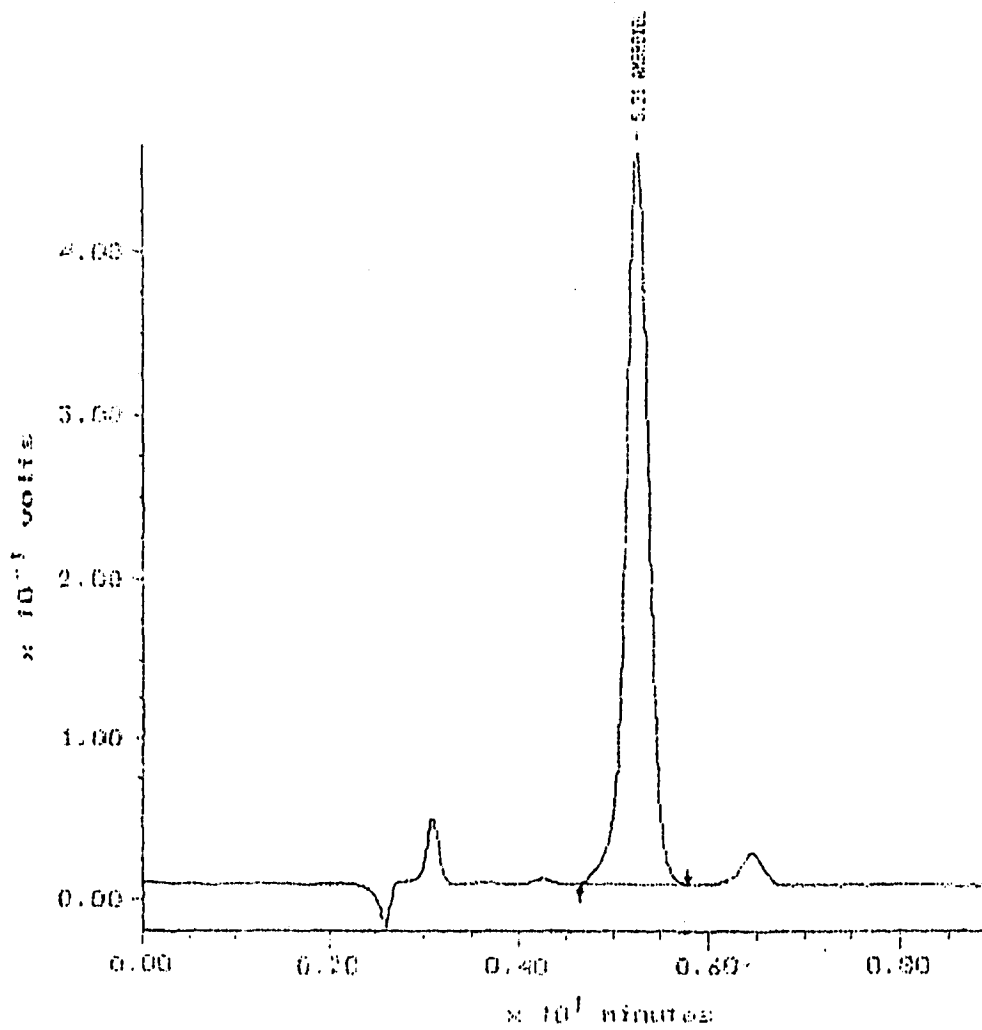


CROMATOGRAMA OBTENIDO DEL PLACEBO SOMETIDO A 45° C POR 30 DIAS, EN FRASCO DE PLASTICO.

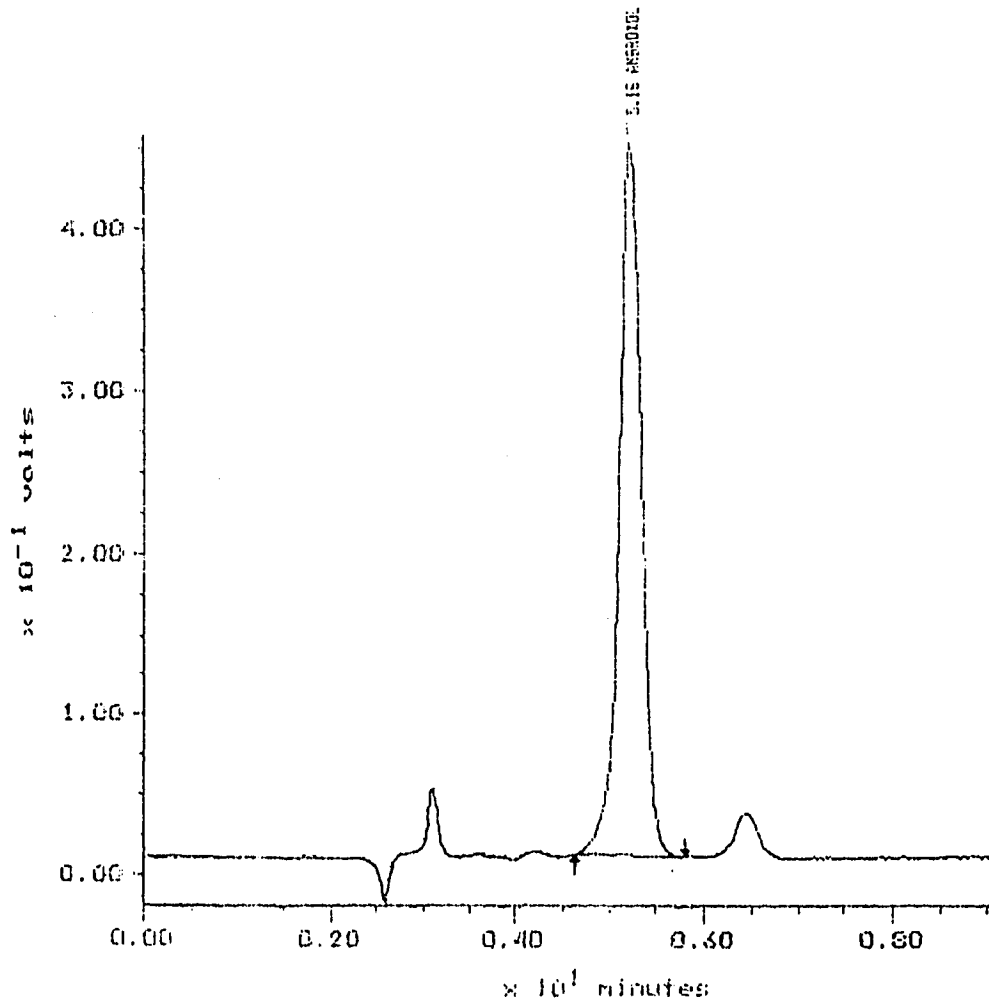
FALLA DE ORIGEN



CROMATOGRAMA OBTENIDO DEL PLACEBO SOMETIDO A 45° C POR 30 DIAS, EN FRASCO DE VIDRIO AMBAR.

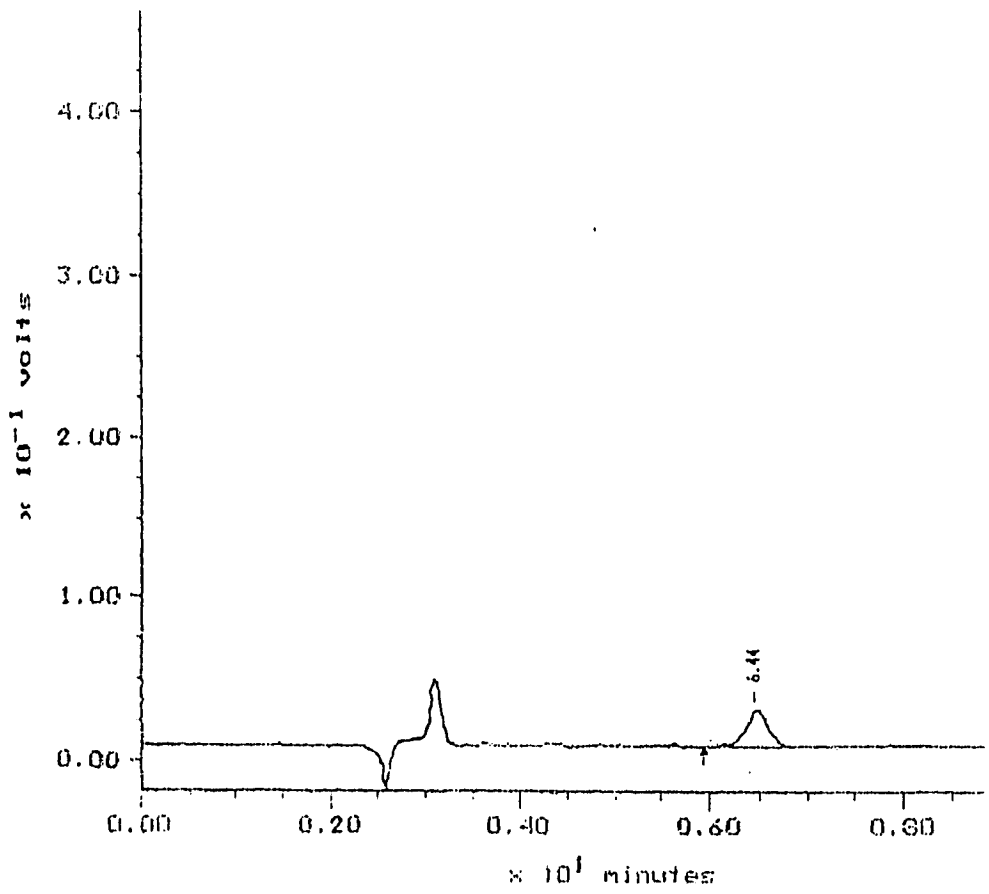


CROMATOGRAMA OBTENIDO DE LA MUESTRA SOMETIDA A 60° C POR 30 DIAS, EN FRASCO DE PLASTICO.



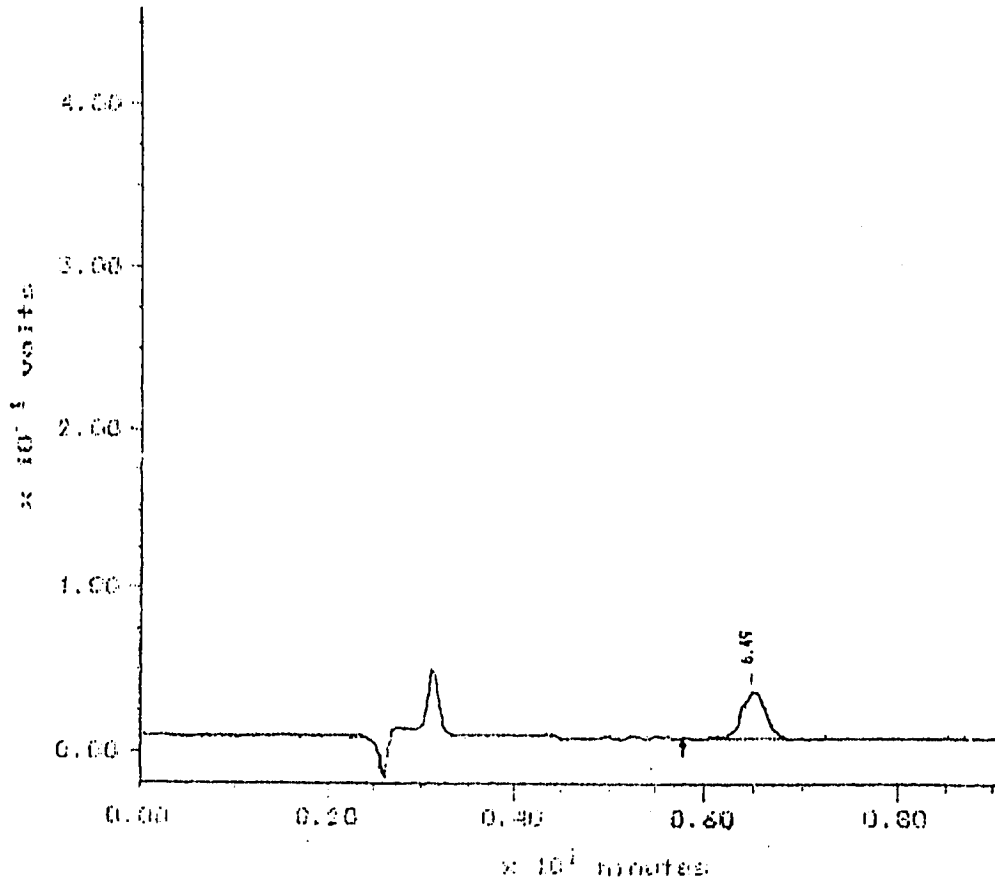
CROMATOGRAMA OBTENIDO DE LA MUESTRA SOMETIDA A 60° C POR 30 DIAS, EN FRASCO DE VIDRIO AMBAR.

FALLA DE ORIGEN



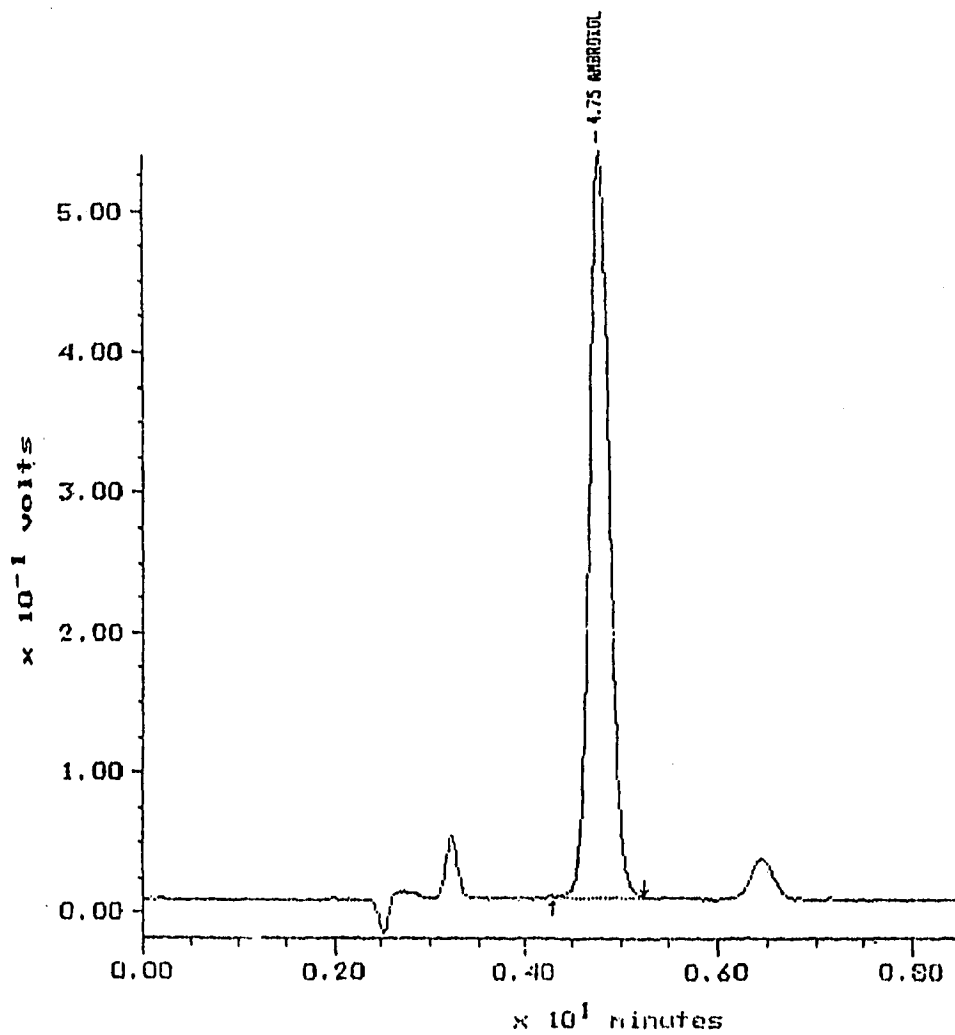
CROMATOGRAMA OBTENIDO DEL PLACEBO SOMETIDO A 60° C POR 30 DIAS, EN FRASCO DE PLASTICO.

FALLA DE ORIGEN

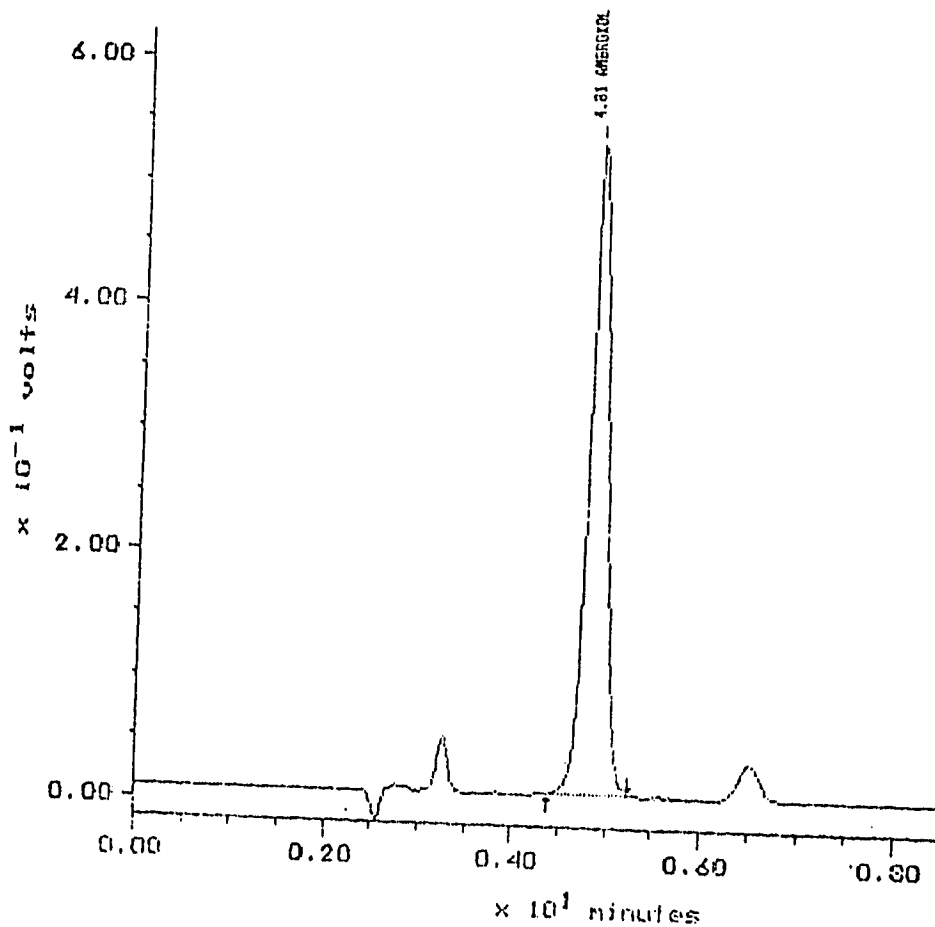


CROMATOGRAMA OBTENIDO DEL PLACEBO SOMETIDO A 60° C POR 30 DIAS, EN FRASCO DE VIDRIO AMBAR.

FALLA DE ORIGEN

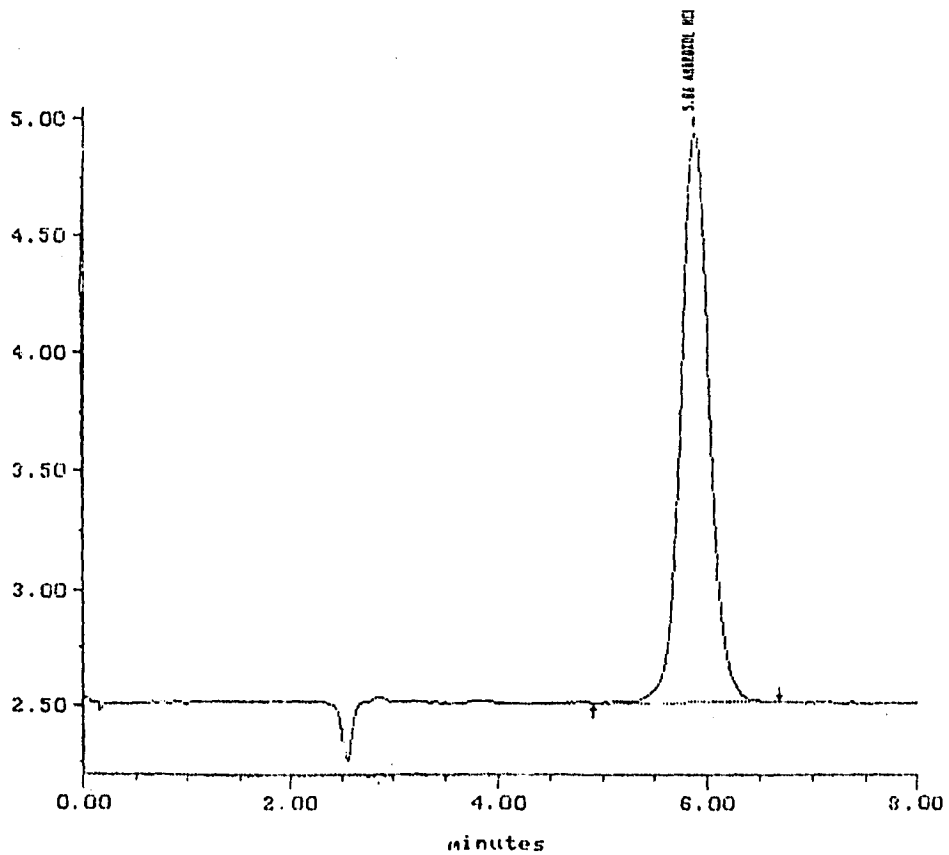


CROMATOGRAMA OBTENIDO DE LA MUESTRA A TEMPERATURA AMBIENTE, DESPUES DE 24 HORAS DE PREPARADA.



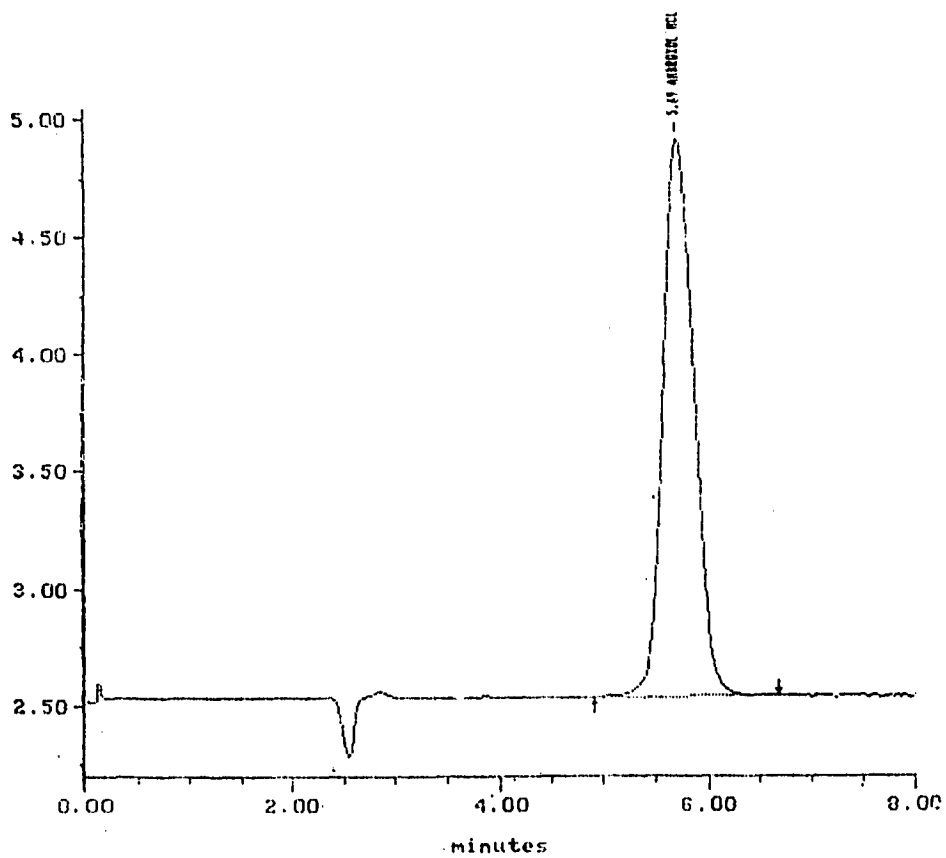
CROMATOGRAMA OBTENIDO DE LA MUESTRA EN REFRIGERACION A 5° C, DESPUES DE 24 HORAS DE PREPARADA.

FALLA DE ORIGEN



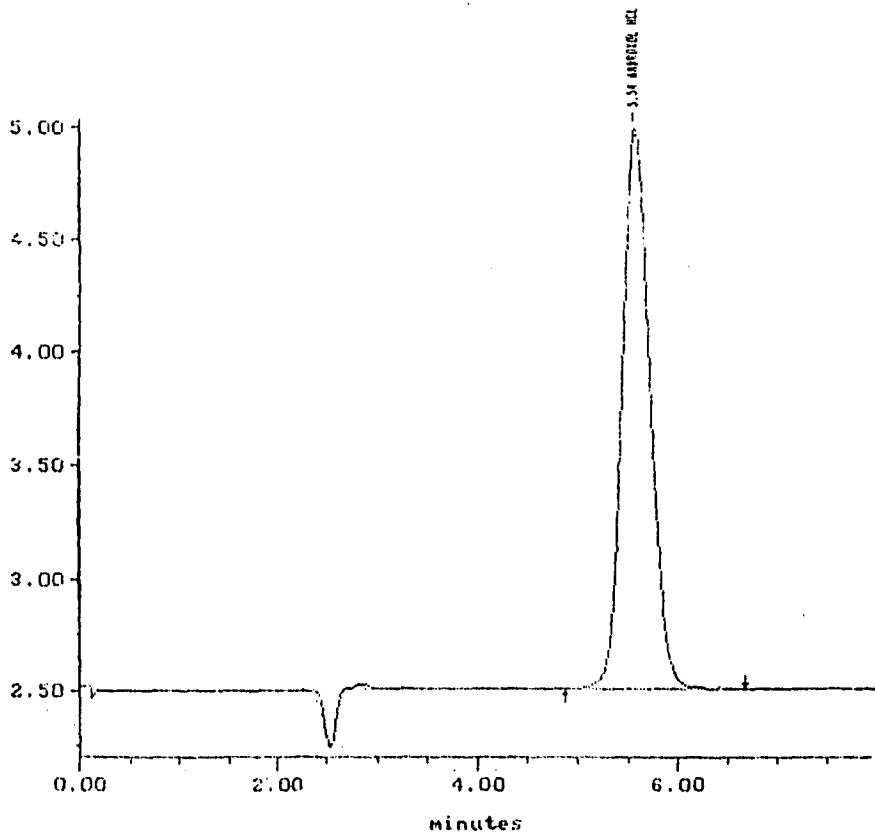
CROMATOGRAMA OBTENIDO DE LA MATERIA PRIMA SOMETIDA A TEMPERATURA AMBIENTE DURANTE 3 MESES.

FALLA DE ORIGEN



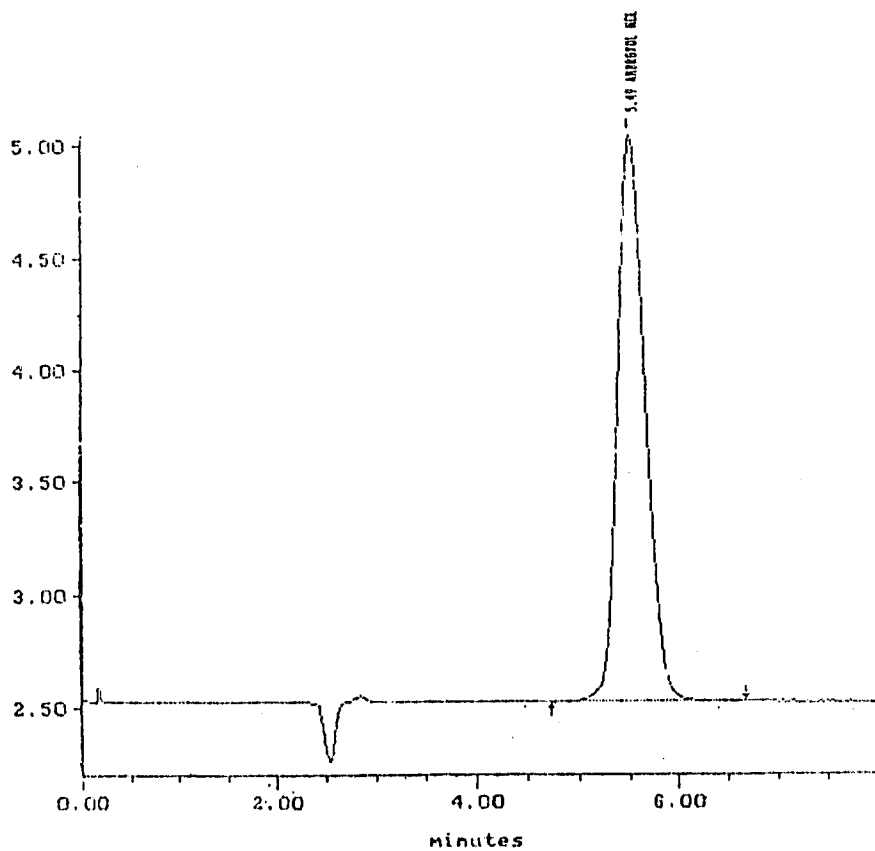
CROMATOGRAMA OBTENIDO DE LA MATERIA PRIMA SOMETIDA A 37° C DURANTE 3 MESES.

FALLA DE ORIGEN



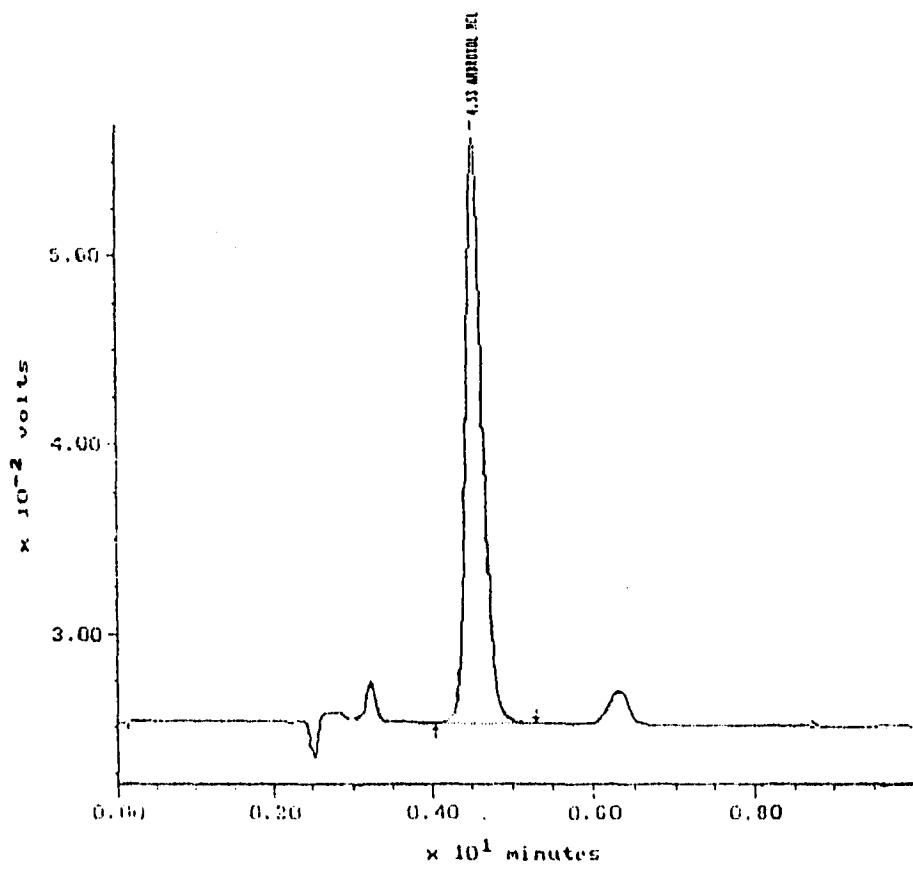
CROMATOGRAMA OBTENIDO DE LA MATERIA PRIMA SOMETIDA A 45° C DURANTE 3 MESES.

FALLA DE ORIGEN



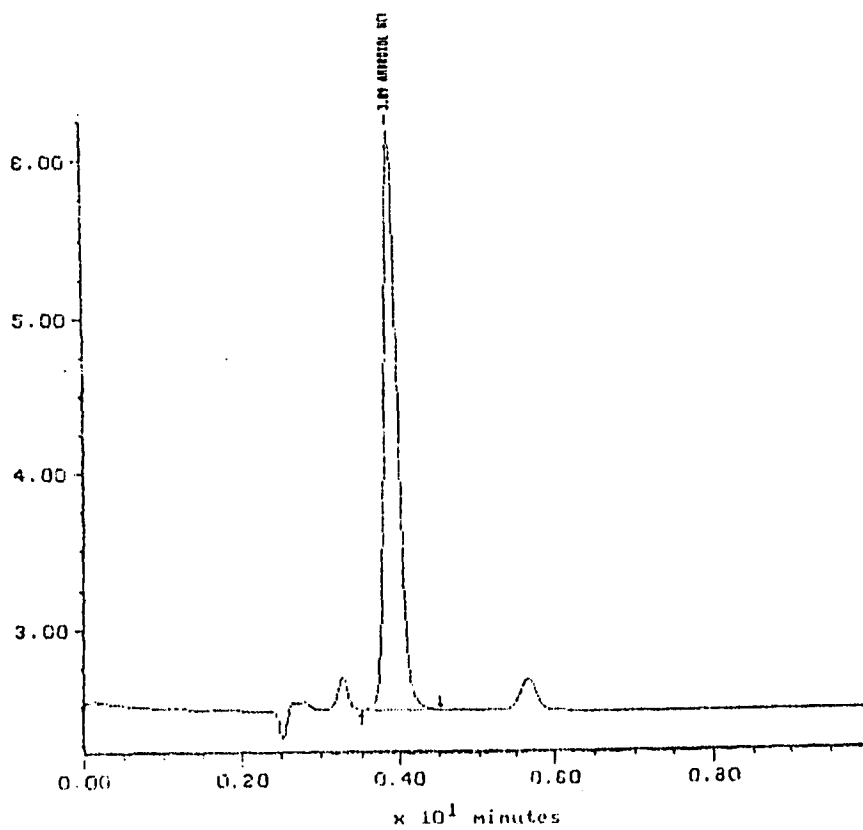
CROMATOGRAMA OBTENIDO DE LA MATERIA PRIMA SOMETIDA A 75% DE HUMEDAD RELATIVA Y 37° DE TEMPERATURA DURANTE 3 MESES.

FALLA DE ORIGEN



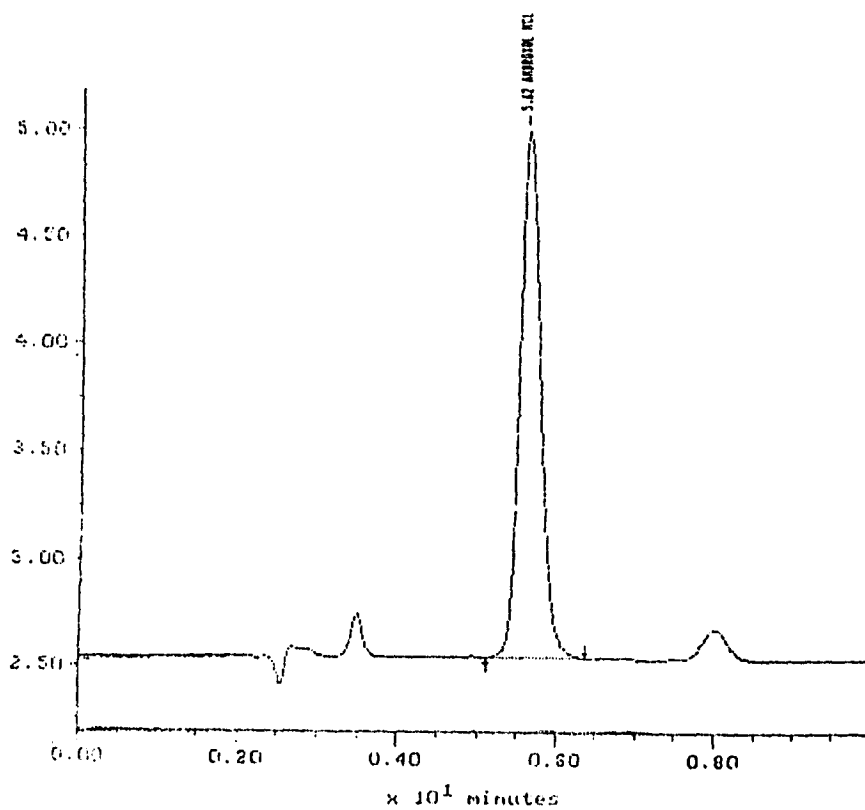
TOLERANCIA DEL SISTEMA . FASE MOVIL : ACIDO ACETICO AL 1% : METANOL (50:50)

FALLA DE ORIGEN



TOLERANCIA DEL SISTEMA . FASE MOVIL : ACIDO ACETICO AL 1% : METANOL (45:55)

FALLA DE ORIGEN



TOLERANCIA DEL SISTEMA . FASE MOVIL : ACIDO ACETICO AL 1% : METANOL (55:45)

FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFIA

1. Bernard, Ostle
Estadística Aplicada
Editorial Limusa
México. 1974
2. Blacow, N.W, Martindale.,
The Extra Pharmacopoeia,
The Pharmaceutical Press,
Londres, Inglaterra, 1989
3. Clarke, E. G.,
Isolation and Identificación of Drugs,
The Pharmaceutical Press,
Londres, Inglaterra, 1986,
4. Connors, Kenneth.
A textbook of Pharmaceutical Analysis
Interscience Publication, 2nd ed.
U S A, 1975
5. Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM)
Quinta Edición
México, S.S.A., 1988
6. Harold M. Mc Nair., Benjamín Esquivel H.,
Cromatografía Líquida de Alta Presión,
Ed. Secretaría Gral de la Organización de los Estados
Americanos,
Washington, D. C. , 1980,
7. Marques de Cantu María Jose
Probabilidad y Estadística para Ciencias Químico
Biológicas.
1a Edición, México 1988.
8. Snyder L.R. , Kirkland J.L.,
Introduction to Modern Liquid Chromatography
2a. Edición
John Willey & Sons, Inc.,
U.S.A, 1974,

9. The Merck Index.,
An Encyclopedia of Chemical and Drugs,
Merck & Co., Inc.,
U.S.A, 1983

10. Yost. R. W., Ettore L.S., Conlon R.D.,
Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica
Ed. Perkin Elmer,
México, 1980,

11. Avalada por la Comisión Permanente de la Farmacopea
de los Estados Unidos Mexicanos,
Comisión Interinstitucional de Prácticas Adecuadas de
Manufactura,
"Guía de Prácticas Adecuadas de Manufactura Farmacéutica"
3a. Edición, México 1989.

12. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de
la Dirección General de Insumos para la Salud, SSA.
Comité de Redacción de "Guías Generales de Validación".

13. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de
la Dirección General de Insumos para la Salud, SSA.
"Guía de Validación de Métodos Analíticos".

14. Notas del curso de Diseño Experimental
de la Facultad de Química UNAM 1993.
Profesor Guillermo Molina G.