

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA**



**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA
LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE CLORHIDRATO DE AMBROXOL Y
LORATADINA EN JARABES**

Trabajo Especial de Grado presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por T.S.U en Química Zurima Parra Pérez, para optar al título de Licenciado en Química.

Tutores:

Doc. Luis Gómez
UCV. Facultad de Ciencias. Escuela de Química

Esp. Marisabel Bor
UCV. Facultad de Farmacia

Caracas, mayo de 2015.

Yo Profesor **Luis Gómez**, Investigador del Centro de Investigación de Química Analítica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela y la Profesora **Marisabel Bor** Investigadora del Laboratorio Análisis de Medicamentos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela.

Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE CLORHIDRATO DE AMBROXOL Y LORATADINA EN JARABES”

Que presenta la T.S.U **Zurima Parra**, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Laboratorio Análisis de Medicamentos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2014 y 2015, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, mayo de 2015



Doc. Luis Gómez

Tutor



Esp. Marisabel Bor

Tutor

RESUMEN

La combinación de clorhidrato de ambroxol y loratadina, como principios activos, es empleada en el tratamiento contra enfermedades respiratorias, los cuales presentan una acción complementaria al combinar carácter de un antihistamínico no sedante de acción prolongada (loratadina) y un expectorante y mucolítico (ambroxol); indicada para el tratamiento de pacientes que muestran condiciones broncopulmonares de origen alérgico, asociados con tos. Actualmente, en el mercado nacional son expedidos, en formulaciones de solución oral o jarabe, una serie de medicamentos de diferentes marcas comerciales, los cuales contemplan la combinación de los fármacos clorhidrato de ambroxol y loratadina.

Sin embargo, no aparecen reportados métodos validados para la determinación simultánea de ambos componentes en formulaciones del tipo jarabe; debido a que los métodos analíticos validados son de vital importancia para el aseguramiento de la composición del medicamento como requisito necesario para su comercialización. Se planteó como objeto del presente trabajo el desarrollo y validación de un procedimiento analítico por HPLC para la determinación simultánea del clorhidrato de ambroxol y loratadina en jarabes, dando lugar a una metodología analítica que permita determinar ambos componentes en una sola corrida cromatográfica, disminuir el tiempo trabajo y economizar en el uso de reactivos.

El método fue desarrollado y posteriormente validado de acuerdo a los requerimientos establecidos en el apartado <1225> de la USP categoría I, para la cuantificación de componentes mayoritarios de fármacos, incluyendo preservantes, en productos farmacéuticos terminados.

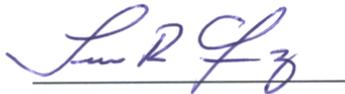
Las condiciones cromatográficas establecidas para el análisis son las siguientes: columna RP 18 (3,9 mm x 150 mm, 5µm) a temperatura ambiente, fase móvil compuesta por la mezcla de buffer fosfato monobásico de amonio (0,05 M, pH 4) y

metanol en proporción 50:50 % v/v, a pH de 3,40 ajustado con ácido ortofosfórico al 85 %, flujo de la fase móvil 0,8 mL/min. Detección UV-Visible a una longitud de onda de 248 nm. Metodología que presenta alta tendencia a la linealidad en un rango de concentración entre 0,12 mg/mL a 0,90 mg/mL para el clorhidrato de ambroxol y 0,02 mg/mL a 0,16 mg/mL para la loratadina.

El método propuesto para la determinación de los principios activos es robusto y confiable bajo las condiciones de análisis. Dando lugar a un método preciso, exacto y selectivo, ya que permite reconocer inequívocamente la presencia del clorhidrato de ambroxol y loratadina y discriminar la presencia de sustancias contaminantes.

El método analítico desarrollado y validado se puede aplicar como un indicador de estabilidad y un método rutinario para pruebas de control de calidad.

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del trabajo Especial de Grado titulado: “Desarrollo y validación de un método analítico por HPLC para la determinación simultánea de clorhidrato de ambroxol y loratadina en jarabes”. Presentado por la T.S.U en Química Zurima Parra Pérez, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.



Doc. Luis Gómez
Tutor



Esp. Marisabel Bor
Tutor



Profa. Rosa Amaro
Jurado



Profa. Katuska Chávez
Jurado

AGRADECIMIENTO

Primeramente quisiera agradecer a todos los profesores que comparten sus valiosos conocimientos, ayudando en la formación del estudiantado día tras día.

Quisiera agradecer a mi tutora Marisabel Bor por prestarme su apoyo, orientación, conocimiento, comprensión y ser una guía en el desarrollo del presente Trabajo Especial de Grado.

Agradezco a mi tutor Luis Gómez por el conocimiento y orientación impartida en el desarrollo de la investigación. Así como al profesor José Chirinos por brindarme su conocimiento en relación al tratamiento estadístico.

Agradezco a la cátedra del Laboratorio Análisis de Medicamentos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela por permitirme realizar el desarrollo de la investigación en sus instalaciones.

Agradezco a Dubraska Vega por estar al pendiente de mí en el desarrollo de la investigación.

Y por último pero no menos importante a mi familia que estuvieron allí en todo momento, brindándome su apoyo cuando los necesite.

¡¡Gracias a todos!!

Dedico el siguiente Trabajo Especial de Grado

A mi familia.

Sin ellos, no hubiese logrado esta meta.

Siempre puedo contar con ustedes.

INDICE GENERAL

	Páginas
Índice de tablas.....	I
Índice de figuras.....	V
Índice de gráficos.....	VIII
1. Introducción.....	1
2. Revisión bibliográfica	
2.1. Tos.....	3
Tipos de tos.....	4
Tratamiento para la tos.....	5
2.2. Expectorante.....	6
2.3. Mucolítico.....	6
2.4. Ambroxol.....	7
2.5. Antihistamínico.....	9
2.6. Loratadina.....	11
2.7. Jarabe comercial compuesto por ambroxol y loratadina.....	13
2.8. Entes reguladores relacionados con el registro y control de medicamentos.....	14
3. Antecedentes de la investigación.....	19
4. Justificación de la investigación.....	35
5. Objetivos	
5.1. Objetivo general.....	37
5.2. Objetivos específicos.....	37
6. Metodología experimental	
6.1. Instrumentación.....	38
6.2. Materiales y equipos para filtración.....	39
6.3. Reactivos y solventes.....	39
6.4. Muestras.....	40
6.5. Procedimientos y técnicas.....	40
6.5.1. Condiciones cromatográficas preliminares para la determinación simultánea del contenido de clorhidrato de ambroxol y loratadina.....	41
6.5.1.1. Preparación de patrones.....	41

6.5.1.1.1. Disolución estándar clorhidrato de ambroxol.....	41
6.5.1.1.2. Disolución estándar de loratadina.....	41
6.5.1.1.3. Disolución combinada de clorhidrato de ambroxol y loratadina.....	41
6.5.1.2. Determinación de la longitud de onda de trabajo.....	42
6.5.1.3. Condiciones preliminares.....	43
6.5.1.4. Estudio de la fase móvil y flujo.....	43
6.5.2. Condiciones optimas de trabajo.....	48
6.5.2.1. Optimización de la fase móvil.....	48
Preparación del material de referencia interno.....	51
Tratamiento del material de referencia interno previo al análisis.....	52
6.5.3. Evaluación del sistema.....	53
6.5.4. Factores cromatográficos.....	54
6.6. Validación del método cromatográfico	
6.6.1. Linealidad.....	56
6.6.2. Precisión.....	70
6.6.3. Exactitud.....	74
6.6.4. Especificidad.....	78
6.6.5. Robustez.....	94
6.7. Análisis de medicamentos de diferentes marcas comerciales.....	97
7. Conclusiones.....	104
8. Recomendaciones.....	107
Referencias.....	108
Apéndice	
Apéndice A	
Cromatografía líquida de alta eficiencia, HPLC.....	113
Apéndice B	
Factores cromatográficos.....	118
Apéndice C	
Reproducibilidad instrumental.....	120
Apéndice D	
Linealidad.....	121

Apéndice E	
Precisión.....	126
Apéndice F	
Exactitud.....	133
Apéndice G	
Robustez.....	135
Apéndice H	
Análisis de medicamentos de diferentes marcas comerciales.....	137
Glosario de acrónimos o abreviaturas.....	140
Glosario de términos médicos.....	141

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla I.	Propiedades físico-químicas de la molécula de clorhidrato de ambroxol.....	8
Tabla II.	Propiedades físico-químicas de la molécula de loratadina.....	12
Tabla III.	Elementos requeridos para la validación.....	15
Tabla IV.	Estudios realizados para la determinación de la fase móvil para la separación cromatográfica del clorhidrato de ambroxol y loratadina.....	44
Tabla V.	Estudios realizados para la determinación de la fase móvil óptimas para la separación cromatográfica del clorhidrato de ambroxol y loratadina.....	49
Tabla VI.	Condiciones cromatográficas para la determinación simultánea del contenido de clorhidrato de ambroxol y loratadina.	51
Tabla VII.	Reproducibilidad instrumental. Estándar clorhidrato de ambroxol y loratadina.	54
Tabla VIII.	Factores cromatográficos asociados a la metodología analítica para la determinación simultánea del clorhidrato de ambroxol y loratadina.....	55
Tabla IX.	Curva de calibración. Linealidad día 1. Clorhidrato de Ambroxol.	57
Tabla X.	Curva de calibración. Linealidad día 2. Clorhidrato de Ambroxol.	58
Tabla XI.	Curva de calibración. Linealidad día 3. Clorhidrato de Ambroxol.	59
Tabla XII.	Curva de calibración. Linealidad día 1. Loratadina.....	60
Tabla XIII.	Curva de calibración. Linealidad día 2. Loratadina.....	61

Tabla XIV.	Curva de calibración. Linealidad día 3. Loratadina.....	62
Tabla XV.	Linealidad Clorhidrato de Ambroxol.	67
Tabla XVI.	Linealidad Loratadina.	67
Tabla XVII.	Evaluación de la precisión del sistema y del método de análisis cromatográfico, ensayo repetibilidad. Clorhidrato de ambroxol.	71
Tabla XVIII.	Evaluación de la precisión del sistema y del método de análisis cromatográfico, ensayo repetibilidad. Loratadina.....	71
Tabla XIX.	Evaluación de la precisión intermedia del análisis cromatográfico. Clorhidrato de ambroxol.....	73
Tabla XX.	Evaluación de la precisión intermedia del análisis cromatográfico. Loratadina.	73
Tabla XXI.	Recuperación del contenido de clorhidrato de ambroxol y loratadina. Evaluación de la exactitud del método.....	77
Tabla XXII.	Estándar de referencia y muestra control. Evaluación de la especificidad del método.	83
Tabla XXIII.	Especificidad del método de análisis. Ángulos de pureza (PA) y ángulos umbral (TH) correspondientes al clorhidrato de ambroxol y loratadina en las muestras sometidas a condiciones extremas.....	92
Tabla XXIV.	Especificidad del método de análisis. Contenido de clorhidrato de ambroxol en las muestras sometidas a condiciones extremas.	93
Tabla XXV.	Especificidad del método de análisis. Contenido de loratadina en las muestras sometidas a condiciones extremas.....	93
Tabla XXVI.	Parámetros aplicados en la evaluación de la robustez del método.	95
Tabla XXVII.	Configuración de parámetros empleados en los experimentos para la evaluación de la robustez del método.....	95

Tabla XXVIII.	Análisis del contenido de clorhidrato de ambroxol y loratadina presentes en medicamentos de diferentes marcas comerciales.	98
Apéndice B		
Tabla 1.	Factores cromatográficos. Patrón 100 % clorhidrato de ambroxol.	119
Tabla 2.	Factores cromatográficos. Patrón 100 %. Loratadina.	120
Tabla	Apéndice C. Reproducibilidad instrumental.	121
Apéndice D. Linealidad.		
Tabla 1.	Hipótesis estadística, función de la respuesta lineal. Clorhidrato de ambroxol.	125
Tabla 2.	Hipótesis estadística, función de la respuesta lineal. Loratadina.	125
Tabla 3.	Comparación de desviaciones estándar. Estadístico de Fisher, estudio de contraste F. Clorhidrato de ambroxol.	126
Tabla 4.	Comparación de desviaciones estándar. Estadístico de Fisher, estudio de contraste F. Loratadina.	126
Apéndice E. Precisión.		
Tabla 1.	Precisión del método. Clorhidrato de ambroxol.	127
Tabla 2.	Precisión del método. Loratadina.	128
Tabla 3.	Precisión intermedia. Analista 1.	129
Tabla 4.	Precisión intermedia. Analista 2.	130
Tabla 5.	Precisión intermedia. Analista 3.	132
Apéndice F. Exactitud.		
Tabla 1.	Contenido de clorhidrato de ambroxol presente en las muestras sin enriquecimiento (S/E).	134
Tabla 2.	Determinación del porcentaje de recuperación en las muestras	

	enriquecidas. Clorhidrato de ambroxol.....	134
Tabla 3.	Contenido de loratadina presente en las muestras sin enriquecimiento.	135
Tabla 4.	Determinación del porcentaje de recuperación en las muestras enriquecidas. Loratadina.	135
Apéndice G. Robustez.		
Tabla 1.	Evaluación de la robustez del método. Clorhidrato de ambroxol.	136
Tabla 2.	Evaluación de la robustez del método. Loratadina.....	137
Apéndice H. Análisis de medicamentos de diferentes marcas comerciales.		
Tabla 1.	Análisis. Medicamento A.....	138
Tabla 2.	Análisis. Medicamento B.....	139
Tabla 3.	Análisis. Medicamento C.....	140

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Molécula de clorhidrato de ambroxol.	7
Figura 2.	Estructura general de las moléculas antagonistas H ₁	10
Figura 3.	Molécula de loratadina.	11
Figura 4.	Molécula de descarboetoxiloratadina.	12
Figura 5.	Cromatograma. Cuantificación de clorhidrato de ambroxol y ácido benzoico en jarabe. Heinänen, M; Barbas, C. Condiciones acetonitrilo: (H ₃ PO ₄ 8,5 mM/ trietilamina pH=2,8) 40:60 % v/v.....	25
Figura 6.	Cromatogramas. Cuantificación de clorhidrato de ambroxol y ácido benzoico en jarabe. Heinänen, M; Barbas, C. Condiciones metanol: (H ₃ PO ₄ 8,5 mM/ trietilamina pH=2,8) 40:60 % v/v.....	25
Figura 7.	Cromatogramas ácido benzoico y placebo. Cuantificación de clorhidrato de ambroxol y ácido benzoico en jarabe. Heinänen, M; Barbas, C. Condiciones metanol/ (H ₃ PO ₄ 8,5 mM/ trietilamina pH=2,8) 40:60 % v/v.....	26
Figura 8.	Cromatograma estándar y muestra. Determinación simultánea de clorhidrato de cetiricina y clorhidrato de ambroxol en jarabes. Raja, MG; Geetha G y colaboradores.....	30
Figura 9.	Barrido de longitudes de onda de los principios activos clorhidrato de ambroxol y loratadina en un rango de 200 a 400 nm.	42
Figura 10.	Cromatograma. Fase móvil metanol y buffer H ₃ PO ₄ (8,5 mM, pH 2,8 ajustado con trietilamina) en proporción 40:60 % v/v.....	45
Figura 11.	Cromatograma. Fase móvil buffer fosfato monobásico de amonio (0,05 M, pH 3,4) y metanol en proporción 50:50 %v/v.....	49
Figura 12.	Cromatograma. Fase móvil buffer fosfato monobásico de amonio (0,05 M, pH 3,4) y metanol en proporción 45:55 %v/v.....	50

Figura 13.	Cromatograma. Fase móvil buffer fosfato monobásico de amonio (0,05 M, pH 3,4) y metanol en proporción 40:60 %v/v.....	50
Figura 14.	Cromatograma. Material de referencia interno.....	53
Figura 15.	Cromatograma. Determinación del volumen muerto.....	55
Figura 16.	Cromatograma solución estándar control. Especificidad.....	81
Figura 17.	Cromatograma muestra control. Especificidad.....	81
Figura 18.	Cromatograma muestra a los 7 días de su preparación. Especificidad.....	82
Figura 19.	Gráfico de pureza. Muestra a los 7 días de su preparación.....	82
Figura 20.	Cromatograma muestra expuesta a fotólisis.....	84
Figura 21.	Gráfico de pureza. Muestra expuesta a fotólisis.....	84
Figura 22.	Cromatograma muestra expuesta a estrés oxidativo.....	85
Figura 23.	Gráfico de pureza de la banda cromatográfica. Clorhidrato de ambroxol.....	86
Figura 24.	Gráfico de pureza de la banda cromatográfica de loratadina.....	86
Figura 25.	Cromatograma muestra expuesta a hidrólisis ácida.....	87
Figura 26.	Gráficos de pureza, clorhidrato de ambroxol y loratadina.....	88
Figura 27.	Cromatograma muestra expuesta a hidrólisis básica.....	88
Figura 28.	Gráficos de pureza, clorhidrato de ambroxol y loratadina.....	89
Figura 29.	Cromatograma muestra expuesta a termólisis.....	90
Figura 30.	Gráficos de pureza de pico, clorhidrato de ambroxol y loratadina	91
Figura 31.	Cromatograma. Análisis del medicamento A.....	99
Figura 32.	Gráficos de pureza, clorhidrato de ambroxol y loratadina.....	99
Figura 33.	Cromatograma. Análisis del medicamento B.....	100
Figura 34.	Gráficos de pureza, clorhidrato de ambroxol y loratadina.....	101

Figura 35.	Cromatograma. Análisis del medicamento C.....	101
Figura 36.	Gráficos de pureza, clorhidrato de ambroxol y loratadina.....	102
Figura 37.	Esquema equipo de cromatografía líquida, HPLC.....	115
Figura 38.	Esquema detector de onda variable o espectrofotómetro empleado en cromatografía líquida, HPLC.....	117
Figura 39.	Diagrama del camino de la luz y camino del líquido para una celda de cromatografía líquida de doble haz para columnas de relleno. Detector de absorción UV-visible empleado en cromatografía líquida, HPLC.....	117

ÍNDICE DE GRÁFICOS

		Páginas
Gráfico 1.	Linealidad día 1. Clorhidrato de ambroxol.....	58
Gráfico 2.	Linealidad día 2. Clorhidrato de ambroxol.....	59
Gráfico 3.	Linealidad día 3. Clorhidrato de ambroxol.....	60
Gráfico 4.	Linealidad día 1. Loratadina.	61
Gráfico 5.	Linealidad día 2. Loratadina.	62
Gráfico 6.	Linealidad día 3. Loratadina.....	63
Gráfico 7.	Análisis de residuales. Clorhidrato de ambroxol.....	64
Gráfico 8.	Análisis de residuales. Loratadina.....	65
Gráfico 9.	Linealidad del clorhidrato de ambroxol. Superposición de curvas linealidad día 1, 2 y 3.	69
Gráfico 10.	Linealidad de la loratadina. Superposición de curvas linealidad día 1, 2 y 3.	69
Gráfico 11.	Relación entre las concentraciones estimadas y las concentraciones reales (80, 100 y 130 %). Clorhidrato de ambroxol.....	77
Gráfico 12.	Relación entre las concentraciones estimadas y las concentraciones reales (80, 100 y 130 %). Loratadina.....	78
Apéndice E		
Gráfico 1.	Precisión intermedia. Clorhidrato de ambroxol. Analista 1.....	129
Gráfico 2.	Precisión intermedia. Loratadina. Analista 1.....	130
Gráfico 3.	Precisión intermedia. Clorhidrato de ambroxol. Analista 2.....	131
Gráfico 4.	Precisión intermedia. Loratadina. Analista 2.....	131
Gráfico 5.	Precisión intermedia. Clorhidrato de ambroxol. Analista 3.....	132
Gráfico 6.	Precisión intermedia. Loratadina. Analista 3.....	133

1. Introducción

La industria farmacéutica está orientada hacia la fabricación y comercialización de medicamentos para el tratamiento y prevención de enfermedades, así como desarrollar y fomentar la investigación e introducción de nuevos tratamientos farmacológicos, con el fin de mejorar la calidad de vida tanto humana como animal.

Los modernos avances científicos y tecnológicos aceleran el descubrimiento y desarrollo de productos farmacéuticos innovadores, dotados de mejor actividad terapéutica y menores efectos secundarios. En este sentido los biólogos moleculares, químicos y farmacéuticos mejoran los beneficios de los fármacos aumentando la actividad y la especificidad. ^[1]

Últimamente se ha estado empleando más de un principio activo en la formulación y fabricación de medicamentos, con el fin de mejorar la eficacia del medicamento sobre un tratamiento específico. Dado que los principios activos que se utilizan en los medicamentos presentan una gran variedad de actividades farmacológicas y propiedades toxicológicas, es necesario un riguroso control de calidad para garantizar la composición exacta de los componentes presentes en los mismos, lo que implica técnicas y métodos que permiten identificar, clasificar y analizar las propiedades que contribuyen a la adecuación del uso de un producto, proceso o servicio, para la mejora y el aseguramiento de la calidad.

Hoy en día los laboratorios farmacéuticos deben demostrar que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables y adecuados para la finalidad y propósito perseguido. En el marco de las buenas prácticas de manufactura (BPM), los métodos de análisis de medicamentos deben ser evaluados y sometidos a prueba para asegurar que producen resultados validos y coherentes con el objetivo previsto, es decir, han de ser validados, o bien, verificados. ^[2] Es por eso que la validación de los métodos analíticos corresponde un requisito que permite a un fabricante de medicamentos demostrar que cumple con las buenas prácticas de manufactura de

productos farmacéuticos, lo cual asegura a la autoridad reguladora que el medicamento es eficaz, seguro y de calidad.

La validación de un método analítico es un procedimiento que permite demostrar por medio de pruebas científicas que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. Implicando la demostración de la determinación de las fuentes de variabilidad y del error sistemático y al azar de un procedimiento, no solo dentro de la calibración sino en el análisis de muestras reales. [3]

El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que el mismo es apto para el uso previsto. La validación de los procedimientos analíticos se dirige a los cuatro tipos más comunes de procedimientos analíticos: pruebas de identificación, prueba cuantitativa para el contenido de impurezas, ensayos límite para el control de impurezas, pruebas cuantitativas de la fracción activa en las muestras de sustancias de drogas o medicamento u otro(s) componente(s) seleccionado(s) en el producto. Los procedimientos de ensayo están diseñados para medir el analito presente en una muestra dada, donde se representa una medición cuantitativa del (de los) componente(s) principal(es) en el producto farmacológico. Las mismas características de validación también pueden aplicarse a los ensayos relacionados con otros procedimientos de análisis (por ejemplo, disolución). [3]

En este orden de ideas, los requerimientos de validación de procedimientos analíticos son de particular interés para la presente investigación, en la cual se desarrollará y validará un método analítico para la cuantificación de los principios activos presentes en medicamentos empleados para el alivio sistemático de los procesos alérgicos respiratorios; asociados o no con la presencia de mucosidad en el tracto respiratorio, y/o procesos broncopulmonares alérgicos, que presentan como síntoma principal la tos.

2. Revisión bibliográfica

2.1. Tos

El término tos se refiere a un mecanismo reflejo de protección que elimina materiales exógenos y secreciones de los bronquios y los bronquiolos, ^[4] asegurando la permeabilidad de las vías respiratorias, constituyendo uno de varios procesos mediante los cuales los pulmones se depuran de secreciones y material extraño inhalado. Consta de tres fases: apertura de la glotis con inspiración, cierre de la glotis con contracción de los músculos respiratorios y apertura brusca de la glotis con expulsión del aire retenido en los pulmones. ^[5]

La tos es frecuente en la mayoría de las infecciones virales agudas de las vías respiratorias superiores, incluso las causadas por los agentes habituales del resfriado común como rinovirus, coronavirus y virus sincicial respiratorio. ^[6] Asimismo, puede ser desencadenada por una reacción inflamatoria en las vías respiratorias, como asma diagnosticada o reflujo crónico con aspiración, o bien por una neoplasia. La tos es una reacción adversa muy frecuente de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, en cuyo caso el tratamiento consiste en una sustitución por otros compuestos, especialmente un antagonista de los receptores de angiotensina. Cabe considerar que se denomina a un antagonista de un receptor, al fármaco que se une sin activarlo y evita de este modo la unión del agonista. ^[4]

La tos se produce por estimulación de la mucosa de los bronquios, la tráquea o la laringe, ya sea por acumulación excesiva de moco en la superficie, sequedad, enfriamiento o sustancias químicas. Durante un acceso de tos, se elimina el contenido de las vías respiratorias mediante diferentes mecanismos. El elevado flujo de aire en las vías respiratorias hace que se expulsen materias extrañas, así como mucosidades. Durante la exhalación forzada, las vías se reducen y comprimen las secreciones de las vías respiratorias pequeñas, de forma que facilitan su expulsión. ^[5]

Las causas de la tos son diversas, entre las principales se encuentran: enfermedades de origen otorrinolaringológico (nariz, garganta y oído), enfermedades como sinusitis, rinitis, amigdalitis, neumonía o bronquitis aguda, asma y alergias; irritación de las vías aéreas superiores; afecciones pulmonares agudas o crónicas; y otras causas accidentales como cuerpos extraños, alimentos en la tráquea, humo, entre otras. [5, 7]

TIPOS DE TOS

Existen diferentes tipos de tos, algunas de ellas requieren tratamiento farmacológico mientras que otras son de menor carácter alarmante. Según la Asociación de Farmacéuticos Adjuntos de Huelva (AFADHU) y el Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Barcelona, los tipos de tos pueden clasificarse de la siguiente manera:

Tos seca o no productiva. Es una tos molesta, fatigante, que no va acompañada de expectoración, donde el sonido seco que se genera es el resultado de la vibración de las cuerdas vocales.

En la mayoría de los casos responde a estímulos irritativos en las vías respiratorias altas. La tos seca no aporta ningún beneficio al organismo, agrava la irritación, y además, supone una vía de diseminación de los microorganismos que se hallan en las vías respiratorias del paciente que la padece.

Tos productiva. Denominada popularmente como tos blanda o húmeda, acompañada de mucosidad en las vías respiratorias bronquiales y expulsión de moco y flemas (expectoración).

Este tipo de tos ayuda a eliminar el esputo (mucosidad o flema) y evita que las secreciones se acumulen en la luz bronquial, obstruyéndola, y minimizando el consiguiente riesgo de sobreinfección de las secreciones acumuladas.

Tos seca falsa: no se consigue expectorar y se produce la deglución de la mucosidad (se da sobre todo en mujeres y niños). También denominada “tos congestiva no productiva”, en la que no aparece expectoración aunque el paciente refiere sensación de opresión en el pecho, por congestión de las vías respiratorias bronquiales.

Tos crónica o aguda: Cuando la tos es más o menos permanente, tiende a perpetuarse a partir de la tercera semana de duración porque la expulsión violenta del aire irrita la tráquea y la laringe. La tos crónica puede ser por una enfermedad latente que supera los mecanismos de defensa, comúnmente padecida por los fumadores habituales, es una tos irritativa.

Tos psicógena (tics): conocida como tos psicósomática, presente en aquellas personas que tienen la costumbre de toser antes de hablar, y cuando están muy nerviosas.

TRATAMIENTOS PARA LA TOS

Como se mencionó anteriormente, la tos puede ser un síntoma de una multitud de posibles enfermedades, al mismo tiempo, las molestias de la tos se pueden mitigar mediante algunos medios y medidas. Principalmente hay que proporcionar al tracto respiratorio la humedad necesaria, tanto por ingestión de líquidos como por humidificación del aire respirado. Se recomienda calmar la tos seca no productiva y facilitar la tos productiva con expectorantes y/o mucolíticos.

Si la tos es seca, no productiva, no sólo produce malestar sino que tiende a auto perpetuarse, a causa de la irritación de la tráquea y de la mucosa faríngea. En estos casos está indicado el tratamiento con fármacos antitusígenos. En caso que la tos sea productiva, puede estar indicada la administración de fármacos expectorantes y/o mucolíticos, para facilitar la extracción de las flemas. ^[5,7]

Los medicamentos antitusígenos pueden ser de dos tipos:

De acción central, que suprimen o inhiben el reflejo de la tos deprimiendo el centro de la tos.

De acción periférica, que pueden actuar sobre la rama eferente del reflejo de la tos.

Los medicamentos mucolíticos hacen disminuir la viscosidad de la secreción bronquial; por tanto, facilitan la expulsión del esputo (mucosidad o flema). Mientras que los medicamentos expectorantes estimulan el mecanismo de eliminación, por ejemplo, con el movimiento ciliar que impulsa la secreción hacia la faringe para ser eliminada por expectoración o deglución. ^[5]

2.2. Expectorante

Los expectorantes son fármacos orales de los que se presume incrementan la eliminación de moco, tales fármacos a menudo se utilizan como eméticos -vomitivo-, que se administran en dosis por debajo de la producción de vómito, con base en que producen irritación gástrica, lo que podría estimular un incremento en la eliminación de moco por mecanismo reflujo. Sin embargo, no existen pruebas para esta suposición. ^[8]

2.3. Mucolítico

Varios fármacos pueden reducir la viscosidad del esputo –mucosidad, flema- *in vitro*, los cuales son denominados con el término farmacológico mucolítico. Los mucolíticos modifican las propiedades físico-químicas de la secreción traqueobronquial, para que la expectoración sea más eficaz y cómoda. Estos fármacos también actúan como antioxidantes y por tanto pueden reducir la inflamación de las vías respiratorias. ^[8]

Uno de los componentes activos presentes en fármacos que actúan como agentes expectorantes y mucolíticos comúnmente empleado a nivel comercial es el ambroxol, el cual es de particular interés para esta investigación.

2.4. Ambroxol

El Ambroxol, (*trans*-4-[2-amino-3,5-dibromofenil-metil-amino] ciclohexanol) ó (2-amino-3,5-dibromo-*N*-(*trans*-4-hidroxiciclohexil)bencilamina), (Figura 1) es usado como expectorante mucolítico broncosecretolítico en diferentes preparaciones farmacéuticas. ^[9]

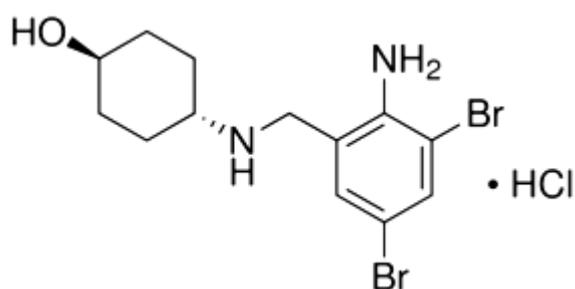


Figura N° 1. Clorhidrato de Ambroxol

Clorhidrato *trans*-4-[2-amino-3,5-dibromofenil-metil-amino] ciclohexanol

La molécula de ambroxol posee dos grupos amino, uno alifático y otro aromático. Estos grupos funcionales se caracterizan por ser bases ligeramente fuertes. El grupo amino aromático presenta menor basicidad que el alifático, debido a la deslocalización por resonancia de los electrones no enlazantes de la amina, y por tanto, una menor disponibilidad para reaccionar con el protón ácido. Las aminas son fuertemente polares y tienden a formar puentes de hidrógeno con disolventes hidroxilados, como el agua y los alcoholes; con excepción de las aminas terciarias. El ambroxol presenta un alcohol secundario en su estructura, en dicho grupo funcional el protón del grupo hidroxilo es débilmente ácido, con una constante de disociación ácida de 1×10^{-18} . El grupo hidroxilo forma puentes de hidrógeno, lo que le confiere un carácter hidrofílico al presentar afinidad por el agua y otras sustancias

polares. La menor electronegatividad del nitrógeno, comparada con la del oxígeno, hace que los puentes de hidrógeno que forman las aminas sean más débiles que los formados por los alcoholes. También se presentan como sustituyentes del anillo aromático dos moléculas de bromo, en posición meta entre ellas, que desactivan el anillo aromático. Los aromáticos halogenados son generalmente insolubles en agua. [10, 11]

Tabla I. Propiedades físico químicas de la molécula de clorhidrato de ambroxol.

Formula molecular	$C_{13}H_{18}BrN_2O.HCl$
Peso molecular	414,6 g/mol
Estado físico	Cristales blancos o amarillentos
Punto de fusión	233-234,5 °C
Solubilidad	Soluble en metanol, insoluble en cloruro de metileno, ligeramente soluble en agua.
pKa (Temperatura 25°C)	8,69

El ambroxol es administrado como sal hidroclicórica en un rango de dosis entre 30-120 mg empleado mayormente en presentaciones tableta y jarabe. Es comúnmente usado para el tratamiento de enfermedades respiratorias agudas o crónicas asociadas con un aumento de la producción de moco, tales como la bronquitis crónica. Debido a su capacidad para promover la secreción y el aclaramiento bronquial, el ambroxol se utiliza como un mucolítico y/o expectorante.

Más recientemente, una aplicación tópica de ambroxol, ha sido aprobado para el tratamiento del dolor de garganta y faringitis asociada con infecciones orofaríngeas agudas. Los efectos farmacológicos de ambroxol cubren una amplia gama, incluyendo la regulación de moco en las células de la glándula, el aumento y fabricación de agente tensoactivo pulmonar, neutralización de estrés oxidativo y nitrosativo, la supresión de la replicación del virus respiratorio, la reducción de citoquinas proinflamatorias, quimiotaxis, estallido respiratorio de las células

inflamatorias, y peroxidación de lípidos del tejido, así como, notablemente, efectos anestésicos locales. ^[2] Después de su administración oral, presenta una rápida y completa velocidad de absorción, observándose la máxima concentración plasmática después de dos horas de su administración, manteniéndose durante 9-10 horas. Presentando un tiempo de vida media estimado entre 20-25 horas, para luego ser excretado casi completamente en la orina. ^[12]

Cabe considerar, como se mencionó anteriormente, que la tos puede ser causa de estados alérgicos, los cuales requieren un tratamiento que no solo actúe sobre la tos sino también sobre el estado alérgico. Es por ello que surgen preparaciones farmacológicas, constituidas tanto por agentes expectorantes y/o mucolíticos así como agentes antihistamínicos.

2.5. Antihistamínico

La histamina es un vasodilatador potente, contrae el músculo de la fibra lisa de bronquios y estimula los receptores nociceptivos del prurito. Las células cebadas de la piel del ser humano poseen receptores H_1 , H_2 y H_4 , estos receptores participan en la formación de reacciones cutáneas alérgicas, específicamente formación de equimosis (mancha en la piel producida por la acumulación de sangre en el tejido celular subcutáneo, consecutiva a la rotura de los capilares de esta zona) y eritema (trastorno cutáneo, enrojecimiento de la piel, causada por problemas con los capilares en la zona afectada), en tanto que sólo los agonistas de los receptores H_1 ocasionan prurito. El bloqueo completo de los receptores H_1 no anula del todo el prurito y las combinaciones con antagonistas receptores H_1 y H_2 pueden ser menores que el empleo de los bloqueadores de receptores H_1 solos.

Muchos antagonistas de H_1 presentan una fracción etilamina sustituida similar en la molécula de histamina, a diferencia de esta última muchos antagonistas de H_1 poseen un grupo amino terciario unido por medio de una cadena de dos o tres

átomos seguido de dos sustituyentes aromáticos, (Figura 2), donde Ar representa el grupo arilo y X es un átomo de nitrógeno o de carbono o un enlace –C-O- (éter) a la cadena lateral β-aminoetilo.

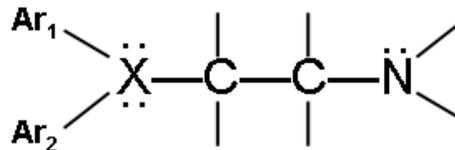


Figura Nº 2. Estructura general de las moléculas antagonistas de H₁

Los antihistamínicos orales y, en particular los antagonistas de los receptores H₁, poseen actividad anticolinérgica y efectos sedantes, lo que los torna útiles para erradicar el prurito.

Todos los antagonistas del receptor H₁ disponibles, son antagonistas inversos que aminoran la actividad constitutiva del receptor y compiten con la histamina en tanto que la unión de la histamina con el receptor induce una conformación totalmente activa, la unión con antihistamínicos genera una conformación inactiva. El efecto observado es proporcional a la ocupación del receptor por parte del antihistamínico.

Los antagonistas de los receptores H₁ de la segunda generación, no muestran los efectos anticolinérgicos adversos y se describen en gran medida como no sedantes porque no cruzan la barrera hematoencefálica, entre los más utilizados se encuentran la cetirizina, dicloruro de levocetirizina, loratadina, desloratadina y clorhidrato de fexofenadina. La loratadina, de particular interés para esta investigación, es un antagonista de receptores H₁ de la segunda generación con un tiempo de vida medio en adultos de ocho horas. ^[8]

2.6. Loratadina

Loratadina (etil-4-(8-cloro-5,6-dihidro-11H-benzo[5,6]ciclohepta[1,2-b]piridin-11-ilideno-a-piperidincarboxilato), (Figura 3), es un antihistamínico de acción prolongada, selectivo de los receptores periféricos H₁, de actividad antagónica. Es empleada en procesos alérgicos tales como rinitis alérgica, urticaria crónica idiopática, alergia a picaduras de insectos, alergia a medicamentos. ^[12] La loratadina está desprovista de efectos de sedación y anticolinérgicos significativos sobre el sistema nervioso central y sistema nervioso autónomo, debido a que este fármaco se une a las proteínas plasmáticas en elevada proporción y prácticamente no atraviesa la barrera hematoencefálica. ^[13]

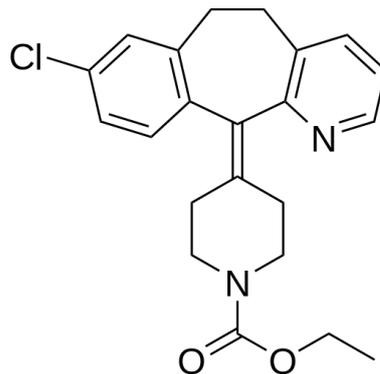


Figura 3. Loratadina

Etil-4-(8-cloro-5,6-dihidro-11H-benzo[5,6]ciclohepta[1,2-b]piridin-11-ilideno-a-piperidin) carboxilato

La molécula de loratadina presenta una estructura tricíclica, constituida en uno de sus extremos por una molécula de piridina, compuesto aromático nitrogenado de carácter básico debido al par de electrones no enlazante disponibles, en solución ácida la piridina se protona y forma el ión piridinio. La estructura de loratadina está caracterizada por la presencia del grupo funcional carbamato.

Los ésteres son derivados de ácido, son estables, la mayoría de los esteres no reaccionan con agua en condiciones neutras, sin embargo se hidrolizan en condiciones ácidas o básicas. ^[10]

Tabla II. Propiedades físico-químicas de la molécula de loratadina

Formula molecular	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₂
Peso molecular	382,88 g/mol
Estado físico	Cristales blancos
Punto de fusión	132 °C
Solubilidad	Muy soluble en acetona, alcohol y cloroformo
pKa (Temperatura 25°C)	4,27± 0,20

La loratadina es presentada bajo las formas farmacéuticas de tabletas y jarabe, con una dosis de 10 mg para tabletas y 5 mg/ 5 mL para el jarabe. Esta molécula es activa por vía oral presentándose el inicio de la acción antihistamínica entre 0,5-3 horas después de su administración, con un efecto máximo entre 1-12 horas y la duración del efecto se extiende hasta las 24 horas gracias a su metabolito activo denominado descarboetoxiloratadina. ^[12]

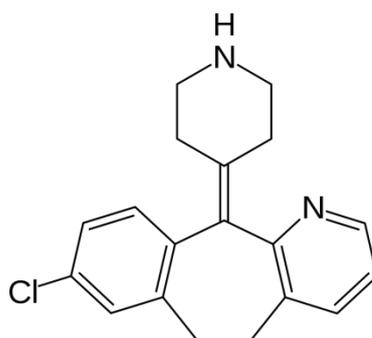


Figura 4. Descarboetoxiloratadina

8-cloro-6,11-dihidro-11-(4-piperidinilideno)- 5H-benzo[5,6]ciclohepta[1,2-b]piridin

Actualmente, en el mercado nacional existen diversos fármacos destinados para el tratamiento de pacientes que presenten síntomas de tos y alergia, en conjunto. Uno de los principales fármacos empleados en nuestro país comprende la combinación de clorhidrato de ambroxol y loratadina, expandido mayormente en formulaciones farmacéuticas tipo jarabe.

2.7. Jarabe comercial constituido por los componentes activos loratadina y clorhidrato de ambroxol

La combinación de ambroxol y loratadina, como principios activos, es empleada en el tratamiento contra enfermedades respiratorias, los cuales presentan una acción complementaria al combinar carácter de un antihistamínico no sedante de acción prolongada (loratadina) y un expectorante y mucolítico (ambroxol); indicada para el tratamiento de pacientes que muestran condiciones broncopulmonares de origen alérgico, asociados con tos, en los cuales se incrementa la viscosidad y adherencia mucosa, dificultando la permeabilidad de las vías aéreas. ^[12]

Esta combinación está diseñada para el alivio sistemático de los procesos alérgicos respiratorios asociados o no con la presencia de moco en el tracto respiratorio, así como en aquellos procesos broncopulmonares alérgicos o no, que cursen con aumento de la viscosidad y adherencia del moco, en los que es necesario mantener libre de secreciones de las vías respiratorias. La composición de este medicamento en su presentación farmacológica jarabe, contempla que cada 5 mL de solución oral contiene 5 mg de loratadina más 30 mg de ambroxol, en presentaciones de 60 mL en frasco y 15 mL dispensador en gotas. ^[14]

Actualmente, en el mercado nacional son expedidos, en formulaciones de solución oral o jarabe, alrededor de siete medicamentos de diferentes marcas comerciales en donde se encuentran combinados los fármacos clorhidrato de ambroxol y loratadina.

Los cuales están registrados en el Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (INHRR).

2.8. Entes reguladores relacionados con el registro y control de medicamentos

El INHRR es un instituto autónomo de referencia nacional para el control sanitario de productos de uso y consumo humano para el cumplimiento de las normativas nacionales e internacionales de gestión de la calidad, en cumplimiento con las políticas de salud del estado venezolano. ^[15]

Este ente establece los requisitos y protocolo analítico de productos farmacéuticos para el seguimiento de la calidad, basado en los estándares establecidos en las farmacopeas correspondientes a códigos oficiales de especificaciones de calidad y pautas de productos farmacéuticos. Siendo las principales farmacopeas la norteamericana The United States Pharmacopeial, conocida por sus siglas en inglés USP y la farmacopea británica (BP). ^[16]

Siendo la validación de los métodos analíticos un requisito para asegurar a la autoridad reguladora que se producen resultados validos y coherentes, asegurando un medicamento eficaz, seguro y de calidad, cuyas normas para la validación están regidas tanto por la USP como por la ICH, *The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*.

La validación de los procedimientos analíticos están regidos bajo el apartado <1225> de la USP, correspondiente al compendio de validación de procedimientos el cual comprende las características analíticas de alto rendimiento de exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, rango de linealidad,

robustez y adecuación del sistema; así como los datos elementales para la validación del análisis basado en una categoría dada. ^[17]

Tabla III. Elementos requeridos para validación.

Características analíticas de rendimiento	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Cuantitativo	Test limite		
Exactitud	Si	Si	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Si	*	Si
Límite de detección	No	No	Si	*	No
Límite de cuantificación	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No
Rango	Si	Si	*	*	No

*Puede requerir, dependiendo de la naturaleza específica del test. Datos tomados de <1225> USP ^[17]

Categoría I. Procedimientos analíticos para la cuantificación de componentes mayoritarios de fármacos o componentes activos, incluyendo preservantes, en productos farmacéuticos terminados. Comprende las características analíticas de alto rendimiento de exactitud, precisión, especificidad, linealidad y rango.

Categoría II. Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en las sustancias farmacológicas granel o compuestos de degradación productos farmacéuticos acabados. Estos procedimientos incluyen ensayos cuantitativos y pruebas de límites. ^[17]

Cuantitativa. La determinación de impurezas y productos de degradación de proceso implica el análisis de trazas donde los componentes presenten menos del 1% de la concentración analítica de la sustancia fármaco a granel o de la demanda de la etiqueta del medicamento terminado. ^[18]

Pruebas de límite. En el caso de la prueba de límite, no está involucrado cuantificación. Una muestra se ejecuta contra un estándar preparado a nivel de especificación. La respuesta de la muestra se determina por encima o por debajo de la cantidad estándar, cuyos resultados pueden ser de aprobación o no de la especificación. ^[18]

Categoría III. Procedimientos analíticos para la determinación de las características de rendimiento (por ejemplo, disolución y liberación del fármaco). ^[17]

Categoría IV. Prueba de identificación.

Pruebas de identificación de la categoría IV sólo requieren especificidad para su validación. La identificación por HPLC generalmente implica la comparación del tiempo de retención o tiempo de retención relativo de una muestra y de inyección estándar. El uso creciente de matriz de fotodiodos (PDA) detectores en métodos de HPLC también permite la identificación mediante la comparación de los espectros de UV de las normas y muestra, además de las características de retención. ^[18]

El procedimiento analítico aplicado para la validación del método desarrollado para la determinación simultánea de clorhidrato de ambroxol y loratadina se regirá bajo las características de validación concernientes a la categoría I de los procedimientos para validación de datos establecidos en el apartado <1225> de la USP que requieren ser evaluadas.

Numerosos métodos definidos en la literatura describen metodologías para la determinación de los componentes farmacológicos activos, clorhidrato de ambroxol y

loratadina expuestos anteriormente, de forma individual y en combinación con otros fármacos. Los métodos descritos para la determinación de loratadina en preparaciones farmacéuticas incluyen técnicas espectrofotométricas de absorción al ultravioleta y visible, ^[13] espectrofluorimetría, electroforesis capilar, espectrometría de absorción atómica, colorimetría, polarigrafía, HPLC, y RC-TLC. ^[19] Métodos similares han sido utilizados para la determinación individual de clorhidrato de ambroxol en soluciones y en tabletas farmacéuticas que incluyen RC-TLC, espectrofotometría, HPLC, análisis por inyección en flujo (FIA) y electroforesis capilar, se han reportado métodos más complejos para la determinación de ambroxol en fluidos biológicos. ^[20]

La USP reporta un método para la determinación individual de loratadina mediante HPLC, cromatografía líquida de alta eficiencia. Actualmente se encuentran escasas investigaciones que planteen métodos por HPLC para la estimación simultánea del contenido de ambroxol y loratadina en tabletas, sin embargo, no se presentan metodologías validadas y estandarizadas para presentaciones farmacéuticas en jarabe para la mezcla de componentes de interés en esta investigación. Los jarabes presentan en su formulación farmacéutica preservativos, excipientes, colorantes, saborizantes y agentes edulcorantes; la presencia de este tipo de sustancias podrían intervenir en la determinación de los principios activos, así como alterar los resultados esperados para este tipo de formulación, por tal motivo se plantea como objetivo el desarrollo y validación de un procedimiento analítico por HPLC para la determinación simultánea del contenido de clorhidrato de ambroxol y loratadina presentes en formulaciones farmacéuticas tipo jarabe.

El desarrollo de esta metodología permitirá la determinación de ambos componentes activos en una sola corrida cromatográfica, permitiendo disminuir el tiempo de preparación de muestra, tiempo de ensayo, así como economizar en el uso de reactivos al realizar el ensayo en conjunto de ambos componentes activos. Minimizar el tiempo de trabajo/análisis en el laboratorio, así como las horas hombre por determinación cromatográfica realizada.

La validación del método analítico para la determinación de clorhidrato de ambroxol y loratadina, permitirá demostrar por medio de una base de datos, que dicho método cumple con los requerimientos necesarios establecidos en la USP para procedimientos analíticos para la cuantificación de componentes mayoritarios de fármacos o bien componentes activos, incluyendo preservantes, en productos farmacéuticos terminados.

3. Antecedentes de la investigación

USP 36. Monografía oficial. Loratadina solución oral

La monografía oficial de la USP 36 ^[21] establece el uso de la columna cromatográfica L₁₁ (30 cm x 3,9 mm, 10 µm), empaque de columna correspondiente a grupos fenilo unidos químicamente a partículas de sílice porosas de 1,5 µm a 10 µm de diámetro, para la determinación y cuantificación de loratadina en presentaciones farmacéuticas tipo solución oral, empleando como condiciones cromatográficas un volumen de inyección de 10 µL, fase móvil mezcla acetonitrilo: buffer fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄) 6,8 g/L pH 3,0, en proporción 30:70 % v/v. Flujo de la fase móvil 2,0 mL/min. Longitud de onda de trabajo 254 nm. Temperatura columna 20-30 °C.

El procedimiento establecido plantea el uso de una solución estándar de 5 mg/mL de loratadina en CH₂Cl₂, empleando como estándar interno butilparabeno en concentración de 0,3 mg/mL. Empleando como solución diluyente la mezcla de acetonitrilo: agua en proporción 30:70 % v/v.

El tratamiento de la muestra consiste en pesar una cantidad de muestra equivalente a 10 mg de loratadina, a la cual se adiciona 10 mL de NaOH 0,2 N y 2,0 mL CH₂Cl₂. Una vez preparada esta solución se procede a centrifugar por espacio de 10 minutos, para el análisis de la muestra se considera la fase orgánica.

La monografía indica que los tiempos de retención relativos son de 0,78 butilparabeno; 1,0 Loratadina. Los valores de asimetría de pico, deben encontrarse alrededor de 1,6 para ambos casos, con desviaciones estándar relativas (RSD) del 2 %.

Validación de las metodologías analíticas para el control de calidad de tabletas de loratadina. Tello, M; Daza, J; y Rocha, M; (1997) ^[13]

Realizaron la validación de dos métodos analíticos para la cuantificación de loratadina en tabletas. Uno de los métodos consistió en una determinación por espectrofotometría ultravioleta a una longitud de onda de 276 nm empleando como solvente HCl 0,1N, obteniendo un intervalo de linealidad entre 6,0-34,0 µg/mL de coeficiente de regresión lineal de 0,9999 y un coeficiente de variación del 0,84 %.

El segundo método consistió en una extracción con etanol y determinación por HPLC; bajo las condiciones cromatográficas siguientes: soluciones estándar etanólicas de loratadina en concentraciones entre 10 y 50 µg/mL, patrón interno diltiazem (30 µg/mL), columna C₁₈, fase móvil de acetonitrilo: metanol: dietilamina al 0,02 % en proporciones 50:20:30 % v/v ajustada a pH 2,5 con H₃PO₄ 0,05 M, en modo isocrático a un flujo de 1,2 mL/min, presión 1300 psi, volumen de inyección de 20 µL y detección espectrofotométrica a 247 nm.

Los resultados obtenidos mostraron que la adición de una amina alifática a la fase móvil permitió mejorar la simetría de picos, presentando tiempos de retención bajo las condiciones cromatográficas propuestas de 3,12 minutos para el diltiazem y 4,50 minutos para la loratadina, con una resolución de 2,824 y un coeficiente de variación del 0,39 %, el método cromatográfico optimizado es aplicable en la identificación y cuantificación de loratadina en el ensayo de valoración de principio activo, no requiriendo de complejos sistemas de extracción y separación.

El etanol empleado para la extracción de loratadina en tabletas permitió obtener porcentajes de recuperación promedio de (100,3 ± 2,6) %, correspondiente a la prueba de uniformidad de contenido evaluado siguiendo el criterio de la USP 23.

La loratadina fue sometida a condiciones de degradación artificial, hidrólisis ácida y oxidación con el fin de evaluar la selectividad del método. La hidrólisis ácida ocasionó una alteración en la estructura de la loratadina, encontrándose que el método cromatográfico propuesto permite separar el subproducto de hidrólisis de la loratadina, con tiempos de retención de 3,37 y 4,50 minutos respectivamente.

Estudio comparativo de comprimidos de loratadina. Varillas, M; Brevedan, M; Gonzalez, N; Sagardoy, M; y Pizzorno, M; (2008)

Varillas y colaboradores ^[22] realizaron un estudio comparativo de comprimidos de loratadina (10 mg) existentes en el mercado farmacéutico argentino y establecieron su equivalencia farmacéutica; efectuando los siguientes ensayos: evaluación de rótulos y prospectos, descripción de los comprimidos, identidad, uniformidad de unidades de dosificación, contenido de loratadina, ensayo y perfiles de disolución, según los requerimientos de USP 29.

El ensayo de uniformidad de contenido fue realizado por espectrofotometría ultravioleta a 280 nm en HCl 0,1 N, según las especificaciones de USP 29, con valores obtenidos que oscilan entre 96,9% y 103,5 % sobre el valor declarado, todas las formulaciones estudiadas cumplen con las especificaciones de USP 29.

Para el ensayo de disolución, apartado II método USP 29, emplearon HCl 0,1 N como medio de disolución a 50 rpm a 37 °C, las muestras fueron debidamente filtradas y cuantificadas por espectrofotometría UV a 280 nm. Todos los productos evaluados cumplen con el porcentaje exigido de liberación del principio activo en el tiempo establecido (no menos del 80 % en 60 minutos). Para el perfil de disolución se tomaron alícuotas a los 7, 15, 30, 45, 60 minutos y cuantificaron por espectrofotometría UV, obteniendo a los 30 minutos del ensayo todas las muestras superaron el 80 % disuelto.

La valoración del contenido de loratadina según el método de HPLC consistió en una fase móvil compuesta por fosfato dibásico de potasio 0,01 M, metanol y acetonitrilo (7:6:6), ajustada a pH 7,2 mediante el agregado de una solución de ácido fosfórico, filtrada a través de membrana de nylon (47 mm, poro 0,45 μm). Columna C_8 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) a temperatura ambiente, bajo condiciones isocráticas y detección del eluido a 254 nm.

La solución estándar fue preparada en una solución diluyente, compuesta por 400 mL ácido clorhídrico 0,05 N y 80 mL fosfato dibásico de potasio 0,6 M, diluidos a 100 mL con mezcla 50:50 % v/v metanol y acetonitrilo. Para la preparación de la solución muestra se transfirieron diez comprimidos de cada marca comercial a un matraces volumétricos de 250 mL. Se agregaron 100 mL de ácido clorhídrico 0,05 N y se agitó por ultrasonido hasta la desintegración de los comprimidos. Posteriormente se agregaron 75 mL de mezcla metanol: acetonitrilo (50:50) y 20 mL de fosfato dibásico de potasio 0,6 M. Se mezcló adecuadamente y se diluyó a volumen con la mezcla metanol: acetonitrilo (50:50). Se realizó dilución 5/50 empleando diluyente. Se filtró por membrana de nylon (25 mm, poro 0,45 μm), se inyectó por triplicado. Concentración de inyección aproximada 0,04 mg/mL. Desviación estándar relativa menor a 2,0 %.

Determinación de Ambroxol en presencia de diferentes conservantes en formulaciones farmacéuticas mediante cromatografía líquida de alta eficiencia. Koundourellis, J; Malliou, E; Broussali, T; (2000)

Koundourellis y colaboradores ^[23] llevaron a cabo la determinación de ambroxol en presencia de diferentes conservantes en formulaciones farmacéuticas tipo jarabe, mediante cromatografía líquida de alta eficiencia.

Para ello estudiaron el comportamiento de retención del clorhidrato de ambroxol junto con metil, etil, propil y butil parabenos, presentes en el jarabe, en función del pH y la composición de la fase móvil formada por buffer acetato de amonio 0,05 M

ajustado con ácido acético glacial a un pH 3,45 y metanol 30:70 % v/v; realizando la continua observación de los eluentes con un detector UV a una longitud de onda de trabajo de 247 nm. Presentando una relación lineal entre cantidades de compuesto farmacéutico y alturas de los picos en un rango de concentración entre 0,74 - 14,08 µg/mL.

Las características instrumentales y parámetros cromatográficos empleados corresponden a columna C₁₈ (150 mm x 4,6 mm, 5 µm), inyector con bucle 20 µL, y análisis bajo condiciones isocráticas.

Los autores realizaron diferentes estudios para seleccionar la fase móvil más conveniente; para ello trabajaron con mezclas de metanol-buffer fosfato y metanol-acetonitrilo-buffer fosfato, observando la formación de precipitados en la fase móvil cuando aumentaron la cantidad de disolvente orgánico. Lo que condujo al empleo de acetato de amonio como buffer, ya que es fácilmente miscible con los disolventes orgánicos y permitió mejorar la simetría del pico. Se presentó dificultad de elución y determinación para los compuestos básicos en su forma no ionizada; en contraste, a pH bajo, la proporción de especies protonadas se incrementa, y como consecuencia la magnitud de la interacción iónica entre las moléculas de soluto aumenta. Las moléculas protonadas tienden a fraccionarse como un par de iones, dependiendo de la naturaleza del anión disponible en la fase móvil, en caso de ambroxol, bajos valores de pH afectan considerablemente la separación del compuesto, mientras que para otros analitos su comportamiento cromatográfico se mantiene casi intacto.

Validación de un método de HPLC para la cuantificación de clorhidrato de ambroxol y ácido benzoico en formulaciones farmacéuticas tipo jarabe como prueba para la evaluación de la estabilidad. Heinänen, M; Barbas, C; (2001)

Heinänen y Barbas ^[20] validaron un método de HPLC para la separación y cuantificación de clorhidrato de ambroxol y ácido benzoico, conservante

antimicrobiano frecuentemente incluido en formas farmacéuticas líquidas, en jarabe como presentación farmacéutica.

Dado las características ácido-base de los compuestos, se presentó un estudio de variabilidad de la separación cromatográfica en dependencia del pH, empleando dos tipos de fases estacionarias y cambios en el pH de la fase móvil y adición de modificadores.

Para el análisis se empleó un sistema de HPLC con inyector automático, detector de arreglo de diodos, columna C₈ de (25 cm x 0,46 cm, 5 µm) en horno de columna a 35 °C. Fase móvil metanol-buffer acuoso (8,5 mM de H₃PO₄ y pH 2,8 ajustado por adición de trietilamina) en proporción 40:60 % v/v. Las muestras fueron preparadas disolviendo los analitos en la fase móvil en una concentración de 0,3 mg/mL de clorhidrato de ambroxol y 0,2 mg/mL de ácido benzoico, posteriormente fueron filtrados a través de membranas de nylon de 0,45 µm de tamaño de poro antes de pasar a viales de inyección.

La optimización cromatográfica partió de una fase móvil de buffer fosfato 8,5 mM, pH 6,5, acetonitrilo 60:40 % v/v, bajo estas condiciones los cromatogramas mostraron interferencias del placebo con el estándar de ácido benzoico. Seguidamente, realizaron cambios en las proporciones de acetonitrilo y el pH del buffer, así como la adición de tetrahidrofurano. Dichas condiciones no mostraron resultados satisfactorios. (Figura 5). Dado que el metanol presenta una fuerte influencia en la disociación del soluto básico, así como efectos característicos en la retención de solutos básicos, en dicha investigación plantean el cambio de acetonitrilo por metanol como disolvente.

Obteniendo como resultado que un compuesto con propiedades básicas, como clorhidrato de ambroxol, es más retenido en RP-HPLC en su forma molecular o desionizada, con valores más altos de pH en la fase móvil, lo contrario para el ácido benzoico, generando cambios en el orden de elución entre pH 6,5 y 2,8. (Figura 6).

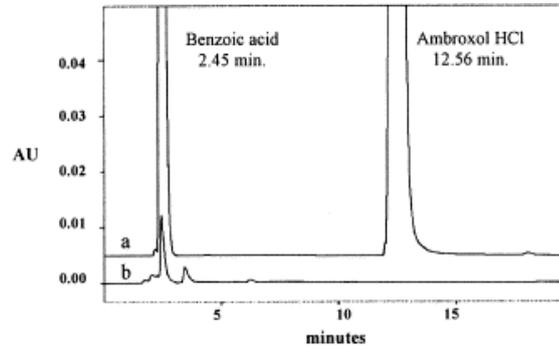


Figura N° 5. Cromatogramas superpuestos:

(a) Ácido benzoico 2,45 minutos y clorhidrato de ambroxol 12,56 minutos

(b) Placebo.

Condiciones: acetonitrilo / (H_3PO_4 8,5 mM / trietilamina pH = 2,8) 40:60 % v/v, flujo 1 ml/min.

Detección UV a 247 nm.

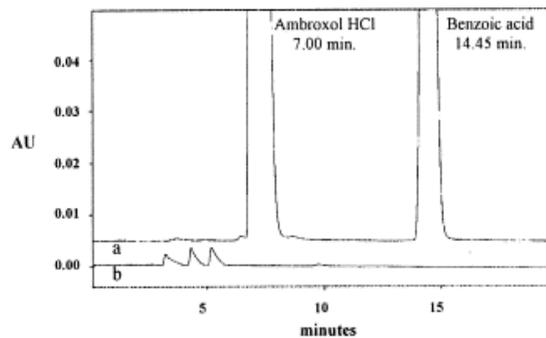


Figura N° 6. Cromatogramas superpuestos:

(a) Clorhidrato de ambroxol 7 minutos, ácido benzoico 14,45 minutos.

(b) Placebo.

Condiciones: metanol / (H_3PO_4 8,5 mM/ trietilamina pH = 2,8) 40:60 % v/v, flujo 1 ml/min. Detección

UV a 247 nm.

Los autores establecieron como condiciones finales para la validación del método: columna Symmetry Shield RPC8, fase móvil metanol/ (H_3PO_4 8,5 Mm / trietilamina pH 2,8) relación 40:60 % v/v. Obteniendo para ambos estándares y muestras una buena linealidad para los analitos con coeficientes de correlación de 0,999 y RSD entre 0,6 y 0,7 %.

Simultáneamente realizaron estudios de degradación acelerada como prueba de estabilidad para garantizar que los productos farmacéuticos no se degraden hasta transcurridos la fecha de caducidad. Para ello consideraron las siguientes condiciones de degradación: medio ácido con buffer fosfato 0,2 M, pH 1,0; agua; medio básico con Na_2HPO_4 0,4 M a pH de 8,9; medio de oxidación con H_2O_2 al 0,3 %.

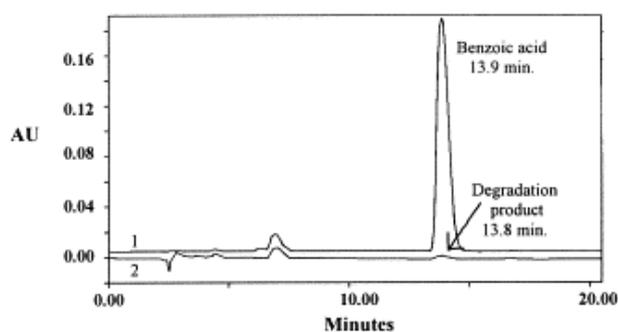


Figura N° 7. Cromatogramas de: (1) ácido benzoico y (2) con placebo (después de condiciones de estrés en medio acuoso). Condiciones: metanol / (H_3PO_4 8,5 mM/ trietilamina pH=2,8) 40:60 % v/v, flujo 1 mL/min. Detección UV a 247 nm.

Para cada uno de los casos expuestos se calentó en autoclave durante una hora a 120 °C soluciones al 1% peso/volumen de estándar o muestra; los resultados mostraron que cada una de las sustancias ensayadas generaron productos de descomposición que no interfieren con la determinación de las sustancias primarias, con excepción de un pequeño pico en el placebo en medio acuoso correspondiente con el tiempo de retención del ácido benzoico en las mismas condiciones (1,2% del pico de ácido benzoico, Figura 7).

Determinación simultánea de ambroxol y doxiciclina en cápsulas por métodos de HPLC y quimiometría asistida por espectroscopia-UV. Hadad, G, El-Gindy, A; Mahmoud, W; (2008)

Hadad y colaboradores ^[24] desarrollaron por HPLC y métodos espectrofotométricos multivariados la determinación simultánea de clorhidrato de ambroxol y doxiciclina

en cápsulas combinadas. La separación cromatográfica se realizó bajo las condiciones presentadas a continuación; columna C_{18} (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m) de fase inversa; fase móvil: mezcla de fosfato monobásico de potasio 20 mM, pH 6, acetonitrilo (50:50 % v/v), detector UV a 245 nm, flujo de 1,5 mL/min, volumen de inyección 20 μ L.

La resolución fue lograda mediante el uso de métodos espectrofotométricos numéricos como mínimos cuadrados clásicos (CLS), regresión de componentes principales (PCR) y mínimos cuadrados parciales (PLS-1) aplicado a los espectros UV de la mezcla y método espectrofotométrico gráfico como primer derivado del método (1DD). Cifras analíticas de mérito (FOM), tales como la sensibilidad, selectividad, sensibilidad analítica, límite de cuantificación y límite de detección se determinaron por CLS, PLS-1 y los métodos de PCR.

Los métodos propuestos fueron validados y aplicados con éxito para el análisis de la formulación farmacéutica y mezclas preparadas en el laboratorio que contienen la combinación de dos componentes. La quimiometría/espectrofotometría es una buena combinación de quimiometría con la química analítica, y se puede mejorar la relación de señal-ruido (S/N), mejorar la selectividad de la determinación, optimizar las condiciones experimentales y aumentar la eficiencia de la operación analítica.

Para el gráfico de calibración, las soluciones estándar de ambroxol y doxiciclina (1mg/mL) fueron preparadas por separado en metanol. Para el método 1DD las soluciones estándar se prepararon por diluciones adicionales de las soluciones madre de patrón con HCl 0,1 M en un intervalo de concentración de 1-21 μ g/mL de ambos compuestos. Obteniendo por 1DD una longitud de onda de trabajo de 282,6 nm correspondiente a la doxiciclina, y 250,2 nm para el ambroxol.

Para el método de HPLC las soluciones estándar se prepararon en un rango de concentración entre 1-100 μ g/mL de doxiciclina y ambroxol. El aumento de

concentración de acetonitrilo a más de 65 % v/v llevó a la separación adecuada de ambroxol y doxiciclina. A un pH de 5,5-6,0 se observó una mejor resolución para los dos compuestos, sin embargo a un pH de 6,0 se presenta una resolución óptima. Se observaron tiempos de retención para doxiciclina y ambroxol de $1,79 \pm 0,01$ y $5,23 \pm 0,05$ minutos, (tiempo medio de retención \pm desviación estándar), respectivamente. Se observaron interferencias de excipientes en las formulaciones farmacéuticas estudiadas en detalle por los métodos 1DD, CLS, PCR, PLS-1 y HPLC. Por esta razón, se aplicó el método de adición estándar a la formulación farmacéutica que contiene estos compuestos.

Cuando se combinan las técnicas espectrofotométricas con herramientas de quimiometría, la calidad de la información espectral se puede aumentar notablemente, la conversión de esta técnica combinada es una herramienta de análisis potente y altamente conveniente. ^[24]

La investigación planteada demostró mediante el estudio comparativo de la utilización de HPLC y métodos espectrofotométricos gráficos y numéricos para la resolución de ambroxol y doxiciclina en sus mezclas multicomponentes, que los métodos de calibración multivariante proporcionan, con el soporte de software adecuado, un claro ejemplo de la potencia de alta resolución y bajo coste de esta técnica. Aunque el método de HPLC es más específico que el método multivariante de calibración.

Método indicativo de estabilidad para la determinación simultánea de clorhidrato de cetiricina y clorhidrato de ambroxol en jarabes. Raja, MG; Geetha G y colaboradores (2012)

La validación del método para demostrar la estabilidad simultánea de clorhidrato de cetiricina y clorhidrato de ambroxol llevado a cabo por Raja y colaboradores ^[25] fue

efectuado según lo establecido por la ICH 12, Q2B para validación de procedimientos analíticos.

El desarrollo y la validación del ensayo se llevó a cabo empleando un sistema de HPLC cuaternario, con el software de EMPOWER de Model la serie de Agilent 1200, constituido por un bomba-G1311A cuaternaria, un desgasificador-G1322A, y detector de fotodiodos de matriz de Waters-2996. La columna analítica empleada en la separación de cromatográfica C₁₈ (250 mm x 4.6 mm, 5 µm). La pureza máxima fue determinada utilizando un detector de arreglo de fotodiodo (PDA, asistente personal digital).

Emplearon como fase móvil, acetonitrilo al 35 % v/v en buffer fosfato-amonio (0,2 M), buffer fue ajustado a pH 4,0 con ácido ortofosfórico. El flujo de fase móvil 1,5 mL/min a una temperatura de columna aproximada de 25°C, presentando tiempo de retención de 18,6 y 5,8 minutos para el clorhidrato de cetiricina y clorhidrato de ambroxol, respectivamente, presentado en la Figura 8 (b). Los patrones y solución de muestra fueron preparados en concentraciones de 50 µg/ml y 30 µg/ml de clorhidrato de cetiricina y clorhidrato de ambroxol, respectivamente, con la fase móvil como un diluyente, fueron colocados en un baño de ultrasonido por aproximadamente 15 minutos, la solución definitiva fue filtrada a través de filtro de 0,45 µm.

La precisión del método fue determinada empleando seis ensayos de muestra, preparadas por separado; la exactitud fue llevada a cabo en cinco niveles de concentración en un rango entre 50 % a 150 % de clorhidrato de cetiricina y clorhidrato de ambroxol, el nivel de mayor y menor concentración de exactitud fueron determinados llevando a cabo seis preparaciones ensayadas por triplicado.

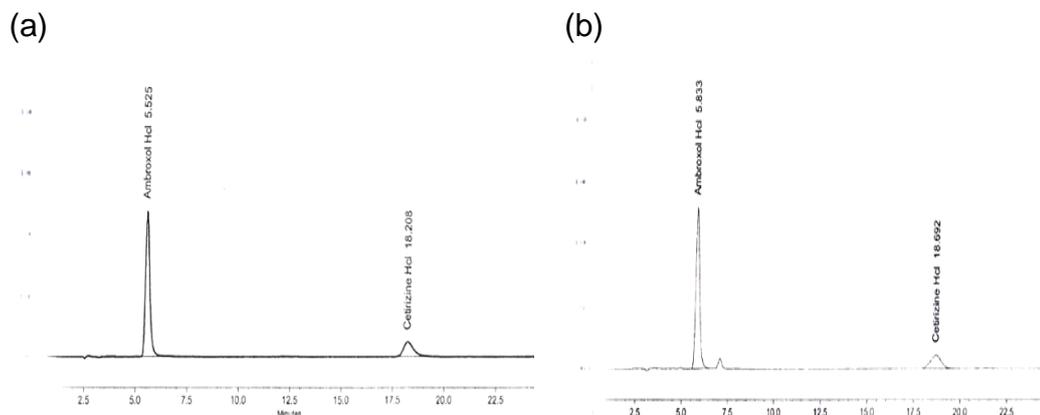


Figura N° 8. Cromatogramas: (a) Estándar. (b) Muestra. Condiciones: acetonitrilo: buffer fosfato-amonio, pH 4,0. (35:65 % v/v); flujo 1,5 mL/min. Detección UV a 230 nm.

La linealidad fue evaluada para la solución muestra y soluciones estándar de clorhidrato de cetiricina y clorhidrato de ambroxol en cinco niveles de concentración entre 50% y 150%. El alcance del método fue determinado a partir de la precisión, la exactitud y la determinación de la linealidad.

Las modificaciones de las condiciones cromatográficas pueden generar cambios significativos del método de separación cromatográfico, por ello la robustez fue demostrada a partir de experimentos de alteraciones de 20 % de flujo, modificación del 10 % del componente orgánico de la fase móvil, 5 % de la temperatura de columna y el pH de la fase móvil, demostrando que el método es robusto bajo esas condiciones, así como la eficacia del sistema.

Los autores realizaron estudios de degradación para determinar la estabilidad del método, empleando muestra y placebo, las condiciones de degradación fueron hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 5 M, hidrólisis básica con hidróxido de sodio 5 M, oxidación con peróxido de hidrógeno 6 %, exposición a luz UV visible durante 24 horas, según pautas de la ICH, degradación térmica manteniendo una temperatura de 105 °C durante 24 horas, degradación por humedad con nitrato de potasio y degradación acuosa empleando agua. Se observó poca variación en el tiempo de

retención y pureza de picos para ambos componentes activos; como resultados de degradación para el placebo y muestra se encontraron porcentajes de degradación de 4,21; 1,21 y 3,23; 1,02 en la hidrólisis ácida y oxidación con peróxido de hidrógeno, respectivamente. Referente a la degradación por humedad se encontró una degradación máxima para el clorhidrato de cetiricina y un mínimo para el clorhidrato de ambroxol.

Obtuvieron un porcentaje de RSD de análisis de 1,6 % y 1,0 % y un factor de cola de 1,2 y 1,3 en clorhidrato de cetiricina y clorhidrato de ambroxol, respectivamente.

Rango de linealidad del clorhidrato de cetiricina corresponde a un rango de concentración entre 25,1 a 75,02 µg/mL y 15,1 a 45,4 µg/mL para el clorhidrato de ambroxol, con un coeficiente de correlación de 0,999 para ambos.

La exactitud de ambos componentes activos fue demostrada en un rango de concentración entre 50-150%, con un RSD promedio para cada nivel de concentración entre 0,3 % y 1,8%. Con un porcentaje de recuperación entre 99,2 % y 101,0 %. La precisión intermedia fue demostrada empleando seis reproducciones de preparaciones de muestra, elaboradas interdiario, con diferente analista, columna diferente y sistema cromatográfico diferente. Los valores de desviación estándar relativa fueron 0,7 y 0,9 % para clorhidrato de cetiricina y clorhidrato de ambroxol, respectivamente.

Método de RP-HPLC para la estimación simultánea de clorhidrato de ambroxol y loratadina en formulaciones farmacéuticas. Nagappan, K; Meyyanathan SN; Rajinikanth, R; y colaboradores (2008)

La estimación simultánea de clorhidrato de ambroxol y loratadina en formulaciones farmacéuticas mediante RP-HPLC con detección ultravioleta fue realizada por

Nagappan y colaboradores, ^[26] llevando a cabo la validación siguiendo las directrices de la ICH.

El método se llevó a cabo usando HPLC, equipado con una bomba isocrática y un detector dual de longitudes de onda, bajo las condiciones cromatográficas de columna C₁₈ (25 cm x 4,6 mm, 5 µm), volumen de inyección 20 µL, fase móvil de acetonitrilo: acetato de amonio 50 mM en una relación 50:50 volumen/volumen, filtrada a través de una membrana de 0,2 µm, flujo de la fase móvil 1,0 mL/min, longitud de onda de trabajo 255 nm, a temperatura ambiente.

Se empleó hidroclorotiazida como estándar interno, utilizando soluciones estándar de 1 mg/mL de ambroxol, loratadina e hidroclorotiazida como patrón interno, preparadas empleando una mezcla de agua-acetonitrilo en relación 50:50 % v/v, la solución patrón mixto contenía 100 µg/mL de clorhidrato de ambroxol, 10 µg/mL de loratadina y 100 µg/mL de hidroclorotiazida. La preparación de las soluciones muestras fue realizada mediante extracción con metanol a una concentración de 12 µg/mL de clorhidrato de ambroxol, 1 µg/mL de loratadina y 25 µg/mL de hidroclorotiazida en mezcla acetonitrilo: agua (50:50 % v/v), obteniendo tiempos de retención de clorhidrato de ambroxol, loratadina e hidroclorotiazida de 5,419; 15,549 y 3,202 minutos, respectivamente.

El método se validó según las directrices de la ICH. La exactitud del método se determinó mediante métodos de recuperación. Se llevaron a cabo los estudios de recuperación en seis muestras por el método de adición de estándar.

La precisión del método se demostró por estudios de variación realizados con un día de por medio (denominada variación interdiaria) y los estudios de variación realizados en un mismo día (denominada variación intradía). En los estudios de variación intradía, se realizaron seis inyecciones repetidas de soluciones estándar y de muestra. En el caso de los estudios de variación interdiaria, se realizaron seis inyecciones repetidas del estándar y soluciones de muestra durante tres días

consecutivos, se calculó el factor de respuesta de los picos del fármaco y RSD porcentuales. A partir de los datos obtenidos, se encontró que el método de HPLC desarrollado era preciso.

La linealidad del método se determinó en rangos de concentración que varían desde 3,0 hasta 21,0 µg/mL para el clorhidrato de ambroxol y 0,25 a 1,75 µg/mL para loratadina. Los resultados demostraron que existe una excelente correlación entre los factores de respuesta y la concentración de los compuestos en el rango de concentración indicado anteriormente.

El límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) del método desarrollado fueron determinados mediante la inyección progresivamente bajo las concentraciones de las soluciones patrón utilizando el método de RP- HPLC desarrollado. El LOD corresponde a la menor concentración del analito que genera una respuesta medible en un grado de confianza dado (relación S/N de 3). El LOD para el clorhidrato de ambroxol y loratadina y se encontró que era de 5 ng/mL y 25 ng/mL, respectivamente. El límite de cuantificación fue de 15 ng/mL y 75 ng/mL para clorhidrato de ambroxol y loratadina, respectivamente.

La robustez del método se determinó mediante la realización del experimento en diferentes instrumentos de HPLC por distintos operadores y utilizando diferentes columnas con similar fase estacionaria y realizando pequeños cambios en las condiciones cromatográficas. Al no encontrarse cambios marcados en los cromatogramas demostraron que el método de HPLC desarrollado es robusto.

Con el fin de demostrar la estabilidad de ambos estándar y soluciones de muestra durante el análisis, ambas soluciones se analizaron durante un período de 5 horas a temperatura ambiente. Los resultados muestran que para ambas soluciones, el tiempo de retención y el área del pico de clorhidrato de ambroxol y loratadina se mantuvo casi sin cambios (% RSD menor de 2,0), con degradación poco significativa

en el plazo indicado, así indicada que ambas soluciones fueron estables durante al menos 5 horas, la cual era suficiente para completar el proceso analítico.

El método desarrollado fue validado en términos de exactitud, precisión, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y estabilidad de la solución. El método propuesto puede ser utilizado para la estimación de estos medicamentos en formas de dosificación farmacéutica combinada.

4. Justificación de la investigación

En la actualidad, avances científicos y tecnológicos aceleran el desarrollo de productos farmacéuticos innovadores que comúnmente presentan mezclas multicomponentes con mayor acción terapéutica. La creación de estos medicamentos multicomponentes representan uno de los principales problemas teóricos y prácticos de la farmacología contemporánea y farmacéutica. Debido a la importancia en la exactitud y precisión de las estimaciones cualitativas y cuantitativas de la composición de las diferentes preparaciones farmacéuticas, es necesario asegurar el cumplimiento de los requisitos necesarios para la comercialización de un producto eficaz y seguro, con altos estándares de calidad. Es por ello que se requiere disponer de métodos analíticos validados, que demuestren científicamente que el método analítico tiene las características de desempeño adecuadas para el cumplimiento de los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas.

Los métodos cromatográficos conforman las principales técnicas empleadas para la determinación del contenido de componentes activos presentes en compuestos farmacéuticos, debido a su alta eficiencia, sensibilidad, resolución y capacidad de separación, por lo que permiten la determinación simultánea de diferentes analitos, parámetros que permiten un menor tiempo de análisis. Los métodos cromatográficos comúnmente empleados contemplan la cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

HPLC es una técnica ideal para determinar la pureza y calidad de las preparaciones farmacéuticas, especialmente aquellas que presentan componentes con inestabilidad térmica o baja volatilidad. Permite la determinación simultánea de componentes de una misma muestra en el análisis de formulaciones farmacéuticas multicomponente. La alta sensibilidad del método permite la determinación de impurezas relativas, incluyendo isómeros y productos de degradación en preparaciones farmacéuticas.

En nuestro país se encuentran registrados alrededor de siete medicamentos compuestos por una mezcla de dos principios activos clorhidrato de ambroxol y loratadina bajo las presentaciones de tabletas, jarabe o solución con dispensador en gotas; utilizados para el alivio sistemático de los procesos alérgicos respiratorios asociados o no con la presencia de mucosidad en el tracto respiratorio, así como en aquellos procesos broncopulmonares alérgicos o no, que cursen con aumento de la viscosidad y adherencia del moco, y son de uso muy común en el mercado nacional. Métodos oficiales reportados en las normas USP y BP plantean la determinación individual de ambos compuestos mediante HPLC, cromatografía líquida de alta eficiencia, y pocas investigaciones plantean métodos por HPLC para la estimación simultánea del contenido de ambroxol y loratadina en formulaciones tipo tabletas. Sin embargo, no se han establecido métodos validados para la determinación de ambos componentes en formulaciones del tipo jarabe.

De aquí surge la iniciativa de desarrollar y validar un procedimiento analítico por cromatografía líquida de alta eficiencia, para la determinación simultánea de clorhidrato de ambroxol y loratadina presentes en formulaciones farmacéuticas tipo jarabe; dando lugar a una metodología analítica que permita determinar ambos componentes activos en una sola corrida cromatográfica, disminuir el tiempo de preparación de muestra, así como economizar en el uso de reactivos al realizar el ensayo en conjunto de ambos componentes activos.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Desarrollar y validar un procedimiento analítico por cromatografía líquida de alta eficiencia, para la determinación simultánea de clorhidrato de ambroxol y loratadina presentes en formulaciones farmacéuticas tipo jarabe.

5.2. Objetivos específicos

- Determinar y evaluar las condiciones cromatográficas preliminares.
- Desarrollar un material de referencia interno.
- Determinar las condiciones cromatográficas óptimas de trabajo.
- Determinar los parámetros de calidad requeridos para la categoría I de validación de procedimientos analíticos.
- Analizar medicamentos de diferentes marcas comerciales.

6. Metodología Experimental

La metodología analítica para la determinación de clorhidrato de ambroxol y loratadina en jarabe mediante HPLC, fue desarrollada y validada empleando los equipos, reactivos y solventes que se mencionan a continuación:

6.1. Instrumentación

Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia, Waters conformado por:

Bomba, modelo 600E.

Automuestreador, modelo 717 Plus.

Detector UV- Visible de arreglo de diodos, modelo 996 PDA.

Programa para la adquisición y procesamiento de datos del sistema cromatográfico, *Millennium*³². Incorpora el comando de análisis de pureza de pico para permitir la detección de las impurezas que estén coeluyendo con las bandas cromatográficas de interés.

Columna RP 18 (3,9 mm x 150mm, 5 μ m). Waters, XTerra.

Balanzas electrónicas. Mettler-Toledo, modelo AG245 de capacidad máxima 210 g, resolución instrumental 0,00001 g. Adventurer OHAUS, modelo AR3130 de capacidad máxima 310 g, resolución instrumental 0,001 g.

pHmetro. Thermo Electron Corporation Orion, modelo 420A+.

Bomba de vacío. Gast, modelo DQA-P104-AA.

Plancha de calentamiento con agitación magnética. Barnstead Thermolyne, modelo sp131325.

Ultrasonido. Branson, modelo 5200.

6.2. Materiales y equipos para filtración

Equipo de filtración de vidrio. Millipore. Empleado para filtración de eluentes.

Equipo de filtración de acero inoxidable para muestras.

Membranas filtrantes de Nylon de 0,22 μm , 47 mm. Magna.

Membranas filtrantes de poliamida, 0,45 μm . Sartorius AG.

Membranas filtrantes de poliamida, 0,2 μm . Sartorius AG.

6.3. Reactivos y solventes

Acetonitrilo (CH_3CN) grado HPLC, 100 % de pureza. Mallinckrodt ChromARHPLC.

Metanol (CH_3OH) grado HPLC, 99,9 % de pureza. Merck KgaA.

Fosfato monobásico de amonio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), 98,4 % de pureza. SIGMA-ALDRICH.

Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), 99,5-100,5 % de pureza. Riedel-de Haën.

Hidróxido de sodio (NaOH), 99 % de pureza. Merck KgaA.

Acetato de amonio ($\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$), 98 % de pureza. HIMEDIA.

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2), 35 % en peso. Riedel-de Haën.

Ácido clorhídrico (HCl), 37 % de pureza. Merck KGaA.

Ácido fosfórico (H_3PO_4), 85 % de pureza. Fisher Scientific.

Agua 18 $\text{M}\Omega$, obtenida por una combinación de un sistema de pre-tratamiento y desionización. Cascada RO MK2 –Pall Corporation. Barnstead, NANOpure.

Patrones, provenientes de materia prima de alta pureza:

Clorhidrato de ambroxol, 99,34 % de pureza. Lote S-D-13-322-1.

Loratadina, 99,87 % de pureza. Research Pharmaceutical Ltd. Lote 010000009471.

6.4. Muestras

Las muestras farmacéuticas analizadas fueron denominadas de la siguiente manera:

Medicamento A. Fabricado en México, distribuido en Venezuela por Laboratorio A. Envase contenedor de vidrio ámbar.

Medicamento B. Fabricado y distribuido en Venezuela por Laboratorio B. Envase contenedor de PET ámbar.

Medicamento C. Fabricado y distribuido en Venezuela por Laboratorio C. Envase contenedor de vidrio ámbar.

Los medicamentos anteriores en su forma farmacéutica jarabe de 60 mL, contemplan la mezcla de los componentes activos clorhidrato de ambroxol y loratadina. Los mismos declaran que cada 5 mL de jarabe, contiene 5 mg de loratadina y 30 mg de clorhidrato de ambroxol.

Los medicamentos analizados se encuentran en actual comercialización y expendio en Venezuela y presentan como fecha de vencimiento año 2017.

6.5. Desarrollo de la metodología experimental

Inicialmente, se realizaron diferentes pruebas preliminares, con el fin de evaluar si con los insumos y materiales disponibles en el laboratorio era posible el desarrollo de una metodología por HPLC, para la determinación simultánea de clorhidrato de ambroxol y loratadina.

Una vez establecidas las condiciones preliminares se procedió a optimizar las condiciones del método cromatográfico, en vías de obtener la mejor separación en el menor tiempo posible. Seguidamente se realizó la evaluación de los parámetros

cromatográficos y validación del método. Finalmente se analizaron medicamentos de diferentes marcas comerciales distribuidos en el país.

6.5.1. Condiciones cromatográficas preliminares para la determinación simultánea del contenido de clorhidrato de ambroxol y loratadina

De la información obtenida en la literatura y en función a los insumos presentes en el laboratorio, se procedió al planteamiento y evaluación de diferentes condiciones preliminares para el desarrollo de la metodología analítica. Todo ello con el propósito de asegurar una adecuada separación de ambos analitos.

6.5.1.1. Preparación de patrones

6.5.1.1.1. Disolución estándar de clorhidrato de ambroxol

Se preparó una disolución estándar de clorhidrato de ambroxol de 0,6 mg/mL, empleando como disolvente una mezcla acetonitrilo y agua en relación 30:70 % v/v.

6.5.1.1.2. Disolución estándar de loratadina

Se preparó una disolución estándar de loratadina de 0,1 mg/mL, empleando como disolvente una mezcla acetonitrilo y agua en relación 30:70 % v/v.

6.5.1.1.3. Disolución estándar combinada de clorhidrato de ambroxol y loratadina

Se preparó una disolución estándar combinada de clorhidrato de ambroxol 0,6 mg/mL y loratadina 0,1 mg/mL, empleando como disolvente una mezcla acetonitrilo y agua en relación 30:70 % v/v.

6.5.1.2. Determinación de la longitud de onda de trabajo

Para determinar la longitud de onda de trabajo (correspondiente a la zona de máxima absorción) se emplearon las disoluciones de las sustancias anteriormente descritas en las secciones 6.5.1.1.1 y 6.5.1.1.2. Para ello se empleó como espectrofotómetro el detector UV-Visible de arreglo de diodo del HPLC, el barrido de longitudes de onda escogido fue en el rango UV de 200 a 400 nm, respectivamente. En la figura 9 se presentan los espectros de absorción molecular correspondientes a las disoluciones de clorhidrato de ambroxol (9a) y loratadina (9b).

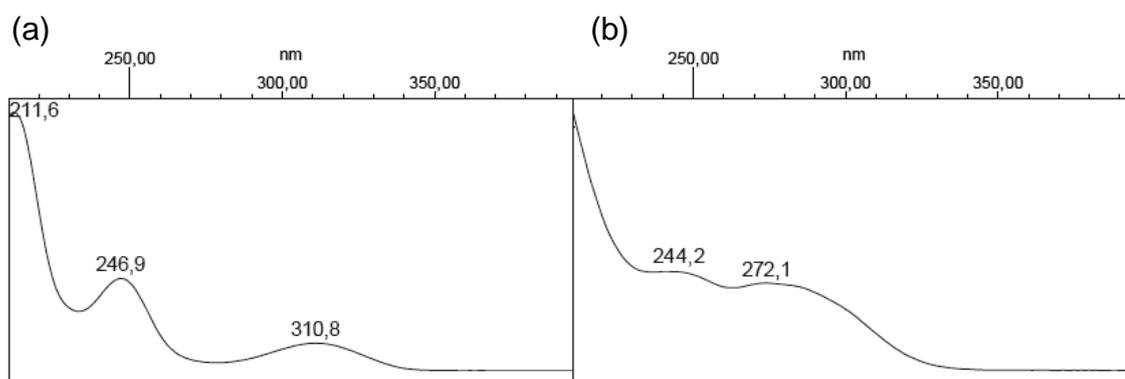


Figura 9. Barrido de longitudes de onda de los principios activos clorhidrato de ambroxol y loratadina en un rango de 200 a 400 nm.

Del análisis de ambos espectros, se evidencia que el clorhidrato de ambroxol presentó una longitud de onda de máxima absorción alrededor de 247 nm, mientras que el espectro de la disolución de loratadina evidencia dos bandas anchas, correspondiendo al máximo de absorción un valor de 245 nm aproximadamente.

Por otra parte, se observa que los máximos de absorción de ambas especies están muy próximos (247 nm y 245 nm), así como, un ancho de banda en los valores del máximo de absorción alrededor de los 4 nm. Por lo tanto, para ambas especies se estableció como única longitud de onda de trabajo la correspondiente a los 248 nm. Adicionalmente esto permitiría trabajar a una sola longitud de onda, para el caso que

no se emplee un sistema de detección simultáneo, contribuyendo a la robustez del método.

6.5.1.3. Condiciones cromatográficas preliminares.

Se realizaron análisis de las disoluciones patrones de clorhidrato de ambroxol y loratadina, por separado, con el fin de establecer el comportamiento cromatográfico de ambos analitos entre la fase móvil y la fase estacionaria. Una vez establecido el orden de elución, se procedió a analizar una disolución combinada de ambas especies con el fin de evaluar el comportamiento simultáneo en las diferentes condiciones cromatográficas preliminares.

La literatura recomienda el empleo de una fase estacionaria de poca polaridad para la separación de ambos compuestos. Debido a ello, se empleó una columna en la modalidad de fase inversa: RP 18 (3,9 mm x 150mm, 5 μ m) Waters, XTerra.

La longitud de onda de trabajo para ambas especies fue de 248 nm y un volumen de inyección de 10 μ L.

6.5.1.4. Estudio de la fase móvil y flujo

En base a los antecedentes estudiados y la disponibilidad de los insumos, se escogieron diversas fases móviles y condiciones de flujo para la adecuada separación de los principios activos clorhidrato de ambroxol y loratadina.

Para ello se emplearon disoluciones estándar individuales y combinadas de clorhidrato de ambroxol y loratadina en concentraciones de 0,6 y 0,1 mg/mL, respectivamente.

Hay que partir del hecho, de que cuando se analizan combinaciones de fármacos que difieren mucho en su composición química, es recomendable el empleo de un gradiente de elución (en la mayoría de los casos), ya que permite realizar variaciones temporales en la composición de la fase móvil a manera de lograr una disminución de los tiempos de retención, mejorar la asimetría y ancho de las bandas y una disminución sustancial del tiempo total de la corrida cromatográfica. Sin embargo, el equipo de HPLC empleado en el laboratorio no permite realizar gradientes de elución, a manera de establecer en el tiempo las mezclas de eluentes convenientes para la separación más idónea del clorhidrato de ambroxol y loratadina. En la tabla IV se muestran las diferentes combinaciones empleadas, resaltando que fueron desarrolladas, en su mayoría, a partir de investigaciones para el análisis de uno de los componentes de interés, y solo una de las investigaciones toma en cuenta el análisis simultáneo de ambas especies.

Tabla IV. Estudios realizados para la determinación de la fase móvil para la separación cromatográfica del clorhidrato de ambroxol y loratadina.

Prueba	Fase móvil	Flujo (mL/min)	Volumen de inyección (μ L)	Tiempo de retención (min)		
				AMH	Lor	Acet
1	Buffer fosfato monobásico de potasio KH_2PO_4 (50 mM pH 3 ajustado con H_3PO_4): Acetonitrilo (70:30 % v/v) pH 3,8	1,0	10	2,94	28,36	1,66
2	H_3PO_4 (8,5 mM pH 3 ajustado con trietilamina): metanol (60:40 % v/v) pH 3,4	0,8		6,50	>30	1,90
3	Buffer fosfato monobásico de amonio $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (50 mM, pH 4 ajustado con H_3PO_4): acetonitrilo (65:35 % v/v) pH 5,0	1,0		1,8	29,66	1,60

4	Acetato de amonio (50 mM): acetonitrilo (60:40 % v/v) pH 7,2	1,0	10	3,16	24,37	1,60
5	Acetato de amonio (50 mM): acetonitrilo (50:50 % v/v) pH 7,4	1,0		2,58	8,13	1,53

AMH Clorhidrato de ambroxol, Lor. Loratadina, acet. Acetona.

La prueba 1 (USP ^[21]) está basada en la determinación de la loratadina empleando una columna de fase estacionaria fenil (L11). Al reproducir dichas condiciones cromatográficas en presencia de una columna C₁₈, debido a la no disponibilidad de columnas L11, se obtuvieron los siguientes tiempos de retención: 2,9 minutos para el clorhidrato de ambroxol y 28 minutos para la loratadina, para un tiempo total de corrida de 30 minutos aproximadamente. El cromatograma obtenido se presenta en la figura 10.

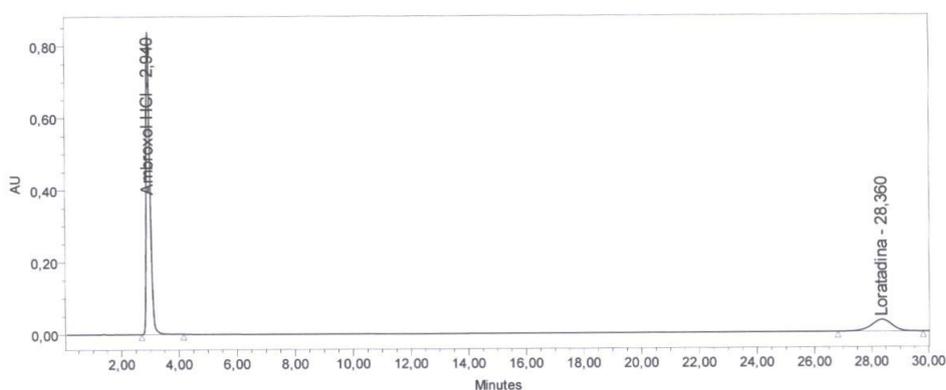


Figura 10. Cromatograma correspondiente a la fase móvil buffer fosfato monobásico de potasio (0,05 M, pH 3) y acetonitrilo en proporción 70:30 % v/v.

La prueba en estudio no es considerada adecuada para la separación cromatográfica de ambas especies, debido a los prolongados tiempos de retención, atribuido posiblemente a la diferencia de selectividad entre ambas columnas.

En la prueba 2 (Heinänen y Barbas ^[20]) reportaron el empleo de una columna C₁₈ para la determinación de clorhidrato de ambroxol. En tal sentido, se procedió a

evaluar la fase móvil para la separación de los analitos objetos de estudio. Se encontró una banda correspondiente al clorhidrato de ambroxol a un tiempo de retención de 6,5 minutos, mientras que la loratadina es fuertemente retenida por la fase estacionaria, bajo estas condiciones no fue posible obtener la señal correspondiente en el detector a un tiempo mayor de 30 minutos. Por dichas razones la prueba 2 es considerada inadecuada para la separación de los analitos de interés.

La prueba 3, basada en la fase móvil planteada por Raja y colaboradores ^[25] los cuales establecen la mezcla buffer fosfato de amonio (0,2 M ajustado a pH 4 con ácido ortofosfórico) y acetonitrilo en proporción 65:35 % v/v, para la determinación de clorhidrato de ambroxol. Experimentalmente se planteó el uso de buffer fosfato monobásico de amonio 0,05 M en lugar de 0.2 M, ya que una menor concentración del buffer afecta en menor proporción el sistema cromatográfico, al minimizar riesgos de obstrucción del sistema por cristalización del buffer.

La evaluación de la fase móvil, generó una corrida cromatográfica en la cual se presentó un tiempo de retención de 1,8 minutos para el clorhidrato de ambroxol y 30 minutos para la loratadina. El tiempo de retención del clorhidrato de ambroxol cercano al tiempo muerto de 1,6 minutos, da lugar a un factor de retención (k) 0,13, valor por debajo del intervalo óptimo esperado (de 1 a 10). Debido a ello se precindió de dicha fase móvil.

La fase móvil compuesta por la mezcla de acetato de amonio (50 mM) y acetonitrilo en proporción 60:40 % v/v, pH 7,2 empleada en la prueba 4, dio lugar a una corrida cromatográfica con tiempos de retención de 3,26 minutos para el clorhidrato de ambroxol y 24,37 minutos para la loratadina. A pesar de presentar una corrida cromatografica en un tiempo menor a las pruebas antes mencionadas, se obtuvo un factor de retención de 0,9 para el clorhidrato de ambroxol, valor cercano a la unidad, sin embargo no satisface el intervalo requerido.

Prueba 5 (Nagappan y colaboradores ^[26]), al simular las condiciones cromatográficas se obtuvieron como tiempos de retención 2,58 minutos para el clorhidrato de ambroxol y 8,13 minutos para la loratadina, con un tiempo muerto alrededor de 1,6 minutos. A pesar de presentar un menor tiempo de elución total para ambos principios activos que en los resultados obtenidos en las pruebas anteriormente mencionadas, el valor correspondiente al factor de retención (k) para el analito menos retenido fue de 0,68. Valor por debajo de lo esperado para un comportamiento adecuado desde el punto de vista termodinámico para cromatografía de líquidos (k mayor de 1 y menor a 10).

En vista de que ninguna de las pruebas anteriores arrojan resultados satisfactorios, se procedió a modificar la prueba 3, al disponer de los insumos necesarios. Para ello se realizó cambios en el modificador orgánico, al sustituir acetonitrilo por metanol. Dicho eluyente es uno de los modificadores orgánicos más utilizados en mezclas con buffer en fase inversa, por su alto poder disolvente de sales, así como su menor toxicidad y costo, con respecto a otros eluentes ^[27].

Por otra parte, es conveniente mencionar que Koundourellis y colaboradores ^[13] también emplearon metanol como componente de fase móvil, por lo que se planteó un ensayo con una fase móvil compuesta por la mezcla de buffer fosfato monobásico de amonio (0,05 M) y metanol en proporción 50:50 % v/v, ajustado a pH $5,00 \pm 0,01$ con ácido ortofosfórico.

En la fase móvil evaluada se generó una irreproducibilidad en los tiempos de retención para el caso de la loratadina, que no permitió evaluar la retención de dicho analito. Posiblemente debido al desplazamiento del equilibrio químico hacia la formación de otras especies.

Seguidamente se planteó el ajuste del pH de la fase móvil a 3,40, cambio que favoreció la reproducibilidad en los tiempos de retención del analito. La prueba bajo

estas condiciones dio lugar a tiempos de elución más satisfactorios, exhibiendo un factor de retención más adecuado.

De lo antes expuesto, se estableció como fase móvil la mezcla buffer fosfato monobásico de amonio pH 3,40 y metanol. En base a ello, se procedió a optimizar y evaluar las condiciones cromatográficas.

6.5.2. Condiciones cromatográficas óptimas de trabajo

6.5.2.1. Optimización de la fase móvil

Establecida la fase móvil más idónea de buffer fosfato monobásico de amonio y metanol se procedió a variar las proporciones de los eluentes, de mayor a menor fuerza elutropica, para una columna de fase inversa. Para ello se estudiaron las proporciones (40:60, 45:55 y 50:50) % v/v. En la tabla V se establecen las condiciones experimentales y sus respectivos resultados. La acetona fue utilizada para evaluar el tiempo muerto (t_M).

De los resultados obtenidos, es posible establecer que todas las condiciones presentaron un tiempo total de corrida menor a los 20 minutos, tal y como se muestra en la figuras 11, 12 y 13.

Sin embargo, en las dos primeras pruebas los factores de retención para la especie menos retenida están por debajo de 1 (prueba A 0,75; prueba B 0,87), mientras que la condición C presentó un factor de retención satisfactorio (1,67).

En relación a lo antes expuesto, la mezcla buffer fosfato monobásico de amonio y metanol en proporción 50:50 % v/v cumple con el requisito de adecuación (k mayor de 1 y menor a 10), según el factor de retención obtenido mayor a la unidad.

Tabla V. Estudios realizados para la optimización de la fase móvil para la separación cromatográfica del clorhidrato de ambroxol y loratadina.

Prueba	Fase móvil	Flujo (mL/min)	Volumen de inyección (μ L)	Tiempo de retención (min)		
				AMH	Lor	Acet
A	Buffer fosfato monobásico de amonio $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (50 mM, pH 4 ajustado con H_3PO_4): metanol (40:60 % v/v) pH 3,4	0,8	10	2,80	6,70	1,60
B	Buffer fosfato monobásico de amonio $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (50 mM, pH 4 ajustado con H_3PO_4): metanol (45:55 % v/v) pH 3,4	0,8		3,00	9,00	1,60
C	Buffer fosfato monobásico de amonio $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (50 mM, pH 4 ajustado con H_3PO_4): metanol (50:50 % v/v) pH 3,4	0,8		4,27	16,60	1,60

AMH Clorhidrato de ambroxol, Lor. Loratadina, acet. Acetona.

Las figuras presentadas a continuación exhiben los respectivos cromatogramas correspondientes a las pruebas de optimización de la fase móvil.

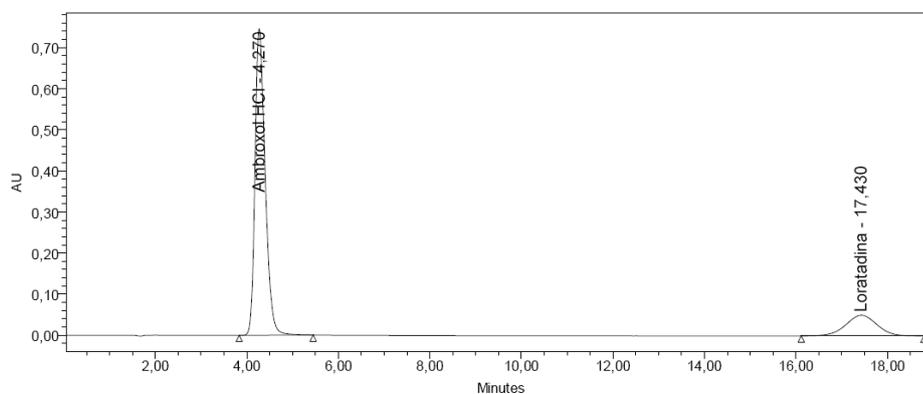


Figura 11. Cromatograma correspondiente a la fase móvil buffer fosfato monobásico de amonio (0,05 M, pH 3,4) y metanol en proporción 50:50 %v/v.

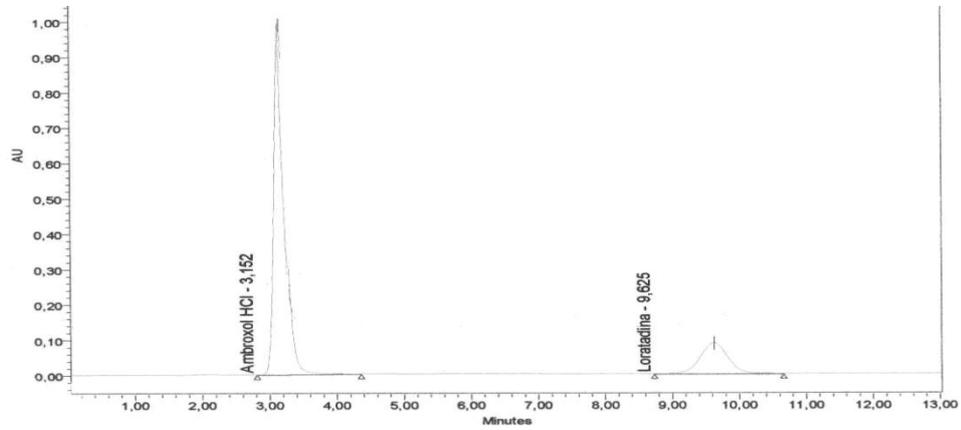


Figura 12. Cromatograma correspondiente a la fase móvil buffer fosfato monobásico de amonio (0,05 M, pH 3,4) y metanol en proporción 45:55 %v/v.

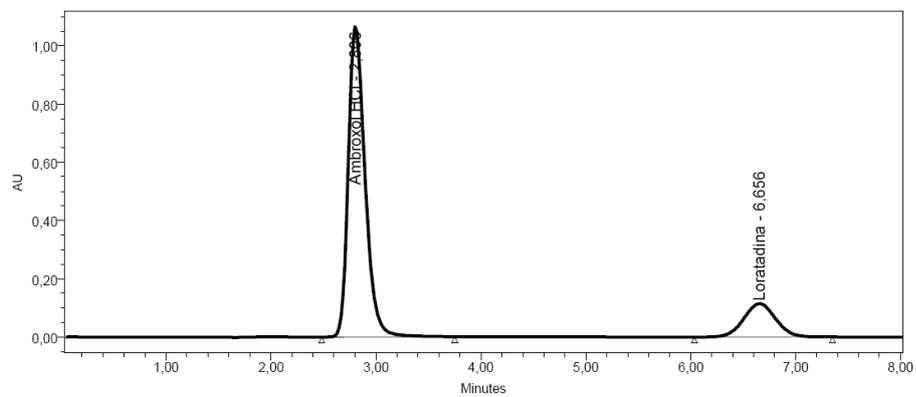


Figura 13. Cromatograma correspondiente a la fase móvil buffer fosfato monobásico de amonio (0,05 M, pH 3,4) y metanol en proporción 40:60 %v/v.

Las condiciones cromatográficas definidas para la metodología analítica son presentas en la tabla VI.

Tabla VI. Condiciones cromatográficas para la determinación simultánea del contenido de clorhidrato de ambroxol y loratadina.

Fase móvil	Buffer fosfato monobásico de amonio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) 50 mM : metanol, proporción (50:50 % v/v)
pH de la fase móvil	3,40 \pm 0,01
Flujo de la fase móvil	0,8 mL/min
Volumen de inyección	10 μL
Temperatura	Ambiente
Columna cromatográfica	RP 18 (3,9 mm x 150 mm, 5 μm). Waters, XTerra
Detección	Detector UV-Visible de arreglo de diodos, PDA
Longitud de onda	248 nm

Las condiciones cromatográficas presentadas anteriormente fueron determinadas con patrones puros, lo cual no garantiza que las mismas sean las más idóneas para muestras que presentan la mezcla de los principios activos, ya que, otros componentes presentes en la muestra pueden coeluir con los analitos de interés. Para abordar dicha situación se decidió preparar un material de referencia interno, debido principalmente a la no disponibilidad de un material de referencia certificado. El material de referencia interno fue desarrollado a partir de una mezcla de jarabes de un mismo lote de producción correspondientes al medicamento A.

Preparación de material de referencia interno

Para la preparación del material de referencia interno, se mezcló y homogeneizó una cantidad determinada de frascos correspondiente a un mismo lote del medicamento A, para un volumen total de 300 mL, la cual fue transferida a un recipiente que no permitiese el paso de luz y almacenada bajo condiciones de refrigeración, hasta el momento de su análisis.

El material de referencia interno presenta las siguientes características organolépticas:

Solución incolora, de olor frutal, pH de la solución oral $3,04 \pm 0,01$.

Densidad de la solución oral ($1,1588 \pm 0,0003$) g/mL, valor determinado a ($25,0 \pm 0,2$) °C de temperatura.

Tratamiento del material de referencia interno previo al análisis

Previo al análisis cromatográfico los analitos de interés deben ser extraídos de los jarabes hacia un eluente más acorde para poder ser inyectados al sistema de HPLC.

El proceso consistió en la disolución de los analitos por agitación mecánica con vortex por cinco minutos, en contacto directo con el disolvente acetonitrilo y agua en relación 30:70 % v/v.

Para ello se pesaron 5,0 mL de solución oral, se añadió un volumen de 10 mL de disolvente acetonitrilo y agua en relación 30:70 % v/v, seguido de agitación mecánica por 5 minutos. Luego se llevó a un volumen final de 50 mL con el disolvente. Posteriormente, se realizó la filtración de la solución empleando filtro provisto de una membrana de filtración (0,2 μm , poliamida). Seguido de su análisis cromatográfico.

Las condiciones establecidas en la tabla VI, fueron evaluadas a partir del análisis cromatográfico del material de referencia interno. En la figura 14 se muestra el cromatograma obtenido.

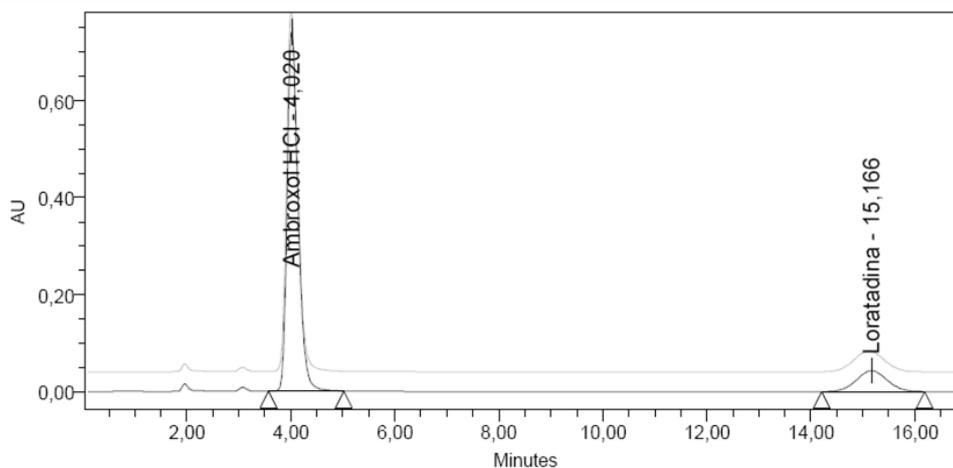


Figura 14. Cromatograma material de referencia interno.

Se observan dos bandas principales cuyos tiempos de retención coinciden con los obtenidos para el clorhidrato de ambroxol y loratadina. Adicionalmente presenta dos bandas minoritarias que no interfieren con los analitos de interés. Lo cual indica que de las condiciones cromatográficas establecidas pueden ser empleadas para la determinación de los principios activos objeto de estudio, en muestras de jarabes.

6.5.3. Evaluación del sistema

La evaluación de la repetibilidad instrumental consistió en estudiar la dispersión de los parámetros de tiempo de retención y área de pico cromatográfico de los analitos de interés en una disolución estándar combinada de clorhidrato de ambroxol y loratadina. Para ello se realizaron 20 inyecciones consecutivas de la disolución estándar bajo las condiciones de análisis presentadas en la tabla VI. Se determinaron los valores promedio, desviaciones estándar y coeficientes de variación de cada parámetro. En la tabla VII se presentan los resultados estadísticos obtenidos, el conjunto de datos individuales son exhibidos en el apéndice C.

Los resultados obtenidos para ambos parámetros indican una dispersión poco significativa del conjunto de datos, al presentar coeficientes de variación alrededor

del 1 %, valores que se encuentran dentro de los límites establecidos para métodos cromatográficos, la USP establece valores menores al 2 %. ^[17]

Tabla VII. Repetibilidad instrumental. Estándar clorhidrato de ambroxol y loratadina.

Estándar 100 % (0,6 mg/mL Ambroxol HCl - 0,1 mg/mL Loratadina)				
Analito	Clorhidrato de Ambroxol		Loratadina	
Parámetro	Tiempo de retención (min)	Área cromatográfica	Tiempo de retención (min)	Área cromatográfica
Promedio	3,80	11171321	16,60	2078554
Desviación estándar	0,02	111858	0,07	21850
CV	0,6	1,0	0,4	1,1

6.5.4. Factores cromatográficos

A partir de los datos obtenidos en las separaciones cromatográficas correspondientes a la evaluación de la repetibilidad instrumental se determinaron los factores cromatográficos de factor de retención (k), factor de asimetría (A_s) y resolución (R_s) para las bandas cromatográficas correspondientes al clorhidrato de ambroxol y loratadina, resultados presentados en la tabla VIII. Conjunto de datos individuales son exhibidos en el apéndice B.

La determinación del tiempo muerto se realizó mediante la inyección de una solución de acetona de 6 μ L/mL de concentración. Se observó una pequeña banda a un tiempo de 1,66 minutos, señal a la cual se le adjudicó el valor correspondiente al tiempo muerto, el cromatograma correspondiente se presenta a continuación (Figura 15).

Tabla VIII. Factores cromatográficos asociados a la metodología analítica para la determinación simultánea del clorhidrato de ambroxol y loratadina.

	Resolución (R_s)	Factor de retención (k)		Factor de asimetría (A_s)	
		AMH	Lor	AMH	Lor
Promedio	14,6	1,29	9,00	1,33	1,11
Desviación estándar	0,3	0,01	0,04	0,01	0,02
CV	2,3	0,99	0,46	0,45	2,02

AMH Clorhidrato de ambroxol, Lor. Loratadina

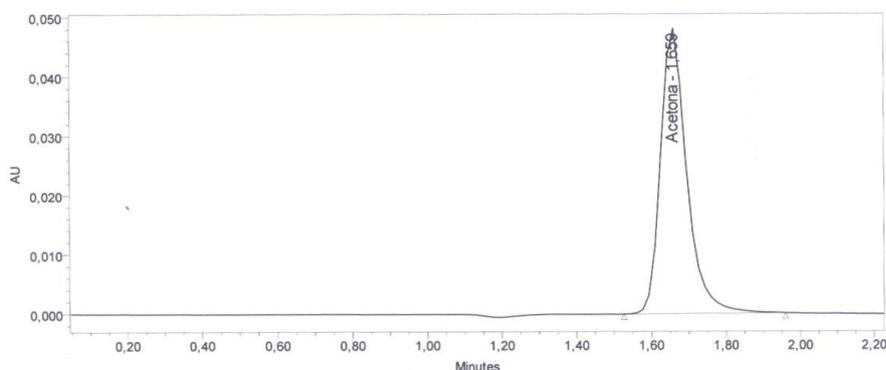


Figura 15. Cromatograma correspondiente a la determinación del volumen muerto.

Los factores de retención correspondieron a 1,3 y 9,0 para el clorhidrato de ambroxol y la loratadina respectivamente, son valores aceptables para una cromatografía por HPLC (k mayor a 1 y menor de 10), adicionalmente un tiempo total de corrida menor a 20 minutos permite un consumo apropiado de eluente. Por otra parte, las bandas cromatográficas completamente resueltas presentan valores de asimetría cercanos a la unidad, lo cual indica una forma apropiada de las bandas lo que permite una adecuada integración de las mismas.

Una vez optimizadas las condiciones experimentales presentadas en la tabla VI y determinadas las condiciones estadísticas que configuran el método cromatográfico propuesto, se procedió a la determinación de los parámetros de calidad para la validación de la metodología analítica propuesta para la determinación simultánea

del contenido de clorhidrato de ambroxol y loratadina mediante cromatografía líquida de alta eficiencia.

6.6. Validación del método cromatográfico

Se procedió a determinar y evaluar los parámetros de calidad requeridos por la categoría I del apartado <1225> de la USP para la cuantificación de principios activos en productos farmacéuticos terminados. ^[17]

6.6.1. Linealidad

La linealidad del método debe ser determinada al establecer una evaluación de un conjunto de señales como una función de la concentración del analito. La ICH establece que deben ser preparadas en forma independiente soluciones de estándar de al menos 5 niveles de concentración, las cuales deben encontrarse en un intervalo mínimo de 80 % a 120 % de la concentración de referencia; este procedimiento deberá repetirse en forma independiente al menos en tres días diferentes, para evaluar estadísticamente la regresión lineal del sistema. ^[17, 18]

Los valores de referencia reportados por los fármacos en estudio, declaran en su formulación que cada 5 mL de jarabe (dosis recomendada), contempla 30 mg de clorhidrato de ambroxol y 5 mg de loratadina, correspondiente a 6 mg/mL de clorhidrato de ambroxol y 1 mg/mL de loratadina.

Debido a los altos valores de concentración de los analitos en los fármacos en estudio, se decidió emplear valores de referencia 10 veces menores, correspondientes a 0,6 mg/mL de clorhidrato de ambroxol y 0,1mg/mL de loratadina. Experimentalmente, se estableció como valor de referencia el nivel de 100 %.

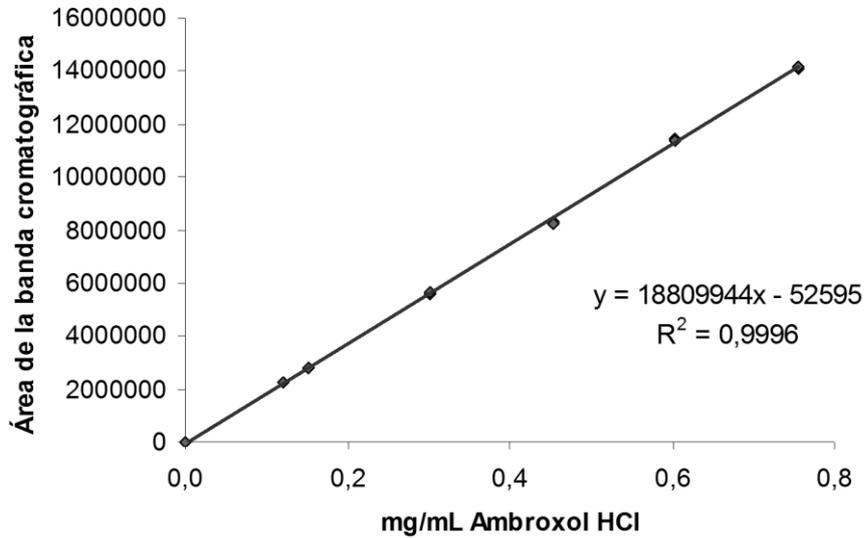
La linealidad del método fue determinada a partir de seis niveles de concentración correspondientes a 25, 50, 75, 100, 125 y 150 % del valor de referencia en base a la

concentración del fármaco, tanto para el clorhidrato de ambroxol como para la loratadina. Los seis niveles de concentración antes mencionados, contemplan un rango de concentración entre 0,12 mg/mL a 0,90 mg/mL para el clorhidrato de ambroxol y 0,02 mg/mL a 0,16 mg/mL para la loratadina.

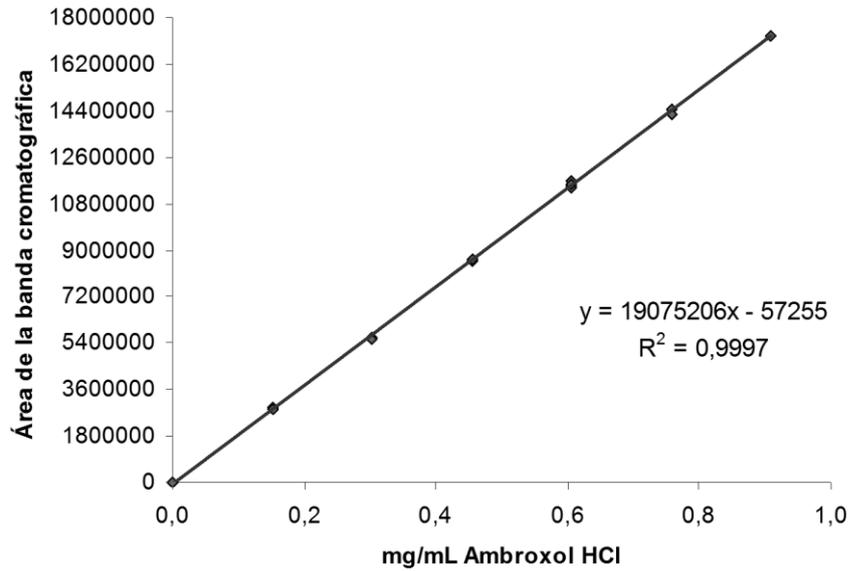
La ecuación de la regresión lineal fue calculada para cada analito y sus respectivas curvas de calibración fueron construidas trazando el área de la señal cromatográfica en función de la concentración del analito correspondiente. Los datos, ecuaciones y curvas de calibración de las tres regresiones lineales desarrolladas son presentadas a continuación, en las tablas IX, X, XI y los gráficos 1, 2 y 3, para el clorhidrato de ambroxol. Los datos y representaciones graficas correspondientes a la loratadina se presentan en las tablas XII, XIII, XIV y los gráficos 4, 5 y 6.

Tabla IX. Curva de calibración. Linealidad día 1. Clorhidrato de Ambroxol.

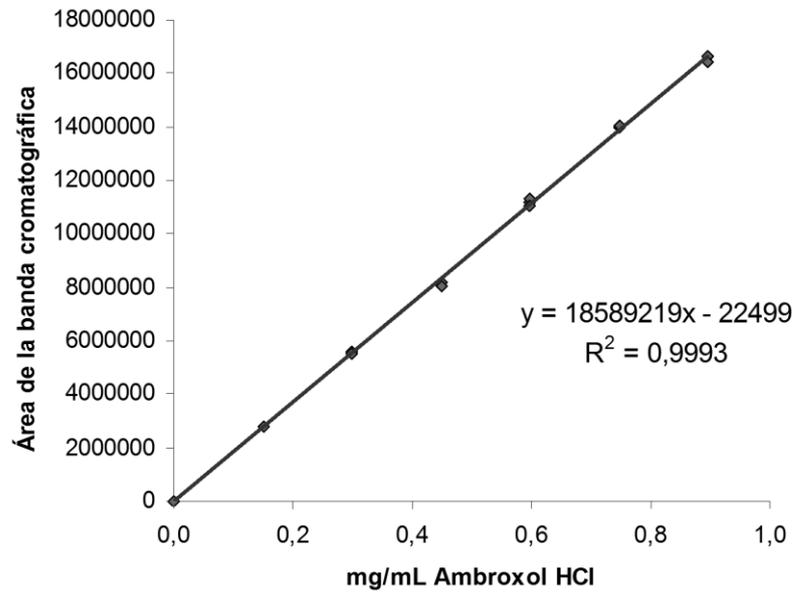
Patrón	Nivel de concentración (%)	Concentración (mg/mL)	Área cromatográfica
0	0	0,0000	0
1	20	0,1208	2235216
1	20	0,1208	2233916
2	25	0,1510	2810615
2	25	0,1510	2792157
3	50	0,3020	5566675
3	50	0,3020	5633612
4	75	0,4530	8290667
4	75	0,4530	8269178
5	100	0,6040	11435366
5	100	0,6040	11356342
5	100	0,6040	11379365
5	100	0,6040	11421716
5	100	0,6040	11373280
6	125	0,7550	14066600
6	125	0,7550	14130928
Pendiente		18809944	
Punto de corte		-52595	
Ecuación de la recta		$y = 18809944x - 52595$	
Coeficiente de determinación (R^2)		0,9996	

Grafico 1. Linealidad día 1. Clorhidrato de ambroxol.**Tabla X.** Curva de calibración. Linealidad día 2. Clorhidrato de Ambroxol.

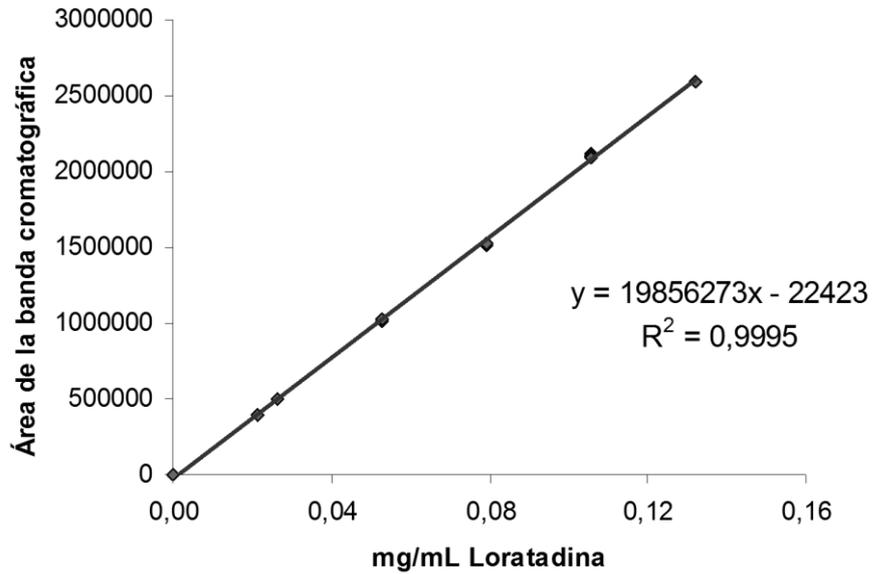
Patrón	Nivel de concentración (%)	Concentración (mg/mL)	Área cromatográfica
0	0	0,0000	0
1	25	0,1515	2875450
1	25	0,1515	2860438
2	50	0,3030	5621745
2	50	0,3030	5555499
3	75	0,4545	8559667
3	75	0,4545	8638337
4	100	0,6060	11505013
4	100	0,6060	11571590
4	100	0,6060	11697150
4	100	0,6060	11450499
4	100	0,6060	11552352
5	125	0,7575	14434640
5	125	0,7575	14275038
6	150	0,9090	17259936
6	150	0,9090	17280833
Pendiente		19075206	
Punto de corte		-57255	
Ecuación de la recta		$y = 19075206x - 57255$	
Coeficiente de determinación (R^2)		0,9997	

Grafico 2. Linealidad día 2. Clorhidrato de ambroxol.**Tabla XI.** Curva de calibración. Linealidad día 3. Clorhidrato de Ambroxol.

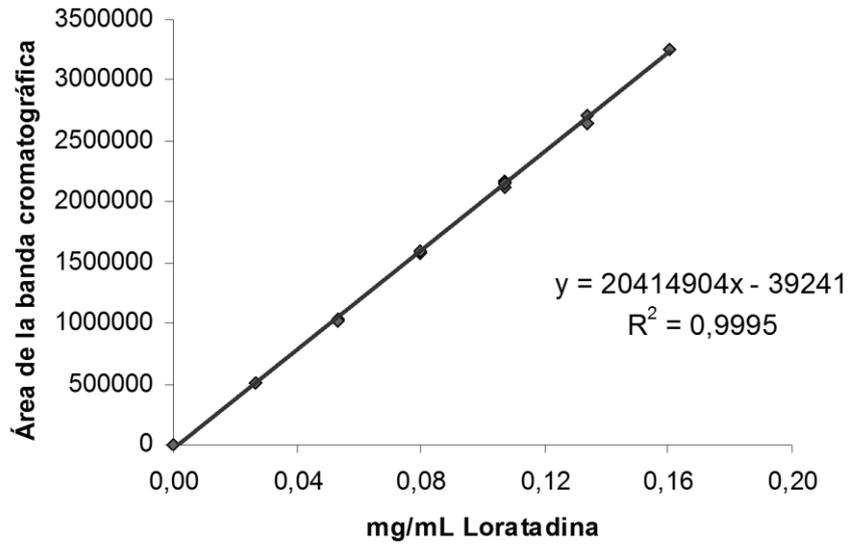
Patrón	Nivel de concentración (%)	Concentración (mg/mL)	Área cromatográfica
0	0	0,0000	0
1	25	0,1493	2779449
1	25	0,1493	2777034
2	50	0,2986	5589124
2	50	0,2986	5506747
3	75	0,4478	8153721
3	75	0,4478	8056204
4	100	0,5971	11175493
4	100	0,5971	11288932
4	100	0,5971	11013705
4	100	0,5971	11011436
4	100	0,5971	11045394
5	125	0,7464	14011029
5	125	0,7464	14029436
6	150	0,8960	16640759
6	150	0,8960	16422257
Pendiente		18589219	
Punto de corte		-22499	
Ecuación de la recta		$y = 18589219x - 22499$	
Coeficiente de determinación (R^2)		0,9993	

Grafico 3. Linealidad día 3. Clorhidrato de ambroxol.**Tabla XII.** Curva de calibración. Linealidad día 1. Loratadina.

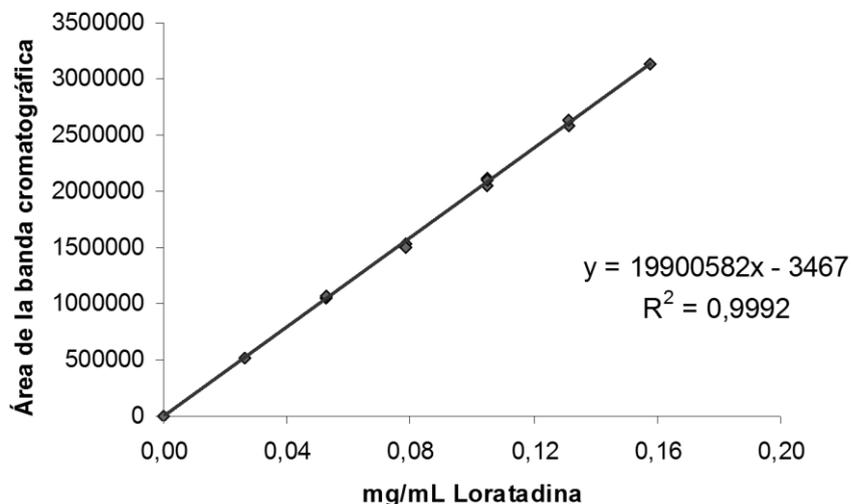
Patrón	Nivel de concentración (%)	Concentración (mg/mL)	Área cromatográfica
0	0	0,0000	0
1	20	0,0212	397204
1	20	0,0212	396393
2	25	0,0265	503641
2	25	0,0265	500356
3	50	0,0529	1012085
3	50	0,0529	1028825
4	75	0,0794	1516947
4	75	0,0794	1523221
5	100	0,1059	2113745
5	100	0,1059	2100147
5	100	0,1059	2099867
5	100	0,1059	2095822
5	100	0,1059	2090401
6	125	0,1323	2587341
6	125	0,1323	2591363
Pendiente		19856273	
Punto de corte		-22423	
Ecuación de la recta		$y = 19856273x - 22423$	
Coeficiente de determinación (R^2)		0,9995	

Grafico 4. Linealidad día 1. Loratadina.**Tabla XIII.** Curva de calibración. Linealidad día 2. Loratadina.

Patrón	Nivel de concentración (%)	Concentración (mg/mL)	Área cromatográfica
0	0	0,0000	0
1	25	0,0267	512990
1	25	0,0267	510790
2	50	0,0534	1028716
2	50	0,0534	1014156
3	75	0,0801	1583951
3	75	0,0801	1593913
4	100	0,1069	2144835
4	100	0,1069	2145587
4	100	0,1069	2164466
4	100	0,1069	2116422
4	100	0,1069	2146127
5	125	0,1336	2703355
5	125	0,1336	2651559
6	150	0,1603	3259761
6	150	0,1603	3248092
Pendiente		20414904	
Punto de corte		-39241	
Ecuación de la recta		$y = 20414904x - 39241$	
Coeficiente de determinación (R^2)		0,9995	

Grafico 5. Linealidad día 2. Loratadina.**Tabla XIV.** Curva de calibración. Linealidad día 3. Loratadina.

Patrón	Nivel de concentración (%)	Concentración (mg/mL)	Área cromatográfica
0	0	0,0000	0
1	25	0,0262	524420
1	25	0,0262	521955
2	50	0,0525	1057485
2	50	0,0525	1061058
3	75	0,0787	1526042
3	75	0,0787	1504012
4	100	0,1050	2105519
4	100	0,1050	2108633
4	100	0,1050	2099161
4	100	0,1050	2051026
4	100	0,1050	2098977
5	125	0,1312	2577333
5	125	0,1312	2641108
6	150	0,1574	3133828
6	150	0,1574	3133096
Pendiente		19900582	
Punto de corte		-3467	
Ecuación de la recta		$y = 19900582x - 3467$	
Coeficiente de determinación (R^2)		0,9992	

Grafico 6. Linealidad día 3. Loratadina.

La linealidad de los gráficos de calibración fue verificada mediante el uso de los métodos de coeficiente de determinación (R^2), prueba de falta de ajuste y análisis de residuales del modelo de regresión.

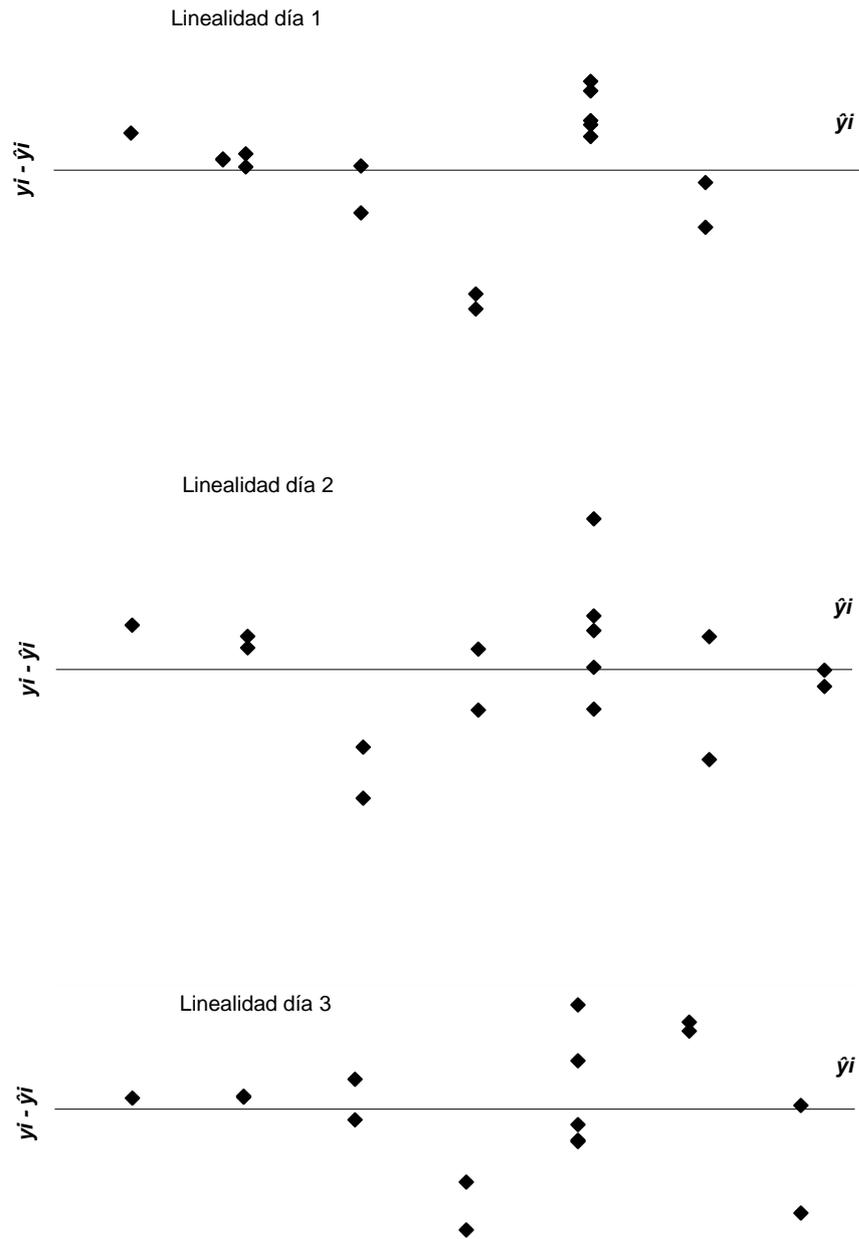
El coeficiente de determinación, expresa la proporción de variabilidad del conjunto de datos originada por la regresión de la variación total. Idealmente su valor debe acercarse a la unidad. ^[29] Las curvas de calibración concernientes a la evaluación de la linealidad presentan valores de coeficientes de determinación cercanos a uno, comportamiento ideal.

El análisis de residuos del modelo de regresión permite determinar la idoneidad del ajuste por mínimos cuadrados. ^[29] En los gráficos 7 y 8 se muestran las representaciones gráficas de los residuos contra los valores ajustados de \hat{y}_i , del clorhidrato de ambroxol y loratadina, respectivamente.

Al evaluar la respuesta medida y calculada de cada punto de la curva, del clorhidrato de ambroxol y de la loratadina, se observó la ausencia de tendencias marcadas en

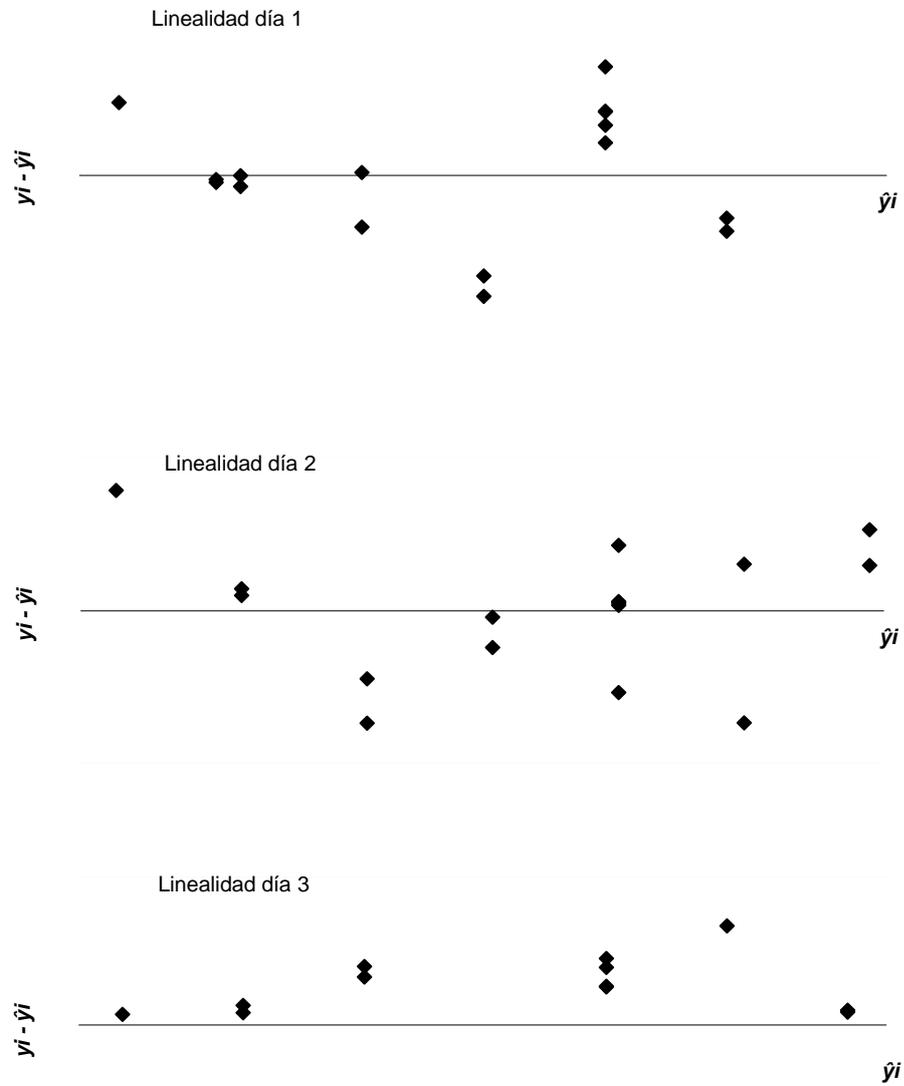
el residuo, lo que indica que las curvas presentan un ajuste lineal. El modelo de regresión lineal simple es el adecuado para el ajuste de datos.

Grafico 7. Análisis de residuales. Clorhidrato de ambroxol.



Valores individuales del área de pico cromatográfico y_i , valores individuales del área de pico cromatográfico para un valor x_i calculado a partir de la ecuación de la regresión \hat{y}_i .

Grafico 8. Análisis de residuales. Loratadina.



Valores individuales del área de pico cromatográfico y_i valores individuales del área de pico cromatográfico para un valor x_i calculado a partir de la ecuación de la regresión \hat{y}_i .

Dado que estos valores no suministran información directa acerca del ajuste del modelo de regresión, se realizó una prueba de falta de ajuste la cual permite validar la linealidad del modelo de regresión.

Prueba de falta de ajuste del modelo de regresión, se planteó la hipótesis:

H_0 : el modelo de regresión lineal simple es correcto

H_1 : el modelo de regresión lineal simple no es correcto.

Los resultados y cálculos correspondientes a la estadística para probar la falta de ajuste son presentados en las tablas XV y XVI, en función a estos resultados se acepta la hipótesis H_0 al exhibir $F_o > F$ ($v_1=4$, $v_2=10$, $p= 0,05$) al nivel de 95 % ($F_{0,05, 4,10}= 4,468$). Lo que indica que existe una excelente relación entre el factor de respuesta y la concentración dentro del rango de concentración indicado anteriormente, tanto para el clorhidrato de ambroxol como para la loratadina.

Tabla XV. Linealidad Clorhidrato de Ambroxol.

	Rango de concentración	Ecuación de la regresión	Coeficiente de determinación	F _o (95%, F _{4, 10} 4,468)	Limites de confianza
					Pendiente (b ± t ₁₄ S _b)
Linealidad día 1	0,12-0,75 mg/mL	y = 18809944x - 52595	0,9996	113713	18809944 ± 211500
Linealidad día 2	0,15-0,90 mg/mL	y = 19075206x - 57255	0,9997	19078	19075206 ± 182323
Linealidad día 3	0,15-0,90 mg/mL	y = 18589219x - 22499	0,9993	10042	18589219 ± 278909

Tabla XVI. Linealidad Loratadina.

	Rango de concentración	Ecuación de la regresión	Coeficiente de determinación	F _o (95%, F _{4, 10} 4,468)	Limites de confianza
					Pendiente (b ± t ₁₄ S _b)
Linealidad día 1	0,02-0,13 mg/mL	y = 19856273x - 22423	0,9995	59118	19856273 ± 259054
Linealidad día 2	0,03-0,16 mg/mL	y = 20414904x - 39241	0,9995	12895	20414904 ± 264418
Linealidad día 3	0,03-0,16 mg/mL	y = 19900582x - 3467	0,9992	7190	19900582 ± 316121

La comparación de la linealidad inter-diario de las regresiones se realizó mediante los estadísticos de la función de la respuesta lineal y el estudio de contraste F, para la comprobación de la idoneidad del modelo de regresión.

Hipótesis estadística, función de la respuesta lineal. La hipótesis planteada puede establecerse en función de la significancia de la pendiente y de la ordenada en el origen entre diferentes regresiones (inter-diario). La mayoría de estos estudios se centran en la significancia de la pendiente, ya que el valor de la ordenada en el origen suele ser muy pequeño en comparación con la pendiente y su suma algebraica. Cuando se realiza el cálculo de la concentración, el valor de la ordenada en el origen no altera en gran medida el valor de la concentración. Por otra parte, es muy común que la ordenada en el origen posea una gran variabilidad al presentar valores cercanos al ruido de fondo. En nuestro caso en particular, la pendiente es alrededor de 1000 veces mayor que la ordenada en el origen (ejemplo $y = 19856273x - 22423$), lo que indica que su contribución es poco significativa en la variabilidad del valor de x (concentración). En vista de ello la comparación de la linealidad se centrara en los valores de las pendientes.

Los resultados presentados en las tablas 1 y 2 (referirse al apéndice D) exponen resultados que demuestran similitud en la sensibilidad del método de análisis, valores mayores a los reportados para un contraste t al nivel de 95 % ($p=0,05$) y (n-2) grados de libertad ($t_{14} = 2,14$), por tanto no hay diferencia significativa entre las pendientes del conjunto de datos correspondientes tanto a la loratadina como al clorhidrato de ambroxol.

La precisión de la pendiente evaluada para las curvas de calibración mediante el estadístico de Fisher, estudio de contraste F ($p=0,05$), exponen resultados que demuestran similitud en la precisión del conjunto de datos, por tanto no hay diferencia significativa entre las varianzas del conjunto de datos correspondientes

tanto a la loratadina como al clorhidrato de ambroxol. Los resultados concernientes al estudio estadístico son presentados en las tablas 3 y 4 (ver apéndice D).

Las siguientes graficas permiten observar claramente la linealidad y correlación entre las curvas realizadas en días diferentes, resultado que demuestran similitud en la precisión del conjunto de datos.

Grafico 9. Linealidad del clorhidrato de ambroxol. Superposición de curvas linealidad día 1, 2 y 3.

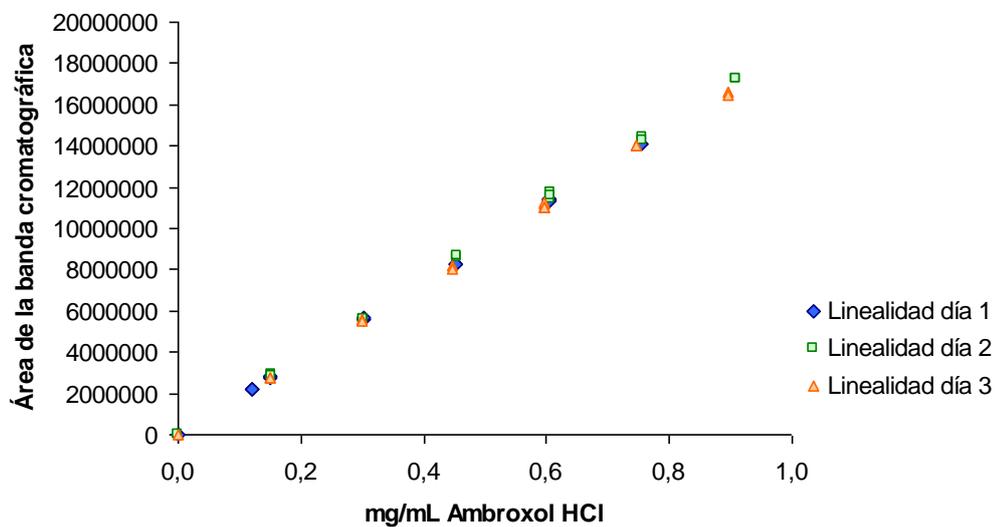
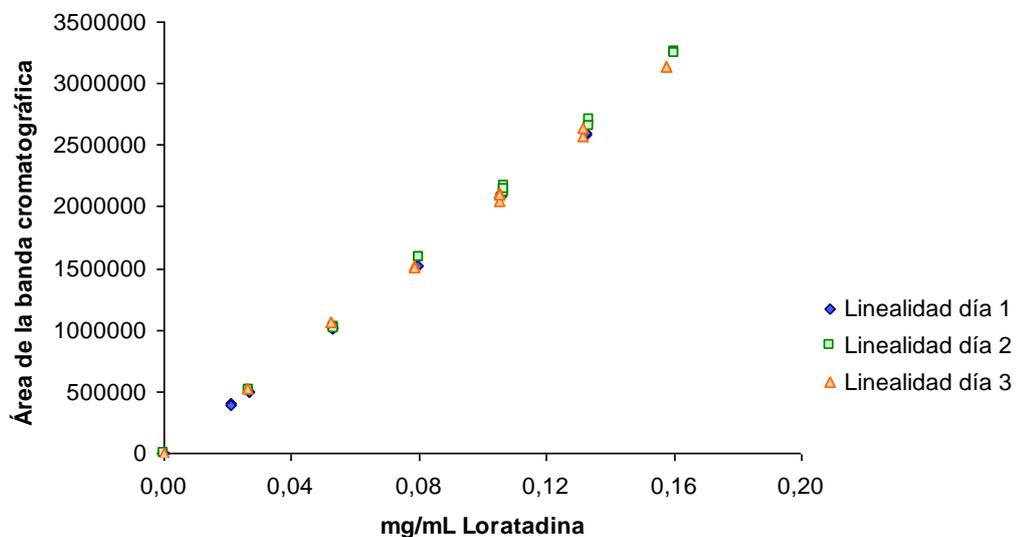


Grafico 10. Linealidad de la loratadina. Superposición de curvas linealidad día 1, 2 y 3.



En este orden de ideas, se establece que las respuestas de las áreas por variación de la concentración, tanto para el clorhidrato de ambroxol como para la loratadina, presentan alta tendencia a la linealidad en un rango de concentración entre 0,12 mg/mL a 0,90 mg/mL para el clorhidrato de ambroxol y 0,02 mg/mL a 0,16 mg/mL para la loratadina.

6.6.2. Precisión

La precisión del método fue evaluada mediante las determinaciones de repetibilidad y precisión intermedia. La precisión debe ser determinada analizando un número suficiente de alícuotas, que permitan calcular estadísticamente la desviación estándar y la desviación estándar relativa (coeficiente de variación). Los documentos ICH recomiendan que la repetibilidad debería evaluarse utilizando un mínimo de nueve determinaciones que cubre el intervalo especificado para el procedimiento (es decir, tres concentraciones y tres repeticiones de cada concentración) o utilizando un mínimo de seis determinaciones al 100 % de la concentración de ensayo. [3, 17, 18]

La precisión del método analítico se estudió sobre el sistema cromatográfico, para ello se evaluó la dispersión de inyecciones consecutivas del estándar nivel 100 % correspondiente a una concentración de 0,6 mg/mL de clorhidrato de ambroxol y 0,1 mg/mL de loratadina. Los resultados se presentan en las tablas XVII y XVIII.

La precisión evaluada a través de la repetibilidad del sistema se encuentra dentro de los límites establecidos para métodos cromatográficos, USP indica RSD porcentual del sistema menor al 2 %, al exhibir desviaciones estándar relativas menores o iguales a 1 % en los tiempos de retención y áreas de pico cromatográfico, tanto para el clorhidrato de ambroxol como para la loratadina.

La precisión del método bajo condiciones analíticas de repetibilidad (mismo analista, mismo día, mismo equipo) fue evaluada mediante la dispersión de seis

preparaciones homogéneas de material de referencia interno al 100% de la concentración. A fin de evaluar el procedimiento desde la preparación de la muestra hasta la medición de los analitos mediante el método de análisis establecido, así como la ejecución y rendimiento de las condiciones del método y estimar la variabilidad total que puede esperarse en el análisis de las muestras y el sistema cromatográfico. Los resultados se presentan en la tabla XVII y XVIII.^[18]

Tabla XVII. Evaluación de la precisión del sistema y del método de análisis cromatográfico, ensayo repetibilidad. Clorhidrato de ambroxol.

Precisión del sistema cromatográfico				Precisión del método		
Tiempo de retención		Área cromatográfica		Ambroxol HCl		
$t_{R\text{ prom}}$ (min) (s = 0,02)	CV	Área promedio (s=111858)	CV	C_{prom} (mg/ 5mL)	s	CV
3,80	0,6	11178115	1,0	30,0	0,3	1,0

* $t_{R\text{ prom}}$ tiempo de retención promedio, C_{prom} , concentración promedio, s desviación estándar, CV, coeficiente de variación.

Tabla XVIII. Evaluación de la precisión del sistema y del método de análisis cromatográfico, ensayo repetibilidad. Loratadina.

Precisión del sistema cromatográfico				Precisión del método		
Tiempo de retención		Área cromatográfica		Loratadina		
$t_{R\text{ prom}}$ (min) (s = 0,07)	CV	Área promedio (s=21850)	CV	C_{prom} (mg/ 5mL)	s	CV
16,60	0,4	2082265	1,1	5,21	0,09	1,7

* $t_{R\text{ prom}}$ tiempo de retención promedio, C_{prom} , concentración promedio, s desviación estándar, CV, coeficiente de variación.

La evaluación de la precisión del método demostró a una desviación estándar de 0,30 mg de contenido de clorhidrato de ambroxol en 5 mL de solución oral y 0,09 mg de contenido de loratadina en 5 mL de solución oral, exhibiendo ambos principios activos coeficientes de variación menores al 2 %. Lo que indica que la precisión evaluada a través de la repetibilidad del método se encuentra dentro de los límites establecidos para métodos cromatográficos.

La precisión intermedia fue determinada bajo las siguientes condiciones: diferente analista y diferente día.

La precisión intermedia fue evaluada mediante la adecuación del sistema a partir de una serie de cinco inyecciones consecutivas del estándar nivel 100 % correspondiente a una concentración de 0,6 mg/mL de clorhidrato de ambroxol y 0,10 mg/mL de loratadina y mediante la evaluación de tres preparaciones homogéneas de material de referencia interno al 100% de la concentración, analizadas por duplicado.

Las condiciones y procedimientos del análisis cromatográfico fueron reproducidas por tres analistas diferentes, en días diferentes empleando el mismo sistema cromatográfico. Los resultados obtenidos son presentados en las tablas XIX y XX.

Para los cálculos concernientes a la precisión intermedia cada analista realizó una curva de calibración, los datos son presentados en las tablas 3 al 5 expuestas en el apéndice E. Las representaciones gráficas correspondientes a las curvas de calibración realizadas por cada analista se muestran en el apéndice E, en la serie de gráficos del 3 al 5.

Tabla XIX. Evaluación de la precisión intermedia del análisis cromatográfico. Clorhidrato de ambroxol.

Ensayo	Precisión del sistema cromatográfico				Precisión del método		
	Tiempos de retención		Área cromatográfica		Ambroxol HCl		
	$t_{R\text{ prom}}$ (min) (s = 0,02)	CV	Área promedio (s=111858)	CV	C_{prom} (mg/ 5mL)	s	CV
Analista 1	3,88	0,5	11162498	0,7	30,0	0,5	1,8
Analista 2	3,88	0,3	11233308	1,0	30,2	0,4	1,2
Analista 3	3,90	0,8	11106992	1,1	31,0	0,6	1,9

* $t_{R\text{ prom}}$ tiempo de retención promedio, C_{prom} , concentración promedio, s desviación estándar, CV, coeficiente de variación.

Tabla XX. Evaluación de la precisión intermedia del análisis cromatográfico. Loratadina.

Ensayo	Precisión del sistema cromatográfico				Precisión del método		
	Tiempos de retención		Área cromatográfica		Loratadina		
	$t_{R\text{ prom}}$ (min) (s = 0,07)	CV	Área promedio (s=21850)	CV	C_{prom} (mg/ 5mL)	s	CV
Analista 1	15,52	0,3	2058906	0,6	4,83	0,07	1,5
Analista 2	15,65	0,1	2032100	1,0	4,91	0,08	1,6
Analista 3	15,82	0,4	2092663	1,1	5,06	0,09	1,8

* $t_{R\text{ prom}}$ tiempo de retención promedio, C_{prom} , concentración promedio, s desviación estándar, CV, coeficiente de variación.

Los resultados exhiben coeficientes de variación menores al 2 %, en los tiempos de retención y áreas de pico cromatográfico de la solución estándar correspondientes a la precisión del sistema, así como en las concentraciones de clorhidrato de ambroxol y loratadina determinadas para las preparaciones de material de referencia interno correspondientes a cada uno de los ensayos.

De la data obtenida, se establece que el método desarrollado es preciso, al presentar una dispersión de datos alrededor de 1,8 %, con lo cual se garantiza la habilidad del método para generar resultados reproducibles.

6.6.3. Exactitud

La exactitud del método fue determinada por la aplicación del procedimiento analítico, en el cual se determina por replicado el contenido promedio de los analitos en la muestra con el método a validar; una vez conocido el contenido promedio se procede a enriquecer las muestras con estándar. Para preparar las soluciones, se mantiene constante la cantidad de muestra tomada y se agregan cantidades variables del estándar.

Se preparan soluciones de muestras enriquecidas a tres niveles de concentración diferentes, los valores sugeridos en la literatura son 50-80, 100 y 120-150 % de la concentración normal de trabajo del método. La USP recomienda preparar muestras independientes por triplicado a cada nivel de concentración. ^[17] Finalmente se calcula el porcentaje de recuperación como medida de la exactitud:

$$\text{Porcentaje de recuperación} = \frac{(\text{Conc. muestra enriquecida} - \text{Conc. muestra sin enriquecer})}{\text{Conc. estándar}} \times 100$$

Experimentalmente se empleó el material de referencia interno como muestra y se establecieron tres niveles de concentración correspondientes a 80, 100 y 130 % respectivamente, del valor de referencia en base a la concentración del fármaco (30

mg/ 5 mL de clorhidrato de ambroxol y 5 mg/ 5 mL de loratadina), correspondiendo al valor de referencia el nivel de 100 % de concentración, constituido por 0,6 mg/mL de clorhidrato de ambroxol y 0,10 mg/mL de loratadina.

Se prepararon nueve réplicas de soluciones muestra no enriquecidas para las cuales se pesaron 2,5 g de material de referencia interno y se llevaron a volumen final 50,0 mL con solución disolvente. Estas fueron analizadas y determinado el contenido promedio de los principios activos clorhidrato de ambroxol y loratadina en las mismas.

Simultáneamente, las soluciones de muestras enriquecidas fueron preparadas tomando una cantidad constante de material de referencia interno equivalente a 15 mg de ambroxol y 2,5 mg de loratadina. Seguidamente, le fueron añadidas alícuotas de 3,0; 5,0; y 8,0 mL de solución estándar de 0,5 mg/mL de loratadina y 3,0 mg/mL de clorhidrato de ambroxol, llevados a un volumen final de 50,0 mL. Todo ello con el fin de enriquecer las muestras y alcanzar como concentraciones finales:

(80 %) 0,48 mg/mL clorhidrato de ambroxol - 0,08 mg/mL loratadina,
(100 %) 0,60 mg/mL clorhidrato de ambroxol - 0,10 mg/mL loratadina,
(130 %) 0,78 mg/mL clorhidrato de ambroxol - 0,13 mg/mL loratadina.

Es de notar que la preparación de cada nivel de enriquecimiento se realizó por triplicado.

Las soluciones enriquecidas fueron analizadas y posteriormente se determinó el porcentaje promedio de recuperación a cada nivel de concentración obteniendo como resultados:

Nivel 80 % de enriquecimiento, se obtuvo el 98,9 % de recuperación como medida de la exactitud del clorhidrato de ambroxol.

Nivel 100 % de enriquecimiento, se obtuvo el 100,4 % de recuperación como medida de la exactitud del clorhidrato de ambroxol.

Nivel 130 % de enriquecimiento, se obtuvo el 99,4 % de recuperación como medida de la exactitud del clorhidrato de ambroxol.

Para enriquecimientos entre el 80 % y 130 %, la exactitud medida como porcentaje de recuperación para el clorhidrato de ambroxol se encuentra entre 98,9 % y 100,4 %.

El porcentaje promedio de recuperación a cada nivel de concentración enriquecida para la loratadina generaron los siguientes resultados:

Nivel 80 % de enriquecimiento, se obtuvo el 99,6 % de recuperación como medida de la exactitud de la loratadina.

Nivel 100 % de enriquecimiento, se obtuvo el 100,7 % de recuperación como medida de la loratadina.

Nivel 130 % de enriquecimiento, se obtuvo el 99,2 % de recuperación como medida de la exactitud de la loratadina.

Para enriquecimientos entre el 80 % y 130 %, la exactitud medida como porcentaje de recuperación para la loratadina se encuentra entre 99,2 % y 100,7 %, los resultados correspondientes a los ensayos mencionados son presentados en la tabla XXI, resultados más detallados referirse al apéndice F.

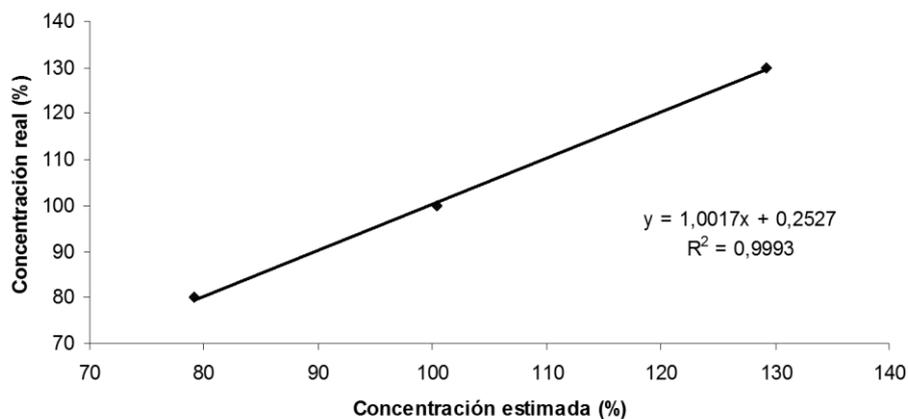
Los resultados presentados como porcentajes de recuperación para ambos analitos, se encuentran dentro de los límites del criterio de aceptabilidad comprendido entre 98,0 % a 102,0 % promedio para cada nivel, según lo establecido en la ICH. ^[18]

Tabla XXI. Recuperación del contenido de clorhidrato de ambroxol y loratadina. Evaluación de la exactitud del método.

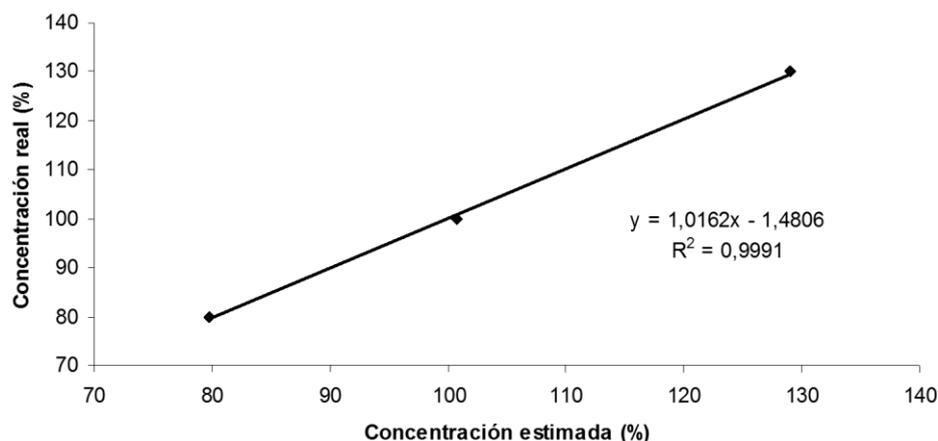
Analito	Clorhidrato de ambroxol		Loratadina	
	Recuperación %	Recuperación promedio (%)	Recuperación %	Recuperación promedio (%)
80 %	101,8	98,9	101,2	99,6
	98,3		98,3	
	96,8		99,3	
100 %	100,6	100,4	100,9	100,7
	103,2		103,2	
	97,3		98,0	
130 %	99,9	99,4	99,8	99,2
	98,5		98,3	
	99,8		99,7	

La evaluación de la linealidad de la relación entre los niveles de concentración estimados y reales para el clorhidrato de ambroxol y la loratadina a través de las representaciones gráficas 11 y 12 presentadas a continuación, muestran pendientes y coeficientes de determinación cercanos a la unidad, resultados que indica que los niveles de concentraciones estimadas y reales son iguales.

Gráfica 11. Relación entre las concentraciones estimadas y las concentraciones reales (80, 100 y 130 %). Clorhidrato de ambroxol.



Grafica 12. Relación entre las concentraciones estimadas y las concentraciones reales (80, 100 y 130 %). Loratadina.



6.6.4. Especificidad

La especificidad requiere poder demostrar que el procedimiento no es afectado por la presencia de impurezas o excipientes. En la práctica, esto se puede hacer enriqueciendo la sustancia de fármaco o producto con niveles apropiados de impurezas o excipientes, demostrando que el resultado del ensayo no se ve afectado por la presencia de estos materiales extraños. ^[17]

Al no contar con estándares de impurezas para llevar a cabo dicho procedimiento, se evaluó la especificidad mediante la comparación de los resultados obtenidos en pruebas con muestras, material de referencia interno, que contuvieran posibles productos de degradación. Estas comparaciones incluyen muestras almacenadas durante siete días, en condiciones extremas de luz, calor, hidrólisis ácida, hidrólisis básica y oxidación. ^[3,17]

El procedimiento realizado para la evaluación de la especificidad del método consistió en pesar 5,0 mL de solución oral, material de referencia interno, en un matraz aforado de 50,0 mL, este procedimiento se realizó para cada una de las

condiciones. Una vez pesado el material de referencia interno, se procedió a someter las muestras a las distintas condiciones de estrés.

Hidrólisis ácida, se añadió 10,0 mL de solución de ácido clorhídrico 1 N en un primer matraz aforado que contenía material de referencia interno, durante este procedimiento la solución permaneció sin cambio perceptible.

Hidrólisis básica, se añadió 10,0 mL de solución de hidróxido de sodio 1 N en un matraz aforado que contenía material de referencia interno, durante este procedimiento se observó una turbidez y formación de un precipitado blanco.

Oxidación, se añadió 10,0 mL de solución de peróxido de hidrógeno al 10 % v/v en un matraz aforado que contenía material de referencia interno, durante este procedimiento la solución permaneció sin cambio perceptible.

Las mezclas antes mencionadas fueron almacenadas en un espacio confinado, sin exposición a la luz durante siete días.

Fotólisis, matraz aforado con material de referencia interno, fue conectado a un sistema con exposición directa a la luz proveniente de una lámpara provista de un bombillo de 15 W/ 120 V/ 60 Hz, durante siete días.

Termólisis, matraz aforado con material de referencia interno, fue sometido a calentamiento en un baño térmico de agua a una temperatura de $60,0 \pm 0,2$ °C, durante cuatro horas, procedimiento realizado el día del análisis cromatográfico.

El sexto matraz con material de referencia interno, correspondiente a la muestra control, fue diluido y llevado a volumen final con solución disolvente, según el procedimiento previo al análisis cromatográfico expuesto anteriormente en el apartado 6.5.2.1. La muestra control fue analizada bajo las condiciones

cromatográficas establecidas, el día de preparación de las soluciones y siete días después, a fin de evaluar la degradación de la solución de análisis del medicamento con el tiempo.

Una vez finalizado el período de exposición de las muestras a la condición de estrés en estudio se observaron los cambios producidos en cada una de las soluciones, observando:

Hidrólisis ácida y termólisis, sin cambio perceptible.

Hidrólisis básica, no se observó cambio en el sólido formado.

Fotólisis y estrés oxidativo, se observó un cambio de coloración, de incolora a ligeramente amarillenta.

Seguidamente se procedió a analizar cada una de las soluciones. Para ello, las soluciones fueron diluidas y llevadas a volumen final con solución disolvente, según el procedimiento correspondiente. Posteriormente fueron analizadas bajo las condiciones cromatográficas establecidas para el método cromatográfico, el software del sistema incorpora el comando de análisis de pureza de la señal cromatográfica, a partir del cual fue posible la evaluación de pureza de las bandas mediante la detección de las impurezas que coeluyeran con el clorhidrato de ambroxol y loratadina en las diferentes soluciones bajo las condiciones de análisis establecidas.

A continuación se presentan los cromatogramas correspondientes a las pruebas de degradación llevadas a cabo para la evaluación de la especificidad bajo las diferentes condiciones extremas de análisis, así como las representaciones gráficas del nivel de pureza de las señales cromatográficas.

- Degradación en el tiempo. Condiciones de temperatura ambiente, sin iluminación.

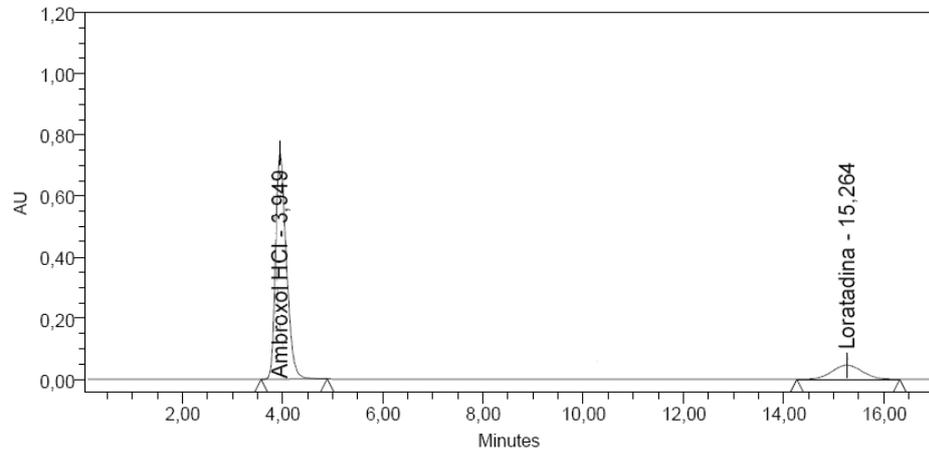


Figura 16. Cromatograma solución estándar control, 0,6 mg/mL de clorhidrato de ambroxol y 0,1 mg/mL de loratadina.

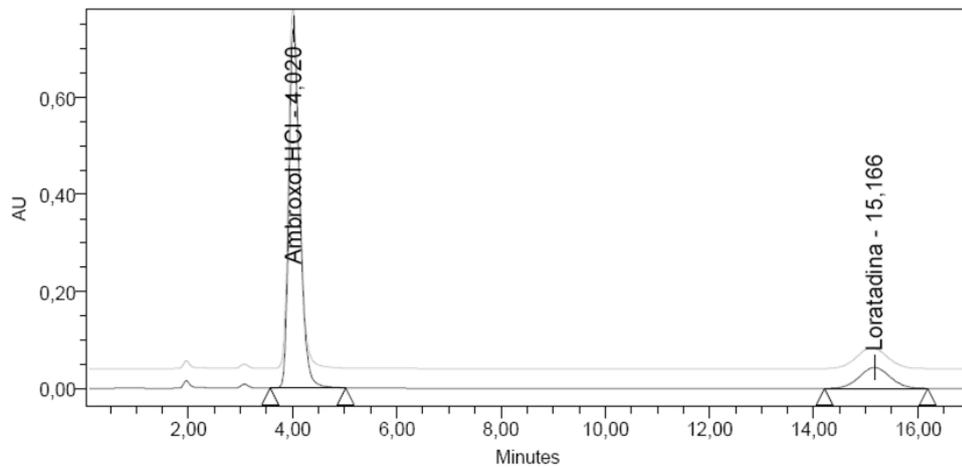


Figura 17. Cromatograma muestra control (material de referencia interno).

Las soluciones correspondientes al estándar y muestra control, presentan comportamiento similar tanto en los tiempos de retención como en el área de las bandas cromatográficas del clorhidrato de ambroxol y loratadina presentes

en ambas soluciones (tabla XXII), las variaciones observadas se encuentran dentro del error del método analítico.

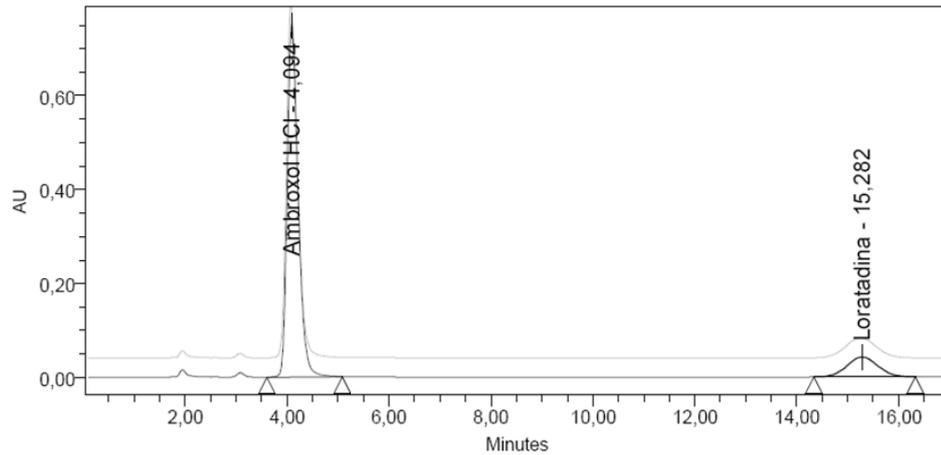


Figura 18. Cromatograma muestra a los 7 días de su preparación.

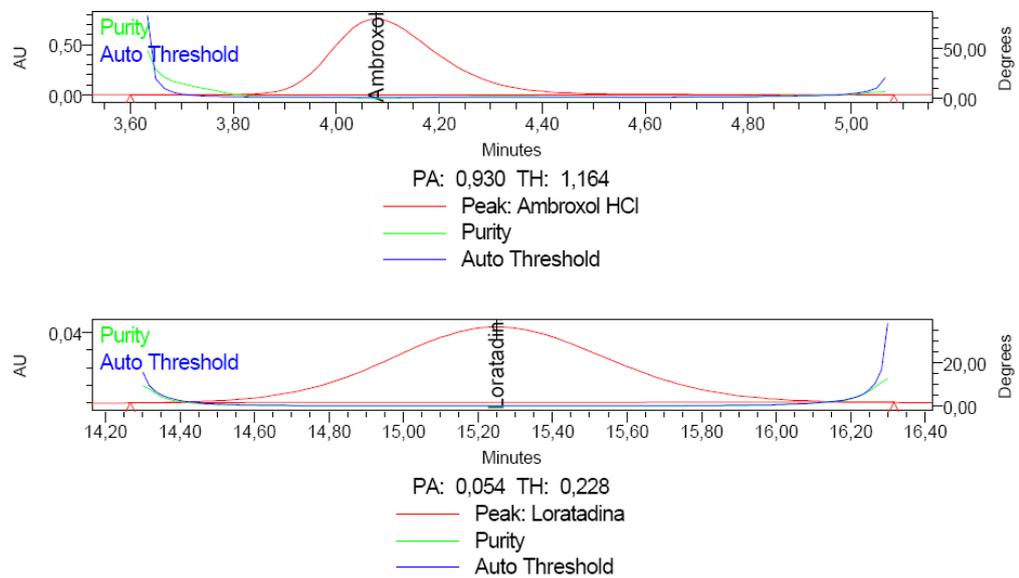


Figura 19. Grafico de pureza. Muestra a los 7 días de su preparación.

Al comparar el área de las señales cromatográficas del clorhidrato de ambroxol y la loratadina en la muestra control el día de preparación y siete días después de su preparación, los resultados presentados en la tabla XXII,

establecen un ligero aumento en el área de la banda cromatográfica del clorhidrato de ambroxol y la loratadina.

Al evaluar la señal de pureza del clorhidrato de ambroxol tras siete días de su preparación la relación entre en ángulo de pureza (PA) 0,930 y ángulo umbral (TH) 1,164 (ángulo de pureza menor al ángulo umbral), no indican presencia de coelución de otros compuestos con el clorhidrato de ambroxol. Por lo que es posible adjudicar esta variación en las áreas a pérdidas por evaporación del disolvente, ya que los gráficos de pureza no indican presencia de impurezas espectrales.

Tabla XXII. Estándar de referencia y muestra control.

Analito	Estándar control			Muestra control día 1			Muestra control día 7		
	Área promedio	C _{prom} (mg/ 5mL)	s	Área promedio	C _{prom} (mg/5mL)	s	Área promedio	C _{prom} (mg/ 5mL)	s
Clorhidrato de ambroxol	10955558	30,2	0,2	10605025	30,2	0,1	11186045	30,4	0,2
Loratadina	1955396	5,10	0,08	1796159	4,84	0,2	1814682	4,69	0,6

Área promedio (s = 111858) clorhidrato de ambroxol, (s = 21850) loratadina.

- Fotólisis.

La separación cromatográfica de los principios activos clorhidrato de ambroxol y loratadina presentes en una solución sometida a condiciones extremas de exposición a la luz no muestran productos de degradación que afecten la cuantificación de los analitos. Es posible evidenciar la estabilidad en los tiempos de retención de ambos analitos (Figura 20).

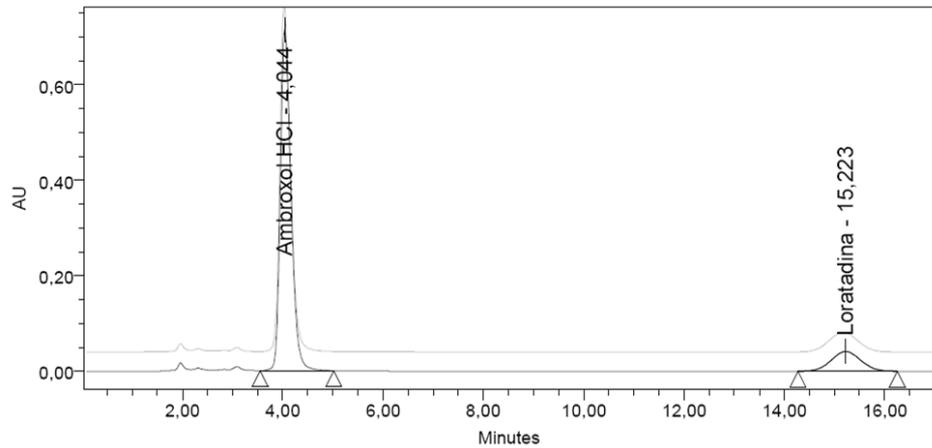


Figura 20. Cromatograma muestra expuesta a fotólisis.

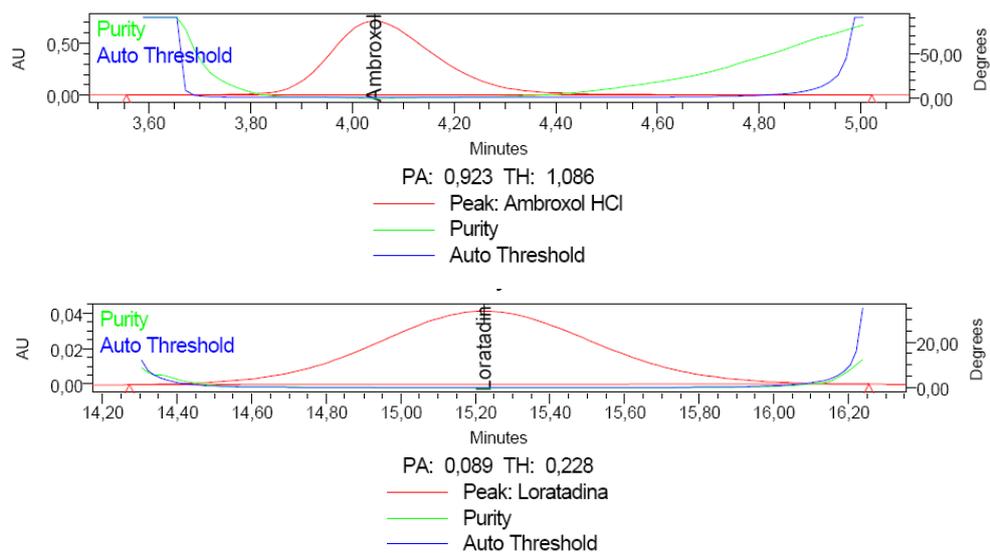


Figura 21. Grafico de pureza. Muestra expuesta a fotólisis.

La evaluación de pureza de la banda del clorhidrato de ambroxol y loratadina, indican estabilidad de ambos compuestos frente a condiciones de exposición a la luz, evidenciado por la correlación entre el ángulo de pureza (PA) menor al ángulo del umbral (TH), siendo PA de 0,923 y TH 1,086 para el clorhidrato de ambroxol y PA 0,089 y TH 0,228 para la loratadina.

- Estrés oxidativo.

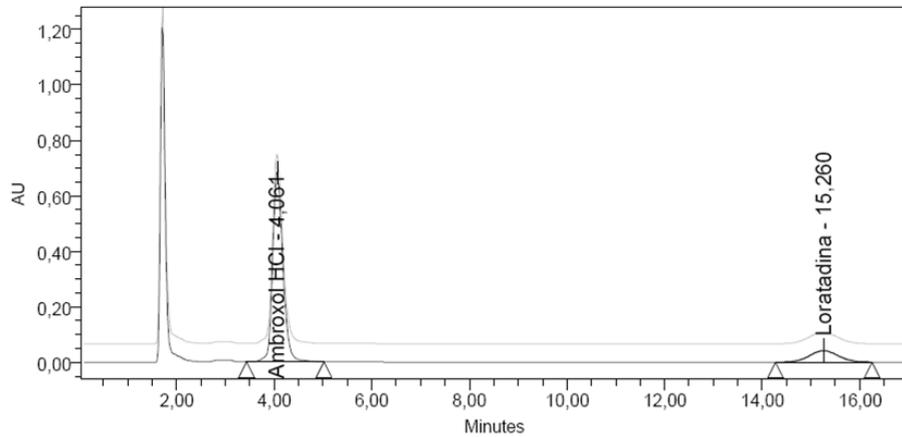


Figura 22. Cromatograma muestra expuesta a estrés oxidativo.

En la separación cromatográfica de los principios activos clorhidrato de ambroxol y loratadina presentes en una solución sometida a condiciones de degradación con peróxido de hidrógeno, se observa la elución de una banda a un tiempo de retención similar al tiempo muerto, compuesto no retenido por la fase estacionaria. La separación de los principios activos no es afectada por el compuesto.

Las señales de pureza de la banda del clorhidrato de ambroxol muestran para la primera derivada una ligera diferencia entre el ángulo de pureza (PA) 0,813 y el ángulo umbral (TH) 0,827, pero la segunda derivada establece un ángulo de pureza (PA) 0,875 y el ángulo umbral (TH) 0,822, resultados que indican la presencia de producto(s) de degradación oxidativa que se superponen al del clorhidrato de ambroxol y no son evidenciados en el cromatograma.

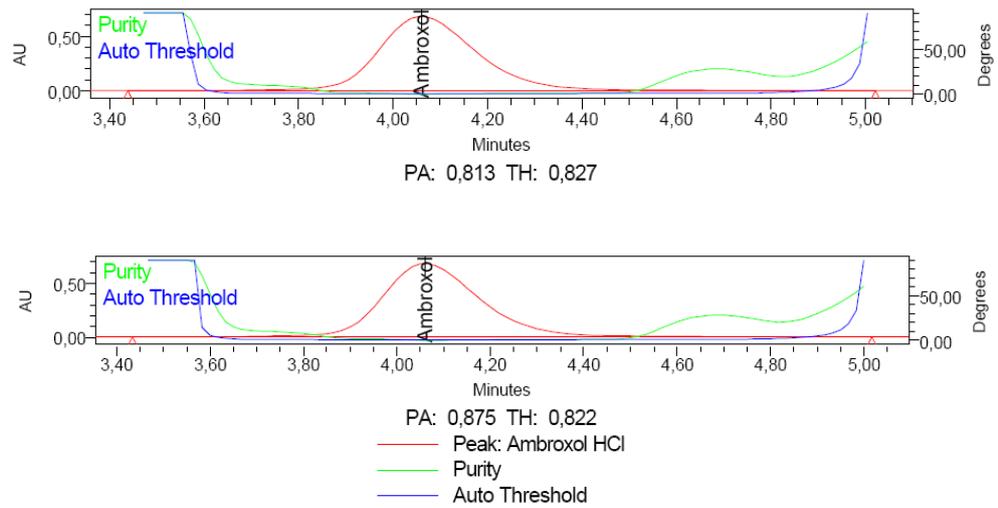


Figura 23. Grafico de pureza de la banda cromatográfica. Primera y segunda derivada correspondiente al clorhidrato de ambroxol.

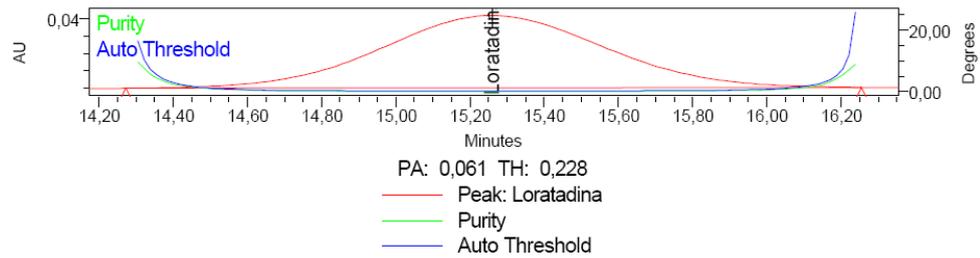


Figura 24. Grafico de pureza de la banda cromatográfica de loratadina. Primera derivada.

La evaluación de la pureza de la loratadina, indican estabilidad del compuesto frente a condiciones de presencia de agente oxidante, evidenciado por la correlación entre el ángulo de pureza (PA) 0,061 menor al ángulo del umbral (TH) 0,228.

- Hidrólisis ácida.

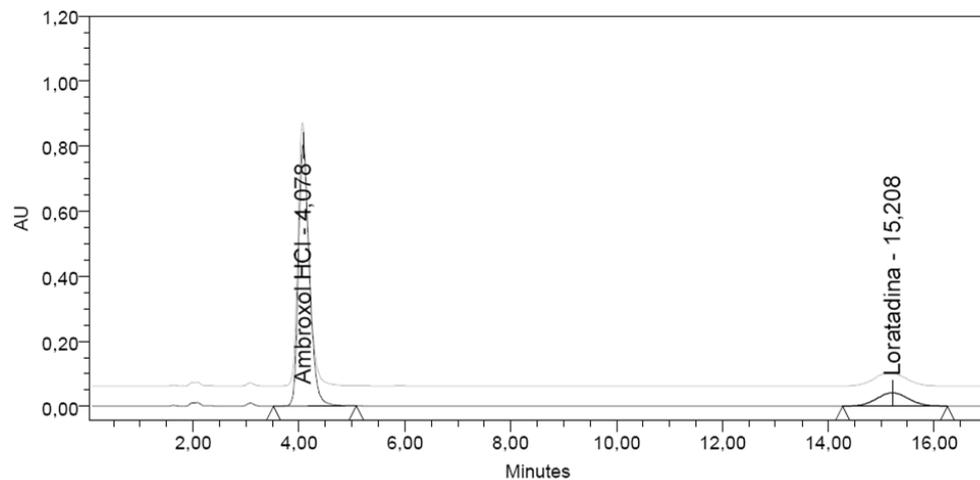
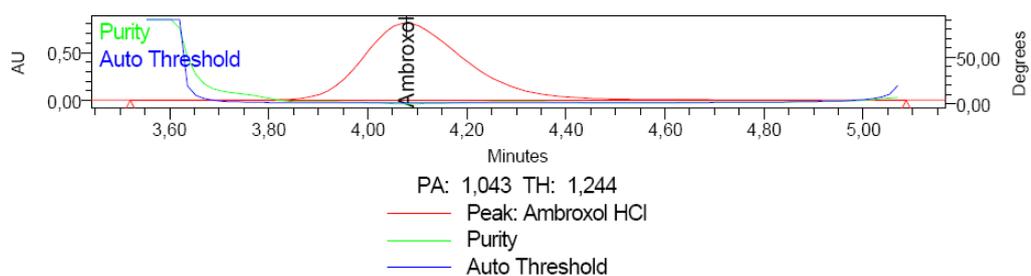


Figura 25. Cromatograma muestra expuesta a hidrólisis ácida.

La separación cromatográfica del clorhidrato de ambroxol y loratadina presentes en una solución sometida a condiciones ácidas no muestran productos de degradación que afecten la separación y cuantificación de los analitos. En este análisis se presenta estabilidad en los tiempos de retención de ambos analitos, y un ligero aumento del área de la señal cromatográfica de clorhidrato de ambroxol (tabla XXIV). Al evaluar la pureza de la banda correspondiente al clorhidrato de ambroxol, tanto la primera como la segunda derivada presentan ángulos de pureza menores al ángulo umbral, lo que implica que no se generan productos de descomposición que produzcan una señal superpuesta a la del analito, PA 1,043 TH 1,244, primera derivada y PA 1,154 TH 1,260, segunda derivada.



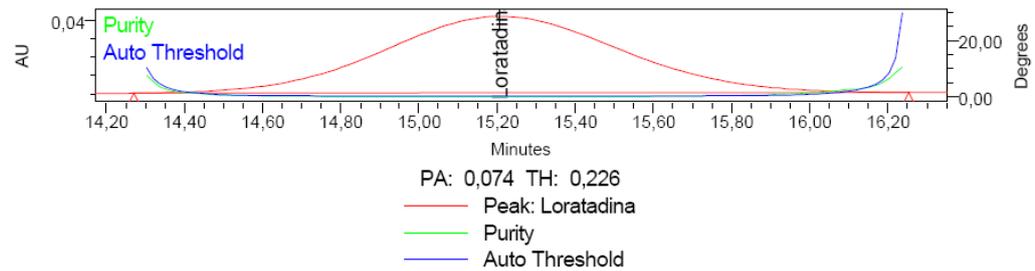


Figura 26. Gráficos de pureza, correspondientes al clorhidrato de ambroxol y loratadina respectivamente.

La evaluación de pureza de la loratadina, indica la estabilidad del compuesto frente a condiciones ácidas, evidenciado por la relación entre el ángulo de pureza (PA) menor al ángulo del umbral (TH), correspondientes a valores de PA 0,074 y TH 0,226.

- Hidrólisis básica.

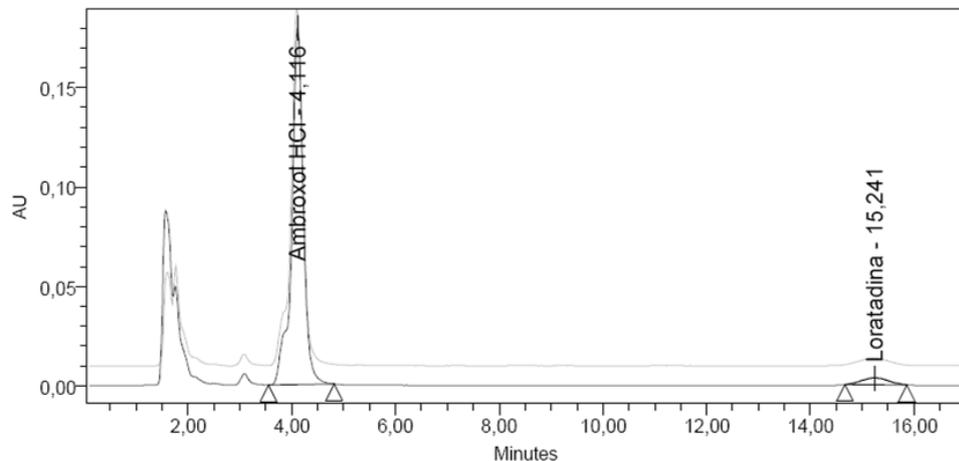


Figura 27. Cromatograma muestra expuesta a hidrólisis básica.

El cromatograma correspondiente a la solución material de referencia interno sometida a condiciones en medio alcalino evidencia productos de degradación. Primeramente se encuentra una banda ancha desdoblada, no retenida por la fase estacionaria, tiempo adjudicado al tiempo muerto. Así

mismo, la banda correspondiente al clorhidrato de ambroxol exhibe asimetría con un desdoblamiento en el frente de la banda de elución, y disminución significativa del área esperada con respecto a la muestra control.

Es posible evidenciar la inestabilidad de ambos analitos frente al hidróxido de sodio, al evaluar la disminución significativa del área de la señal de ambos analitos en el análisis cromatográfico. La condición de degradación en medio básico pudo generar la hidrólisis del éster, presente en la molécula de loratadina, dando lugar a un subproducto, este hecho justifica la disminución del área de la señal correspondiente a la loratadina. De igual forma, la molécula de clorhidrato de ambroxol sufrió cambios en el medio básico que alteraron su composición química, generando producto(s) de degradación. Los resultados del análisis son presentados en las tablas XXIV y XXV.

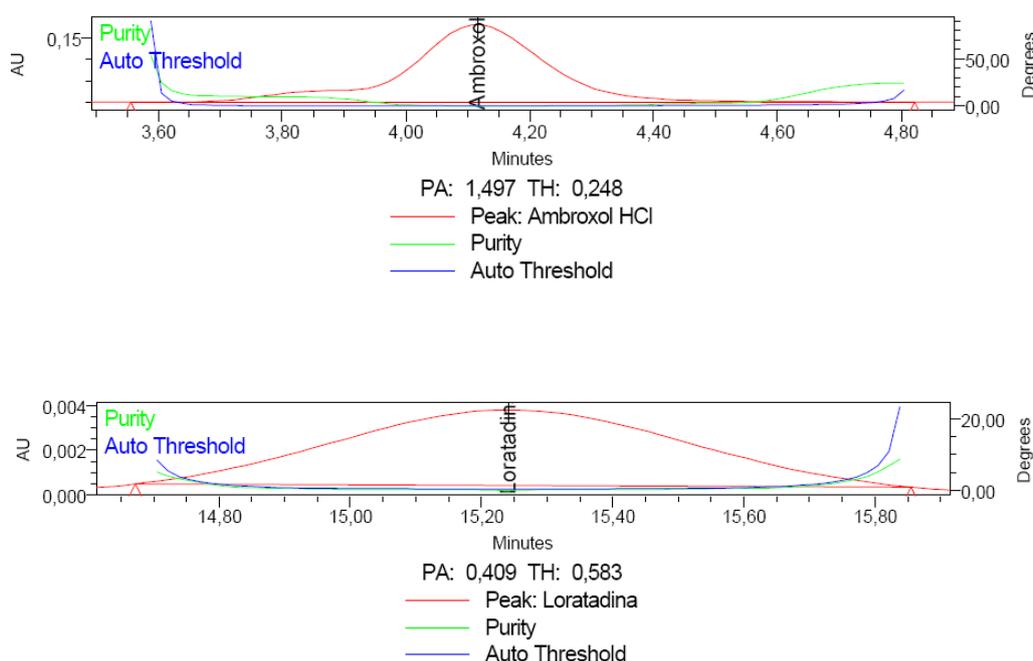


Figura 28. Gráficos de pureza, correspondientes al clorhidrato de ambroxol y loratadina respectivamente. Primera derivada.

La evaluación de pureza de las bandas del clorhidrato de ambroxol y loratadina, confirma la presencia de producto(s) de degradación que se superpone(n) al del clorhidrato de ambroxol, lo cual se evidencia por la relación entre el ángulo de pureza (PA) 1,497 mayor al ángulo del umbral (TH) 0,248. Mientras que la loratadina presenta una relación de ángulo de pureza (PA) 0,409 menor al ángulo umbral (TH) 0,583 indicando que los productos generados en medio alcalino son menos afines a la fase estacionaria.

- Termólisis.

El cromatograma correspondiente a la solución del material de referencia interno sometida a condiciones de exposición al calor no evidenció productos de degradación que afecten la separación de los analitos. Los resultados obtenidos bajo estas condiciones presentan una marcada estabilidad en los tiempos de retención tanto para el clorhidrato de ambroxol como para la loratadina.

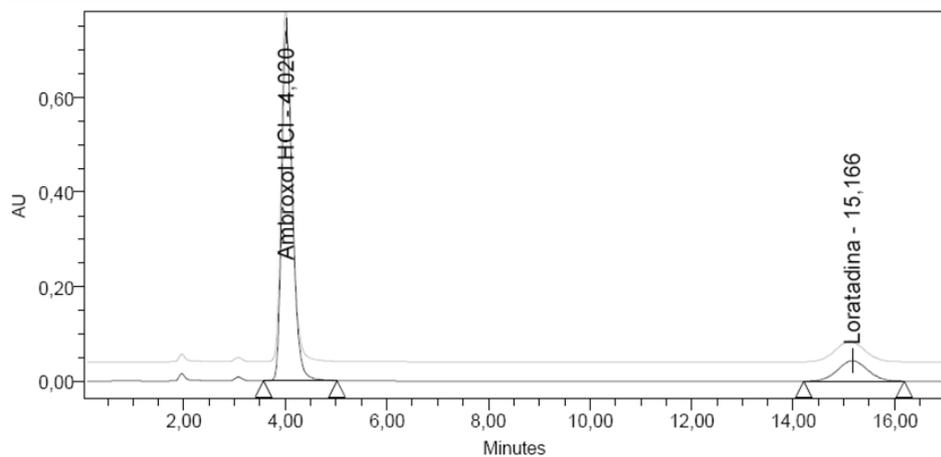


Figura 29. Cromatograma muestra expuesta a termólisis.

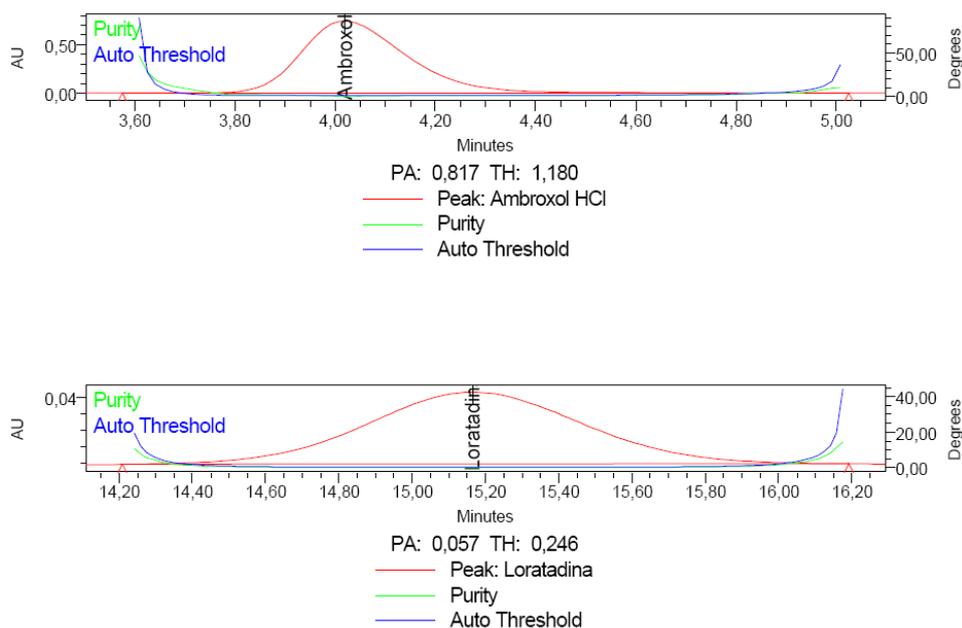


Figura 30. Gráficos de pureza de pico, correspondientes al clorhidrato de ambroxol y loratadina respectivamente. Primera derivada.

La pureza de las bandas cromatográficas del clorhidrato de ambroxol y loratadina, indican estabilidad de ambos compuestos frente a condiciones de exposición al calor, evidenciado por la relación entre el ángulo de pureza (PA) menor al ángulo del umbral (TH), siendo PA de 0,817 y TH 1,180 para el clorhidrato de ambroxol y PA 0,057 y TH 0,246 para la loratadina.

La evaluación de la especificidad del método cromatográfico para la separación simultánea del clorhidrato de ambroxol y loratadina bajo las condiciones cromatográficas presentadas en la tabla VI, indica que el método produce una señal medible debida solo a la presencia de los analitos clorhidrato de ambroxol y loratadina, libre de interferencias de otros componentes en la matriz de la muestra bajo condiciones de luz, calor e hidrólisis ácida.

Tabla XXIII. Especificidad del método de análisis. Ángulos de pureza (PA) y ángulos umbral (TH) correspondientes al clorhidrato de ambroxol y loratadina en las muestras sometidas a condiciones extremas.

Condición (7 días)	Clorhidrato de ambroxol		Loratadina	
	PA	TH	PA	TH
Muestra control	0,930	1,164	0,054	0,228
Fotólisis	0,923	1,086	0,089	0,228
Oxidación	0,813	0,827	0,061	0,228
	0,875	0,822		
Hidrólisis ácida	1,043	1,244	0,074	0,226
Hidrólisis básica	1,497	0,248	0,409	0,583
Termólisis	0,817	1,180	0,057	0,246

Indicador de degradación

Los resultados obtenidos en las diferentes pruebas de degradación bajo condiciones extremas, llevadas a cabo para la evaluación de la especificidad del método, fueron empleados para la determinación del porcentaje de degradación que sufrieron las disoluciones de material de referencia interno bajo las diferentes condiciones de análisis. Cabe resaltar que estos análisis no fueron realizados por replicados, pero permiten dar una idea del grado de degradación que se da a lugar en la muestra bajo condiciones de fotólisis, termólisis, oxidación, hidrólisis ácida e hidrólisis básica. En las tablas XXIV y XXV se presentan el contenido de clorhidrato de ambroxol y loratadina, así como los porcentajes de degradación de cada analito bajo las condiciones de análisis.

Tabla XXIV. Especificidad del método de análisis. Contenido de clorhidrato de ambroxol en las muestras sometidas a condiciones extremas.

Condiciones	Área promedio (s=111858)	C _{prom} (mg/ 5mL)	Desviación estándar (s)	CV	Porcentaje degradación (%)
Muestra control	10955558	30,2	0,2	0,1
Muestra control (7 días)	11186045	30,4	0,2	0,2	-0,7
Fotólisis	10538344	28,6	0,2	0,5	5,3
Oxidación	9963378	27,2	0,2	0,2	9,9
Hidrólisis ácida	11608460	31,6	0,2	0,3	-4,6
Hidrólisis básica	2801614	7,7	0,2	0,7	74,5
Termólisis	10857157	29,7	0,2	0,8	1,6

Tabla XXV. Especificidad del método de análisis. Contenido de loratadina en las muestras sometidas a condiciones extremas.

Condiciones	Área promedio (s=21850)	C _{prom} (mg/ 5mL)	Desviación estándar (s)	CV	Porcentaje degradación (%)
Muestra control	1955396	4,84	0,04	0,2
Muestra control (7 días)	1814682	4,69	0,07	0,6	3,1
Fotólisis	1727312	4,46	0,06	0,5	7,9
Oxidación	1745812	4,52	0,04	0,2	6,6
Hidrólisis ácida	1778125	4,59	0,04	0,1	5,2
Hidrólisis básica	120205	0,40	0,07	3,9	91,7
Termólisis	1786075	4,64	0,07	0,7	4,1

Los resultados presentados en las tablas XXIV y XXV, obtenidos bajo las condiciones de fotólisis, termólisis e hidrólisis ácida presentan una marcada estabilidad en los resultados concernientes a la determinación del contenido de ambos analitos al presentar variaciones dentro del error del análisis. Dando lugar a porcentajes de degradación menores al 10 % del contenido en la muestra inicial.

Al evaluar la cuantificación de los analitos en la condición de estrés oxidativo no se observa cambio significativo en el contenido de loratadina, al presentar una degradación de 6,6 %. Sin embargo, el contenido de clorhidrato de ambroxol es menor al obtenido en la muestra control, con un porcentaje de degradación del 9,9 %. Resultado que establece una mayor inestabilidad del clorhidrato de ambroxol bajo condición de oxidación. Los resultados concernientes a la evaluación de la pureza de la señal cromatográfica y los obtenidos en la determinación del porcentaje de degradación indican la presencia de producto(s) de degradación oxidativa que se superponen al del clorhidrato de ambroxol, afectando la cuantificación del mismo.

La condición de hidrólisis básica generó degradaciones del 75 % para el clorhidrato de ambroxol y 92 % para la loratadina, resultados que establecen una disminución significativa del contenido de ambos analitos en la disolución de análisis. En medio básico las moléculas de ambos analitos sufren alteraciones en su composición química, generando producto(s) de degradación que afecta(n) su cuantificación.

Los principios activos clorhidrato de ambroxol y loratadina en presencia de un agente oxidante como peróxido de hidrógeno y bajo condiciones de hidrólisis básica, tienden a generar productos de degradación que interfieren con su cuantificación.

6.6.5. Robustez

La robustez de un procedimiento analítico, es una medida de su capacidad de no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas de los parámetros del

procedimiento y proporciona una indicación de su idoneidad durante su aplicación.
[17]

Para la evaluación de la robustez del método se establece una serie de parámetros de idoneidad del sistema, con la finalidad de asegurar que se mantiene la validez del procedimiento analítico utilizado. [17] Los parámetros establecidos experimentalmente para la evaluación de la robustez del método fueron el flujo de la fase móvil, pH de la fase móvil y composición de la fase móvil. Parámetros propuestos en la tabla XXVI, presentada a continuación.

Tabla XXVI. Parámetros aplicados en la evaluación de la robustez del método.

Parámetro	Flujo de la fase móvil (mL/min)		pH de la fase móvil		Composición de la fase móvil (Buffer: Metanol)*	
	A	a	B	b	C	c
Especificación	0,7	0,9	3,3	3,5	52:48	48:52

* Buffer fosfato monobásico de amonio (0,05 M)

El diseño experimental descrito por Plackett y Burman fue empleado en la estimación de la robustez del método, este diseño plantea que los parámetros de validación se evalúan utilizando un enfoque de dos niveles para cada variable que sea puesta a prueba. [18] Según lo antes expuesto se estableció un nivel por encima y por debajo del valor establecido por el método, modificaciones de ± 1 en flujo y pH de la fase móvil, ± 2 % en la composición de la fase móvil. El efecto de estos cambios fue evaluado utilizando ocho experimentos presentados en la tabla XXVII.

Tabla XXVII. Configuración de parámetros empleados en los experimentos para la evaluación de la robustez del método.

Parámetro	Experimento							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	a	a	a	a	A	A	A	A
B/b	b	b	B	B	B	B	b	b
C/c	c	C	C	c	C	c	c	C
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

* Letras en mayúscula, representan parámetros por encima del valor del método. Letras minúsculas, representan parámetros por debajo del valor del método.

Los resultados obtenidos en la evaluación de los parámetros en los diferentes experimentos fueron empleados en la determinación de la diferencia de medias para cada parámetro, los cuales dieron como resultado los datos presentados en las tablas 1 y 2 del apéndice G. La influencia significativa de cada parámetro sobre el resultado se determinó mediante la relación con el producto de la desviación estándar y la raíz de dos, considerando diferencias significativas aquellos resultados por encima de este valor, ^[27] los resultados se muestran en las tablas 1 y 2 del apéndice G.

El cambio deliberado de las condiciones cromatográficas demuestran la confiabilidad del método de separación propuesto para la determinación simultánea del clorhidrato de ambroxol y loratadina bajo las condiciones de fase móvil buffer fosfato monobásico de amonio (0,05 M) y metanol en proporción 50:50 \pm 2 % v/v, pH 3,4 \pm 0,1, y flujo de fase móvil 0,8 \pm 0,1 mL/ min, resultados que establecen un método robusto bajo dichas condiciones de análisis para el clorhidrato de ambroxol.

El método analítico es robusto para la determinación del clorhidrato de ambroxol, incluso bajo la combinación de cambios deliberados de las tres condiciones de

análisis estudiadas (composición, flujo y pH de la fase móvil), resultado que establece que el método es capaz de soportar diferentes alteraciones experimentales sin afectar la determinación del contenido de clorhidrato de ambroxol.

La evaluación de la robustez del método analítico para la determinación de la loratadina mostró diferencias significativas para la combinación del cambio deliberados de las tres condiciones de análisis propuesto (ABC, la tabla 2 del apéndice G se presentan los resultados concernientes). La determinación de bajas concentraciones de loratadina no tolera la alteración simultánea de las condiciones de análisis fase móvil buffer fosfato monobásico de amonio (0,05 M) y metanol en proporción $50:50 \pm 2\%$ v/v, $\text{pH } 3,4 \pm 0,1$, y flujo de fase móvil $0,8 \pm 0,1$ mL/ min.

Resultados que establecen que el método de análisis cromatográfico propuesto no es robusto para la determinación de loratadina bajo cambios deliberados de las tres condiciones de análisis estudiadas. Sin embargo, el método es robusto bajo cambios simultáneos de una o dos condiciones de análisis.

6.7. Análisis de medicamentos de diferentes marcas comerciales

Una vez validada la metodología analítica para la determinación simultánea del clorhidrato de ambroxol y loratadina, se procedió a analizar tres medicamentos de diferentes marcas comerciales. Los medicamentos A, B y C, fueron analizados bajo las condiciones cromatográficas expuestas en la tabla VI y siguiendo el procedimiento para tratamiento de muestras descrito en el apartado 6.5.2.1.

Simultáneamente, se determinaron las características organolépticas de cada uno de los medicamentos analizados.

Medicamento A

Solución incolora, de olor frutal, pH de la solución oral $3,04 \pm 0,01$.

Densidad de la solución oral ($1,1588 \pm 0,0003$) g/mL, valor determinado a ($25,0 \pm 0,2$) °C de temperatura.

Medicamento B

Solución amarillenta, de olor frutal, pH de la solución oral $3,20 \pm 0,01$.

Densidad de la solución oral ($1,2031 \pm 0,0003$) g/mL, valor determinado a ($25,0 \pm 0,2$) °C de temperatura.

Medicamento C

Solución amarillenta, de olor almendrado, pH de la solución oral $2,45 \pm 0,01$.

Densidad de la solución oral ($1,1148 \pm 0,0003$) g/mL, valor determinado a ($25,0 \pm 0,2$) °C de temperatura.

El análisis de contenido de clorhidrato de ambroxol y loratadina presente en tres muestras de diferentes marcas comerciales condujo a comportamientos diferentes, debido a los excipientes constituyentes de las soluciones orales.

A continuación se muestran los cromatogramas de las muestras comerciales analizadas y los resultados de la cuantificación de los principios activos.

Tabla XXVIII. Análisis del contenido de clorhidrato de ambroxol y loratadina presentes en medicamentos de diferentes marcas comerciales.

Medicamento	Clorhidrato de ambroxol			Loratadina		
	C _{prom} (mg/ 5 mL)	Desviación estándar s	CV	C _{prom} (mg/ 5 mL)	Desviación estándar s	CV
A	30,8	0,4	1,1	5,0	0,1	1,9
B	24,1	0,4	1,5	4,9	0,1	1,8
C	29,9	0,4	1,1	5,0	0,1	1,9

* Concentración reportada 30 mg/ 5 mL de clorhidrato de ambroxol y 5 mg/ 5mL de loratadina.

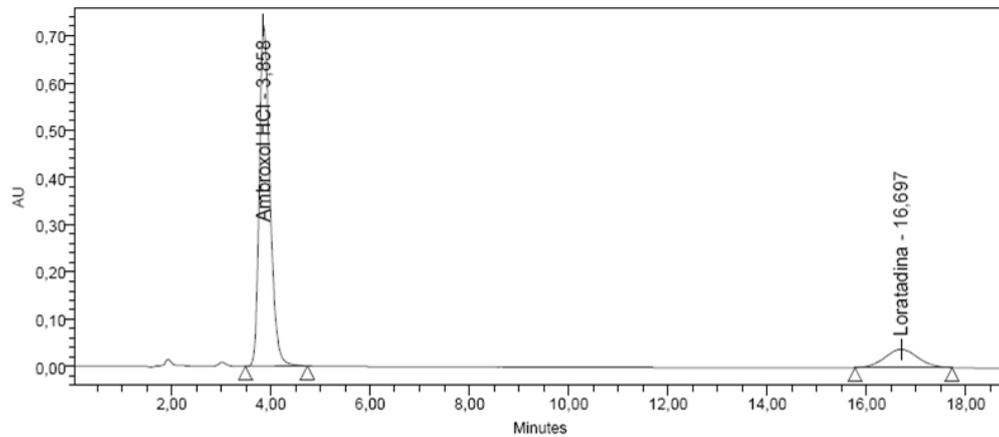


Figura 31. Cromatograma correspondiente al análisis del medicamento A.

Los excipientes presentes en la fórmula comercial correspondiente al medicamento A, no interfieren con la separación cromatográfica, y mucho menos con la cuantificación de los principios activos, al presentar concentraciones similares a las reportadas por el fabricante, resultados presentados en la tabla XXVIII. Así como la estabilidad de ambos principios activos bajo condiciones normales de almacenamiento, evidenciado por la relación entre el ángulo de pureza (PA) menor al ángulo del umbral (TH), correspondientes a valores de PA 1,026 y TH 1,121 para el clorhidrato de ambroxol y PA 0,082 y TH 0,281 para la loratadina.

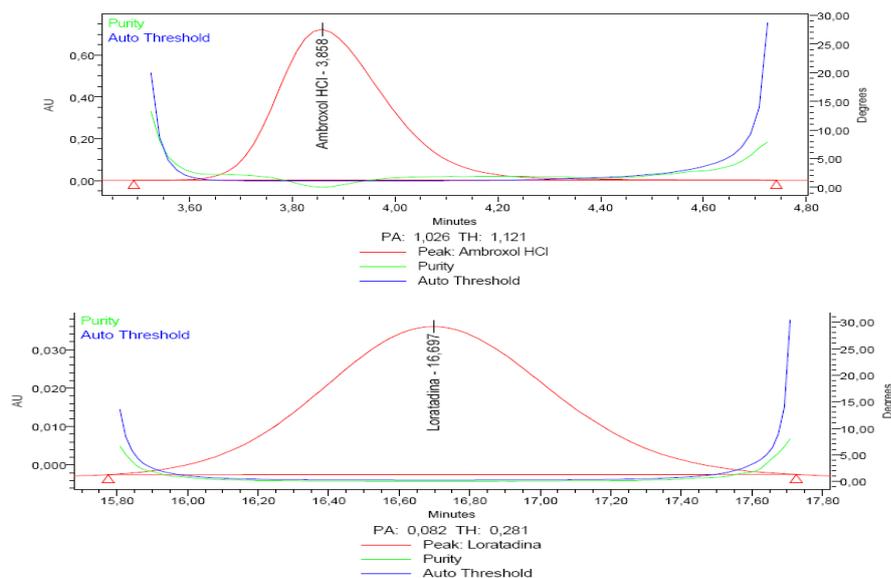


Figura 32. Gráficos de pureza, correspondientes al clorhidrato de ambroxol y loratadina respectivamente.

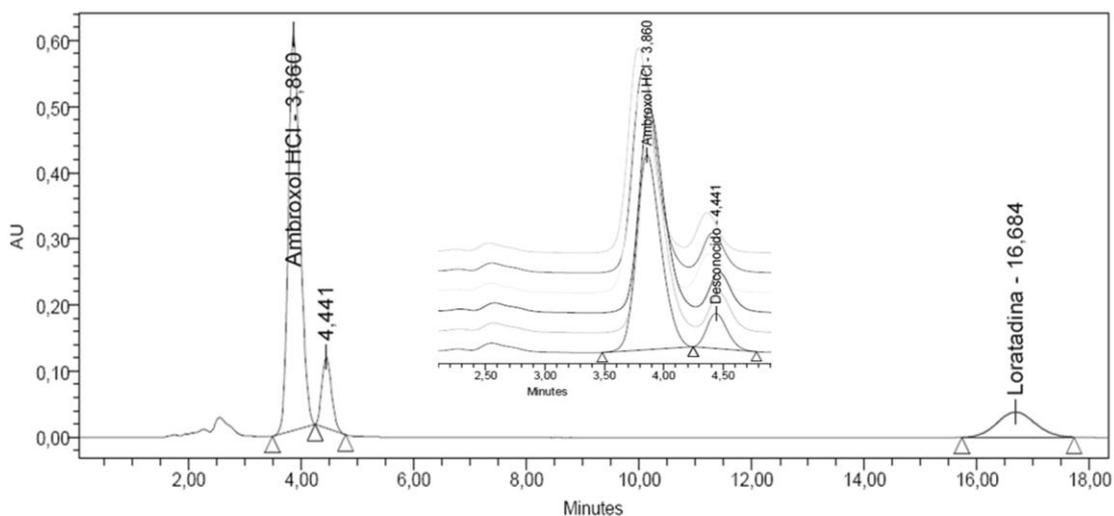


Figura 33. Cromatograma correspondiente al análisis del medicamento B.

En el cromatograma correspondiente al medicamento B, se observa la presencia de una banda cercana a la banda del clorhidrato de ambroxol, con un resolución de 1,7 entre el clorhidrato de ambroxol y la banda desconocida, resultado que establece la completa resolución de las bandas cromatográficas. Al evaluar el contenido de ambos principios activos, se obtuvo como resultado una concentración de 24,1 mg/ 5 mL de clorhidrato de ambroxol, dicha concentración se encuentra por debajo de lo reportado por el fabricante (30 mg/ 5 mL).

La evaluación de pureza de las bandas del clorhidrato de ambroxol y loratadina, confirma la presencia excipientes o producto(s) de degradación, bajo condiciones normales de almacenamiento, que se superpone(n) a la banda del clorhidrato de ambroxol, este hecho es evidenciado por la relación entre el ángulo de pureza (PA) 1,334 mayor al ángulo del umbral (TH) 0,652. Mientras que la loratadina presenta una relación de ángulo de pureza (PA) 0,086 menor al ángulo umbral (TH) 0,269 indicando la pureza del principio activo en la formula comercial.

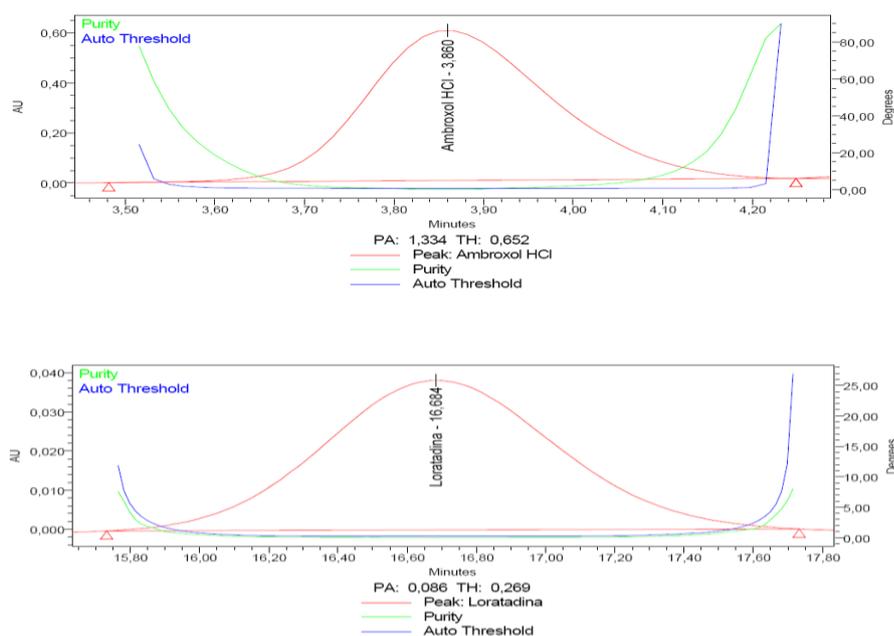


Figura 34. Gráficos de pureza, correspondientes al clorhidrato de ambroxol y loratadina respectivamente.

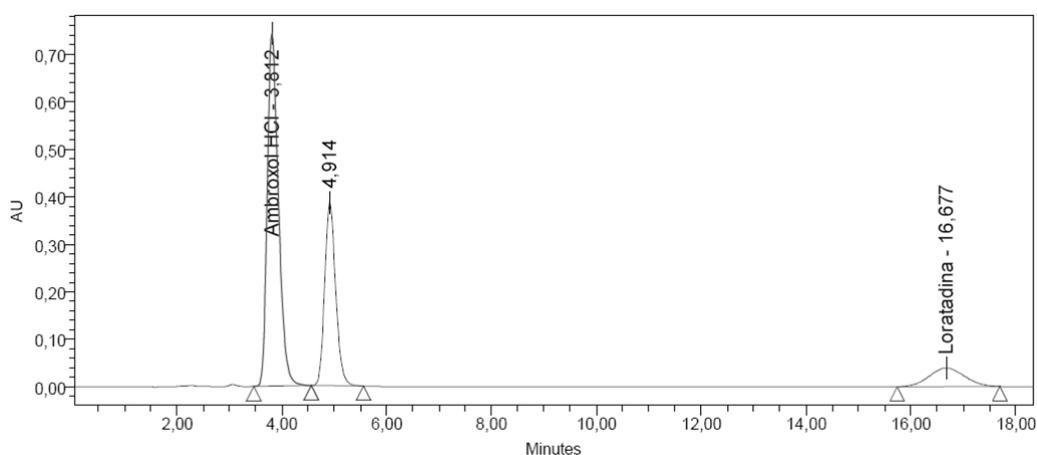


Figura 35. Cromatograma correspondiente al análisis del medicamento C.

El medicamento C, presenta una señal cercana al tiempo de elución del clorhidrato de ambroxol, similar al presentado en el medicamento B, presentando una completa resolución cromatográfica de los componentes de la muestra, solución oral. En lo referente a la cuantificación del clorhidrato de ambroxol y loratadina, ambos analitos

exhiben concentraciones similares a las reportadas por el fabricante, se obtuvo como resultado una concentración de 29,9 mg/ 5 mL de clorhidrato de ambroxol y 5 mg/ 5 mL de loratadina.

Las señales de pureza de la banda del clorhidrato de ambroxol muestran para la primera derivada una ligera diferencia entre el ángulo de pureza (PA) 1,246 y el ángulo umbral (TH) 1,242, resultados que indican interferencias espectrales que se superponen a la banda del clorhidrato de ambroxol. Mientras que la loratadina presenta una relación de ángulo de pureza (PA) 0,086 menor al ángulo umbral (TH) 0,246 indicando la pureza del principio activo en la fórmula comercial.

La cuantificación del contenido de clorhidrato de ambroxol, no se ve afectada por la banda cromatográfica cercana, al dar como resultado una concentración similar a la reportada en su formulación farmacéutica.

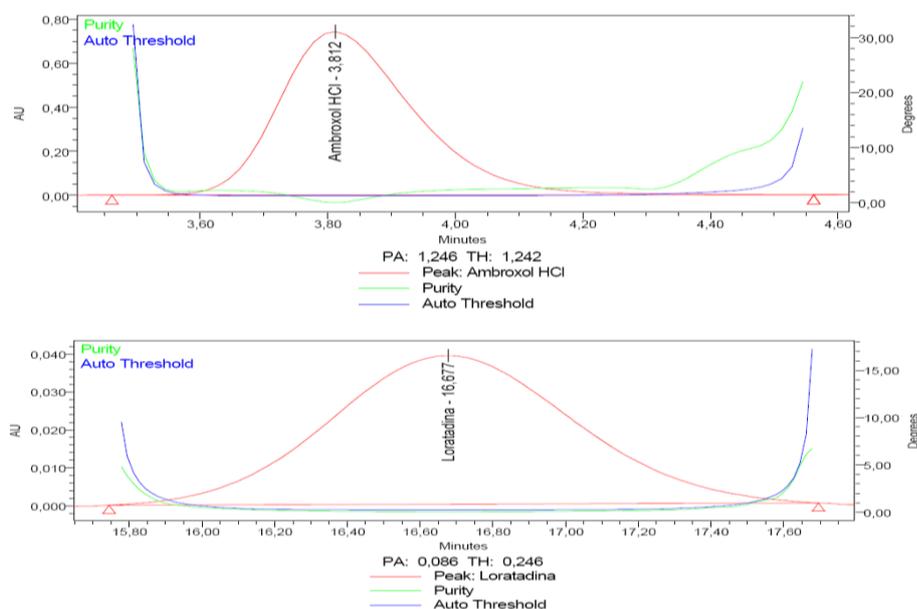


Figura 36. Gráficos de pureza, correspondientes al clorhidrato de ambroxol y loratadina respectivamente. Primera derivada.

El análisis de los medicamentos A, B y C permitió establecer que el método de análisis para la determinación de clorhidrato de ambroxol y loratadina es capaz de discriminar la presencia de otros compuestos presentes en las diferentes formulaciones farmacéuticas. Por lo tanto el método resulta ser un indicador de estabilidad, ya que permite analizar la muestra y discriminar la presencia de señales diferentes a las bandas de interés. Los datos correspondientes a las bandas cromatográficas y contenido de las soluciones orales analizadas se presentan en las tablas del 1 al 3, en el apéndice H.

Los resultados antes presentados demuestran que el método de separación y cuantificación establecido permite analizar muestras que difieren en su constitución de manera reproducible, específica, y precisa. Siendo un método selectivo, al permitir identificar inequívocamente la presencia del clorhidrato de ambroxol y la loratadina, así como distinguir la presencia de otros componentes en la matriz de la muestra.

7. Conclusiones.

- Se desarrolló un procedimiento analítico por cromatografía líquida de alta eficiencia para la determinación simultánea del contenido de clorhidrato de ambroxol y loratadina presentes en jarabes. Se establecieron como condiciones cromatográficas columna RP 18 (3,9 mm x 150 mm, 5 μ m) a temperatura ambiente, fase móvil compuesta por la mezcla de buffer fosfato monobásico de amonio (0,05 M, pH 4) y metanol en proporción 50:50 % v/v, a pH de 3,40 ajustado con ácido ortofosfórico al 85 %, flujo de la fase móvil 0,8 mL/min. Detección UV-Visible a una longitud de onda de 248 nm.
- Se estableció que las respuestas de las áreas por variación de la concentración para el clorhidrato de ambroxol presentan alta tendencia a la linealidad en un rango de concentración entre 0,12 mg/mL a 0,90 mg/mL.
- Se encontró una alta tendencia a la linealidad entre las respuestas de las áreas por variación de la concentración de la loratadina en un rango de concentración entre 0,02 mg/mL a 0,16 mg/mL.
- La evaluación inter-diaria de la linealidad del método cromatográfico demostró la poca variabilidad en la sensibilidad del método. Evaluación que indicó la ausencia de diferencias significativas entre las pendientes inter-diario tanto para el clorhidrato de ambroxol como para la loratadina.
- El método cromatográfico desarrollado es preciso, al presentar una dispersión de datos menores al 2 %, con lo cual se garantiza la habilidad del método para generar resultados reproducibles.
- La exactitud medida como porcentaje de recuperación para el clorhidrato de ambroxol se encontró entre 98,9 % y 100,4 %, para niveles de concentración

enriquecidas entre el 80 % y 130 %, resultados que se encuentran dentro de los límites del criterio de aceptabilidad comprendido entre 98,0 % a 102,0 %, según lo establecido en la ICH.

- La exactitud medida como porcentaje de recuperación para la loratadina se encontró entre 99,2 % y 100,7 %, para niveles de concentración enriquecidas entre el 80 % y 130 %, resultados que se encuentran dentro de los límites del criterio de aceptabilidad comprendido entre 98,0 % a 102,0 %, según lo establecido en la ICH.
- El método cromatográfico desarrollado para la determinación simultánea del contenido de clorhidrato de ambroxol y loratadina es exacto para ambos analitos.
- Los principios activos clorhidrato de ambroxol y loratadina en presencia de agente oxidante como peróxido de hidrógeno y bajo condiciones de hidrólisis básica, tienden a generar productos de degradación que interfieren en su cuantificación.
- El método cromatográfico desarrollado es selectivo al permitir reconocer inequívocamente la presencia del clorhidrato de ambroxol y loratadina y discriminar la presencia de sustancias contaminantes.
- El método propuesto para la determinación del clorhidrato de ambroxol es robusto y confiable bajo cambios simultáneos de las condiciones de análisis de fase móvil buffer fosfato monobásico de amonio (0,05 M) y metanol en proporción 50:50 \pm 2 % v/v, pH 3,4 \pm 0,1, y flujo de fase móvil 0,8 \pm 0,1 mL/min.

- El método de análisis cromatográfico propuesto es robusto para la determinación de clorhidrato de ambroxol bajo cambios deliberados de las tres condiciones de análisis proporción de los constituyentes de la fase móvil, pH y flujo de la fase móvil.
- El método de análisis cromatográfico propuesto no es robusto para la determinación de loratadina bajo cambios deliberados de las tres condiciones de análisis proporción de los constituyentes de la fase móvil, pH y flujo de la fase móvil.
- El método propuesto para la determinación de la loratadina es robusto y confiable bajo cambios simultáneos de una o dos condiciones de análisis de fase móvil buffer fosfato monobásico de amonio (0,05 M) y metanol en proporción $50:50 \pm 2$ % v/v, pH $3,4 \pm 0,1$, y flujo de fase móvil $0,8 \pm 0,1$ mL/min.
- El método desarrollado para la determinación del contenido de clorhidrato de ambroxol en jarabes es selectivo, preciso, robusto y lineal en el rango de concentraciones establecidas.
- El método desarrollado para la determinación del contenido de loratadina en jarabes es selectivo, preciso y lineal en el rango de concentraciones establecidas.

8. Recomendaciones

Preparar el material de referencia interno a partir de una mezcla de muestras de diferente marca comercial, bajo la misma forma farmacéutica y misma dosis de principios activos.

Realizar la evaluación de la robustez del método empleando los parámetros de idoneidad del sistema de longitud de onda de trabajo y concentración de la disolución buffer fosfato monobásico de potasio.

Referencias bibliográficas

- [1] Tait, K. (s.f). Industria farmacéutica. *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Industrias químicas. Capítulo 79*. [Enciclopedia en línea]. Consultado el 11 de mayo de 2014 en: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo3/79.pdf>
- [2] Manual de Buenas Prácticas de Manufactura para la Fabricación de Productos Farmacéuticos (BPM) de la Organización Mundial de la Salud (OMS). República Bolivariana de Venezuela. Ministerio de Salud y Desarrollo Social. Agosto 2004.
- [3] The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)
- [4] Rang, H; Dale, M. (2008). *Farmacología*. (6^{ta} edición). Barcelona: Elsevier. Pág.3, 8, 9, 11, 12, 15, 98, 366.
- [5] Carretero, M. (s.f). Collegi De Farmacéutics de la Provincia de Barcelona. [Revista en línea]. Consultado el 29 de julio de 2014 en: <http://www.farmaceuticonline.com/es/familia/548-tos>
- [6] Gorena, S; Imaña, C; Mendoza, A. (2005). Fármacos antitusivos y antihistamínicos. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*, 44 (2). Consultado el 21 de junio de 2014 en: <http://www.intramed.net/contenido.asp?contenidoID=62683>
- [7] Rua, F. (2011, Agosto). La Tos. *AFADHU Asociación de farmacéuticos adjuntos de Huelva*. [Revista en línea]. (4). Consultado el 24 de junio de 2014 en: <http://www.afadhu.com/formacion/objetos/La%20tos.%20Etiolog%EDa%20y%20Tratamiento.pdf>

- [8] Goodman, L; Gilman, A. (2012). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. (12^a edición). México: Mc Graw Hill International Editores, S.A. Pág. 919, 1057, 1815, 1816.
- [9] Beeh, K.M; Beier, J; Esperester, A; Paul, L.D. (2008). Anti-inflammatory properties of ambroxol. *European Journal of Medical Research*, 13, 557-562.
- [10] Wade, L.G. (2004). *Química orgánica*. (5^{ta} edición). Madrid: Pearson Educación, S.A
- [11] Pine, S; Hendrickson, J; y colaboradores. (1993). *Química Orgánica*. (2^{da} edición). México: Mc Graw Hill.
- [12] Alcántara, F. (2006). *Caracterización farmacocinética de las tabletas individuales de loratadina, ambroxol y de su combinación en voluntarios sanos*. [Tesis en línea]. Escuela Superior de Medicina. Sección Estudios de Posgrado e Investigación, México. D.F. Consultada el 04 de marzo de 2014 en: <http://tesis.ipn.mx/jspui/handle/123456789/782>
- [13] Tello, M; Daza, J; y Rocha, M. (1997). Validación de las metodologías analíticas para el control de calidad de tabletas de loratadina. *Revista Colombiana de Ciencias Químico farmacéuticas*. 26, 43-47.
- [14] P. R. Vademécum. (2007). *Medicamentos de uso en Venezuela*. (5^{ta} edición). Venezuela: Licitelco S.A. Pág. 65-66, 421, 557, 733.
- [15] Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. (2014). [Página web en línea]. Consultado el 15 de febrero del 2015 en: http://www.inhrr.gob.ve/nuestro_instituto.php

- [16] Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. (1998). Medicamentos usuales normas de la junta revisora de productos farmacéuticos y sistema de registro nacional de productos farmacéuticos.
- [17] The United States Pharmacopeial Convention 2012, USP apartado <1225>
- [18] Lister, A. (2005). Validation of HPLC methods in pharmaceutical analysis. Analytical Sciences, World Research & Development, Purdue Pharma. *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*.
- [19] Chavhan, M; Shirkhedkar, A; Sanjay, S. (2013). Development and validation of stability indicating RP-TLC/densitometric method for determination of loratadine in bulk and in tablets. *Arabian Journal of Chemistry. King Saud University*. [Revista en línea]. Consultada el 04 de marzo de 2014 en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.12.014>
- [20] Heinänen, M; Barbas, C. (2001). Validation of an HPLC method for the quantification of ambroxol hydrochloride and benzoic acid in a syrup as pharmaceutical form stress test for stability evaluation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 24 (6), 1005-1010.
- [21] The United States Pharmacopeial Convention 2014, USP 36. Official Monographs. Loratadine Oral Solution.
- [22] Varillas, M; Brevedan, M; Gonzalez, N; Sagardoy, M; y Pizzorno, M. (2008). Estudio comparativo de comprimidos de loratadina. *Latin American Journal of Pharmacy (formerly acta farmaceutica Bonaerense)*, 27 (4), 492-497.
- [23] Koundourellis, J; Malliou, E; Broussali, T. (2000). High performance liquid chromatographic determination of Ambroxol in the presence of different preservatives in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 23, 469-475.

- [24] Hadad, G; El-Gindy, A; Mahmoud, W. (2008). HPLC and chemometrics-assisted UV-spectroscopy methods for the simultaneous determination of Ambroxol and doxycycline in capsule. *Spectrochimica Acta part A*, 70, 655-663.
- [25] Raja, MG; Geetha, G; y colaboradores. (2012). Simultaneous and stability indicating method for determination of cetirizine hydrochloride and ambroxol hydrochloride in syrup. *International Journal Pharmaceutical Science Reserches*, 3 (8), 2658-2663
- [26] Nagappan, K; Meyyanathan, S; Rajinikanth, R; y colaboradores. (2008). A RP-HPLC Method for simultaneous estimation of Ambroxol Hydrochloride and Loratadine in pharmaceutical formulation. *Reseach Journal pharmaceutical and Technology*, 1 (4).
- [27] Quattrocchi, O; Abelaira, S; Laba, R. (1992). *Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Capítulo 10. Análisis Cuantitativo*. Buenos Aires: Artes Graficas Farro S.A.
- [28] Skoog, D; James, F; Nieman, T. (2001). *Principios de análisis instrumental*. (5^{ta} edición). Madrid: Mc Graw Hill. Capitulo 28. pág. 786-796.
- [29] Montgomery, D. (1991). *Diseño y análisis de experimentos*. México: Grupo editorial Iberoamericana, S.A de C.V. Capitulo 15. Análisis de regresión.
- [30] Rubinson, K; Rubinson, J. (2001). *Análisis Instrumental*. Madrid: Pearson Educación S.A. Capítulo 14. pág. 640, 661, 662.
- [31] Diccionario de medicina VOX. [Pagina web en línea]. Consultado el 05 de septiembre de 2014 en: <http://salud.doctissimo.es/diccionariomedico/angiotensina.html>

- [32] Enciclopedia de salud, dietética y psicología. [Pagina web en línea]. Consultado el 05 de septiembre de 2014 en: <http://www.encyclopediasalud.com/definiciones/bronquiolo>
- [33] Láñez, E. (s.f.). Curso de inmunología general: 14. Citoquinas. Departamento de Microbiología Universidad de Granada España. [Pagina web en línea]. Consultado el 05 de septiembre de 2014 en: http://www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap_14.htm
- [34] Organización mundial de la salud OMS (2014). [Pagina web en línea]. Consultado el 05 de septiembre de 2014 en: http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/es/
- [35] Manual de patología general capítulo 5: Alteraciones del crecimiento y desarrollo. Universidad católica de Chile. [Pagina web en línea]. Consultado el 05 de septiembre de 2014 en: http://escuela.med.puc.cl/publ/patologiageneral/Patol_090.html
- [36] Medlineplus Biblioteca Nacional de medicina de EEUU. [Pagina web en línea]. Consultado el 05 de septiembre de 2014 en: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/>
- [37] Representantes de la AAAeIC. Anuncian nuevas pautas para tratar la urticaria crónica. (Diciembre, 2011). [Publicación en línea]. Consultado el 05 de septiembre de 2014 en: <http://www.docsalud.com/articulo/5282/anuncian-nuevas-pautas-para-tratar-la-urticaria-cr%C3%B3nica>
- [38] Farmacopea Británica. Volumen I y II. 2012
- [39] Narendrabhai, P.G. (2011). *Stability indicating HPLC method for simultaneous estimation of ambroxol hydrochloride and loratadine in pharmaceutical formulation*. [Tesis en línea]. Bajiv Gandhi University of Health Sciences,

Karnataka, Bangalore. Consultado el 15 de marzo de 2014 en: http://14.139.15.9.4:8080/spui/bitstream/123456789/5168/1/THESIS_GAURAV.pdf

[40] Kostarnoi, A; Golubitskii, G; Basova, E; y otros. (2008). High-performance liquid chromatography in the analysis of multicomponent pharmaceutical preparations. *Journal of analytical chemistry*, 63 (6), 516-529.

[41] Miller, J; Miller, J. (2002). Estadística y quimiometría para química analítica. Cuarta edición. Madrid: Pearson Educación, S.A.

Apéndice A.

Cromatografía líquida de alta eficiencia, HPLC.

La cromatografía es un conjunto de diversos métodos físicos que permiten la separación de componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza en la fase móvil, que puede ser un gas, un líquido, o un fluido supercrítico. La fase móvil se hace pasar a través de la fase estacionaria, con la cual es inmisible, fijada en una columna. Las dos fases son elegidas de forma tal, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase estacionaria y la fase móvil, moviéndose junto con el flujo de la fase móvil los componentes débilmente unidos a la fase estacionaria y lentamente aquellos retenidos fuertemente por la fase estacionaria. Esta diferencia de movilidad trae consigo que los componentes de la muestra se separen en bandas que pueden ser analizadas cualitativa y/o cuantitativamente. ^[28]

El análisis cualitativo se basa en la medida de los parámetros cromatográficos como tiempos de retención y volúmenes de retención, mientras que el análisis cuantitativo se basa en la medida de las alturas o áreas de pico cromatográfico que se relacionan con la concentración.

La cromatografía líquida de alta eficiencia es la técnica analítica más ampliamente utilizada, y constituye la base de diversos métodos para la separación de los componentes de mezclas complejas, debido a su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles y termolábiles, y su gran aplicabilidad a sustancias de interés industrial.

En la figura N° 37 se muestra un esquema de los componentes fundamentales de un cromatógrafo de líquidos de alta eficacia, siendo los más generales:

- Recipientes para la fase móvil y sistema para tratamiento de los disolventes.
- Sistemas de bombeo (bombas).
- Sistemas de inyección de muestra.
- Columnas para cromatografía de líquidos; columna analíticas, termostatzadas y precolumnas.
- Detectores; Ultravioleta-Visible, Infrarrojo, Índice de refracción, Fluorescencia, Espectrometría de masas, entre otros.
- Registrador de la señal.

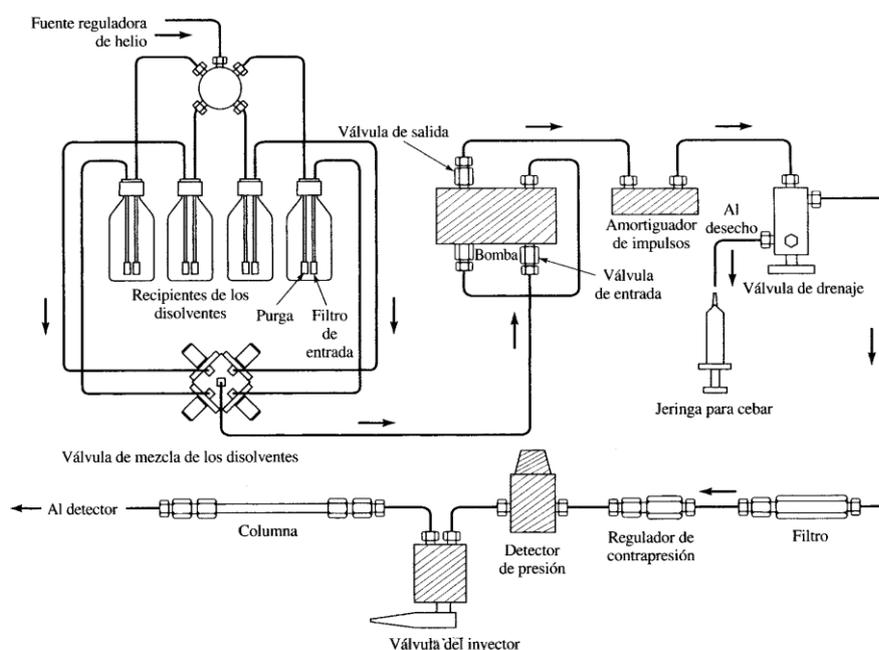


Figura N° 37. Esquema de un equipo de cromatografía líquida, HPLC. [28]

Los sistemas de bombeo ideales para los equipos de cromatografía líquida, deben soportar altas presiones (6000 PSI) con un flujo libre de pulsaciones, y con alta reproducibilidad de caudal en un intervalo entre 0,1 a 10 mL/min. Los sistemas de inyección de muestras disponibles en el mercado son de dos tipos: manuales o automáticos, siendo éstos el factor limitante en la precisión de las medidas en la cromatografía de líquidos, por la reproducibilidad con la que puede ser introducida la muestra a la columna. [28]

Los diferentes detectores de HPLC se pueden agrupar en dos propiedades; los que miden una propiedad de la disolución, como los detectores de índice de refracción, o los que se basan en la medida de una propiedad del soluto como los detectores de absorbancia (UV-Visible) y los detectores de fluorescencia.

Los detectores espectrofotométricos de ultravioleta y visible son específicos para compuestos que absorben luz, poseen una buena sensibilidad y rango lineal, siendo este último del orden de 10^4 con un límite de detección aproximado del 10^{-11} g. Se caracterizan por no ser destructivos y pueden emplearse con gradientes de solventes que no presenten absorción en la longitud de onda de trabajo; permiten cambiar el volumen de su celda, generalmente con volúmenes en un rango de 1 a 12 μ L. Son detectores muy pocos sensibles a los cambios de caudal y de temperatura, y operan en el rango 190 a 350 nm, en algunos equipos se puede extender a la zona del visible del espectro (350 a 700 nm). La concentración del analito en la muestra se determina por aplicación de la ley de Beer. Existen dos tipos de detectores ultravioleta, los de longitud de onda fija y los de longitud de onda variable, siendo uno de los detectores más comercializado del mercado el detector de arreglo de diodos en serie u ordenamiento de fotodiodos. ^[27, 28]

En los detectores de arreglo de diodos en serie, la detección debe realizarse empleando un sistema óptico en el cual una celda se ilumina con luz blanca, no monocromada, y la luz emergente de la celda llega a la red de difracción y allí es dispersada hacia el elemento fotosensible, fotodiodos. De esta forma se consigue medir no solo la luz transmitida a una longitud de onda sino todo el espectro de absorción del eluido en tiempo real. Para el caso de columnas capilares, la detección debe realizarse pasando la luz a través de un capilar, ya que una celda puede causar una disminución de eficiencia debido a la mezcla de los volúmenes adyacentes. ^[28,30] En las figuras 38 y 39 se presentan dos diagramas con la configuración característica de los componentes de los detectores de absorción UV-visible.

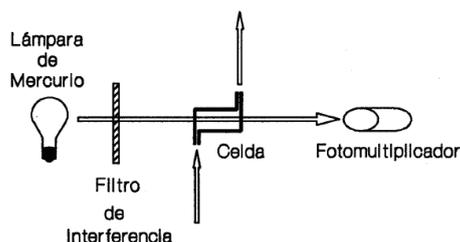


Figura N° 38. Esquema de un detector de onda variable o espectrofotómetro empleado en cromatografía líquida, HPLC. ^[27]

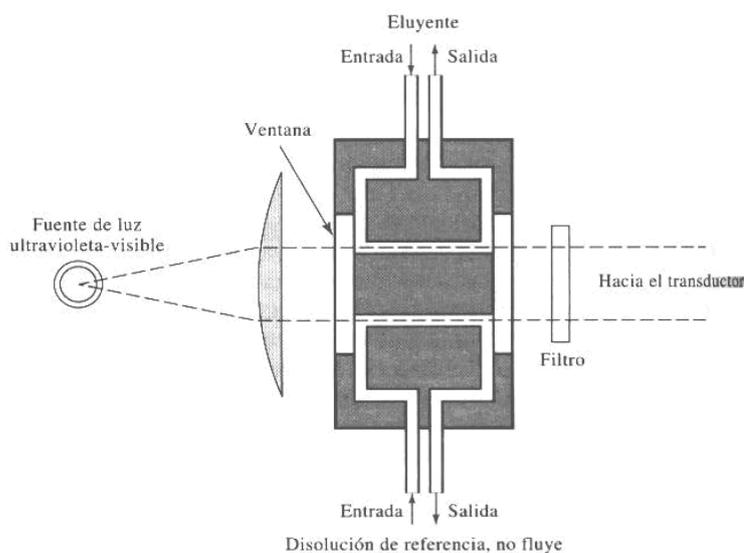


Figura N° 39. Diagrama del camino de la luz y camino del líquido para una celda de cromatografía líquida de doble haz para columnas de relleno. Detector de absorción UV-visible empleado en cromatografía líquida, HPLC. ^[30]

La luz desde la fuente de la izquierda pasa a través de una ventana y de dos tubos rellenos de líquidos. Uno de los tubos contiene una muestra estática de la fase móvil para evitar pérdidas. El efluente de la columna pasa hacia el otro tubo. La diferencia de luz absorbida entre los dos tubos se amplifica y se registra dando lugar al cromatograma. La longitud de onda de la luz se selecciona por el filtro. El volumen de la celda a través del que pasa la luz generalmente está en el intervalo 10-20 μL . ^[30]

En cromatografía podemos diferenciar cuatro tipos básicos de cromatografía líquida, cromatografía de reparto, de absorción o líquido-sólido, iónica y de exclusión por tamaño o en geles.

La cromatografía de reparto se divide en cromatografía líquido-líquido y cromatografía de fase unida químicamente a la superficie del soporte, siendo esta última más ampliamente usada. Los rellenos de la columna en la cromatografía de fase unida químicamente se clasifican en: fase normal, el recubrimiento enlazado a la fase estacionaria presenta grupos funcionales polares, y en fase inversa el recubrimiento enlazado presenta carácter no polar.

La fase móvil en cromatografía líquida en fase inversa (RP-HPLC) en general, esta constituida por un solvente polar, mezcla de agua y un modificador orgánico, a los que es posible agregar aditivos, sales o buffers. En este tipo de cromatografía a mayor proporción de modificador orgánico corresponde menor retención (menor k) y a mayor proporción de agua, mayor retención (mayor k), en la separación en fase inversa los disolventes poco polares son eluyentes más poderosos. ^[27]

Entre las ventajas que presenta RP-HPLC se encuentran: la fase móvil predominante es agua, los modificadores orgánicos predominantes metanol, acetonitrilo, requiere poco tiempo para el equilibrio del sistema luego de un cambio de fase móvil, entre otros. ^[27]

Este tipo de cromatografía se utilizan fundamentalmente dos tipos de fases estacionarias, estando formada la más comúnmente usada por grupos no polares unidos a la sílice, siendo los más utilizados los tipo alquílicos $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_8\text{H}_{17}$, y $-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$, de ellas la cadena de 18 carbonos, grupo octadecilo, es la más comúnmente empleada, conocida como C_{18} . En RPLC cuanto más larga sea la cadena carbonada mayor fuerza de interacción con los solutos afines a fases orgánicas. Sin embargo, las columnas de cadena más corta producen picos más simétricos que las de cadena larga, probablemente porque los silanoles libres, más accesibles, interaccionan con los solventes polares de la fase móvil, permitiendo la solvatación de la fase estacionaria y con ello, se alcanza más rápido el equilibrio. ^[27, 30]

Apéndice B. Factores cromatográficos.

Tabla 1. Patrón 100 % clorhidrato de ambroxol.

Número de inyección	Tiempo de retención (min)	Área	Factor de retención	Factor de asimetría
1	3,80	11251147	1,29	1,33
2	3,79	11360560	1,28	1,33
3	3,84	11294451	1,31	1,32
4	3,82	11091607	1,30	1,34
5	3,82	11106579	1,30	1,34
6	3,81	11065748	1,30	1,33
7	3,80	11200196	1,29	1,33
8	3,77	11230762	1,27	1,33
9	3,82	11092439	1,30	1,33
10	3,78	11085194	1,28	1,33
11	3,77	11211158	1,27	1,32
12	3,79	11381651	1,28	1,33
13	3,82	11164601	1,30	1,33
14	3,82	11087025	1,30	1,33
15	3,78	11048604	1,28	1,33
16	3,80	11153983	1,29	1,34
17	3,83	11125205	1,31	1,33
18	3,77	11193166	1,27	1,33
19	3,79	11325478	1,28	1,32
20	3,79	10956878	1,28	1,32
Promedio	3,80	11171322	1,29	1,33
Desviación estándar	0,02	111858	0,01	0,01
% RSD	0,56	1,00	0,99	0,45

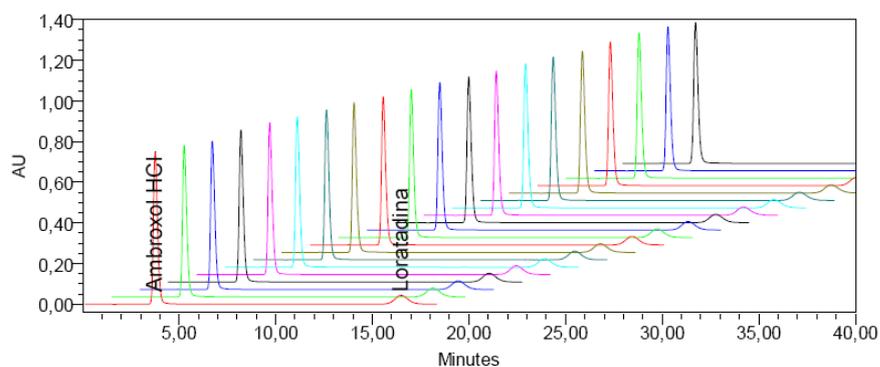
Tabla 2. Patrón 100 %. Loratadina

Número de inyección	Tiempo de retención (min)	Área	K	Factor de asimetría
1	16,60	2112919	9,00	1,12
2	16,68	2083171	9,05	1,13
3	16,54	2065419	8,96	1,13
4	16,69	2116474	9,05	1,14
5	16,52	2067246	8,95	1,14
6	16,67	2070976	9,04	1,13
7	16,57	2071933	8,98	1,12
8	16,60	2065984	9,00	1,11
9	16,64	2072263	9,02	1,09
10	16,51	2058138	8,95	1,09
11	16,68	2082676	9,05	1,09
12	16,51	2053919	8,95	1,09
13	16,66	2078008	9,04	1,08
14	16,57	2117656	8,98	1,08
15	16,58	2117197	8,99	1,09
16	16,64	2079261	9,02	1,08
17	16,50	2080637	8,94	1,08
18	16,67	2064400	9,04	1,09
19	16,64	2073454	9,02	1,13
20	16,49	2039350	8,93	1,09
Promedio	16,60	2078554	9,00	1,11
Desviación estándar	0,07	21850	0,04	0,02
% RSD	0,41	1,05	0,46	2,02

Apéndice C. Reproducibilidad instrumental.

Estándar 100 % (0,6 mg/mL Ambroxol HCl - 0,1 mg/mL Loratadina)					
Clorhidrato de Ambroxol			Loratadina		
Inyección	Tiempo de retención (min)	Área cromatográfica	Inyección	Tiempo de retención (min)	Área cromatográfica
1	3,80	11251147	1	16,60	2112919
2	3,79	11360560	2	16,68	2083171
3	3,84	11294451	3	16,54	2065419
4	3,82	11091607	4	16,69	2116474
5	3,82	11106579	5	16,52	2067246
6	3,81	11065748	6	16,67	2070976
7	3,80	11200196	7	16,57	2071933
8	3,77	11230762	8	16,60	2065984
9	3,82	11092439	9	16,64	2072263
10	3,78	11085194	10	16,51	2058138
11	3,77	11211158	11	16,68	2082676
12	3,79	11381651	12	16,51	2053919
13	3,82	11164601	13	16,66	2078008
14	3,82	11087025	14	16,57	2117656
15	3,78	11048604	15	16,58	2117197
16	3,80	11153983	16	16,64	2079261
17	3,83	11125205	17	16,50	2080637
18	3,77	11193166	18	16,67	2064400
19	3,79	11325478	19	16,64	2073454
20	3,79	10956878	20	16,49	2039350
Promedio	3,80	11171322	Promedio	16,60	2078554
Desviación estándar	0,02	111858	Desviación estándar	0,07	21850
C.V	0,56	1,00	C.V	0,41	1,05

Cromatograma solución estándar 100 %.



Apéndice D. Linealidad.

Prueba de falta de ajuste. Permite validar si el grado del modelo es correcto.

Hipótesis:

H₀: el modelo de la regresión lineal simple es correcto.

H₁: el modelo de regresión lineal simple no es correcto.

La hipótesis nula se rechaza si $F_o > F_{\alpha, m-2, n-m}$.

Donde: $F_o = \frac{SS_{LOF}/(m-2)}{SS_{PE}/(n-m)}$ (ec. 1)

Para n igual al número total de la regresión y m al número total de replicas.

La suma de cuadrado de la regresión (SS_R) y del residuo (SS_E) pueden ser determinadas a partir de las siguientes ecuaciones:

$$SS_E = SS_{PE} + SS_{LOF} \text{ (ec. 2)}, \quad SS_E = S_{yy} - SS_R \text{ (ec. 2)}, \quad SS_R = \hat{\beta}_1 S_{xy}, \quad \hat{\beta}_1 = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} \text{ (ec. 4)}$$

Donde $\hat{\beta}_1$ representa la estimación de mínimos cuadrados de la pendiente.

La ecuación 1, establece que la fuente de variación de residuo (SS_E) está compuesta por el error puro y la falta de ajuste del modelo de regresión, correspondiendo a:

SS_{PE} , suma de cuadrados del error puro del modelo de regresión.

SS_{LOF} , suma de cuadrados de la falta de ajuste del modelo de regresión.

Las ecuaciones presentadas a continuación derivan de las ecuaciones 2, 3 y 4.

$$SS_R = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} \cdot S_{xy} \text{ (ec. 5)} \quad SS_E = S_{yy} - \frac{S_{xy} \cdot S_{xy}}{S_{xx}} \text{ (ec. 6)} \quad SS_{LOF} = SS_E - SS_{PE} \text{ (ec. 7)}$$

$$SS_{LOF} = \left(S_{yy} - \frac{S_{xy}^2}{S_{xx}} \right) - \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{ni} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 \text{ (ec. 8)}$$

Al sustituir la ecuación 7 en la primera ecuación se obtiene la ecuación 9. El valor de F_0 es determinado al sustituir los valores concernientes a las ecuaciones 6 y 8 en la ecuación de F_0 .

$$F_0 = \frac{(SS_E - SS_{PE})/(m - 2)}{(SS_{PE})/(n - m)} \quad (\text{ec. 9})$$

Las desviaciones estándares de la regresión, del conjunto de datos de x, y del conjunto de datos correspondientes a y, son presentadas a continuación.

$$S_{xy} = \sum_{i=1}^n y_i x_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n}, \quad S_{xx} = \sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n}, \quad S_{yy} = \sum_{i=1}^n y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n}$$

La prueba de falta de ajuste fue empleada en la evaluación de la linealidad de las curvas de calibración, prueba estadística a partir de la cual fue posible establecer que el modelo de regresión lineal simple empleado es el correcto. A continuación se presentan un ejemplo del conjunto de datos generados en el estudio estadístico, prueba de falta de ajuste realizada para las curvas de calibración en la evaluación de la linealidad.

Tabla A. Análisis de varianza. Linealidad día 1. Clorhidrato de ambroxol.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	F_0
Regresión	9767710852	1	113713
Residuo	3,2660E+14	16	
Falta de ajuste	3,2659E+14	6	
Error puro	7,1802E+09	10	
Total	3,2661E+14	27	

Tabla B. Análisis de varianza. Linealidad día 1. Loratadina.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	F _o
Regresión	14653907317	1	59118
Residuo	1,1166E+13	16	
Falta de ajuste	1,1166E+13	6	
Error puro	472168796	10	
Total	2,23466E+13	27	

Función de respuesta lineal. Hipótesis estadística.

Hipótesis formulada:

1. Establecer la significancia de a' y b' en comparación con ciertos valores a_0 y b_0 .

Donde: a corresponde a la pendiente de la regresión y b a la ordenada en el origen.

La significancia de la estimación de valores de a' y b' en comparación con valores de a_0 y b_0 , pueden ser establecidos por medio de las variables estadísticas presentadas en las ecuaciones 1 y 2. La hipótesis de diferencia significativa se rechaza si:

$$\frac{(a' - a_0)}{s'_a} \geq \left| t_{\frac{\alpha}{2}, n-2} \right|$$

$$\frac{(b' - b_0)}{s'_b} \geq \left| t_{\frac{\alpha}{2}, n-2} \right|$$

Tabla 1. Hipótesis estadística, función de la respuesta lineal. Clorhidrato de ambroxol.

	Linealidad			$(a' - a_0) / s_{a'}$ ($t_{14} = 2,14, 95\%, p=0,05$)			$(b' - b_0) / s_{b'}$ ($t_{14} = 2,14, 95\%, p=0,05$)		
	Día 1	Día 2	Día 3		a' / a_0	a_0 / a'		b' / b_0	b_0 / b'
Ecuación de la regresión	$y = 18809943x - 52594$	$y = 19075206x - 57255$	$y = 18589219x - 22499$	Día 1 / Día 2	5,63	5,42	Día 1 / Día 2	0,05	0,05
Desviación estándar de la pendiente (S_b)	98832	85198	130331	Día 1 / Día 3	4,69	2,99	Día 1 / Día 3	0,30	0,23
Desviación estándar de la ordenada en el origen (S_a)	47086	48938	73773	Día 2 / Día 3	9,93	6,59	Día 2 / Día 3	0,41	0,27

Tabla 2. Hipótesis estadística, función de la respuesta lineal. Loratadina.

	Linealidad			$(a' - a_0) / s_{a'}$ ($t_{14} = 2,14, 95\%, p=0,05$)			$(b' - b_0) / s_{b'}$ ($t_{14} = 2,14, 95\%, p=0,05$)		
	Día 1	Día 2	Día 3		a' / a_0	a_0 / a'		b' / b_0	b_0 / b'
Ecuación de la regresión	$y = 19856273x - 22423$	$y = 20414904x - 39241$	$y = 19900582x - 3467$	Día 1 / Día 2	55,26	44,63	Día 1 / Día 2	0,14	0,14
Desviación estándar de la pendiente (S_b)	121053	123558	147720	Día 1 / Día 3	4,38	3,01	Día 1 / Día 3	0,16	0,13
Desviación estándar de la ordenada en el origen (S_a)	10109	12517	14697	Día 2 / Día 3	41,09	34,99	Día 2 / Día 3	0,29	0,24

Tabla 3. Comparación de desviaciones estándar. Estadístico de Fisher, estudio de contraste F. Clorhidrato de ambroxol.

	Linealidad			Prueba de contraste F ($v_1= 15, v_2= 14, 95\%, p=0,05$)		
	Día 1	Día 2	Día 3	(S Día 2/ S Día 3)	(S Día 4/ S Día 2)	(S Día 4/ S Día 3)
Ecuación de la regresión	$y = 18809943x - 52594$	$y = 19075206x - 57255$	$y = 18589219x - 22499$			
Desviación estándar de la regresión ($S_{y/x}$)	94938	89192	134470	1,1330	2,0062	2,2730
Desviación estándar de la pendiente (S_b)	98832	85198	130331	1,3457	1,7390	2,3401
Desviación estándar de la ordenada en el origen (S_a)	47086	48938	73773	1,0802	2,4547	2,2725

Tabla 4. Comparación de desviaciones estándar. Estadístico de Fisher, estudio de contraste F. Loratadina

	Linealidad			Prueba de contraste F ($v_1= 15, v_2= 14, 95\%, p=0,05$)		
	Día 1	Día 2	Día 3	(S Día 2/ S Día 3)	(S Día 4/ S Día 2)	(S Día 4/ S Día 3)
Ecuación de la regresión	$y = 19856273x - 22423$	$y = 20414904 x - 39241$	$y = 19900582 x - 3467$			
Desviación estándar de la regresión ($S_{y/x}$)	20380	22817	26786	1,2535	1,7275	1,3782
Desviación estándar de la pendiente (S_b)	121053	123558	147720	1,0418	1,4891	1,4293
Desviación estándar de la ordenada en el origen (S_a)	10109	12517	14697	1,5329	2,1134	1,3787

Apéndice E. Precisión.

Tabla 1. Precisión del método. Clorhidrato de ambroxol.

Muestra	Masa (± 0,0001 g)	Tiempo de retención (min) (s= 0,02)	Área (s=111858)	Concentración mg/mL	Concentración mg/ 5 mL	Promedio mg/ 5 mL	Porcentaje de lo declarado
1	5,5948	4,300	11058672	6,0336	30,1682	30,2868	100,9559
1	5,5948	4,304	11145939	6,0811	30,4054		
2	5,5748	4,306	11013443	6,0306	30,1531	30,1650	100,5501
2	5,5748	4,310	11022207	6,0354	30,1770		
3	5,5840	4,311	10809041	5,9094	29,5468	29,5803	98,6011
3	5,5840	4,317	10833662	5,9228	29,6139		
4	5,5754	4,317	11082047	6,0674	30,3369	30,2681	100,8937
4	5,5754	4,321	11031581	6,0399	30,1993		
5	5,5794	4,321	10824590	5,9227	29,6135	29,7430	99,1433
5	5,5794	4,328	10919587	5,9745	29,8724		
6	5,5876	4,331	11058978	6,0416	30,2079	30,1585	100,5282
6	5,5876	4,332	11022637	6,0218	30,1090		
Promedio		4,317	10985199	6,0067	30,0336	30,0	100,1
Desviación estándar (s)		0,01	111140	0,0592	0,2958	0,3	0,9
Coeficiente de variación		0,25	1,01	0,9848	0,9848	0,99	0,99

Tabla 2. Precisión del método. Loratadina.

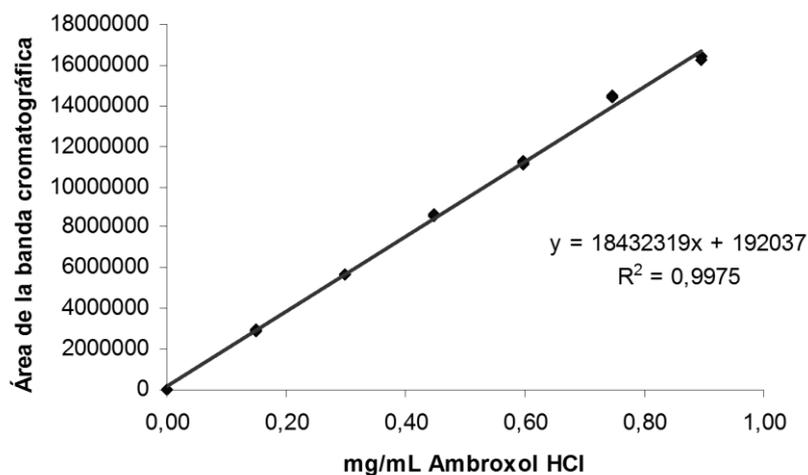
Muestra	Masa (± 0,0001 g)	Tiempo de retención (min) (s= 0,07)	Área (s=21850)	Concentración mg/mL	Concentración mg/ 5 mL	Promedio mg/ 5 mL	Porcentaje de lo declarado
1	5,5948	18,701	1883407	1,05	5,23	5,25	104,98
1	5,5948	18,711	1895400	1,05	5,27		
2	5,5748	18,715	1871608	1,04	5,22	5,22	104,43
2	5,5748	18,724	1873367	1,04	5,22		
3	5,5840	18,728	1832912	1,02	5,11	5,12	102,30
3	5,5840	18,740	1840325	1,03	5,13		
4	5,5754	18,746	1882663	1,05	5,25	5,25	104,93
4	5,5754	18,756	1881266	1,05	5,24		
5	5,5794	18,763	1849137	1,03	5,15	5,17	103,44
5	5,5794	18,773	1862872	1,04	5,19		
6	5,5876	18,783	1881669	1,05	5,23	5,23	104,53
6	5,5876	18,790	1875956	1,04	5,22		
Promedio		18,74	1869215	1,04	5,21	5,21	104,10
Desviación estándar (s)		0,03	19147	0,01	0,05	0,05	1,04
Coeficiente de variación		0,16	1,02	0,98	0,98	1,00	1,00

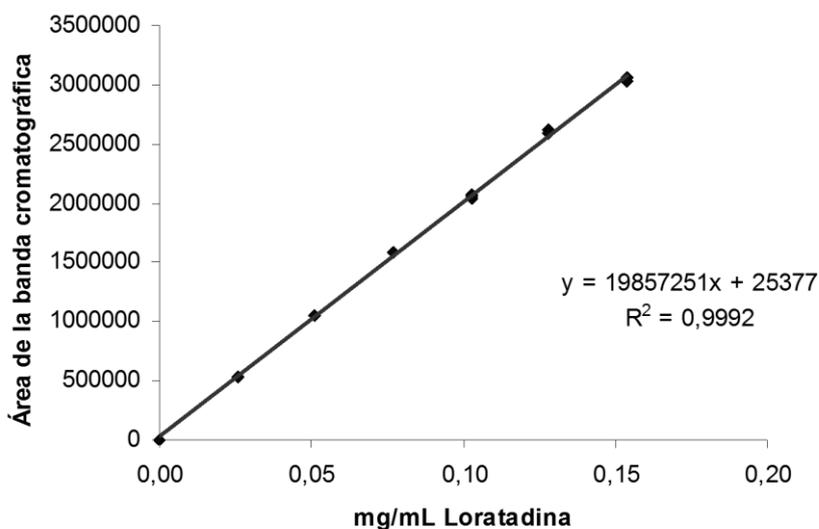
Precisión intermedia.

Tabla 3. Precisión intermedia. Analista 1.

Clorhidrato de ambroxol			Loratadina		
Nivel de concentración (%)	Concentración (mg/mL)	Área (s=111858)	Nivel de concentración (%)	Concentración (mg/mL)	Área (s=21850)
0	0,0000	0	0	0,0000	0
25	0,1495	2931565	25	0,0257	532760
25	0,1495	2904659	25	0,0257	528268
50	0,2990	5678346	50	0,0513	1043821
50	0,2990	5712798	50	0,0513	1045541
75	0,4484	8593132	75	0,0770	1579819
75	0,4484	8674879	75	0,0770	1589721
100	0,5979	11285131	100	0,1027	2079125
100	0,5979	11126125	100	0,1027	2049720
100	0,5979	11169878	100	0,1027	2057763
100	0,5979	11091077	100	0,1027	2048113
100	0,5979	11140280	100	0,1027	2059810
125	0,7474	14505949	125	0,1283	2626266
125	0,7474	14380909	125	0,1283	2594682
150	0,8969	16406931	150	0,1540	3061334
150	0,8969	16254767	150	0,1540	3033420
Pendiente		18432319	Pendiente		19857251
Punto de corte		192037	Punto de corte		25377
Coeficiente de determinación (R ²)		0,9975	Coeficiente de determinación (R ²)		0,9992

Grafica 1. Precisión intermedia. Clorhidrato de ambroxol. Analista 1.



Grafica 2. Precisión intermedia. Loratadina. Analista 1.**Tabla 4.** Precisión intermedia. Analista 2.

Clorhidrato de ambroxol			Loratadina		
Nivel de concentración (%)	Concentración (mg/mL)	Área (s=111858)	Nivel de concentración (%)	Concentración (mg/mL)	Área (s=21850)
0	0,0000	0	0	0,0000	0
25	0,1492	2847104	25	0,0256	504016
25	0,1492	2838509	25	0,0256	500131
50	0,2984	5692665	50	0,0512	1037363
50	0,2984	5684246	50	0,0512	1035072
75	0,4476	8426853	75	0,0768	1525572
75	0,4476	8510875	75	0,0768	1527029
100	0,5968	11032422	100	0,1025	2006939
100	0,5968	11267273	100	0,1025	2041472
100	0,5968	11289357	100	0,1025	2032469
100	0,5968	11328081	100	0,1025	2059283
100	0,5968	11249405	100	0,1025	2020335
125	0,7460	14260945	125	0,1281	2598126
125	0,7460	14183587	125	0,1281	2585308
150	0,8953	17466652	150	0,1537	3174255
150	0,8953	17472637	150	0,1537	3221958
Pendiente		19304933	Pendiente		20582525
Punto de corte		-124327	Punto de corte		-37655
Coeficiente de determinación (R^2)		0,9989	Coeficiente de determinación (R^2)		0,9982

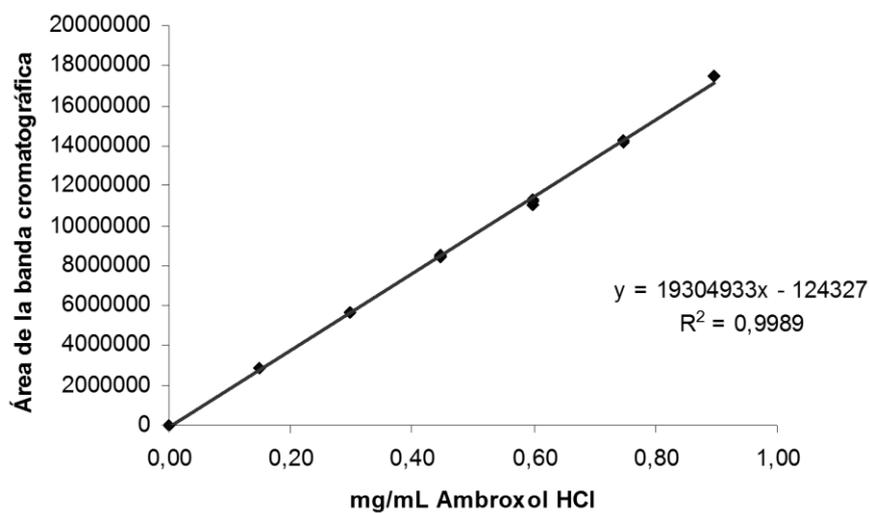
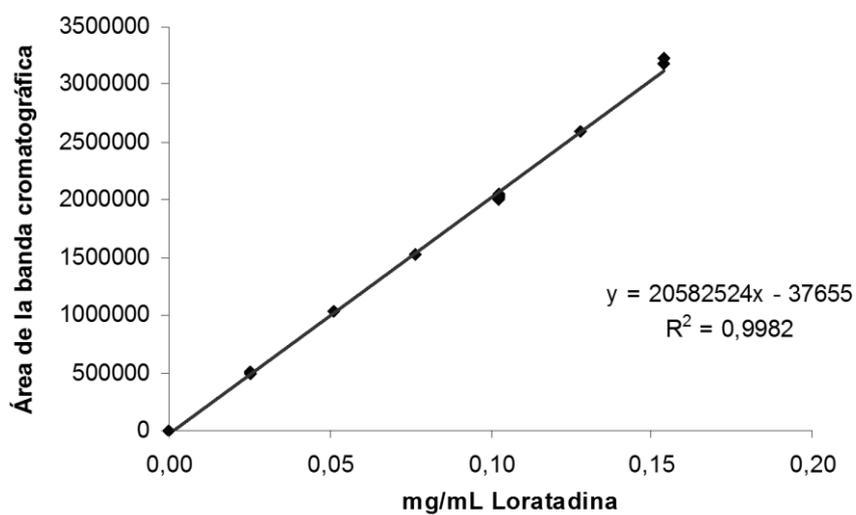
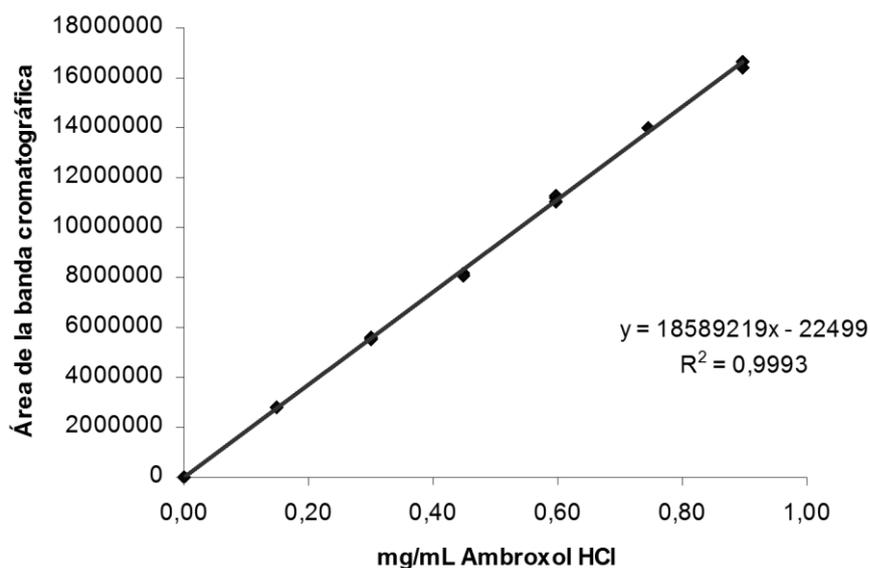
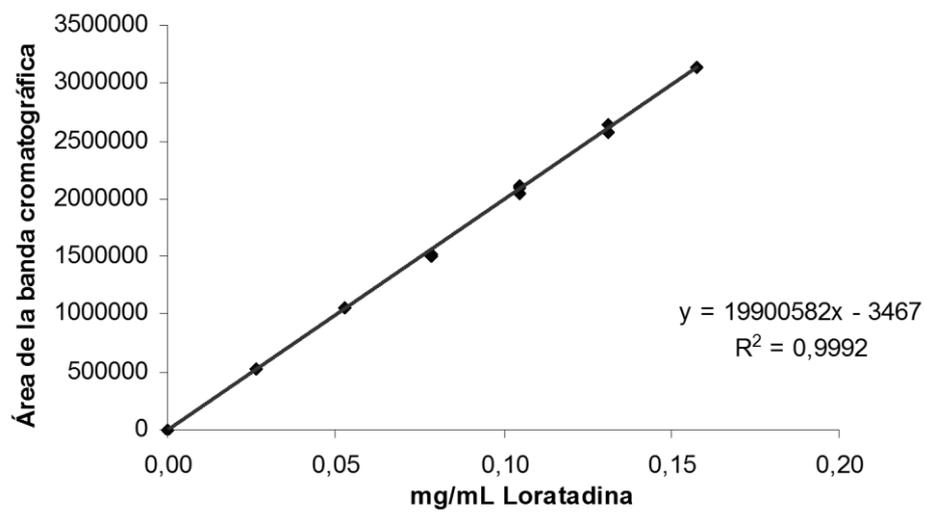
Grafica 3. Precisión intermedia. Clorhidrato de ambroxol. Analista 2.**Grafica 4.** Precisión intermedia. Loratadina. Analista 2.

Tabla 5. Precisión intermedia. Analista 3.

Clorhidrato de ambroxol			Loratadina		
Nivel de concentración (%)	Concentración (mg/mL)	Área (s=111858)	Nivel de concentración (%)	Concentración (mg/mL)	Área (s=21850)
0	0,0000	0	0	0,0000	0
25	0,1493	2779449	25	0,0262	524420
25	0,1493	2777034	25	0,0262	521955
50	0,2986	5589124	50	0,0525	1057485
50	0,2986	5506747	50	0,0525	1061058
75	0,4478	8153721	75	0,0787	1526042
75	0,4478	8056204	75	0,0787	1504012
100	0,5971	11175493	100	0,1050	2105519
100	0,5971	11288932	100	0,1050	2108633
100	0,5971	11013705	100	0,1050	2099161
100	0,5971	11011436	100	0,1050	2051026
100	0,5971	11045394	100	0,1050	2098977
125	0,7464	14011029	125	0,1312	2577333
125	0,7464	14029436	125	0,1312	2641108
150	0,896	16640759	150	0,1574	3133828
150	0,896	16422257	150	0,1574	3133096
Pendiente		18589219	Pendiente		19900582
Punto de corte		-22499	Punto de corte		-3467
Coeficiente de determinación (R ²)		0,9993	Coeficiente de determinación (R ²)		0,9992

Grafica 5. Precisión intermedia. Clorhidrato de ambroxol. Analista 3.

Grafica 6. Precisión intermedia. Loratadina. Analista 3.

Apéndice F. Exactitud.

Tabla 1. Contenido de clorhidrato de ambroxol presente en las muestras sin enriquecimiento (S/E).

Nivel de enriquecimiento (%)	Masa de jarabe S/E ($\pm 0,00001$ g)	Área señal promedio S/E (s=111858)	Contenido de ambroxol HCl (mg/mL)
80	2,85691	5566450	4,9190
	2,81090	5469548	4,9099
	2,85781	5625684	4,9713
100	2,87139	5588082	4,9137
	2,81448	5590216	5,0151
	2,85433	5598652	4,9527
130	2,81263	5727505	5,1452
	2,88383	6027612	5,2885
	2,83746	5536586	4,9253
Contenido promedio ambroxol HCl mg/mL			5,00
Desviación estándar (s)			0,13

Tabla 2. Determinación del porcentaje de recuperación en las muestras enriquecidas. Clorhidrato de ambroxol.

Nivel (%)	Masa ($\pm 0,00001$ g)	Contenido de ambroxol HCl S/E (mg)	Área (s=111858)	Contenido de ambroxol HCl (mg)	Recuperación (%)	Rp (%)	Nivel de concentración estimada (%)
80	2,88180	14,4220	9215338	23,5331	101,81	98,95	79,16
	2,82189	14,1222	8977795	22,9160	98,27		
	2,82467	14,1361	8931363	22,7953	96,76		
100	2,89699	14,4980	11513045	29,5027	100,60	100,36	100,36
	2,82330	14,1293	11518137	29,5160	103,16		
	2,82983	14,1619	11195754	28,6784	97,33		
130	2,87667	14,3964	14871424	38,2280	99,87	99,38	129,19
	2,87463	14,3861	14738975	37,8839	98,47		
	2,87006	14,3633	14853058	38,1803	99,80		

Tabla 3. Contenido de loratadina presente en las muestras sin enriquecimiento.

Nivel de enriquecimiento (%)	Masa de jarabe S/E ($\pm 0,00001$ g)	Área señal promedio S/E (s=21850)	Contenido de loratadina (mg/mL)
80	2,85691	930962	0,8126
	2,81090	907979	0,8059
	2,85781	947859	0,8268
100	2,87139	961169	0,8343
	2,81448	955936	0,8466
	2,85433	950452	0,8301
130	2,81263	989995	0,8768
	2,88383	1030149	0,8892
	2,83746	958625	0,8421
Contenido promedio de loratadina mg/mL			0,84
Desviación estándar (s)			0,03

Tabla 4. Determinación del porcentaje de recuperación en las muestras enriquecidas. Loratadina.

Nivel (%)	Masa ($\pm 0,00001$ g)	Contenido de loratadina S/E (mg)	Área (s=21850)	Contenido de Loratadina (mg)	Recuperación (%)	Rp (%)	Nivel de concentración estimada (%)
80	2,88180	2,4221	1594530	3,9452	101,22	99,61	79,69
	2,82189	2,3718	1555871	3,8506	98,28		
	2,82467	2,3741	1563250	3,8686	99,33		
100	2,89699	2,4349	2011746	4,9660	100,93	100,71	100,71
	2,82330	2,3729	2010073	4,9619	103,24		
	2,82983	2,3784	1958383	4,8354	97,98		
130	2,87667	2,4178	2606283	6,4206	99,76	99,24	129,02
	2,87463	2,4161	2581231	6,3593	98,28		
	2,87006	2,4122	2602897	6,4123	99,69		

Apéndice G. Robustez.

Tabla 1. Evaluación de la robustez del método. Clorhidrato de ambroxol.

Experimento	Áreas de pico cromatográfico					Concentración mg/mL	Porcentaje de lo declarado (%)
	Replica			Promedio	% RSD		
	1	2	3				
1	12681291	12603307	12529356	12604651	0,60	29,81	99,35
2	12258101	12692671	12753762	12568178	2,15	29,28	97,59
3	12471657	12335518	12476203	12427793	0,64	30,41	101,37
4	11740005	11684885	11743808	11722899	0,28	27,97	93,24
5	9705268	9760512	9748991	9738257	0,30	29,74	99,14
6	10001003	10027118	10108273	10045465	0,56	30,28	100,94
7	9802770	9741694	9776856	9773773	0,31	29,87	99,58
8	9792091	9871812	9815612	9826505	0,42	29,84	99,45
Masa de la muestra (g)		5,64056		Promedio		29,7	99,83
Densidad (g/mL)		1,1588		Desviación estándar		0,8	2,54
Volumen de dilución		50 mL		% RSD		3	3
				S*√2			3,6
Diferencia de respuestas por parámetro							
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
Valor	1,8897	-0,3205	1,1081	0,8434	-2,0765	2,0560	-2,8937

Tabla 2. Evaluación de la robustez del método. Loratadina.

Experimento	Áreas de pico cromatográfico						Concentración mg/mL	Porcentaje de lo declarado (%)
	Replica				Promedio	% RSD		
	1	2	3	4				
1	1992666	1991962	1986990	2126790	1990539	0,16	4,92	98,50
2	2106714	2202322	2144126		2151054	2,24	4,74	94,75
3	2181445	2150586	2149410		2152058	1,04	4,97	99,40
4	1852971	1855778	1859803		1856184	0,19	4,84	96,83
5	1672885	1685881	1684862		1681209	0,43	4,87	97,35
6	1686273	1707349	1669476		1687699	1,12	4,89	97,82
7	1570990	1540274	1554187		1555150	0,99	4,83	96,69
8	1626057	1640145	1610018		1625407	0,93	4,93	98,55
					Promedio		4,87	97,48
Masa de la muestra (g)		5,64056			Desviación estándar		0,07	1,44
Densidad (g/mL)		1,1588			%RSD		1,48	1,48
Volumen de dilución		50 mL			S*√2			2,04
Diferencia de respuestas por parámetro								
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC	
Valor	0,2320	0,7295	0,0528	-0,7649	0,6415	0,9950	-2,1655	

Apéndice H. Análisis de medicamentos de diferentes marcas comerciales.

Tabla 1. Medicamento A.

		Clorhidrato de ambroxol				Loratadina			
Replica	Masa (g)	Tiempo de retención (min) (s= 0,02)	Área (s=111858)	Concentración (mg/ 5mL)	Promedio (mg/ 5mL)	Tiempo de retención (min) (s= 0,07)	Área (s=21850)	Concentración (mg/ 5mL)	Promedio (mg/ 5mL)
1	5,64777	3,86	10817695	30,48	30,86	16,70	1863508	4,96	5,02
	5,64777	3,88	11092523	31,25		16,85	1913780	5,09	
2	5,64535	3,91	10972994	30,93	30,70	16,85	1864844	4,97	4,96
	5,64535	3,86	10810076	30,47		16,70	1863079	4,96	
3	5,67143	3,89	10896621	30,57	30,83	16,86	1872772	4,96	4,96
	5,67143	3,91	11085459	31,10		16,84	1873215	4,96	
Promedio					30,80				
Desviación estándar				Sm = 0,4	0,09	Sm= 0,1			0,04
Coeficiente de variación				1,1	0,28	1,9			0,71

Tabla 2. Medicamento B.

		Clorhidrato de ambroxol				Loratadina			
Replica	Masa (g)	Tiempo de retención (min) (s= 0,02)	Área (s=111858)	Concentración (mg/ 5mL)	Promedio (mg/ 5mL)	Tiempo de retención (min) (s= 0,07)	Área (s=21850)	Concentración (mg/ 5mL)	Promedio (mg/ 5mL)
1	5,86274	3,86	8683347	23,63	23,90	16,68	1893152	4,85	4,91
	5,86274	3,88	8884386	24,17		16,82	1940141	4,97	
2	5,84695	3,88	8989029	24,52	24,13	16,67	1931574	4,96	4,94
	5,84695	3,80	8699890	23,74		16,58	1911696	4,91	
3	5,83709	3,83	8939721	24,43	24,29	16,68	1923905	4,95	4,96
	5,83709	3,79	8836853	24,15		16,51	1931717	4,97	
Promedio					24,11				4,93
Desviación estándar				Sm=0,4	0,19	Sm= 0,1			0,02
Coeficiente de variación				1,5	0,81	1,8			0,50

Tabla 3. Medicamento C.

		Clorhidrato de ambroxol				Loratadina			
Replica	Masa (g)	Tiempo de retención (min) (s= 0,02)	Área (s=111858)	Concentración (mg/ 5mL)	Promedio (mg/ 5mL)	Tiempo de retención (min) (s= 0,07)	Área (s=21850)	Concentración (mg/ 5mL)	Promedio (mg/ 5mL)
1	5,52395	3,81	10937270	29,68	23,90	16,68	1936550	4,96	4,976
	5,52395	3,80	11048041	29,98		16,52	1950077	4,99	
2	5,53949	3,79	11089532	30,17	24,13	16,64	1969155	5,05	4,967
	5,53949	3,83	10923127	29,73		16,59	1899176	4,88	
3	5,54160	3,78	10831511	29,53	24,29	16,57	1932070	4,97	4,974
	5,54160	3,82	11083979	30,21		16,66	1935279	4,98	
Promedio					29,88				
Desviación estándar				Sm= 0,4	0,06	Sm=0,1			0,005
Coeficiente de variación				1,1	0,20	1,9			0,098

Glosario de acrónimos o abreviaturas

INHRR	Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel.
USP	The United States Pharmacopeial.
BP	British Pharmacopoeia.
ICH	The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
rpm	Revoluciones por minuto.
PA	Angulo de pureza de la señal cromatográfica. Grafico de pureza.
TH	Ángulo umbral de la señal cromatográfica. Grafico de pureza.
SS_R	Suma de cuadrados del modelo de regresión.
SS_E	Suma de cuadrados de los residuos del modelo de regresión.
SS_{LOF}	Suma de cuadrados atribuible a la falta de ajuste del modelo de regresión.
SS_{PE}	Suma de cuadrados atribuible al error puro del modelo de regresión.

Glosario de términos médicos.

Agonista.

Se llama agonista a un compuesto químico capaz de simular el efecto de una sustancia producida por nuestro propio cuerpo. El agonista no es la sustancia original de nuestro cuerpo pero actúa de forma parecida, la imita.

Las sustancias que produce nuestro cuerpo actúan sobre los receptores. Si un agonista imita a la sustancia producida de forma natural, estimula al receptor y se logran los efectos que esa sustancia natural produce en las células. ^[31]

Angiotensina

Hormona peptídica formada por ocho (angiotensina II) o diez (angiotensina I) aminoácidos que actúa provocando una vasoconstricción general en las arteriolas, lo que a su vez provoca un aumento de la presión arterial y una mayor tasa de filtración en los glomérulos del riñón. ^[31]

Antitusígenos

Son medicamentos destinados a aliviar la tos. Su efecto actúa directamente sobre el centro de la tos en el cerebro o sobre las terminaciones nerviosas que se encuentran en los bronquios, y se denominan antitusígenos de acción central o de acción periférica respectivamente. ^[31]

Bronquiolos.

Pequeños conductos pulmonares formados por la ramificación de los bronquios. Los bronquiolos desembocan en unos racimos de estructuras globulares denominadas alveolos, donde se da el intercambio de gases (oxígeno y CO₂). ^[32]

Bronquios.

Estructura tubular que conduce el aire desde la tráquea a los alveolos pulmonares. Los bronquios son tubos con ramificaciones progresivas arboriformes y diámetro decreciente, cuya pared está formada por cartílagos y capa muscular, elástica y mucosa. ^[32]

Citoquinas.

Las citoquinas (o citocinas) son un grupo de proteínas de bajo peso molecular que actúan mediando interacciones complejas entre células de linfoides, células inflamatorias y células hematopoyéticas. ^[33]

Coronavirus.

Los coronavirus son una extensa familia de virus, algunos de los cuales puede ser causa de diversas enfermedades humanas, que van desde el resfriado común hasta el SRAS (síndrome respiratorio agudo severo). Los virus de esta familia también pueden causar varias enfermedades en los animales. ^[34]

Neoplasia.

Neoplasia es una alteración de la proliferación y, muchas veces, de la diferenciación celular, que se manifiesta por la formación de una masa o tumor. Una neoplasia (llamada también tumor o blastoma) es una masa anormal de tejido, producida por multiplicación de algún tipo de células; esta multiplicación es descoordinada con los mecanismos que controlan la multiplicación celular en el organismo, y los supera. ^[35]

Prurito.

El prurito es un hormigueo o irritación de la piel que provoca el deseo de rascarse en el área afectada. El prurito o picazón puede ocurrir en todo el cuerpo o solamente en un lugar. ^[32]

Quimiotaxis.

Respuesta de las bacterias y otros organismos que implica dirigir su movimiento según un estímulo químico, aproximándose o alejándose de él. Habitualmente el estímulo es la concentración de ciertas sustancias químicas en el medio ambiente del organismo. ^[32]

Rinitis.

La rinitis es la inflamación de la mucosa de las fosas nasales, es una de las enfermedades alérgicas más frecuentes. ^[12]

Rinovirus.

Los rinovirus son los patógenos más comunes en humanos; reconocidos como los agentes causales más comunes de las infecciones respiratorias de vías altas, tanto en niños como en adultos, causante del resfriado común. ^[32]

Sinusitis.

Se refiere a la inflamación de los senos paranasales que ocurre con una infección a raíz de un virus, una bacteria o un hongo.

Los senos paranasales son espacios llenos de aire en el cráneo. Están localizados por detrás de la frente, los huesos de la nariz, las mejillas y los ojos. Los senos paranasales saludables no contienen bacterias ni otros microorganismos. Por lo general, el moco puede salir y el aire puede circular a través de ellos. Cuando las aberturas paranasales resultan bloqueadas o se acumula demasiado moco, las bacterias y otros microorganismos pueden multiplicarse más fácilmente. ^[36]

Urticaria crónica idiopática.

La aparición de ronchas rojas en la piel, acompañada de picazón, hinchazón e inclusive dolor, puede corresponder a lo que clásicamente se ha venido llamando Urticaria Crónica Idiopática (UCI), y que actualmente por consenso se denomina Urticaria Crónica Espontánea (UCE). Este cuadro, que produce molestias y deteriora la calidad de vida, a menudo se confunde con otras afecciones, o no es tratado por especialistas, lo que se prolonga sin alivio. ^[37]

Virus sincicial.

El virus sincicial respiratorio (VSR) es el microbio más común que causa infecciones en los pulmones y en las vías respiratorias en los bebés y en los niños pequeños. Es un virus muy común que ocasiona síntomas leves similares a los del resfriado en los adultos y en los niños sanos mayores. Puede ser más serio en los bebés, especialmente aquellos que están en ciertos grupos de alto riesgo. ^[36]