



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA PARA LA IDENTIFICACIÓN Y
CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN
DE AMBROXOL CLORHIDRATO 7,5mg + CLENBUTEROL CLORHIDRATO
0,005mg/5mL EN JARABE.**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO**

AUTORES

BACH: CAMONES VARGAS, FLOR ANA

<https://orcid.org/0000-0001-9649-3687>

BACH: VIDAL SANCHEZ, KAREN PRISCILA

<https://orcid.org/0000-0002-9205-5660>

ASESOR

MG. HERNANDEZ GUERRA, REYNA EMPERATRIZ

<https://orcid.org/0000-0002-4844-8539>

LIMA – PERÚ

2021

DEDICATORIA:

Lleno de regocijo, de amor y esperanza, dedico este proyecto a Dios Padre, por los cuidados, por permitirme sonreír ante todos mis logros y darme luz en días oscuros.

Con todo mi corazón a mi madre, el principal motor de mi vida y mi guía, su bendición a diario me protege y me lleva por el camino del bien.

A mi padre por ser el impulso de mis sueños, gracias por siempre confiar en mí, creer en mí, por siempre acompañarme en cada una de las agotadoras y largas noches de estudio, gracias por cada palabra que fueron mi guía en el transcurso de la carrera.

Gracias por estar presentes día a día, a mis hermanos: Fredegungo Avellaneda, Wilmer Avellaneda, Wilson Avellaneda, María Avellaneda, Miguel Diaz, Anderson Camones, Jhonatan Camones, Claudia Camones, gracias por tanto apoyo incondicional y ser el orgullo de todos ellos.

Camones Vargas, Flor Ana

Es de mi agrado poder dedicar este trabajo a Dios, por la dicha de concederme vida y salud hasta el momento, y la oportunidad de estudiar esta emocionante carrera.

A mi madre e hija, por ser el soporte de que siga esforzándome personal y profesionalmente.

A mi estimado amigo y padre de mi hija, por alentarme, motivarme y entre risas, consejos, y altibajos, apoyarme a seguir avanzando.

A mis hermanos con cariño, no es fácil, pero se puede lograrlo.

A mi abuelita Anita, que, aunque no esté conmigo, supo inculcarme desde pequeña valores y aprendizajes de vida que hoy me permite ser la mujer que soy.

Vidal Sánchez, Karen Priscila

AGRADECIMIENTO

Agradecer a Dios por su infinito amor, bondad y misericordia que nos permite disfrutar con cada amanecer un nuevo día.

A nuestros padres por educarnos bajos sus principios de amor, humildad y esfuerzo, pues de ellos aprendimos a valorar lo que hoy somos y ahora tenemos.

A grandes amigos y personas especiales que nos han apoyado en el desarrollo de este trabajo de investigación.

A nuestra asesora, la Mg. Reyna Emperatriz Hernández Guerra, por su tiempo, indicaciones de mejoras continuas en el presente estudio.

A laboratorios S.J. Roxfarma, por permitirnos utilizar las instalaciones, equipos y todo lo necesario para la reproducibilidad y desarrollo del presente trabajo.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
I. INTRODUCCIÓN	11
II. MATERIALES Y MÉTODOS	18
2.1 Enfoque y diseño de la investigación.....	18
2.2 Población, muestra y muestreo.....	18
2.3 Variables de la investigación.....	18
2.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	19
2.5 Plan metodológico de recolección de datos.....	19
2.6 Procesamiento del análisis estadístico.....	52
2.7 Aspectos éticos.....	58
III. RESULTADOS	59
IV. DISCUSIÓN	91
4.1 Discusión de resultados.....	91
4.2 Conclusiones.....	95
4.3 Recomendaciones.....	97
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
ANEXOS	98
a. Instrumentos de recolección de datos.....	98
b. Matriz de consistencia.....	115
c. Operacionalización de variables.....	116
d. Carta de aprobación para la ejecución del proyecto de tesis.....	118
e. Evidencias fotográficas del trabajo de campo.....	119

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Variación de flujo.....	22
Tabla 2. Variación de longitud de onda.....	22
Tabla 3. Número de muestras y número de inyecciones-Aptitud del sistema.....	24
Tabla 4. Número de muestras y número de inyecciones-Especificidad por identificación.....	27
Tabla 5. Número de muestras y número de inyecciones-Especificidad por degradación.....	36
Tabla 6. Número de muestras y número de inyecciones-Linealidad del sistema...	40
Tabla 7. Número de muestras y número de inyecciones-Linealidad del método...	43
Tabla 8. Número de muestras y número de inyecciones-Exactitud del método.....	45
Tabla 9. Número de muestras y número de inyecciones – P. Repetibilidad.....	46
Tabla 10. Número de muestras y número de inyecciones-P.I. diferente analista...	47
Tabla 11. Número de muestras y número de inyecciones-P.I. diferentes equipos.	47
Tabla 12. Número de muestras y número de inyecciones - Límite de Detección y Cuantificación.....	49
Tabla 13. Número de muestras y número de inyecciones-Robustez.....	50
Tabla 14. Evaluación de los resultados de la aptitud del sistema cromatográfico de ambroxol.....	59
Tabla 15. Resultados de la aptitud del sistema cromatográfico de ambroxol.....	59
Tabla 16. Evaluación de los resultados de la aptitud del sistema cromatográfico de clenbuterol.....	60
Tabla 17. Resultados de la aptitud del sistema cromatográfico de clenbuterol.....	60
Tabla 18. Evaluación de los resultados de Especificidad por Identificación.....	61

Tabla 19. Evaluación de los resultados de Especificidad por Degradación.....	63
Tabla 20. Resultados de Especificidad por Degradación de Ambroxol.....	64
Tabla 21: Resultados de Especificidad por Degradación de Clenbuterol.....	66
Tabla 22: Evaluación de los resultados de Linealidad del Sistema.....	68
Tabla 23: Resultados de la Linealidad del sistema para Ambroxol-serie 1.....	69
Tabla 24: Resultados de la Linealidad del sistema para Ambroxol-serie 2.....	70
Tabla 25: Resultados de la Linealidad del sistema para Ambroxol-serie 3.....	71
Tabla 26: Resultados de la Linealidad del sistema para Clenbuterol-serie 1.....	72
Tabla 27: Resultados de la Linealidad del sistema para Clenbuterol-serie 2.....	73
Tabla 28: Resultados de la Linealidad del sistema para Clenbuterol serie 3.....	74
Tabla 29. Evaluación de los resultados de Linealidad del método.....	75
Tabla 30: Resultados de la Linealidad del método para Ambroxol.....	76
Tabla 31: Resultados de la Linealidad del método para Clenbuterol.....	77
Tabla 32. Evaluación de los resultados de Exactitud del método.....	78
Tabla 33: Resultados de la exactitud del método para Ambroxol.....	79
Tabla 34: Resultados de la exactitud del método para Clenbuterol.....	80
Tabla 35. Evaluación de los resultados de Precisión del método.....	81
Tabla 36: Resultados de Precisión: Repetibilidad en Ambroxol.....	82
Tabla 37: Resultados de Precisión: Repetibilidad en Clenbuterol.....	83
Tabla 38: Resultados de Precisión Intermedia: Diferentes analistas para Ambroxol.....	83
Tabla 39: Resultados de Precisión Intermedia: Diferentes equipos para Ambroxol.....	84
Tabla 40: Resultados de Precisión Intermedia: Diferentes analistas para Clenbuterol.....	84

Tabla 41: Resultados de Precisión Intermedia: Diferentes equipos para Clenbuterol.....	85
Tabla 42: Evaluación de los resultados de Límite de Detección y Cuantificación...85	
Tabla 43: Resultados de límite de cuantificación y detección para Ambroxol.....86	
Tabla 44: Resultados de límite de cuantificación y detección para Clenbuterol.....87	
Tabla 45. Evaluación de los resultados de Robustez.....88	
Tabla 46: Resultados de Robustez en Ambroxol.....89	
Tabla 47: Resultados de Robustez en Clenbuterol.....90	
Tabla 48. Evaluación de los resultados del Rango.....90	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Gráfica de la Linealidad del sistema serie 1 – Ambroxol.....	70
Figura 2: Gráfica de la Linealidad del sistema serie 2 – Ambroxol.....	71
Figura 3: Gráfica de la Linealidad del sistema serie 3 – Ambroxol.....	72
Figura 4: Gráfica de la Linealidad del sistema serie 1 – Clenbuterol.....	73
Figura 5: Gráfica de la Linealidad del sistema serie 2 – Clenbuterol.....	74
Figura 6: Gráfica de la Linealidad del sistema serie 3 – Clenbuterol.....	75
Figura 7: Gráfica de la Linealidad del método – Ambroxol.....	77
Figura 8: Gráfica de la Linealidad del método – Clenbuterol.....	78
Figura 9: Gráfica del Límite de detección y cuantificación para Ambroxol.....	86
Figura 10: Gráfica del Límite de detección y cuantificación para Clenbuterol.....	87
Figura 11: Cromatograma de Ambroxol + Clenbuterol en aptitud del sistema del estándar 1.....	108
Figura 12: Cromatograma de Ambroxol + clenbuterol en aptitud del sistema del estándar 2.....	108
Figura 13: Especificidad por identificación de la fase móvil.....	109
Figura 14: Especificidad por identificación del analito Ambroxol.....	110
Figura 15: Especificidad por identificación del analito Clenbuterol.....	111
Figura 16: Especificidad por identificación del estándar mixto.....	112
Figura 17: Especificidad por identificación del producto terminado.....	113
Figura 18: Especificidad por identificación del Placebo.....	114
Figura 19: Tesistas preparando las soluciones de trabajo para el desarrollo de la validación de la técnica analítica	119
Figura 20: Tesistas analizando las muestras antes de introducir al cromatógrafo.....	120

RESUMEN

OBJETIVO: Validar la técnica analítica para la identificación y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución de Ambroxol Clorhidrato 7,5mg + Clenbuterol clorhidrato 0.005mg/5mL en jarabe.

MATERIALES Y MÉTODOS: Consistió en la identificación, cuantificación y separación de los principios activos en el sistema cromatográfico y se evaluó los parámetros de desempeño: especificidad, linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y cuantificación, robustez y rango.

RESULTADOS: La técnica analítica es específica, puesto que no presenta interferencia con ningún compuesto de degradación del principio activo o algún excipiente. Es lineal, muestra proporcionalidad con la concentración del analito, donde el coeficiente de correlación (r) para el sistema y el método fueron $r \geq 0.995$ que es su valor aceptable. Es exacta, obteniéndose un porcentaje de recuperación de 100.1% en ambroxol y 100.5% en clenbuterol. Es precisa, con un coeficiente de variación (CV) para repetibilidad en ambroxol del 0.16% y en clenbuterol 0.41%, para precisión intermedia entre diferentes analistas, se obtuvo 0.23 y 1% en ambroxol y clenbuterol respectivamente y entre diferentes equipos 0.48% y 1.08% en ambroxol y clenbuterol respectivamente, el $CV \leq 2.0\%$. El límite de detección 1.9052ppm y 0.001949ppm en ambroxol y clenbuterol respectivamente. El límite de cuantificación fue 2.3003ppm en ambroxol y 0.004971ppm en clenbuterol. Es robusto, el producto terminado no evidencia alteración. El rango obtenido oscila entre 80%-120%.

CONCLUSIÓN: La técnica analítica validada cumplió con las exigencias establecidas de la USP vigente y se encuentra aptos para su respectiva utilización.

Palabras Claves: Validación, HPLC, criterio de aceptación, técnica analítica, parámetros de desempeño.

ABSTRACT

OBJETIVE: To validate the analytical technique for the identification and quantification by high performance liquid chromatography of Ambroxol hydrochloride 7,5mg + Clenbuterol hydrochloride 0,005mg/5mL in syrup.

MATERIALS AND METHODS: It consisted of the identification, quantification and separation of the active ingredients in the chromatographic system and the performance parameters were evaluated: specificity, linearity, accuracy, precisión, detection and quantification limit, robustness and range.

RESULTS: The analytical technique is specific, since it does not interfere with any degradation compound of the active ingredient or any excipient. It is linear, it shows proportionality with the concentration of the analyte, where the correlation coefficient (r) for the system and the method were $r \geq 0.995$, which is its acceptable value. It is exact, obtaining a recovery percentage of 100.1% in ambroxol and 100.5% in clenbuterol. It is precise, with a coefficient of variation (CV) for repeatability in ambroxol of 0.16% and in clenbuterol 0.41%, for intermediate precisión between different analysts 0.23 and 1% were obtained in ambroxol and clenbuterol respectively and between different teams 0.48% and 1.08% in ambroxol and clenbuterol respectively, the $CV \leq 2.0\%$. The detection limit 1.9052ppm and 0.001949ppm in ambroxol and clenbuterol respectively. The quantification limit was 2.3003ppm for ambroxol and 0.004971ppm for clenbuterol. It is robust, the finished product shows no alteration. The range obtained is between 80%-120%.

CONCLUSION: The validated analytical technique complied with the requirements established by the current USP and is suitable for its respective use.

Keywords: Validation, HPLC, acceptance criterio, analytical technique, performance parameters.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad el termino validación viene integrándose como parte imprescindible en la industria farmacéutica. Básicamente se fundamenta en el proceso de demostrar que los resultados obtenidos por un determinado método, técnica, procedimiento o actividad, contribuye con el propósito previsto.¹

A nivel mundial cerciorarse del cumplimiento de los procesos de validación viene llevándose a cabo por los entes reguladores más importantes como son la OMS (Organización Mundial de la Salud), la FDA (Administración de Medicamentos y Drogas de los Estados Unidos), la ICH (Consejo Internacional para la Armonización de requisitos técnicos para productos farmacéuticos de uso humano), la EMA (Agencia Europea de Medicamentos); siendo la ICH la principal referencia para recomendaciones y definiciones acerca de las características de validación de los procedimientos analíticos¹, sin embargo la FDA en 1976 determina por primera vez el concepto de revisión en las normas correctas de fabricación, y siete años posteriores incluyó criterios orientados a mejorar los validación de procesos.²

La validación de los métodos analíticos son un grupo de procesos y análisis que al documentarlos nos permite demostrar frente a las entidades farmacéuticas y demás, la confiabilidad de resultados precisos y exactos, y garantizar productos de calidad para el cual fueron destinados.³ Por ello en cada país se crearon normativas con el propósito de regular las etapas del desarrollo de los productos farmacéuticos con el fin de obtener productos de altos estándares de calidad.

En el Perú, la DIGEMID (Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas) mediante los manuales de BPM (Buenas Prácticas de Manufactura) y BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio), permiten que se realicen la fabricación de los productos farmacéuticos con suma confiabilidad, eficacia, calidad y seguridad, para ello los textos de consultas oficiales como la farmacopea americana, británica, europea y japonesa, nos proporcionan las técnicas analíticas de muchos de estos activos.⁴ Sin embargo, los parámetros de desempeño dados no se alinean a las condiciones de cada laboratorio en su debido país. Por tal motivo los laboratorios actuales deben demostrar la aplicabilidad de los métodos analíticos a su producto e instalaciones, así como la entidad reguladora DIGEMID en el Perú exigirá el cumplimiento de la

Validación de los métodos analíticos de cada medicamento que llegue a una etapa de comercialización .^{5,6,7}

La asociación de ambroxol clorhidrato y clenbuterol clorhidrato que son los principios activos de nuestro estudio, son una de las combinaciones más usadas y comercializadas actualmente, por el aporte sinérgico frente a las afecciones respiratorias más comunes como broncoespasmos, asma bronquial, EPOC, fibrosis pulmonar, entre otros.^{8,9}

Una de las metodologías de análisis con más uso y de primera elección en la identificación y cuantificación de analitos es realizado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), método que nos proporciona seguridad y alto grado de confianza en los resultados de nuestro producto farmacéutico de interés, la combinación de ambroxol y clenbuterol.^{10,18}

Según lo antes mencionado, el presente trabajo de investigación tiene como énfasis la Validación de la técnica analítica para la identificación y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución de ambroxol clorhidrato 7,5mg + clenbuterol clorhidrato 0,005mg/5mL en jarabe, en las instalaciones de laboratorios farmacéuticos S.J. Roxfarma, con el fin de documentar que la técnica es aplicable, reproducible y confiable dentro de los límites esperados mediante la USP vigente.

La definición de validación se presenta de muchas maneras, siendo la propuesta más aceptada por la FDA como “la evidencia documentada que provee un alto grado de garantía de que un proceso específico producirá, de forma consistente, un producto que cumpla con sus especificaciones predeterminadas y atributos de calidad”¹¹. Teniendo en cuenta esta definición podemos conceptualizar que la validación de métodos analíticos es el proceso por el cual queda establecido por estudios experimentales y/o de laboratorio, que la capacidad del método y características de desempeño cumple con los requisitos para la aplicación analítica deseada.¹ La clasificación para métodos analíticos se da según la función de su estado regulatorio, encontrando aquí a los métodos farmacopéicos y los no farmacopeicos¹². Las pruebas analíticas farmacopéicas se pueden evaluar según los parámetros de cuatro categorías (USP43): categoría I, para cuantificar componentes principales de los fármacos a granel o activos (incluidos conservantes) en productos terminados. Categoría II, para determinar impurezas en fármacos a granel o residuos

de degradación, en estos procedimientos incluyen pruebas de límite y análisis cuantitativos. Categoría III, para determinar características de desempeño como disolución, liberación de fármacos. Categoría IV, para pruebas de identificación.^{3,7} Dependiendo de cada categoría se requiere tener en cuenta información analítica diferente en los parámetros de desempeño como se muestra en el anexo A1.

Los síntomas asociados a las enfermedades respiratorias suelen darse por la tos y las secreciones traqueo bronquiales, es por ello que combinaciones sinérgicas de principios activos es una de las alternativas para el tratamiento de este tipo de afecciones. El Clenbuterol como agente broncodilatador ejerce estimulación sobre los receptores agonistas B₂ adrenérgicos de manera selectiva dilatando los bronquios oprimidos y el Ambroxol, por sus propiedades mucolíticas actúa modificando las características fisicoquímicas de la secreción bronquial, rompe los puentes disulfuros(S₂) y realiza la lisis de las mucoproteínas, mejorando el flujo y transporte de moco para su fácil eliminación.^{8,11,13}

Entre los antecedentes internacionales y nacionales encontrados respectivamente, se dispone de los siguientes estudios:

Guillen, J. (2019). En su tesis “Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación simultánea de ambroxol y clenbuterol en jarabe por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)” tuvo como objetivo desarrollar y validar un procedimiento analítico por HPLC para determinar simultáneamente clorhidrato de ambroxol y clenbuterol en jarabes. En la evaluación de la exactitud se encontraron porcentajes de recuperación en los niveles 70, 100 y 130% entre (69,34; 100,86;129,69) % y (68,76; 99,16; 127,71) % con coeficiente de variación de (0,38; 0,61; 0,24) y (0,20; 1,63; 0,35) para clenbuterol y ambroxol respectivamente. Los límites de detección y cuantificación fueron (0,23/0,70) y (0,07/0,22) para clenbuterol y ambroxol respectivamente. Los resultados demostraron que el método propuesto fue satisfactorio bajo las condiciones de análisis desarrolladas.⁸

Morales, J. (2017). En su tesis “Desarrollo de un método para la cuantificación de clenbuterol y ambroxol en jarabes para la tos por medio de cromatografía líquida de alta resolución”, la investigación propuso determinar la concentración de clenbuterol y ambroxol en conjunto en jarabe por HPLC. Sin embargo, esto no fue posible debido a que el compuesto clenbuterol no se pudo detectar por medio de la metodología

propuesta. Para ambroxol la desviación de 2,25 estuvo fuera del criterio; precisión intermedia fue de 4×10^{-14} , fuera de aceptación; precisión del sistema fue 0,3 lo cual cumple con el criterio; la linealidad cuyo cociente de regresión de 0,998 por lo que se considera lineal; el rango fue de 80% al 120% de la concentración de ambroxol, es decir, de 0,6 a 0,9g/mL. El método no fue el adecuado para la evaluación de este tipo de jarabes.¹¹

Parra, Z. et al (2017). En su artículo “Desarrollo y validación de un método analítico por HPLC para la determinación simultánea de clorhidrato de ambroxol y loratadina en jarabes” describe que su propósito de investigación fue la desarrollar y validar una metodología por HPLC para la determinación simultánea de clorhidrato de ambroxol y loratadina en jarabes. La metodología fue validada según los requerimientos de la USP vigente. El método propuesto fue lineal en un rango de concentración entre 0,12mg/mL a 0,90mg/mL para clorhidrato de ambroxol y 0,02mg/mL a 0,16mg/mL para loratadina. Los resultados demostraron que el método es robusto y confiable bajo las condiciones de análisis dadas, asimismo, fue preciso, exacto y selectivo, lo cual reconoció inequívocamente la presencia de ambroxol y loratadina, discriminando la presencia de productos de degradación y sustancias contaminantes. Se concluyó que el método puede ser aplicado para procedimiento rutinario en pruebas de control de calidad.¹⁸

Guarniz, D. (2016) en su tesis “Validación del método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación de ambroxol clorhidrato en polvo para suspensión oral”. En sus resultados: La linealidad del sistema tuvo un coeficiente de correlación $r=1,000$ y $0,9993$ la linealidad del método. En la precisión los valores obtenidos de RSD nos demuestran que el valor máximo permitido es de 2% y el método en repetibilidad tuvo un RSD de 1,155% siendo conforme. El estándar, muestra, placebo nos demuestran que ningún excipiente interfiere con el pico del principio activo, por lo tanto, el método es selectivo.¹⁴

Acosta M, et al (2014) en su tesis “Validación de una técnica analítica por cromatografía de alta performance (HPLC) y cálculo de la incertidumbre para los ensayos de ambroxol clorhidrato y clenbuterol clorhidrato en un jarabe, Arequipa-2013” tuvieron como objetivo primordial el validar la metodología analítica por HPLC y calcular la incertidumbre de los principios activos ambroxol y clenbuterol en un

jarabe. Evaluaron parámetros como linealidad, precisión, exactitud, especificidad y rango, obteniéndose resultados adecuados. Demostraron mediante diseño experimental que la metodología analítica era lineal dado que se obtuvo un coeficiente de correlación para ambroxol:0,9992 y clenbuterol: 0,9998; lineal en el rango de 0,09mg/mL a 0,21mg/mL para ambroxol y 0,00030mg/mL a 0,00057mg/mL para clenbuterol; es precisa ya que el coeficiente de variación para las áreas y los tiempos fue de $\leq 2\%$, la repetibilidad tuvo un coeficiente de variación de 0,80% y 1,38% para ambroxol y clenbuterol respectivamente; es exacta con una recuperación media de ambroxol del 99,86% y clenbuterol de 99,87%; es específica dado que no se evidenció interferencia de productos de degradación o de los excipientes en el análisis de los principios activos .⁹

Tapia W.,(2011) en su Informe de investigación tipo III " Validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución(HPLC) para la cuantificación de ambroxol clorhidrato 7,5mg/mL solución oral gotas", se evaluaron en la presente investigación los parámetros de desempeño como son: Linealidad, precisión, exactitud, límite de cuantificación y detección, especificidad, robustez y rango, los cuales concluyeron que el método analítico propuesto es lineal, exacta, precisa, específica y robusta, lo cual, con este método demostraron confiabilidad garantizando la fórmula del principio activo analizada¹⁹.

El trabajo mencionado por Tapia, es un antecedente relevante, puesto que coincide con uno de los principios activos estudiados en esta investigación, más aun teniendo en cuenta la información que brindará para nuestra discusión.

De esta forma justificamos la investigación realizada, puesto que observamos la necesidad que tiene la industria farmacéutica al no contar con la documentación, el equipamiento, insumos y los conocimientos necesarios para la aplicación de técnicas analíticas confiables que pueden demandar gastos de inversión económica, humana y de tiempo en el desarrollo. Es por ello que se requiere implementar la validación de nuevos métodos analíticos o la adaptación de los métodos farmacopéicos a las necesidades de cada laboratorio, siempre garantizando la confiabilidad en los resultados y el cumplimiento de Buenas Prácticas de Manufactura, Buenas Prácticas de Laboratorio que demuestren la aplicabilidad del método al producto e instalaciones.¹⁵

Al trabajar juntos ambroxol y clenbuterol de manera sinérgica mejorando las vías respiratorias que cursan con broncoconstricción y dificultad para expulsar las secreciones bronquiales, este medicamento en el facultativo es de primera elección, es por ello que se busca que la técnica analítica cumpla con los altos estándares de calidad.¹³

El HPLC es el equipo adecuado de mayor alcance para lograr los resultados en la técnica analítica, este nos permite obtener tiempo de análisis más rápidos, separar sustancias de mezclas complejas, ejecución de los análisis con facilidad y exactitud, y con errores relativos menores al 1%.^{2, 16}

Por las razones anteriormente descritas se ha tomado la decisión de validar una técnica analítica adecuada para el principio activo de nuestro interés rigiéndonos al marco legal.

El objetivo general de la investigación es validar la técnica analítica para la identificación y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución de ambroxol clorhidrato 7,5mg + clenbuterol clorhidrato 0,005mg/5mL en jarabe.

La hipótesis general de la investigación hace énfasis que:

La validación de la técnica analítica para la identificación y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución de ambroxol clorhidrato 7,5mg + clenbuterol clorhidrato 0,005mg/5mL en jarabe cumple con los parámetros establecidos.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Enfoque y diseño de la investigación

2.1.1 Enfoque: La investigación reúne un enfoque cuantitativo. Cuantitativo porque usa la recolección de datos para probar la hipótesis basándonos en la medición y análisis estadístico.

2.1.2 Diseño: Es de diseño experimental, porque en el estudio trabajado se controló la influencia de la variable independiente sobre la variable dependiente una vez manipulada, observando y vigilando el procedimiento experimental. Asimismo, se analizó los datos recogidos con el uso de técnicas estadísticas hasta obtener las conclusiones respectivas.

2.1.3 Tipo: Prospectivo y longitudinal. Prospectivo, ya que el estudio se inició antes de los hechos y los datos que se recogieron fueron a medida que se realizaba el procedimiento. Longitudinal, porque se analizó y observó la secuencia, modificación o evolución de nuestra muestra a lo largo de un tiempo.

2.2 Población, muestra, y muestreo

2.2.1 Población: Lote industrial de 1200L de ambroxol clorhidrato 7,5mg + clenbuterol clorhidrato 0,005mg/5mL en jarabe comercializados por laboratorios S.J. Roxfarma.

2.2.2 Muestra: Se tomaron 10 frascos de 120mL de ambroxol clorhidrato 7,5mg + clenbuterol clorhidrato 0,005mg/5mL en jarabe siendo el 0.1% de la población.

2.2.3 Muestreo: Considerando el tamaño del lote, las muestras se seleccionaron de manera aleatoria.

2.3 Variables de la investigación

2.3.1 Variable 1: Validación de la técnica analítica por cromatografía líquida de alta resolución. Es la variable que se ve afectada por la estimulación de la variable 2.

2.3.2 Variable 2: Identificación y cuantificación de ambroxol clorhidrato 7,5mg + clenbuterol clorhidrato 0,005mg/5mL en jarabe. Es la variable de estudio, la cual se manipuló para observar los efectos que produjo sobre la variable 1.

2.4 Técnica e instrumentos de recolección de datos

2.4.1 Técnica: Se realizó mediante la observación experimental y el análisis documentado y proporcionado por el cromatógrafo líquido de alta resolución¹.

2.4.2 Instrumentos: La Hoja de trabajo y registro de datos, como muestra anexo A2, fueron ingresados a cuadros en sistema Excel y formato Minitab 18¹⁶.

2.5 Plan metodológico para la recolección de datos

El procedimiento para la recolección de datos del estudio se basa en la observación y realización de lo siguiente:

Se desarrolló y se validó la técnica analítica de nuestra investigación con metodologías y especificaciones farmacopéicas vigentes, utilizándose el procedimiento analítico del producto Ambroxol clorhidrato 7,5mg + Clenbuterol clorhidrato 0,005mg/5mL en jarabe brindada por el laboratorio S.J. Roxfarma y en el caso de pruebas específicas se procedió según el protocolo establecido.

El sistema cromatográfico cumple con las siguientes condiciones: Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) marca Thermo Scientific cuyo modelo es Dionex 3000 con detector DAD (Diode Array Detectors), UV/VIS (Ultravioleta o Visible) ajustado a 248nm para ambroxol clorhidrato y 215nm para clenbuterol clorhidrato. Se usó la columna cromatográfica Octadecilsilano ligado químicamente a micropartículas de sílice totalmente porosa (L1), cuyas dimensiones son de 250mm x 4,6mm x 5µm (Eclipse XDB-C18) para ambos principios activos, a flujo de 1,0mL/minuto dentro de una temperatura a 25°C con volumen de inyección 10µL en un tiempo de corrida de aproximadamente 6 minutos para ambroxol clorhidrato y para clenbuterol clorhidrato a flujo de 0.6mL/minuto a 40°C con volumen de inyección 50µL en un tiempo de corrida de 60 minutos la muestra y 25 minutos el estándar.

Para el desarrollo de la técnica analítica y su respectiva validación se procedió de la siguiente manera:

2.5.1 Estándares:

- Ambroxol clorhidrato.
- Clenbuterol clorhidrato.

2.5.2 Muestra:

- Ambroxol clorhidrato 7,5mg + Clenbuterol clorhidrato 0,005mg/5mL.

2.5.3 Reactivos:

- Agua purificada
- Acetonitrilo
- Metanol
- Heptanosulfonato de sodio
- Ácido fosfórico
- Hidróxido de potasio
- Fosfato de monobásico de potasio
- Ácido clorhídrico
- Peróxido de hidrogeno 30%
- Hidróxido de sodio

2.5.4 Instrumentos y equipos:

- Balanza analítica
- Purificador de agua
- Baño ultrasonido
- Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) Thermo Scientific/Dionex 3000.
- Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) Thermo Scientific/Dionex U-3000
- Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) Dionex Ultimate 3000
- Refrigeradora

- Baño María
- Estufa
- Cámara climática
- Multiparámetro

2.5.5 Materiales

- Vasos de precipitación de 250mL, 500mL.
- Matraz volumétrico de 10mL, 20mL, 50mL, 100mL, 200mL.
- Pipetas volumétricas de 1mL, 2mL, 4mL, 5mL, 10mL.
- Pipetas graduadas de 1mL, 2mL, 5mL, 10mL.
- Probetas de 500mL, 1000mL, 2000mL.
- Membrana filtrante PVDF GVWP02500 de 0,45µm de poro x 25mm.
- Membrana filtrante PVDF HVLP04700 de 0,45µm de poro x 47mm.
- Porta filtros y jeringas descartables.
- Viales de HPLC de 2mL y tapas.
- Columna cromatográfica: Octadecilsilano ligado químicamente partículas de sílice totalmente porosa (L1) (Zorbax XDB-C18) de 250mm x 4,6mm x 5µm.

2.5.6 Método analítico:

2.5.6.1 Condiciones cromatográficas:

- En la preparación de la fase móvil se mezcló y desgasificó, durante 10 minutos.
- Una hora antes de iniciar el análisis se acondicionó el sistema cromatográfico.

2.5.6.2 Sistema Cromatográfico:

- Columna: Octadecilsilano ligado químicamente a partículas de sílice porosa (L1) (Zorbax Eclipse XDB-C18)
- Dimensiones de la Columna: 250mm x 4.6mm x 5µm.

- Flujo: Gradiente

Tabla 1: Variación de flujo	
Tiempo (min)	Flujo
0.00 min	0,90mL/min
34.5 min	0,90mL/min
35.0 min	1,60mL/min
54.5 min	1,60mL/min
54.9 min	0,90mL/min
55.0 min	0,90mL/min

- Temperatura: 35°C
- Detección: 210nm – 310nm

Tabla 2: Variación de longitud de onda	
Tiempo	nm
0.00 min	210
35.00 min	310
55.00min	210

- Volumen de inyección: 80µL
- Tiempo de corrida: Aproximadamente 55 minutos

2.5.6.3 Fase móvil:

2.5.6.3.1 Preparación del Buffer pH 3.0: Se pesó 5,0g de fosfato monobásico de potasio y 3,0g de heptanosulfonato de sodio en un matraz de 1000mL, agregaremos 850mL de agua. Sonicamos hasta disolución completa y mezclamos. Ajustamos a pH 3.0 con ácido fosfórico 30%(V/V).

2.5.6.3.2 La fase móvil: Buffer pH 3.0: Acetonitrilo: Metanol, (600:105:295) con las siguientes proporciones respectivamente para 1000mL. Filtramos a través de la membrana PVDF a 0,45µm, desgasificamos y trasvasamos a un frasco apropiado.

2.5.7 Preparación de las soluciones de trabajo:

2.5.7.1 Diluyente: Ácido Clorhídrico (HCl) 0,1N.

2.5.7.2 Solución estándar mixto: Concentración final (Ambroxol Clorhidrato 0,3mg/mL y Clenbuterol 0,0002mg/mL). Se pesó aproximadamente 20mg de Clenbuterol HCl RS, en un matraz volumétrico de 100mL, agregamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos; se completó a volumen con diluyente y mezclamos. De la solución anterior se transfirió 2,0mL en un matraz volumétrico de 100mL; completamos a volumen con diluyente y mezclamos para obtener la solución A.

Pesamos 30mg de ambroxol Clorhidrato, en un matraz volumétrico de 100mL, agregamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos hasta disolución completa. Transferimos 5,0mL de la solución A; hasta completar a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.7.3 Solución muestra: Transferimos 5mL de muestra (\pm 7,5mg de Ambroxol clorhidrato y 0,005 de Clenbuterol clorhidrato) exactamente medidos a un matraz volumétrico de 25mL, llevamos a volumen con diluyente y mezclamos. Se filtró una porción de esta solución a través de la membrana PVDF de 0,45 μ m descartando los primeros mililitros del filtrado. Obteniendo una concentración final de Ambroxol 0,3mg/mL y Clenbuterol Clorhidrato 0,0002mg/mL.

2.5.7.4 Muestra placebo: Transferimos 5,0mL de placebo (\pm 0,0mg de Ambroxol Clorhidrato y 0,0mg de Clenbuterol Clorhidrato), medidos exactamente en un matraz volumétrico de 25mL diluimos y llevamos a volumen con diluyente mezclamos y homogenizamos.

2.5.7.5 Estándar Ambroxol Clorhidrato: Transferimos 15mg de Ambroxol clorhidrato a un matraz volumétrico de 50mL, se agregó 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos. Llevamos a volumen con diluyente y homogenizamos.

2.5.7.6 Estándar Clenbuterol Clorhidrato: Transferimos 20mg de Clenbuterol clorhidrato y lo colocamos a un matraz volumétrico de 100mL, seguidamente agregamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos, llevamos a volumen con la misma solución y mezclamos.

Transferimos 2,0mL solución y llevamos a un matraz volumétrico de 200mL, completamos con diluyente y mezclamos. De la solución anterior transferimos 2,0mL y llevamos a un matraz de 20mL diluyendo a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8 Proceso de Validación:

2.5.8.1 Aptitud de Sistema: Se preparó dos muestras del estándar mixto según el punto 2.5.7.2 detallado antes en la presente investigación; filtramos una porción de la solución a través de la membrana PVDF 0,45µm hacia los viales HPLC descartando los primeros mililitros del filtrado.

Luego procedimos a realizar la recolección de datos de 6 inyecciones del estándar mixto por duplicado y en el ensayo se evaluó la adecuación del sistema.

Tabla 3: Número de muestras y número de inyecciones- Aptitud de sistema		
Muestras	Nº de Muestras	Nº de Inyecciones
Estándar Mixto 1	1	6
Estándar Mixto 2	1	6

2.5.8.2 Especificidad:

Capacidad de evaluar de manera evidente y clara el analito en participación con aquellos componentes cuya presencia pueden encontrarse como probables, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz⁶. Se realizó pruebas de Especificidad por identificación y Especificidad por degradación.

2.5.8.2.1 Especificidad por Identificación: Se realizó análisis individuales de cada uno de los componentes de la formula, tomando como referencia la concentración de cada uno de ellos, según técnica analítica.

- 2.5.8.2.1.1 Estándar mixto (Ambroxol clorhidrato y Clenbuterol clorhidrato):** Se preparó la solución estándar según lo establecido en el punto 2.5.7.2 detallado anteriormente en la presente investigación.
- 2.5.8.2.1.2 Estándar de Ambroxol clorhidrato:** Se preparó la solución estándar según el punto 2.5.7.5 detallado anteriormente en la presente investigación.
- 2.5.8.2.1.3 Estándar de Clenbuterol clorhidrato:** Se preparó la solución estándar según el punto 2.5.7.6 detallado previamente en la presente investigación.
- 2.5.8.2.1.4 Metilparabeno:** Se pesó 36mg de metilparabeno en un matraz volumétrico de 100mL, se llevó a volumen con diluyente y se mezcló.
- 2.5.8.2.1.5 Propilparabeno:** Pesamos 20mg de propilparabeno en un matraz volumétrico de 50mL, diluimos a volumen con diluyente y mezclamos. Transferimos 5,0mL de esta solución y llevamos a un matraz volumétrico de 50mL, completamos a volumen con diluyente y mezclamos.
- 2.5.8.2.1.6 Glicerol:** Pesamos 848mg de Glicerol en un matraz volumétrico de 20mL y llevamos a volumen con diluyente. De esta primera solución transferimos 10mL a un matraz volumétrico de 20mL, completamos a volumen con diluyente y mezclamos.
- 2.5.8.2.1.7 Sorbitol solución no cristalizante:** Pesamos 1880mg de sorbitol solución no cristalizante en un matraz volumétrico de 20mL, luego diluimos a volumen con diluyente y mezclamos.
- 2.5.8.2.1.8 Propilenglicol:** Se pesó 320mg de propilenglicol en un matraz volumétrico de 20mL, diluimos a volumen con diluyente y mezclamos. Asimismo, transferimos 5,0mL de esta primera solución a un matraz volumétrico de 20mL, completamos a volumen con diluyente y mezclamos.
- 2.5.8.2.1.9 Ácido Cítrico anhidro:** Pesamos 52mg de ácido cítrico anhidro en un matraz volumétrico de 100mL, diluimos a volumen con diluyente y mezclamos. Seguidamente, transferimos de la solución anterior

25mL y lo llevamos a un matraz volumétrico de 50mL, completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.2.1.10 Citrato de sodio dihidratado: Pesamos 40mg de citrato de sodio dihidratado en un matraz volumétrico de 50mL, diluimos a volumen con diluyente y mezclamos. De esta solución transferimos 1mL y llevamos a un matraz volumétrico de 20mL, completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.2.1.11 Sacarina Sódica Dihidratada: Pesamos 20mg de Sacarina sódica dihidratada en un matraz volumétrico de 50mL, diluimos a volumen con diluyente y mezclamos. Se transfirió 1mL de esta solución y se llevó a un matraz volumétrico de 20mL, luego completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.2.1.12 Sabor granadilla: Medimos 0,465mL de sabor a granadilla en un matraz volumétrico de 50mL, luego diluimos a volumen con diluyente y mezclamos. Seguidamente transferimos 2mL de esta solución y lo llevamos a un matraz volumétrico de 20mL, completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.2.1.13 Placebo: Se preparó la muestra según el punto 2.5.7.4 detallado anteriormente en el presente estudio.

2.5.8.2.1.14 Estándar mixto de Ambroxol Clorhidrato y Clenbuterol Clorhidrato: Se preparó la solución estándar mixta según el punto 2.5.7.2 descrito con anterioridad en la presente investigación.

2.5.8.2.1.15 Solución Muestra: Se preparó la solución muestra según lo establecido en el punto 2.5.7.3 descrito anteriormente en el presente estudio.

Filtramos una porción de estas soluciones a través de la membrana de PVDF de 0.45µm hacia los viales HPLC, descartando los primeros tres mililitros. Luego procedimos a realizar la corrida en el equipo HPLC colocando las muestras en el orden que indica la siguiente tabla.

Tabla 4: Número de muestra y número de inyecciones-Especificidad por Identificación		
Muestras	Nº de muestras	Nº de inyecciones
Fase móvil	1	2
Agua	1	2
Buffer	1	2
Acetonitrilo	1	2
Metanol	1	2
Estándar mixto de Ambroxol y Clenbuterol	1	5
Estándar de Ambroxol Clorhidrato	2	2
Estándar de Clenbuterol Clorhidrato	2	2
Metilparabeno	2	2
Propilparabeno	2	2
Glicerol	2	2
Sorbitol solución no Cristalizante	2	2
Propilenglicol	2	2
Ácido cítrico Anhidro	2	2
Citrato de sodio Dihidratado	2	2
Sacarina Sódica Dihidratado	2	2
Sabor a Granadilla	2	2
Placebo	2	2
Estándar mixto de ambroxol y clenbuterol	2	2
Muestra de producto terminado	2	2

2.5.8.2.2 Especificidad por degradación: Se realizó análisis individuales de cada uno de los componentes de la fórmula: placebo, analito (estándar mixto, estándar de ambroxol y estándar de clenbuterol) y producto terminado (solución muestra).

2.5.8.2.2.1 Preparación de la muestra a CONDICIONES NORMALES:

2.5.8.2.2.1.1 Placebo: Pesamos 5,0mL de placebo (\pm 0,0mg Ambroxol Clorhidrato y 0,0mg Clenbuterol Clorhidrato), exactamente

medidos, luego lo trasladamos a un matraz volumétrico de 25mL, diluimos a volumen con diluyente y mezclamos.

- 2.5.8.2.2.1.2 Estándar mixto Ambroxol HCl y Clenbuterol HCl: Se preparó la solución según el punto 2.5.7.2 antes mencionado en el presente informe.
- 2.5.8.2.2.1.3 Solución estándar de Ambroxol Clorhidrato: Se preparó la solución según el punto 2.5.7.5 antes mencionado en el presente informe.
- 2.5.8.2.2.1.4 Solución estándar de Clenbuterol: Se preparó la solución según el punto 2.5.7.6 antes mencionado en el presente informe.
- 2.5.8.2.2.1.5 Solución muestra: Se preparó la solución según el punto 2.5.7.3 mencionado con anterioridad en el presente informe.

2.5.8.2.2.2 Preparación de la muestra sometida a degradación por FOTÓLISIS:

2.5.8.2.2.2.1 Placebo:

- 2.5.8.2.2.2.1.1 Degradación por luz ultravioleta: Trasferimos 5,0mL de placebo, exactamente medidos, a un matraz volumétrico de 25mL, lo cual sometimos a condiciones de degradación a luz ultravioleta por un periodo de 24 horas. Seguidamente continuamos la preparación de la solución placebo según el punto 2.5.7.4 establecidos antes en la presente investigación.
- 2.5.8.2.2.2.1.2 Degradación por luz natural: Transferimos 5,0mL de placebo, exactamente medidos, a un matraz volumétrico de 25mL, luego lo sometimos a condiciones de degradación por luz natural. Seguidamente continuamos la preparación de la solución placebo según el punto 2.5.7.4 que fueron descritos anteriormente en la presente investigación.
- 2.5.8.2.2.2.2 Estándar mixto ambroxol clorhidrato y clenbuterol clorhidrato:
- 2.5.8.2.2.2.2.1 Degradación por luz ultravioleta: Se transfirió 20mg de Clenbuterol clorhidrato a un matraz volumétrico de 100mL, y sometimos a exposición por la lámpara UV (luz UV a

254nm) por 24 horas. Paralelamente transferimos aproximadamente 30mg de Ambroxol clorhidrato a un matraz volumétrico de 100mL, seguidamente sometimos a exposición por lampara UV (luz UV a 254nm) por 24 horas, ambas muestras. Luego continuamos la preparación de la solución estándar según el método antes establecido en el punto 2.5.7.2 de la presente investigación.

- 2.5.8.2.2.2.2 Degradación por luz natural: Transferimos 20mg de Clenbuterol clorhidrato a un matraz volumétrico de 100mL, paralelamente transferimos 30mg de Ambroxol Clorhidrato exactamente pesados a un matraz volumétrico de 100mL y lo sometimos a exposición por luz natural por 24 horas, ambas muestras. Luego del tiempo continuamos la preparación de la solución estándar según la técnica antes establecida en el punto 2.5.7.2 de la presente investigación.
- 2.5.8.2.2.2.3 Solución de Ambroxol Clorhidrato:
- 2.5.8.2.2.2.3.1 Degradación por luz ultravioleta: Pesamos 15mg de Ambroxol clorhidrato, colocamos en un matraz volumétrico de 50mL y lo sometimos a exposición por lampara UV (luz a 254nm) por 24 horas. Luego agregamos 20mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos hasta disolución completa y mezclamos.
- 2.5.8.2.2.2.3.2 Degradación por luz natural: Pesamos 15mg de Ambroxol clorhidrato, colocamos en un matraz volumétrico de 50mL, lo sometimos a exposición por luz natural por 24 horas. Luego del tiempo indicado agregamos 20mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos hasta disolución completa, seguidamente lo llevamos a volumen y mezclamos.
- 2.5.8.2.2.2.4 Solución de Clenbuterol Clorhidrato:
- 2.5.8.2.2.2.4.1 Degradación por luz ultravioleta: Pesamos 20mg de Clenbuterol clorhidrato y colocamos en un matraz volumétrico de 100mL, luego lo sometimos a exposición por lampara UV (luz UV a 254nm) por 24 horas.

Seguidamente continuamos la preparación de la solución estándar según el método antes detallado en el punto 2.5.7.6 de la presente investigación.

2.5.8.2.2.2.4.2 Degradación por luz natural: Pesamos 20mg de Clenbuterol clorhidrato y colocamos en un matraz volumétrico de 100mL, y sometimos a exposición por luz natural a 24 horas. Luego continuamos la preparación de la solución estándar según el método establecido con anterioridad en el punto 2.5.7.6 de la presente investigación.

2.5.8.2.2.2.5 Solución muestra:

2.5.8.2.2.2.5.1 Degradación por luz Ultravioleta: Se transfirió 5,0mL de la muestra a un matraz volumétrico de 25mL y sometimos a exposición por lámpara UV (luz UV a 254nm) durante 24 horas. Luego continuamos la preparación de la solución muestra según el método antes descrito en el punto 2.5.7.3 de la presente investigación.

2.5.8.2.2.2.5.2 Degradación por luz natural: Se transfirió 5,0mL de la muestra a un matraz volumétrico de 25mL y sometimos a exposición por luz natural durante 24 horas. Seguidamente continuamos la preparación de la solución muestra según el método antes detallado en el punto 2.5.7.3 de la presente investigación.

Filtramos una porción de cada solución final a través de la membrana de PVDF de 0.45µm hacia los viales de HPLC, descartando los primeros mililitros y se procedió a realizar la corrida en el cromatógrafo.

2.5.8.2.2.3 Preparación de muestra sometida a degradación por TERMOLISIS.

2.5.8.2.2.3.1 Placebo: Transferimos 5,0mL de placebo a un matraz volumétrico de 25mL, y lo colocamos en la estufa a 70°C por 24 horas, continuamos la preparación de la solución placebo

según la técnica antes establecido en el punto 2.5.7.4 del presente informe.

2.5.8.2.2.3.2 Estándar Mixto Ambroxol clorhidrato y Clenbuterol clorhidrato:

Pesamos 20mg de Clenbuterol clorhidrato, y colocamos en un matraz volumétrico de 100mL, paralelamente pesamos 30mg de Ambroxol clorhidrato y transferimos a un matraz volumétrico de 100mL, seguidamente colocamos en la estufa a 70°C por 24 horas y luego esperamos que la muestra llegue a temperatura ambiente. Posteriormente continuamos la preparación de la solución estándar según el método establecido con anterioridad en el punto 2.5.7.2 del presente informe.

2.5.8.2.2.3.3 Solución de Ambroxol clorhidrato:

Transferimos 15mg de Ambroxol clorhidrato a un matraz volumétrico de 50mL, y colocamos a la estufa a 70°C por 24 horas. Luego esperamos que la muestra llegue a temperatura ambiente. Seguidamente agregamos 20mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos hasta disolución completa, se llevó a volumen y mezclamos.

2.5.8.2.2.3.4 Solución de Clenbuterol clorhidrato:

Transferimos 20mg de Clenbuterol clorhidrato a un matraz volumétrico de 100mL, y colocamos en la estufa a 70°C por 24 horas, luego de esto esperamos que la muestra llegue a temperatura ambiente, y posteriormente continuamos con la preparación de la solución estándar según el método antes establecido en el punto 2.5.7.6 del presente informe.

2.5.8.2.2.3.5 Solución Muestra:

Transferimos 5,0mL de solución muestra a un matraz volumétrico de 25mL y colocamos en la estufa a 70°C por 24 horas, luego se esperó que la muestra llegue a temperatura ambiente y continuamos con la preparación de la solución muestra siguiendo la técnica detallada anteriormente en el punto 2.5.7.3 del presente informe.

Filtramos una porción de cada solución final a través de la membrana de PVDF de 0.45µm hacia los viales de HPLC descartando los primeros mililitros y se procedió a realizar la corrida en el equipo.

2.5.8.2.2.4 Preparación de la muestra sometida a degradación ÁCIDA:

2.5.8.2.2.4.1 Placebo: Transferimos 5,0mL de placebo a un matraz volumétrico de 25mL, agregamos 1mL de Ácido clorhídrico 1N y llevamos a baño María a una temperatura de 60°C, por un periodo de una hora. Pasado el tiempo retiramos y dejamos enfriar a temperatura ambiente, neutralizamos adicionando 1mL de Hidróxido de sodio 1N, posterior a esto continuamos la preparación de la solución placebo según la técnica detallada antes en el punto 2.5.7.4 del presente estudio.

2.5.8.2.2.4.2 Estándar mixto Ambroxol clorhidrato y Clenbuterol clorhidrato: Pesamos 20mg de Clenbuterol clorhidrato en un matraz volumétrico de 100mL, paralelamente transferimos 30mg de Ambroxol clorhidrato en un matraz volumétrico de 100mL, agregamos 1mL de Ácido clorhídrico 1N, llevamos a baño María a 60°C durante una hora. Pasado el tiempo retiramos la muestra y dejamos enfriar a temperatura ambiente, neutralizamos adicionando 1mL de hidróxido de sodio 1N, luego continuamos con la preparación de la solución estándar según el método detallado antes en el punto 2.5.7.2 del presente estudio.

2.5.8.2.2.4.3 Solución de Ambroxol Clorhidrato: Pesamos 15mg de Ambroxol clorhidrato en un matraz volumétrico de 50mL y agregamos 1mL de Ácido clorhídrico 1N, llevamos a baño María a una temperatura de 60°C durante una hora, pasado el tiempo retiramos la muestra y dejamos enfriar a temperatura ambiente, neutralizamos adicionando 1mL de hidróxido de sodio 1N, luego agregamos 20mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos hasta disolución completa, seguidamente llevamos a volumen y mezclamos.

2.5.8.2.2.4.4 Solución de Clenbuterol Clorhidrato: Pesamos 20mg de Clenbuterol clorhidrato a un matraz volumétrico de 100mL, agregamos 1mL de Ácido clorhídrico 1N llevamos a baño María a una temperatura de 60°C por una hora y dejamos enfriar a temperatura ambiente. Pasado el tiempo neutralizamos adicionando 1mL de hidróxido de sodio 1N. Continuamos la preparación de la solución según el método establecido antes en el punto 2.5.7.6 del presente estudio.

2.5.8.2.2.4.5 Solución Muestra: Transferimos 5,0mL de la muestra a un matraz volumétrico de 25mL y agregamos 1mL de Ácido clorhídrico 1N, luego llevamos a baño María a una temperatura de 60°C durante una hora, retiramos y dejamos enfriar a temperatura ambiente, seguidamente neutralizamos adicionando 1mL de hidróxido de sodio 1N y continuamos la solución muestra según la técnica antes establecido en el punto 2.5.73 del presente estudio.

Filtramos una porción de cada solución final a través de la membrana de PVDF de 0.45µm hacia los viales HPLC, descartando los primeros mililitros. Seguidamente procedimos a realizar la corrida en el cromatógrafo.

2.5.8.2.2.5 Preparación de muestras sometidas a degradación ALCALINA:

2.5.8.2.2.5.1 Placebo: Transferimos 5,0mL de placebo a un matraz volumétrico de 25mL, agregamos 1mL de Hidróxido de sodio 1N y llevamos a baño María a una temperatura de 60°C por una hora, retiramos y dejamos enfriar a temperatura ambiente; luego neutralizamos con la adición 1mL de Ácido clorhídrico 1N. Seguidamente continuamos la preparación de la solución placebo según el método antes establecido en el punto 2.5.7.4 de la presente investigación.

2.5.8.2.2.5.2 Estándar mixto de Ambroxol clorhidrato y Clenbuterol clorhidrato: Pesamos 20mg de Clenbuterol clorhidrato en un matraz volumétrico de 100mL, paralelamente pesamos 30mg de Ambroxol clorhidrato en un matraz volumétrico de 100mL,

agregamos 1mL de hidróxido de sodio 1N, luego lo llevamos a baño María a 60°C por una hora. Pasado el tiempo retiramos y dejamos enfriar a temperatura ambiente. Se neutralizó adicionando 1mL de Ácido clorhídrico 1N y continuamos la preparación de la solución estándar según el método antes establecido en el punto 2.5.7.2 de la presente investigación.

2.5.8.2.2.5.3 Solución de Ambroxol clorhidrato: Pesamos 15mg de Ambroxol clorhidrato en un matraz volumétrico de 50mL, agregamos 1mL de Hidróxido de sodio 1N, lo llevamos a baño María a una temperatura de 60°C por una hora. Pasado el tiempo retiramos y dejamos enfriar a temperatura ambiente, neutralizamos adicionando 1mL de Ácido clorhídrico 1N. Luego agregamos 20mL de diluyente y sonicamos por 5min hasta la disolución completa, seguidamente lo llevamos a volumen y mezclamos.

2.5.8.2.2.5.4 Solución de Clenbuterol clorhidrato: Pesamos 20mg de Clenbuterol clorhidrato en un matraz volumétrico de 100mL y agregamos 1mL de Hidróxido de sodio 1N y lo llevamos a baño María a una temperatura de 60°C por una hora. Pasado el tiempo retiramos y dejamos enfriar a temperatura ambiente. Neutralizamos adicionando 1mL de Ácido clorhídrico 1 N y continuamos la preparación de la solución estándar según el método antes establecido en el punto 2.5.7.6 de la presente investigación.

2.5.8.2.2.5.5 Solución Muestra: Transferimos 5,0mL de la muestra a un matraz volumétrico de 25mL y agregamos 1mL de Hidróxido de sodio 1N y lo llevamos a baño María a una temperatura de 60°C por una hora. Transcurrido el tiempo retiramos y dejamos enfriar a temperatura ambiente, luego neutralizamos adicionando 1mL de Ácido Clorhídrico 1 N y continuamos la preparación según el método antes establecido en el punto 2.5.7.3 de la presente investigación.

Filtramos una porción de cada solución final a través de la membrana de PVDF de 0.45µm hacia los viales de HPLC, descartando los primeros mililitros. Seguidamente procedimos a realizar la corrida en el equipo HPLC.

2.5.8.2.2.6 Preparación de muestras sometidas a degradación OXIDATIVA

2.5.8.2.2.6.1 Placebo: Transferimos 5,0mL de placebo a un matraz volumétrico de 25mL y lo protegimos de la luz, luego agregamos 1mL de Peróxido de hidrógeno 30% dejándolo reposar por una hora. Continuamos con la preparación de la solución placebo según la técnica antes detallada en el punto 2.5.7.4 del presente informe.

2.5.8.2.2.6.2 Estándar misto de Ambroxol clorhidrato y Clenbuterol clorhidrato: Pesamos 20mg de Clenbuterol clorhidrato en un matraz volumétrico de 100mL, paralelamente transferimos 30mg de Ambroxol clorhidrato en un matraz volumétrico de 100mL y lo protegimos de la luz, seguidamente agregamos 1mL de Peróxido de hidrógeno 30%, dejamos reposar por durante una hora y continuamos la preparación de la solución estándar según la técnica antes detallada en el punto 2.5.7.2 del presente informe.

2.5.8.2.2.6.3 Solución de Ambroxol clorhidrato: Pesamos 15mg de Ambroxol clorhidrato en un matraz volumétrico de 50mL y lo protegimos de la luz, luego agregamos 1mL de Peróxido de hidrógeno al 30%, lo dejamos reposar por una hora, seguidamente agregamos 20mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos hasta disolución completa, luego llevamos a volumen y mezclamos.

2.5.8.2.2.6.4 Solución de Clenbuterol Clorhidrato: Pesamos 20mg de Clenbuterol clorhidrato en un matraz volumétrico de 100mL protegido de la luz y agregamos 1mL de Peróxido de hidrógeno 30%, luego dejamos reposar por una hora y

continuamos la preparación de la solución según la técnica antes detallada en el punto 2.5.7.6 del presente informe.

2.5.8.2.2.6.5 Solución Muestra: Transferimos 5mL a un matraz volumétrico de 25mL y lo protegimos de la luz, luego agregamos 1mL de peróxido de hidrógeno 30%, dejamos reposar por una hora, posterior a esto continuamos con la preparación de la muestra según la técnica antes detallada en el punto 2.5.7.3 del presente informe.

Filtramos una porción de cada solución final a través de la membrana de PVDF de 0.45µm hacia los viales HPLC, descartando los primeros mililitros. Seguidamente procedimos a realizar la corrida en el cromatógrafo.

Table 5: Número de muestras y número de inyecciones-Especificidad por Degradación

Tipo de degradación	Muestra	Nº de Muestra	Nº de Inyecciones
Condiciones Normales	Placebo	2	2
	Estándar mixto	2	2
	Solución de Ambroxol clorhidrato	2	2
	Solución de Clenbuterol clorhidrato	2	2
	Muestra de producto terminado	2	2
Fotólisis por luz Ultravioleta	Placebo	2	2
	Estándar mixto	2	2
	Solución de Ambroxol clorhidrato	2	2
	Solución de Clenbuterol clorhidrato	2	2
	Muestra de producto terminado	2	2
Fotólisis por luz natural	Placebo	2	2
	Estándar mixto	2	2
	Solución de Ambroxol clorhidrato	2	2
	Solución de Clenbuterol clorhidrato	2	2
	Muestra de producto terminado	2	2
Termólisis	Placebo	2	2

	Estándar mixto	2	2
	Solución de Ambroxol clorhidrato	2	2
	Solución de Clenbuterol clorhidrato	2	2
	Muestra de producto terminado	2	2
Hidrólisis Ácida	Placebo	2	2
	Estándar mixto	2	2
	Solución de Ambroxol clorhidrato	2	2
	Solución de Clenbuterol clorhidrato	2	2
	Muestra de producto terminado	2	2
Hidrólisis Básica	Placebo	2	2
	Estándar mixto	2	2
	Solución de Ambroxol clorhidrato	2	2
	Solución de Clenbuterol clorhidrato	2	2
	Muestra de producto terminado	2	2
Hidrólisis Oxidativa	Placebo	2	2
	Estándar mixto	2	2
	Solución de Ambroxol clorhidrato	2	2
	Solución de Clenbuterol clorhidrato	2	2
	Muestra de producto terminado	2	2

2.5.8.3 Linealidad:

Capacidad que tienen los ensayos de obtener resultados directamente proporcionales a la concentración del analito, dentro de un rango determinado⁶. Este parámetro se divide en linealidad del sistema y linealidad de método.

2.5.8.3.1 Linealidad de sistema: Se preparó tres series de cinco concentraciones con un sistema de estándares al 80%, 90%, 100%, 110% y 120% analizados por triplicado.

2.5.8.3.1.1 Estándar al 80% (Concentración Clenbuterol HCl 0,00016mg/mL y Ambroxol HCl 0,24mg/mL):

2.5.8.3.1.1.1 **Solución 1:** Pesamos 16mg de Clenbuterol clorhidrato y colocamos en un matraz volumétrico de 100mL, luego agregamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos; para finalmente completar a volumen con diluyente y mezclarlo. Seguidamente transferimos 2,0mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100mL y completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.3.1.1.2 **Solución 2:** Pesamos 24mg de Ambroxol clorhidrato y colocamos en un matraz volumétrico de 100mL, adicionamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos hasta disolución completa; posteriormente transferimos 5,0mL de la solución 1, completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.3.1.2 Estándar al 90% (concentración de Clenbuterol HCl 0,00018mg/mL y Ambroxol HCl 0,27mg/mL):

2.5.8.3.1.2.1 **Solución 1:** Pesamos 18mg de Clenbuterol clorhidrato y colocamos en un matraz volumétrico de 100mL, agregamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos, luego completamos a volumen con diluyente y mezclamos. Seguidamente transferimos 2,0mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100mL, completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.3.1.2.2 **Solución 2:** Pesamos 27mg de Ambroxol clorhidrato y colocamos en un matraz volumétrico de 100mL, adicionamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos hasta disolución completa; luego transferimos 5,0mL de la solución 1, completamos a volumen y mezclamos.

2.5.8.3.1.3 Estándar al 100% (concentración Clenbuterol HCl 0,0002mg/mL y Ambroxol HCl 0,3mg/mL):

2.5.8.3.1.3.1 **Solución 1:** Pesar 20mg de Clenbuterol clorhidrato y colocamos en un matraz volumétrico de 100mL, agregamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos, luego completamos a volumen con diluyente y mezclamos. Posteriormente transferimos 2.0mL de la solución anterior a un matraz

volumétrico de 100mL, completamos a volumen con diluyente, y mezclamos.

2.5.8.3.1.3.2 **Solución 2:** Pesamos 30mg de Ambroxol clorhidrato y colocamos en un matraz volumétrico de 100mL, agregamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos hasta disolución completa, luego transferimos 5,0mL de la solución 1, lo cual se completó a volumen con diluyente, y se mezcló.

2.5.8.3.1.4 **Estándar al 110% (concentración de Clenbuterol HCl 0,00022mg/mL y Ambroxol HCl 0,33mg/mL):**

2.5.8.3.1.4.1 **Solución 1:** Pesamos 22mg de Clenbuterol clorhidrato y colocamos en un matraz volumétrico de 100mL, agregamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos, luego completamos a volumen con diluyente y mezclamos. Seguidamente transferimos 2.0mL de la solución anterior, a un matraz volumétrico de 100mL, completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.3.1.4.2 **Solución 2:** Pesamos 33mg de Ambroxol clorhidrato y colocamos en un matraz volumétrico de 100mL; agregamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos hasta disolución completa, posteriormente transferimos 5,0mL de la solución 1, completamos a volumen con diluyente, y mezclamos.

2.5.8.3.1.5 **Estándar 120% (Concentración de Clenbuterol HCl 0,00024mg/mL y Ambroxol HCL 0,36mg/mL):**

2.5.8.3.1.5.1 **Solución 1:** Pesamos 24mg de Clenbuterol clorhidrato y colocamos en un matraz volumétrico de 100mL, agregamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos; luego completamos a volumen con diluyente y mezclamos. Seguidamente transferimos 2,0mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100mL completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.3.1.5.2 **Solución 2:** Transferimos 36mg de Ambroxol clorhidrato y colocamos en un matraz volumétrico de 100mL, agregamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos hasta disolución

completa. Finalmente transferimos 5,0mL de la solución 1, completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

Filtramos una porción de cada solución final a través de la membrana de PVDF de 0.45µm hacia los viales HPLC, descartando los primeros mililitros. Posteriormente se procedió a realizar la corrida en el equipo HPLC.

Tabla 6: Número de muestras y número de inyecciones-Linealidad del Sistema		
Serie 1		
Muestra	Nº de Muestra	Nº de Inyección
Muestra al 80%: M1. Rep. 1	1	1
Muestra al 80%: M2. Rep. 1	1	1
Muestra al 80%: M3. Rep. 1	1	1
Muestra al 90%: M1. Rep. 1	1	1
Muestra al 90%: M2. Rep. 1	1	1
Muestra al 90%: M3. Rep. 1	1	1
Muestra al 100%: M1. Rep. 1	1	1
Muestra al 100%: M2. Rep. 1	1	1
Muestra al 100%: M3. Rep. 1	1	1
Muestra al 110%: M1. Rep. 1	1	1
Muestra al 110%: M2. Rep. 1	1	1
Muestra al 110%: M3. Rep. 1	1	1
Muestra al 120%: M1. Rep. 1	1	1
Muestra al 120%: M2. Rep. 1	1	1
Muestra al 120%: M3. Rep. 1	1	1

De igual forma se realizó la secuencia de la Serie 2, que inicia con la Muestra al 80%: M1. Rep. 2... y termina en Muestra al 120%: M3. Rep. 2. Luego la serie 3 que inicia con la muestra al 80%: M1. Rep. 3... y termina en muestra al 120%: M3. Rep. 3

2.5.8.3.2 Linealidad de Método: El estudio se realizó con la adición del placebo más una cantidad de analito al 80%, 90%, 100%,110% y 120% preparándose muestras por triplicado.

2.5.8.3.2.1 Solución estándar mixto: Se preparó la solución estándar según lo establecido con anterioridad en el punto 2.5.7.2 del presente estudio.

2.5.8.3.2.2 Analito al 80% (Concentración de Clenbuterol 0,00016mg/mL y Ambroxol HCl 0,24mg/mL):

2.5.8.3.2.2.1 Solución 1: Pesamos 16mg de Clenbuterol clorhidrato y colocamos en un matraz volumétrico de 100mL, agregamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos, luego se completó a volumen con diluyente y mezclamos. Posteriormente transferimos 2,0mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100mL donde completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.3.2.2.2 Solución 2: Pesamos 24mg de Ambroxol clorhidrato y colocamos en un matraz de 100mL, agregamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos hasta disolución completa, luego añadimos 20mL de placebo y 5mL de la solución 1, completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.3.2.3 Analito al 90% (Concentración Clenbuterol HCl 0,00018mg/mL y Ambroxol HCl 0,0,27mg/mL):

2.5.8.3.2.3.1 Solución 1: Pesamos 18mg de Clenbuterol clorhidrato y colocamos en un matraz volumétrico de 100mL, agregamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos, se completó a volumen y mezclamos. Seguidamente transferimos 2,0mL de la solución anterior, a un matraz volumétrico de 100mL donde completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.3.2.3.2 Solución 2: Pesamos 27mg de Ambroxol clorhidrato y colocamos en un matraz volumétrico de 100mL, adicionamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos hasta disolución completa; luego añadimos 20mL de placebo y 5,0mL de la solución 1, seguido completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.3.2.4 Analito al 100% (Concentración de Clenbuterol HCl 0,0002mg/mL y Ambroxol HCl 0,3mg/mL):

2.5.8.3.2.4.1 **Solución 1:** Pesamos 20mg de Clenbuterol clorhidrato y colocamos en un matraz volumétrico de 100mL, agregamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos, luego se completó a volumen con diluyente y se mezcló. Transferimos 2,0mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100mL, seguidamente completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.3.2.4.2 **Solución 2:** Transferimos 30mg de Ambroxol clorhidrato y colocamos en un matraz volumétrico de 100mL, agregamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos hasta disolución completa, después añadimos 20mL de placebo y 5,0mL de la solución 1, completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.3.2.5 Analito al 110% (Concentración de Clenbuterol HCl 0,00022mg/mL y Ambroxol HCl 0,33mg/mL):

2.5.8.3.2.5.1 **Solución 1:** Pesamos 22mg de Clenbuterol clorhidrato en un matraz volumétrico de 100mL, agregamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos, completamos a volumen con diluyente y mezclamos. Luego transferimos 2,0mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100mL, después completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.3.2.5.2 **Solución 2:** Pesamos 33mg de Ambroxol clorhidrato en un matraz volumétrico de 100mL, adicionamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos hasta disolución completa; posteriormente añadimos 20mL de placebo y 5,0mL de la solución 1, completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.3.2.6 Analito al 120% (Concentración de Clenbuterol HCl 0,00024mg/mL y Ambroxol HCl 0,36mg/mL):

2.5.8.3.2.6.1 **Solución 1:** Pesamos 24mg de Clenbuterol clorhidrato en un matraz volumétrico de 100mL, agregamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos, luego completamos a volumen con

diluyente y mezclamos. Posterior a ello transferimos 2,0mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100mL donde completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.3.2.6.2 **Solución 2:** Pesamos 36mg de Ambroxol Clorhidrato en un matraz volumétrico de 100mL, adicionamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos hasta disolución completa; después añadimos 20mL de placebo y 5,0mL de la solución 1, completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

Filtramos una porción de cada solución final a través de la membrana de PVDF de 0.45µm hacia los viales del HPLC, descartamos los primeros mililitros. Seguidamente se procedió a realizar la corrida en el equipo HPLC.

Tabla 7: Número de muestras y número de inyecciones-Linealidad del Método		
Muestra	Nº de muestra	Nº de inyección
Estándar Mixto	1	5
Muestra al 80%	3	3
Muestra al 90%	3	3
Muestra al 100%	3	3
Muestra al 110%	3	3
Muestra al 120%	3	3

2.5.8.4 Exactitud de Método:

Nivel de concordancia entre el valor real y el valor medido⁶.Este estudio se realizó con adición del placebo más una cantidad del conocido analito al 80%, 100% y 120%. Se preparó muestras por triplicado.

2.5.8.4.1 Solución mixta: Se preparó la solución estándar según lo detallado antes en el punto 2.5.7.2 del presente estudio.

2.5.8.4.2 Analito al 80% (Concentración de Clenbuterol HCl 0,00016mg/mL y Ambroxol HCl 0,24mg/mL):

2.5.8.4.2.1 Solución 1: Pesamos 16mg de Clenbuterol clorhidrato y colocamos en un matraz volumétrico de 100mL, agregamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos; luego completamos a volumen con diluyente y mezclamos. Seguidamente transferimos 2,0mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100mL donde se completó a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.4.2.2 Solución 2: Pesamos 24mg de Ambroxol clorhidrato y colocamos en un matraz volumétrico de 100mL, después agregamos 20mL de placebo, adicionamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos hasta disolución completa, luego transferimos 5mL de la solución 1, completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.4.3 Analito al 100% (Concentración de Clenbuterol HCl 0,0002mg/mL y Ambroxol HCl 0,3mg/mL):

2.5.8.4.3.1 Solución 1: Pesamos 20mg de Clenbuterol clorhidrato y colocamos en un matraz volumétrico de 100mL, agregamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos; luego completamos a volumen con diluyente y mezclamos. Como siguiente paso transferimos 2,0mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100mL, donde completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.4.3.2 Solución 2: Pesamos 30mg de Ambroxol clorhidrato y colocamos en un matraz volumétrico de 100mL, luego agregamos 20mL de placebo, añadimos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos hasta disolución completa. Seguidamente transferimos 5,0mL de la solución 1, completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.4.4 Analito al 120% (Concentración de Clenbuterol HCL 0,00024mg/mL y Ambroxol HCl 0,36mg/mL)

2.5.8.4.4.1 Solución 1: Pesamos 24mg de Clenbuterol clorhidrato y lo colocamos a un matraz volumétrico de 100mL, agregamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos; luego completamos a volumen con diluyente y mezclamos. Seguido a ello transferimos 2,0mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100mL, completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.4.4.2 Solución 2: Pesamos 36mg de Ambroxol clorhidrato y colocamos en un matraz volumétrico de 100mL; agregamos 20mL de placebo, adicionamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos hasta disolución completa, luego transferimos 5,0mL de la solución 1, completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

Filtramos una porción de cada solución final a través de la membrana de PVDF de 0.45µm hacia los viales de HPLC, descartando los primeros mililitros y se procedió a realizar la corrida en el equipo HPLC.

Tabla 8: Número de muestras y número de inyecciones-Exactitud		
Muestra	Nº de Muestra	Nº de Inyecciones
Estándar Mixto	1	5
Muestra al 80%	3	3
Muestra al 100%	3	3
Muestra al 120%	3	3

2.5.8.5 Precisión del Método:

Capacidad del método de medir el grado de concordancia entre los resultados individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. En este parámetro se considera en tres niveles: repetibilidad (precisión bajo las mismas condiciones operativas durante periodo corto de tiempo), precisión intermedia (dentro de las variaciones del laboratorio: días diferentes, diferente analista y equipo diferentes)⁵.

2.5.8.5.1 Repetibilidad: En el procedimiento se aplicó añadiendo una concentración al 100% de analito y placebo, se preparó muestras por sextuplicado, se comparó con un estándar.

2.5.8.5.1.1 Solución estándar mixta: Preparamos la solución estándar según lo establecido previamente en el punto 2.5.7.2. del presente estudio.

2.5.8.5.1.2 Analito al 100%: (Concentración de Clenbuterol HCl 0,0002mg/mL y Ambroxol HCl 0,3mg/mL)

2.5.8.5.1.2.1 Solución 1: Pesamos 20mg de Clenbuterol clorhidrato en un matraz volumétrico de 100ml, agregamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos; luego completamos a volumen con diluyente y mezclamos. Seguidamente se procedió a transferir 2,0mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100mL, después completamos a volumen y mezclamos.

2.5.8.5.1.2.2 Solución 2: Pesamos 30mg de Ambroxol clorhidrato en un matraz volumétrico de 100mL, adicionamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos hasta disolución completa, luego añadimos 20mL de placebo y 5,0mL de la solución 1, completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

Filtramos una porción de cada solución final a través de la membrana de PVDF de 0.45µm hacia los viales HPLC, descartamos los primeros mililitros. Paso seguido se procedió a realizar la corrida en el equipo HPLC.

Tabla 9: Número de muestra y número de inyecciones – P.		
Repetibilidad		
Muestra	Nº de Muestra	Nº de inyección
Estándar mixto	1	5
Muestra al 100%	6	2

2.5.8.5.2 Precisión intermedia: Realizamos el procedimiento con el producto terminado, donde preparamos muestras por sextuplicado, y se comparó con el estándar, tanto para diferentes analistas como para diferentes equipos.

2.5.8.5.2.1 Solución estándar mixto: Preparamos la solución estándar según lo establecido previamente en el punto 2.5.7.2 del presente informe.

2.5.8.5.2.2 Muestra: Transferimos 5,0mL de la muestra a un matraz volumétrico de 25mL, diluimos a volumen con diluyente y mezclamos.

Filtramos una porción de cada solución final a través de la membrana PVDF de 0.45µm hacia los viales HPLC, descartando los primeros mililitros y seguidamente se procedió a realizar la corrida en el cromatógrafo.

Tabla 10: Número de muestra y número de inyecciones-P.I. Diferente Analista

Tipo	Muestra	Nº de Muestra	Nº de Inyecciones
Diferente analista	Estándar mixto	1	5
	Muestra al 100%	6	2

Tabla 11: Número de muestra número de inyecciones-P.I. Diferente Equipo

Tipo	Muestra	Nº de Muestra	Nº de Inyecciones
Diferentes equipos	Estándar mixto	1	5
	Muestra al 100%	6	2

2.5.8.6 Límite de Detección y Cuantificación:

El límite de detección comprende la cantidad mínima de un analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada. El límite de cuantificación estima la concentración mínima del analito en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptable⁵. En nuestra investigación se aplicó el método por extrapolación a concentración cero, de muestras conteniendo bajas concentraciones del analito.

Preparamos soluciones para cuatro concentraciones por duplicado dentro del intervalo de 12,5% al 75% de las concentraciones de trabajo.

2.5.8.6.1 Solución estándar mixto: Preparamos el estándar según lo previamente detallado en el 2.5.7.2 del presente trabajo.

2.5.8.6.2 Solución al 12,5 (Concentración de Clenbuterol HCl 0,00025mg/mL y Ambroxol HCl 0,0375mg/mL)

2.5.8.6.2.1 Solución 1: Transferimos aproximadamente 25mg de Clenbuterol clorhidrato RS, los cuales fueron pesados exactamente y colocados en un matraz volumétrico de 100mL,

se agregó 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos, se completó a volumen con diluyente y mezclamos. De la solución anterior transferimos 1,0mL exactamente medido a un matraz volumétrico de 10mL y se completó a volumen con el diluyente.

2.5.8.6.2.2 Solución 2: Transferimos aproximadamente 37,5mg de Ambroxol clorhidrato RS, que fueron pesados y colocados en un matraz volumétrico de 10mL, luego adicionamos 5mL del diluyente y sonicamos por 5 minutos hasta disolución completa, seguido completamos a volumen con diluyente y mezclamos. De esta solución se transfirió 1,0mL a un matraz volumétrico de 100mL, añadimos 20mL de placebo y 5mL de la solución 1, después completamos a volumen con diluyente y se mezclamos.

2.5.8.6.3 Solución al 25% (Concentración de Clenbuterol HCl 0,00005mg/mL y Ambroxol HCl 0,075mg/mL)

2.5.8.6.3.1 Solución 1: Se transfirió 25mg de Clenbuterol clorhidrato RS a un matraz volumétrico de 50mL, agregamos 20mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos, luego completamos con diluyente y mezclamos. Seguidamente se procedió a transferir 2,0mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100mL, donde completamos con diluyente y mezclamos. De la solución anterior transferimos 1,0mL a un matraz volumétrico de 10mL, completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.6.3.2 Solución 2: Transferimos 75mg de Ambroxol clorhidrato RS a un matraz volumétrico de 10mL, adicionamos 5mL de diluyente, sonicamos por 5 minutos, luego completamos a volumen con diluyente y mezclamos. Seguidamente transferimos 1,0mL, de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100mL, añadimos 20mL de placebo y 5,0mL de la solución 1, completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.6.4 Solución al 50% (Concentración de Clenbuterol HCl 0,0001mg/mL y Ambroxol HCl 0,15mg/mL)

2.5.8.6.4.1 Solución 1: Transferimos 20mg de Clenbuterol clorhidrato RS, a un matraz volumétrico de 100mL, agregamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos, luego completamos a volumen con diluyente y mezclamos. De la solución anterior transferimos 2,0mL a un matraz volumétrico de 100mL, completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.6.4.2 Solución 2: Transferimos 15mg de Ambroxol clorhidrato RS a un matraz volumétrico de 100mL, adicionamos 5mL de diluyente, sonicamos por 5 minutos, luego añadimos 20mL del placebo y 5,0mL de la solución 1, completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.6.5 Solución al 75% (Concentración de Clenbuterol HCl 0,00015mg/mL y Ambroxol HCl 0,225mg/mL)

2.5.8.6.5.1 Solución 1: Transferimos 15mg de Clenbuterol clorhidrato RS, a un matraz volumétrico de 100mL, agregamos 30mL de diluyente y sonicamos por 5 minutos, luego completamos a volumen con diluyente y mezclamos. De esta solución transferimos 1,0mL a un matraz volumétrico de 50mL, completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.6.5.2 Solución 2: Transferimos 22,5mg de Ambroxol clorhidrato RS, a un matraz volumétrico de 100mL, adicionamos 5mL de diluyente, sonicamos por 5 minutos, seguidamente añadimos 20mL de placebo y 5,0mL de la solución 1, completamos a volumen con diluyente y mezclamos.

Tabla 12: Número de muestras y número de inyecciones-Límite de Detección y Cuantificación		
Muestras	Nº de muestras	Nº de Inyecciones
Estándar mixto	1	5
Muestra al 12,5%	2	2
Muestra al 25%	2	2
Muestra al 50%	2	2
Muestra al 75%	2	2

2.5.8.7 Robustez:

Este parámetro tiene la capacidad en el procedimiento de producir resultados analíticos con exactitud y precisión aceptables bajo variadas condiciones establecidas⁶. Se analizó la muestra al 100% de la concentración en las siguientes condiciones:

2.5.8.7.1 Preparación del estándar mixto en condiciones normales:

Se preparó la solución estándar mixto según lo establecido previamente en el punto 2.5.7.2 de la presente investigación.

2.5.8.7.2 Preparación de la muestra a condiciones normales

Transferimos 5,0mL de muestra ($\pm 0,0002$ de Clenbuterol clorhidrato y 0,3mg de Ambroxol clorhidrato) a un matraz de 25mL, luego diluimos a volumen con diluyente y mezclamos.

2.5.8.7.3 Variación del pH de la fase móvil:

Pasamos de una proporción de fase móvil, buffer pH 3.0: Acetonitrilo: Metanol (60:18:22) a una proporción buffer pH 2.8: Acetonitrilo: Metanol (60:18:22) y buffer pH 3.2: Acetonitrilo: Metanol (60:18:22).

2.5.8.7.4 Condiciones de almacenamiento

Las muestras estuvieron a 24 horas T°C normal, a 24 horas en refrigeración, muestras a 48 horas a T°C normal, a 48 horas en refrigeración.

Filtramos una porción de la solución a través de la membrana de PVDF de 0,45µm descartando los primeros mililitros del filtrado y procedimos a la corrida en el equipo HPLC.

Tabla 13: Número de muestras y número de inyecciones-Robustez			
Variación en metodología	Muestras	Nº de muestras	Nº de Inyecciones
Condición normal	Estándar mixto	1	5
	Muestras	2	2
Variación del pH de la fase móvil: Buffer pH2.8: Acetonitrilo Metanol (60:18:22)	Estándar mixto	1	5
	Muestras	2	2
Condiciones de almacenamiento: Muestras a 24 horas a T°C ambiente y en refrigeración.	Estándar mixto	1	5
	Muestras	2	2
Condiciones de almacenamiento: Muestras a 48 horas de T°C ambiente y en refrigeración.	Estándar mixto	1	5
	Muestras	2	2

2.5.8.8 Rango:

Este parámetro permite la comprensión entre las concentraciones superiores e inferiores del analito, donde aplicando el procedimiento se demuestra que el analito es cuantificado con un nivel satisfactorio de precisión, exactitud y linealidad⁵. En nuestra investigación se tomó los datos de concentración más bajos y más altos obtenidos en

Exactitud y Linealidad con el cual se definió el rango que coincide con estos parámetros.

2.6. Procesamiento de análisis estadísticos

Los datos recolectados fueron usados para el análisis estadístico, donde se vació en el sistema Excel, siendo los cuadros adaptables y de manera entendible con lo cual se procedió a la evaluación de cada parámetro. También se utilizó el formato Minitab 18 como ayuda comparativa en la evaluación.

Entre los cálculos estadísticos para los parámetros de desempeño en la validación de la técnica analítica para la identificación y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución de ambroxol clorhidrato 7,5mg + clenbuterol 0,005mg/5mL en jarabe se utilizaron los siguientes:

- En la Aptitud del sistema: Aplicamos el porcentaje de Desviación Estándar Relativa (RSD%) o conocido también como Coeficiente de Variación (CV).

$$CV\% = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$$

- En la Especificidad: Aplicamos el porcentaje de interferencia entre picos de los excipientes y analitos, los cuales deben cumplir que los picos de excipientes o sustancias producidas por la degradación no interfieran con el pico del analito o que estos sean $\leq 2\%$, asimismo estos picos deben estar claramente identificados.
- En la Linealidad: Se aplicó para este parámetro la prueba estadística de coeficiente de correlación (r), coeficiente de determinación (r^2) donde criterio de aceptación debe ser $r \geq 0,995$ y $r^2 \geq 0,990$. El Test t de Student de verificación de la pendiente "b" o test de linealidad, test estadístico donde el criterio aceptable es $t(\text{experimental}) > t(\text{tablas})$, la prueba es conforme si se rechaza la hipótesis nula ($H_0: b=0$), también debe concluir que estadísticamente la pendiente es significativamente diferente de cero y el intervalo de confianza no debe incluir a cero. Test t de Student de

proporcionalidad o de verificación de la variable independiente “a” (intercepto), donde el criterio de aceptación indica que el $t(\text{tablas}) > t(\text{experimental})$, la prueba es conforme si no se rechaza la hipótesis nula ($H_0: a=0$), para ello debe evidenciar que estadísticamente el intercepto es significativamente igual a cero y el intervalo de confianza debe incluir a cero. Test t Student del coeficiente de correlación (r), este test rechaza la hipótesis nula ($H_0: r=0$), para ello la prueba debe evidenciar que el coeficiente de correlación es significativamente diferente de cero y $t(\text{experimental}) > t(\text{tablas})$, para $n-2$ grados de libertad y nivel de significancia 0,05. Test de normalidad de residuales ($y - y'$), los residuales respecto al eje deben cumplir la hipótesis de distribución normal.

Para la evaluación estadística de los resultados de la linealidad se usó las siguientes ecuaciones:

- Ecuación de la recta: $y = bx + a$

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

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

- Coeficiente de correlación (r)

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

- Test de la verificación de la pendiente b o de la linealidad

- Varianza residual ($S^2_{y,x}$):

$$S^2_{y,x} = \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n - 2}$$

- Varianza de la pendiente (S^2_b)

$$S^2_b = \frac{S^2_{y,x}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

- Desviación estándar de la pendiente (S_b)

$$\sqrt{S^2_b}$$

$S_b =$

- Desviación estándar relativa de la pendiente S_b rel (%)

$$S_b \text{ rel. (\%)} = \frac{S_b}{b} \times 100$$

- Límites de confianza de la pendiente

$$b \pm tS_b$$

- Test de t Student

$$t_{\text{exp}} = \frac{|b|}{S_b}$$

- Test de verificación de la variable independiente (intercepto) o de proporcionalidad **a**.

- Varianza del término independiente (S_a^2)

$$S_a^2 = S_b^2 * \frac{\sum x^2}{n}$$

- Desviación estándar del término independiente (S_a)

$$S_a = \sqrt{S_a^2}$$

- Desviación estándar relativa del término independiente

$$S_a \text{ rel. (\%)} = \frac{S_a}{a} \times 100$$

- Límites de confianza del término independiente

$$a \pm tS_a$$

- Test de t Student

$$t_{\text{exp}} = \frac{|a|}{S_a}$$

- Test estadístico de correlación (r)

Para $H_0: r=0$; $H_1: r=1$; (n-2) grados de libertad

$$i_r = \frac{r\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

- Prueba de normalidad de residuales de linealidad, aplicamos la prueba de hipótesis: donde la hipótesis nula(H_0): Los residuales tienen distribución normal y la Hipótesis alternativa (H_A): Los residuales no tienen distribución normal. El nivel de significancia $\alpha=0.05$ y si $p\text{-value}<0.05$, se rechaza la hipótesis nula.
- o En la Exactitud: Aplicamos el porcentaje de recuperación, prueba estadística donde el criterio de aceptación es de 98% a 102%. Asimismo, el coeficiente de variación (CV) o Desviación Estándar Relativa (RSD%), el cual el valor aceptable es $\leq 2\%$; Test t de Student (para n-1 grados de libertad y $p=0,5$) donde debe cumplir que el $t(\text{experimental}) < t(\text{tablas})$. Para estos cálculos se emplea las siguientes ecuaciones:

- Porcentaje de recuperación(%R):

$$\%R = \frac{(\text{mg analito hallado}) \times 100}{(\text{mg analito añadido})}$$

- Coeficiente de Variación (CV) o Desviación relativa estándar (RSD%)

$$CV\% = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$$

- T de Student

$$t_{exp} = \frac{|100 - \%R_{prom}| \sqrt{n}}{CV}$$

- o En la Precisión del método: Aplicamos la Desviación Estándar Relativa (RSD%) o Coeficiente de variación (CV), donde no debe ser mayor al 2% para estándares en inyecciones repetidas. La aptitud del sistema que anteriormente se ha calculado. La Prueba de Normalidad (Anderson Darling), donde los resultados de cada secuencia deben cumplir la hipótesis de distribución normal. La Prueba de Igualdad de Varianzas (Prueba F y prueba de Bartlett), donde el resultado de comparación de secuencias de igualdad de varianzas es aceptable de acuerdo al resultado final de la prueba de medias, y se considera que, si $p\text{-value} > 0.05$, no se rechaza la hipótesis nula y se considera que estadísticamente las varianzas son

iguales. La Prueba de medias: Análisis de varianza (ANOVA) y t de 2 muestras, donde se realiza por diferentes equipos y analistas, por el método de ANOVA (Analysis Of Variance) para tres grupos de muestras o más y t de dos muestras para comparación de dos grupos; para ello se debe aceptar la hipótesis nula (H_0 : las medias de los grupos son iguales) y si p-value es $> 0,5$ entonces se considera el resultado conforme. Agrupación por el método de Games – Howel y el método de Tukey, esta prueba estadística se aplica a 3 o más grupo de muestras, la prueba es conforme si los grupos de muestras tienen la misma agrupación. Asimismo, se halla y registra el Límite de confianza de los resultados individuales y límite de confianza de los resultados promedios.

Los cálculos emplean las siguientes ecuaciones y condiciones:

- Coeficiente de variación (CV) o Desviación Estándar Relativa (RSD%)

$$CV\% = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$$

- Prueba de normalidad:

Prueba de hipótesis: Hipótesis nula (H_0) e Hipótesis alternativa (H_A).

H_0 : Los datos tienen distribución normal

H_A : Los datos no tienen distribución normal

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Si p-value < 0.05 , se rechaza la hipótesis nula.

- Prueba de igualdad de varianzas:

Prueba de hipótesis:

H_0 = Todas las varianzas son iguales

H_A = Al menos alguna varianza es diferente

Nivel de significancia es $\alpha = 0.05$

Si p-value < 0.05 ; se rechaza la hipótesis nula.

- Prueba de Análisis de varianza (ANOVA)

Prueba de hipótesis:

H_0 : La media de los equipos son iguales

H_A : la media de los equipos es estadísticamente diferentes

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Si $p\text{-value} < 0.05$, se rechaza la hipótesis nula.

- Límite de confianza de los resultados individuales

$$X \pm tS$$

- Límite de confianza de los resultados promedios

$$X \pm tS/\sqrt{n}$$

- o Para Límite de cuantificación y detección: La prueba estadística que aplicamos fue el coeficiente de correlación (r) con criterio de aceptación es $\geq 0,995$ y coeficiente de determinación (r^2) donde el criterio de aceptación es $\geq 0,990$. Las ecuaciones que se utilizan para estos cálculos son:

- Límite de detección:

$$LD = \frac{y_{bl} + 3s_{bl}}{b} \cdot \frac{1}{\sqrt{n}}$$

- Límite de Cuantificación:

$$LC = \frac{y_{bl} + 10s_{bl}}{b} \cdot \frac{1}{\sqrt{n}}$$

- o Para robustez: Aplicamos el promedio (\bar{X}), CV, calculamos el porcentaje de alteración, donde el criterio de aceptación es $\leq 2\%$.

Las ecuaciones calculadas fueron:

- mg del analito encontrado:

$$\text{mg analito hallado} = \frac{\text{Amp}}{A_{st}} \times F_{st} \times F_{mp}$$

$$F_{st} = \frac{w_{st}}{100} \times \frac{P_{ot.S_t}}{100}$$

$$F_{mp} = \frac{25}{V_{mp}} \times 5$$

- Porcentaje del analito (%p.a.)

$$\%p.a. = \frac{\text{mg analito hallado}}{\text{mg analito a\u00f1adido}} \times 100$$

- Porcentaje de alteraci\u00f3n

$$\%alteraci\u00f3n = \%p.a. \text{ normal} - \%p.a. \text{ alterado}$$

- o Para rango: Se tom\u00f3 los datos de concentraci\u00f3n m\u00e1s bajos y m\u00e1s altos obtenidos en Exactitud y Linealidad; y luego al comparar definiremos si el rango coincide con este par\u00e1metro.

2.7. Aspectos \u00e9ticos

De acuerdo a la investigaci\u00f3n detallada anteriormente y siguiendo las normas \u00e9ticas, se considera el principio de no maleficencia, donde lo primordial es no causar da\u00f1o. Bajo este principio damos fe de no haber perjudicado ni afectado en ninguna circunstancia al medio ambiente. En ese sentido, los desechos de sustancias y materiales org\u00e1nicos utilizados en el presente trabajo siguen los criterios de protocolo de bioseguridad de laboratorios S.J. Roxfarma para la eliminaci\u00f3n de estos.¹⁷

III. RESULTADOS

Al realizar los procedimientos de Validación se obtuvieron los siguientes resultados:

3.1. Aptitud del sistema

Tabla 14: Evaluación de los resultados de la aptitud de sistema cromatográfico de Ambroxol

Parámetro	Límites	Resultados
Aptitud del Sistema	Áreas CV ≤ 2.0%	Estándar 1: 0.08% Estándar 2: 0.09%
	Tiempos de Retención(min) CV ≤ 2.0%	Estándar 1: 0.63% Estándar 2: 0.06%
	Asimetría < 2.0	Estándar 1: 1.69 Estándar 2: 1.70
	Platos teóricos > 1000	Estándar 1: 19363.7 Estándar 2: 19136.5

Tabla 15: Resultados de la aptitud del sistema cromatográfico de Ambroxol.

Inyección	Estándar 1				Estándar 2			
	Áreas	Tiempo de Retención (min)	Asimetría	Platos teóricos	Áreas	Tiempo de Retención (min)	Asimetría	Platos teóricos
1	118.2137	42.450	1.6850	19364	118.8056	42,400	1.7058	19158
2	118.3111	42.443	1.6774	19294	118.7309	42.416	1.7056	19230
3	118.3341	42.450	1.6882	19398	118.7475	42.408	1.7096	19185
4	118.3373	42.436	1.6855	19544	118.6410	42.368	1.7089	19219
5	118.3572	42.405	1.6942	19362	118.8068	42.425	1.6803	19006
6	118.2771	42.375	1.7059	19220	118.9456	42.435	1.6938	19021
Promedio	118.2771	42.426	1.6893	19363	118.7796	42.408	1.7021	19136
CV%	0.08	0.63	0.58	0.56	0.09	0.06	0.50	0.52

Tabla 16: Evaluación de los resultados de la aptitud del sistema cromatográfico de Clenbuterol

Parámetro	Límites	Resultados
Aptitud del sistema	Áreas CV ≤ 2%	Estándar 1: 0.13% Estándar 2: 0.26%
	Tiempos de Retención(min) CV ≤ 2%	Estándar 1: 0.39% Estándar 2: 0.06%
	Asimetría < 2.0	Estándar 1: 1.15 Estándar 2: 1.16
	Platos teóricos >1000	Estándar 1: 15992.8 Estándar 2: 16215.8

Tabla 17: Resultados de la aptitud del sistema cromatográfico de Clenbuterol.

Nº Inyección	Estándar 1				Estándar 2			
	Áreas	Tiempos de retención (min)	Asimetría	Platos teóricos	Áreas	Tiempos de retención (min)	Asimetría	Platos teóricos
1	2.4115	22.142	1.1504	16197	2.3978	22.112	1.1386	16187
2	2.4117	22.133	1.1443	16152	2.3986	22.132	1.1479	16302
3	2.4148	22.142	1.1448	16173	2.3918	22.135	1.1557	16318
4	2.4116	22.142	1.1408	15565	2.3832	22.100	1.1665	16236
5	2.4109	22.110	1.1594	15748	2.3954	22.120	1.1749	16315
6	2.4189	22.100	1.1600	16122	2.4001	22.128	1.1542	15937
Promedio	2.4132	22.128	1.1499	15992	2.3945	22.121	1.1563	16215
CV%	0.13	0.39	0.71	1.68	0.26	0.06	1.12	0.90

3.2 Especificidad

3.2.1 Especificidad por Identificación:

Tabla 18: Evaluación de los resultados de Especificidad por identificación.

Parámetro	Límites	Resultado	
		Ambroxol	Clenbuterol
Soluciones de la fase móvil: (agua, metanol, fase móvil)	- No hay interferencia con el pico de Ambroxol HCL. - No hay interferencia con el pico de Clenbuterol HCL	No hay interferencia	No hay interferencia
Componentes de la fórmula: ➤ Estándar mixto ➤ Analito: Ambroxol HCl Clenbuterol HCl. ➤ Otros: Metilparabeno, propilparabeno, glicerol, sorbitol,	- Se identifican picos para Ambroxol HCl y Clenbuterol HCl. - Se identifican los picos de Ambroxol HCl. - Se identifica picos de Clenbuterol HCl. - No hay interferencia con	(+) Tiempo de retención :47.4 min. (+) Tiempo de retención:47.4 min.	(+) Tiempo de retención: 22.9 min. (+) Tiempo de retención: 22.9 min.

<p>propilenglicol, ácido cítrico, citrato de sodio, sacarina sódica, alcohol bencílico, sabor granadilla.</p>	<p>el pico de Ambroxol HCL.</p> <p>- No hay interferencia con el pico de Clenbuterol HCl.</p>		<p>No hay interferencia.</p>
<p>Soluciones de trabajo:</p> <p>➤ Estándar Mixto</p> <p>Ambroxol HCl</p> <p>Clenbuterol HCl</p> <p>➤ Producto terminado: (Ácido cítrico, sacarina sódica, sabor granadilla, propilparabeno, metilparabeno, ambroxol HCl, clenbuterol HCl).</p>	<p>- Se identifican los picos de Ambroxol HCl y Clenbuterol HCl.</p> <p>- No hay interferencia para el pico de Ambroxol HCl.</p> <p>- No hay interferencia para el pico de Clenbuterol HCl.</p>	<p>(+) Tiempo de retención: 47.7 min.</p> <p>No hay interferencia.</p> <p>(+) Tiempo de retención: 47.7 min.</p>	<p>(+) Tiempo de retención: 23.1 min.</p> <p>No hay interferencia.</p> <p>(+) Tiempo de retención: 23.0 min.</p>
<p>Placebo: (Ácido cítrico, sacarina sódica, sabor granadilla, propilparabeno, metilparabeno, ambroxol HCl, clenbuterol HCl).</p>	<p>- No hay interferencia con el pico de Ambroxol HCl.</p> <p>- No hay presencia del pico de Ambroxol HCl por ser placebo.</p>	<p>No hay interferencia.</p> <p>Tiempo de retención: -</p>	

	<ul style="list-style-type: none"> - No hay interferencia con el pico de Clenbuterol HCl. - No hay presencia de pico de clenbuterol HCl por ser placebo. 		<p>No hay interferencia.</p> <p>Tiempo de retención: -</p>
--	--	--	--

3.2.2 Especificidad por Degradación:

Tabla 19: Evaluación de resultados de Especificidad por Degradación

Parámetro	Límites	Resultados					
		Ambroxol			Clenbuterol		
Condición		Placebo	Analito	Producto terminado	Placebo	Analito	Producto terminado
Normal	≤ 2.0%	0.0%	0.8%	0.1%	0.0%	1.7%	0.6%
Hidrólisis ácida	≤ 2.0%	0.0%	1.3%	1.0%	0.0%	24.4%	3.5%
Hidrólisis básica	≤ 2.0%	0.0%	0.4%	0.6%	0.0%	5.7%	5.1%
Oxidativa	≤ 2.0%	0.0%	79.2%	0.6%	0.0%	31.2%	0.5%
Termólisis	≤ 2.0%	0.0%	0.5%	0.2%	0.0%	1.8%	1.3%
Fotólisis UV. 24 horas	≤ 2.0%	0.0%	0.6%	0.5%	0.0%	8.2%	0.5%
Fotólisis Luz natural 24 horas	≤ 2.0%	0.0%	0.9%	0.7%	0.0%	8.9%	7.4%

Tabla 20: Resultados de Especificidad por degradación de Ambroxol.

Muestras		Analito Añadido		Áreas	mg Analito Hallado	% Interferencia	% Promedio Interferencia	Criterio de Aceptación		
Condiciones Normales	Analito	mp1.1	30.285 mg		642.058	30.35 mg	0.22	0.8	≤ 2.0%	
		mp1.2	30.285 mg		642.123	30.35 mg	0.23			
		mp2.1	30.365 mg		651.170	30.78 mg	1.37			
		mp2.2	30.365 mg		651.004	30.77 mg	1.34			
	Muestra	Volumen	Concentración	Áreas	mg/5mL	% Interf.	% Prom.			
	Producto Terminado	mp1.1	5 mL	7.5mg/5mL		635.911	7.515	0.1		0.1
		mp1.2	5 mL	7.5mg/5mL		636.101	7.517	0.1		
		mp2.1	5 mL	7.5mg/5mL		637.424	7.533	0.1		
		mp2.2	5 mL	7.5mg/5mL		636.709	7.524	0.0		
	Degradación por Hidrólisis (Ácida)	Interferencia x Placebo	mp1	5.0mL		0.00000	-	0.00		0.0
mp2			5.0mL		0.00000	-	0.00			
Analito		mp1.1	30.165 mg		629.408	29.75 mg	1.37	1.3		
		mp1.2	30.165 mg		629.337	29.75 mg	1.38			
		mp2.1	30.170 mg		630.159	29.79 mg	1.27			
		mp2.2	30.170 mg		631.759	29.86 mg	1.02			
Muestra		Volumen	Concentración	Áreas	mg/5mL	% Interf.	% Prom.			
Producto Terminado		mp1.1	5 mL	7.5mg/5mL		641.423	7.580	0.8	1.0	
		mp1.2	5 mL	7.5mg/5mL		640.843	7.573	0.7		
		mp2.1	5 mL	7.5mg/5mL		645.202	7.625	1.4		
	mp2.2	5 mL	7.5mg/5mL		644.887	7.621	1.3			
Degradación por Hidrólisis (Básica)	Interferencia x Placebo	mp1	5.0mL		0.00000	-	0.00	0.0	≤ 2.0%	
		mp2	2.0mL		0.00000	-	0.00			
	Analito	mp1.1	30.120 mg		635.728	30.05 mg	0.23	0.4		
		mp1.2	30.120 mg		634.006	29.97 mg	0.50			
		mp2.1	30.115 mg		641.251	30.31 mg	0.66			
		mp2.2	30.115 mg		638.501	30.18 mg	0.22			
	Muestra	Volumen	Concentración	Áreas	mg/5mL	% Interf.	% Prom.			
	Producto Terminado	mp1.1	5 mL	7.5mg/5mL		634.498	7.498	0.3		0.6
		mp1.2	5 mL	7.5mg/5mL		633.501	7.486	0.5		
		mp2.1	5 mL	7.5mg/5mL		632.041	7.469	0.7		
mp2.2		5 mL	7.5mg/5mL		631.971	7.468	0.7			
Degradación Oxidativa	Interferencia x Placebo	mp1	5.0mL		0.00000	-	0.00	0.0	≤ 2.0%	
		mp2	5.0mL		0.00000	-	0.00			
	Analito	mp1.1	30.045 rrg		130.927	6.19 mg	79.40	79.2		
		mp1.2	30.045 rrg		132.997	6.29 mg	79.08			
		mp2.1	30.065 rrg		133.246	6.30 mg	79.05			
		mp2.2	30.065 rrg		130.622	6.17 mg	79.46			
	Muestra	Volumen	Concentración	Áreas	mg/5mL	% Interf.	% Prom.			
	Producto Terminado	mp1.1	5 mL	4.6mg/5mL		395.536	4.674	1.2		0.6
		mp1.2	5 mL	4.6mg/5mL		391.198	4.623	0.1		
		mp2.1	5 mL	4.6mg/5mL		390.312	4.613	0.1		
mp2.2		5 mL	4.6mg/5mL		386.269	4.565	1.2			
Degradación por Terrólisis	Interferencia x Placebo	mp1	5.0mL		0.00000	-	0.00	0.0	≤ 2.0%	
		mp2	5.0mL		0.00000	-	0.00			
	Analito	mp1.1	30.440 rrg		640.236	30.26 mg	0.58	0.5		
		mp1.2	30.440 rrg		639.895	30.25 mg	0.63			
		mp2.1	30.460 rrg		646.200	30.55 mg	0.28			
		mp2.2	30.460 rrg		647.252	30.60 mg	0.45			
	Muestra	Volumen	Concentración	Áreas	mg/5mL	% Interf.	% Prom.			
	Producto Terminado	mp1.1	5 mL	7.5mg/5mL		629.752	7.442	0.3		0.2
		mp1.2	5 mL	7.5mg/5mL		632.240	7.472	0.1		
		mp2.1	5 mL	7.5mg/5mL		631.519	7.463	0.0		
mp2.2		5 mL	7.5mg/5mL		632.876	7.479	0.2			

Muestras		Analito Añadido		Áreas	mg Analito Hallado	% Interferencia	% Promedio Interferencia	Criterio de Aceptación	
Degradación por Fotólisis	Interferencia x Placebo	mp1	5.0mL	0.00000	-	0.00	0.0	≤ 2.0%	
		mp2	5.0mL	0.00000	-	0.00			
	Analito	mp1.1	30.355 mg	640.889	30.30 mg	0.20	0.6		
		mp1.2	30.355 mg	650.750	30.76 mg	1.34			
		mp2.1	30.375 mg	645.873	30.53 mg	0.51			
mp2.2		30.375 mg	639.542	30.23 mg	0.47				
Lámpara UV (Luz UV a 254nm) por 24 Horas	Muestra		Volumen	Concentración	Áreas	mg/5mL	% Interf.		%Prom.
	Producto Terminado	mp1.1	5 mL	7.5mg/5mL	635.837	7.514	0.5		0.5
		mp1.2	5 mL	7.5mg/5mL	633.946	7.492	0.2		
		mp2.1	5 mL	7.5mg/5mL	626.410	7.403	1.0		
		mp2.2	5 mL	7.5mg/5mL	633.663	7.488	0.2		
Degradación por Fotólisis	Interferencia x Placebo	mp1	5.0mL	0.00000	-	0.00	0.0	≤ 2.0%	
		mp2	5.0mL	0.00000	-	0.00			
	Analito	mp1.1	30.380 mg	647.572	30.61 mg	0.76	0.9		
		mp1.2	30.380 mg	635.345	30.03 mg	1.14			
		mp2.1	30.405 mg	636.964	30.11 mg	0.97			
mp2.2		30.405 mg	639.237	30.22 mg	0.62				
Luz Natural por 24 Horas	Muestra		Volumen	Concentración	Áreas	mg/5mL	% Interf.		%Prom.
	Producto Terminado	mp1.1	5 mL	7.5mg/5mL	640.880	7.574	0.7		0.7
		mp1.2	5 mL	7.5mg/5mL	641.638	7.583	0.8		
		mp2.1	5 mL	7.5mg/5mL	639.868	7.562	0.5		
		mp2.2	5 mL	7.5mg/5mL	641.335	7.579	0.8		

Tabla 21: Resultados de Especificidad por degradación de Clenbuterol.

Muestras		Analito Añadido		Áreas	mg Analito Hallado	% Interferencia	% Promedio Interferencia	Criterio de Aceptación		
Condiciones Normales	Analito	mp1.1	20.130 mg		13.113	20.37 mg	1.17	1.7	≤2.0%	
		mp1.2	20.130 mg		13.164	20.44 mg	1.56			
		mp2.1	20.155 mg		13.330	20.70 mg	2.72			
		mp2.2	20.155 mg		13.175	20.46 mg	1.53			
	Muestra	Volumen	Concentración	Áreas	mg/5mL	% Interf.	%Prom.			
	Producto Terminado	mp1.1	5 mL	0.005mg/5mL		13.027	0.0051	1.2		0.6
		mp1.2	5 mL	0.005mg/5mL		13.229	0.0051	0.4		
		mp2.1	5 mL	0.005mg/5mL		13.255	0.0051	0.6		
mp2.2		5 mL	0.005mg/5mL		13.216	0.0051	0.3			
Degradación por Hidrólisis (Ácida)	Interferencia x Placebo	mp1	5.0mL		0.00000	-	0.00	0.0	≤2.0%	
		mp2	5.0mL		0.00000	-	0.00			
	Analito	mp1.1	20.155 mg		9.733	15.12 mg	25.00	24.4		
		mp1.2	20.155 mg		9.736	15.12 mg	24.98			
		mp2.1	20.180 mg		9.866	15.32 mg	24.07			
		mp2.2	20.180 mg		9.918	15.40 mg	23.66			
	Muestra	Volumen	Concentración	Áreas	mg/5mL	% Interf.	%Prom.			
	Producto Terminado	mp1.1	5 mL	0.005mg/5mL		12.765	0.0050	3.2		3.5
mp1.2		5 mL	0.005mg/5mL		12.673	0.0049	3.9			
mp2.1		5 mL	0.005mg/5mL		12.743	0.0049	3.3			
mp2.2		5 mL	0.005mg/5mL		12.698	0.0049	3.7			
Degradación por Hidrólisis (Básica)	Interferencia x Placebo	mp1	5.0mL		0.00000	-	0.00	0.0	≤2.0%	
		mp2	5.0mL		0.00000	-	0.00			
	Analito	mp1.1	20.105 mg		12.140	18.85 mg	6.22	5.7		
		mp1.2	20.105 mg		12.111	18.81 mg	6.44			
		mp2.1	20.130 mg		12.321	19.14 mg	4.94			
		mp2.2	20.130 mg		12.271	19.06 mg	5.32			
	Muestra	Volumen	Concentración	Áreas	mg/5mL	% Interf.	%Prom.			
	Producto Terminado	mp1.1	5 mL	0.005mg/5mL		12.538	0.0049	4.9		5.1
mp1.2		5 mL	0.005mg/5mL		12.482	0.0048	5.3			
mp2.1		5 mL	0.005mg/5mL		12.457	0.0048	5.5			
mp2.2		5 mL	0.005mg/5mL		12.577	0.0049	4.6			
Degradación Oxidativa	Interferencia x Placebo	mp1	5.0mL		0.00000	-	0.00	0.0	≤2.0%	
		mp2	5.0mL		0.00000	-	0.00			
	Analito	mp1.1	20.145 mg		9.051	14.06 mg	30.22	31.2		
		mp1.2	20.145 mg		8.828	13.71 mg	31.94			
		mp2.1	20.090 mg		8.811	13.68 mg	31.88			
		mp2.2	20.090 mg		8.982	13.95 mg	30.56			
	Muestra	Volumen	Concentración	Áreas	mg/5mL	% Interf.	%Prom.			
	Producto Terminado	mp1.1	5 mL	0.005mg/5mL		13.270	0.0052	0.4		0.5
mp1.2		5 mL	0.005mg/5mL		13.403	0.0052	0.6			
mp2.1		5 mL	0.005mg/5mL		13.386	0.0052	0.5			
mp2.2		5 mL	0.005mg/5mL		13.228	0.0051	0.7			
Degradación por Termólisis	Interferencia x Placebo	mp1	5.0mL		0.00000	-	0.00	0.0	≤2.0%	
		mp2	5.0mL		0.00000	-	0.00			
	Analito	mp1.1	20.110 mg		13.077	20.31 mg	0.99	1.8		
		mp1.2	20.110 mg		13.057	20.28 mg	0.84			
		mp2.1	20.125 mg		13.291	20.64 mg	2.57			
		mp2.2	20.125 mg		13.299	20.66 mg	2.63			
	Muestra	Volumen	Concentración	Áreas	mg/5mL	% Interf.	%Prom.			
	Producto Terminado	mp1.1	5 mL	0.005mg/5mL		14.515	0.0056	0.8		1.3
mp1.2		5 mL	0.005mg/5mL		14.661	0.0057	1.8			
mp2.1		5 mL	0.005mg/5mL		14.126	0.0055	1.9			
mp2.2		5 mL	0.005mg/5mL		14.284	0.0055	0.8			

Muestras		Analito Añadido		Áreas	mg Analito Hallado	% Interferencia	% Promedio Interferencia	Criterio de Aceptación	
Degradación por Fotólisis	Interferencia x Placebo	mp1	5.0mL	0.00000	-	0.00	0.0	≤ 2.0%	
		mp2	5.0mL	0.00000	-	0.00			
	Analito	mp 1.1	20.120 mg	14.296	22.20 mg	10.35	8.2		
		mp 1.2	20.120 mg	14.011	21.76 mg	8.15			
		mp 2.1	20.135 mg	13.855	21.52 mg	6.87			
mp 2.2		20.135 mg	13.907	21.60 mg	7.27				
Muestra		Volumen	Concentración	Áreas	mg/5mL	% Interf.	%Prom.		
Producto Terminado	mp 1.1	5 mL	0.005mg/5mL	14.340	0.0056	0.8	0.5		
	mp 1.2	5 mL	0.005mg/5mL	14.264	0.0055	0.2			
	mp 2.1	5 mL	0.005mg/5mL	14.090	0.0055	1.0			
	mp 2.2	5 mL	0.005mg/5mL	14.226	0.0055	0.0			
Degradación por Fotólisis	Interferencia x Placebo	mp1	5.0mL	0.00000	-	0.00	0.0	≤ 2.0%	
		mp2	5.0mL	0.00000	-	0.00			
	Analito	mp 1.1	20.020 mg	14.102	21.90 mg	9.40	8.9		
		mp 1.2	20.020 mg	14.195	22.05 mg	10.12			
		mp 2.1	20.115 mg	13.960	21.68 mg	7.79			
mp 2.2		20.115 mg	14.009	21.76 mg	8.16				
Muestra		Volumen	Concentración	Áreas	mg/5mL	% Interf.	%Prom.		
Luz Natural por 24 Horas	Producto Terminado	mp 1.1	5 mL	0.005mg/5mL	14.296	0.006	8.5		7.4
		mp 1.2	5 mL	0.005mg/5mL	14.285	0.006	8.4		
		mp 2.1	5 mL	0.005mg/5mL	13.998	0.005	6.2		
		mp 2.2	5 mL	0.005mg/5mL	14.073	0.005	6.8		

3.3 Linealidad

3.3.1 Linealidad del sistema

Tabla 22: Evaluación de Resultados de la Linealidad del Sistema

Parámetro	Límites	Resultados		
Linealidad de sistema		Serie 1	Serie 2	Serie 3
- Ecuación de la recta	$y=bx + a$	A: $y=384.1040X + (2.3593)$ C: $y=11690.60X + (0.0051)$	A: $y=382.7548X + (2.7720)$ C: $y=11626.18X + (0.0507)$	A: $y=387.0380X + (1.5807)$ C: $Y=11700.29X + (0.0313)$
- Coeficiente de Correlación (r)	$r \geq 0.995$	A: 0.9997 C: 0.9996	A: 0.9993 C: 0.9991	A: 0.9990 C: 0.9989
- Coeficiente de Determinación (r^2)	$r^2 \geq 0.990$	A: 0.9995 C: 0.9992	A: 0.9987 C: 0.9981	A: 0.9979 C: 0.9978
- Test estadístico T Student de verificación de la pendiente "b" o de Linealidad	$T_{exp} > T_{tablas}$	A: $T_{exp}=155.554$ $T_{tablas}=2.160$ C: $T_{exp}=124.760$ $T_{tablas}=2.160$	A: $T_{exp}=98.858$ $T_{tablas}=2.160$ C: $T_{exp}=83.314$ $T_{tablas}=2.160$	A: $T_{exp}=79.395$ $T_{tablas}=2.160$ C: $T_{exp}=77.287$ $T_{tablas}=2.160$
- Test estadístico T Student de verificación de la variable independiente(intercepto) o de la proporcionalidad "a"	$T_{exp} < T_{tablas}$	A: $T_{exp}=0.817$ $T_{tablas}=2.160$ C: $T_{exp}=0.069$ $T_{tablas}=2.160$	A: $T_{exp}=0.612$ $T_{tablas}=2.160$ C: $T_{exp}=0.464$ $T_{tablas}=2.160$	A: $T_{exp}=0.277$ $T_{tablas}=2.160$ C: $T_{exp}=0.264$ $T_{tablas}=2.160$

- Test estadístico T Student del Coeficiente de Correlación (r)	Tr > Ttablas	A: Tr= 155.554 Ttablas=2.160 C: Tr= 124.760 Ttablas=2.160	A: Tr= 98.858 Ttablas=2.160 C: Tr =83.314 Ttablas=2.160	A: Tr= 79.395 Ttablas=2.160 C: Tr=77.287 Ttablas=2.160
- Test Distribución normal de los residuales	Valor p ≥ 0.05	A: Valor p =0.109 C: Valor p = 0.79	A: Valor p =0.838 C: Valor p=0.802	A: Valor p=0.760 C: Valor p = 0.95

A: Ambroxol C: Clenbuterol

Tabla 23: Resultados de la Linealidad del sistema para Ambroxol - Serie 1

Concentración Teórica	Muestras	mg/mL	Áreas	xy	x ²	y ²
		(x)	(y)			
80%	mp1.1	0.240483	95.0600019	22.86034961	0.05783	9036.4
	mp2.1	0.240933	94.9396638	22.87409470	0.05805	9013.5
	mp3.1	0.241782	95.0819590	22.98912523	0.05846	9040.6
90%	mp1.1	0.271805	106.5611919	28.96388128	0.07388	11355.3
	mp2.1	0.272455	106.8758994	29.11882721	0.07423	11422.5
	mp3.1	0.271156	106.5803451	28.89987235	0.07353	11359.4
100%	mp1.1	0.303427	118.3525343	35.91131537	0.09207	14007.3
	mp2.1	0.302977	118.5000891	35.90281038	0.09180	14042.3
	mp3.1	0.302428	118.2634326	35.76612254	0.09146	13986.2
110%	mp1.1	0.331352	130.1716420	43.13257079	0.10979	16944.7
	mp2.1	0.331501	130.3151710	43.19965902	0.10989	16982.0
	mp3.1	0.331751	130.5214761	43.30065045	0.11006	17035.9
120%	mp1.1	0.362773	141.1401684	51.20187195	0.13160	19920.5
	mp2.1	0.362873	141.6293776	51.39349413	0.13168	20058.9
	mp3.1	0.363223	141.7400402	51.48321498	0.13193	20090.2
Σ		4.53092	1775.7	546.99786	1.39626	214295.7

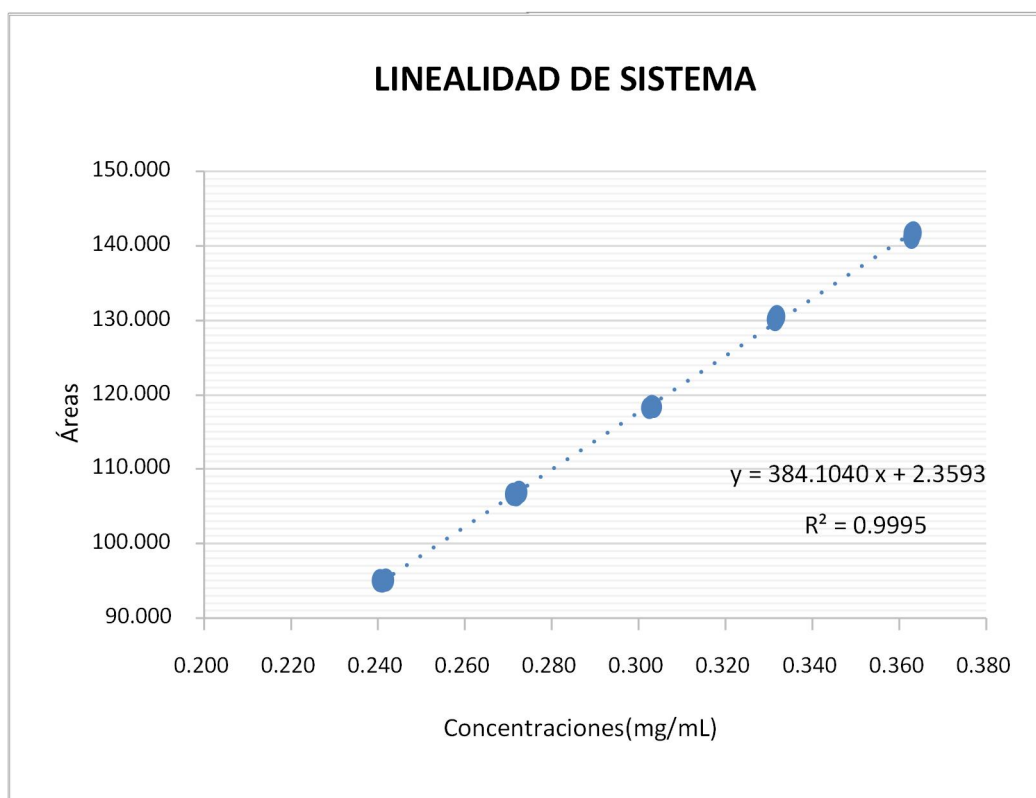


Figura 1: Gráfica de la Linealidad del sistema serie 1 - Ambroxol

Tabla 24: Resultados de la Linealidad del sistema para Ambroxol - Serie 2

Concentración Teórica	Muestras	mg/mL	Áreas	xy	x ²	y ²
		(x)	(y)			
80%	mp1.2	0.240483	94.8971241	22.82118021	0.05783	9005.5
	mp2.2	0.240933	94.9741559	22.88240498	0.05805	9020.1
	mp3.2	0.241782	94.9109836	22.94778642	0.05846	9008.1
90%	mp1.2	0.271805	106.6600567	28.99075324	0.07388	11376.4
	mp2.2	0.272455	107.4468046	29.27437295	0.07423	11544.8
	mp3.2	0.271156	106.6780656	28.92636982	0.07353	11380.2
100%	mp1.2	0.303427	118.1893238	35.86179295	0.09207	13968.7
	mp2.2	0.302977	118.3800874	35.86645262	0.09180	14013.8
	mp3.2	0.302428	118.3601425	35.79537028	0.09146	14009.1
110%	mp1.2	0.331352	130.2902486	43.17187126	0.10979	16975.5
	mp2.2	0.331501	130.1133497	43.13275498	0.10989	16929.5
	mp3.2	0.331751	131.2484235	43.54181609	0.11006	17226.1
120%	mp1.2	0.362773	140.9950180	51.14921527	0.13160	19879.6
	mp2.2	0.362873	140.6703997	51.04550683	0.13168	19788.2
	mp3.2	0.363223	141.9967485	51.57645729	0.13193	20163.1
Σ		4.53092	1775.8	546.98411	1.39626	214288.7

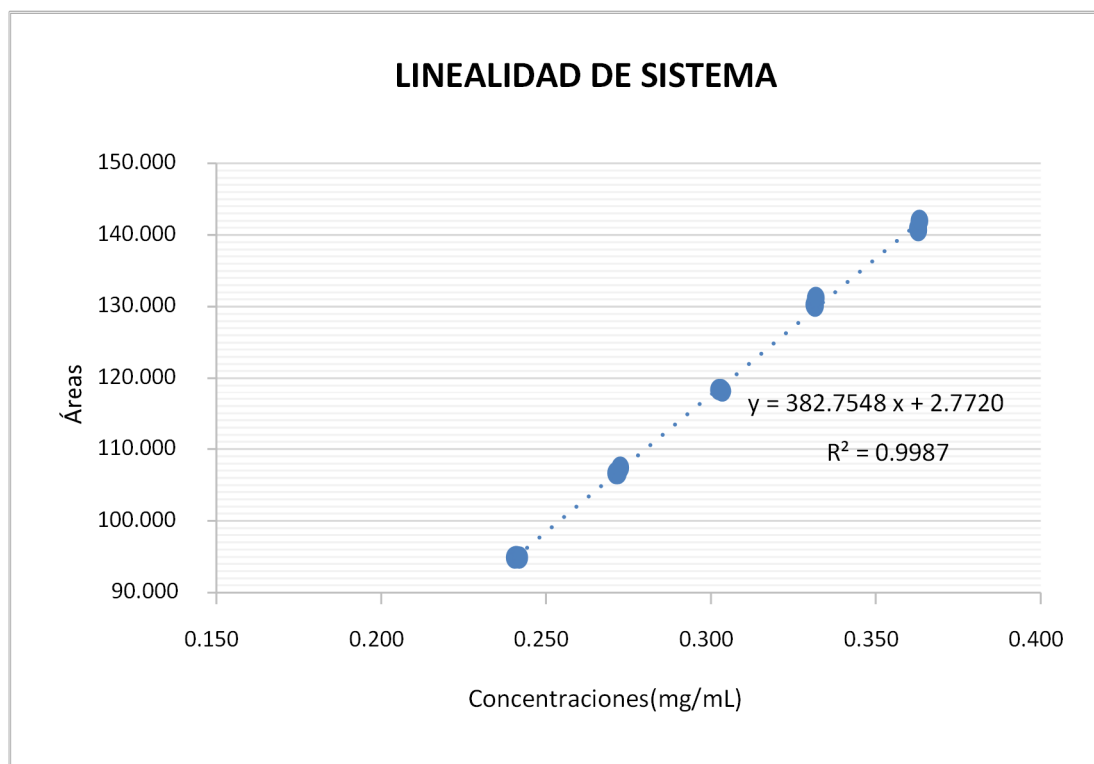


Figura 2: Gráfica de la Linealidad del sistema serie 2 - Ambroxol

Tabla 25: Resultados de la Linealidad del sistema para Ambroxol - Serie 3

Concentración Teórica	Muestras	mg/mL	Áreas	xy	x ²	y ²
		(x)	(y)			
80%	mp1.3	0.240483	94.7926677	22.79606018	0.05783	8985.6
	mp2.3	0.240933	95.0189050	22.89318651	0.05805	9028.6
	mp3.3	0.241782	94.6932440	22.89514086	0.05846	8966.8
90%	mp1.3	0.271805	106.2987946	28.89256034	0.07388	11299.4
	mp2.3	0.272455	107.8880413	29.39458990	0.07423	11639.8
	mp3.3	0.271156	106.5582797	28.89388919	0.07353	11354.7
100%	mp1.3	0.303427	118.0489004	35.81918475	0.09207	13935.5
	mp2.3	0.302977	118.3374385	35.85353098	0.09180	14003.7
	mp3.3	0.302428	118.3729931	35.79925666	0.09146	14012.2
110%	mp1.3	0.331352	130.4380758	43.22085403	0.10979	17014.1
	mp2.3	0.331501	130.1527407	43.14581315	0.10989	16939.7
	mp3.3	0.331751	131.8054693	43.72661668	0.11006	17372.7
120%	mp1.3	0.362773	140.8010656	51.07885454	0.13160	19824.9
	mp2.3	0.362873	141.3500175	51.29212186	0.13168	19979.8
	mp3.3	0.363223	142.7922622	51.86540601	0.13193	20389.6
Σ		4.53092	1777.3	547.56707	1.39626	214747.3

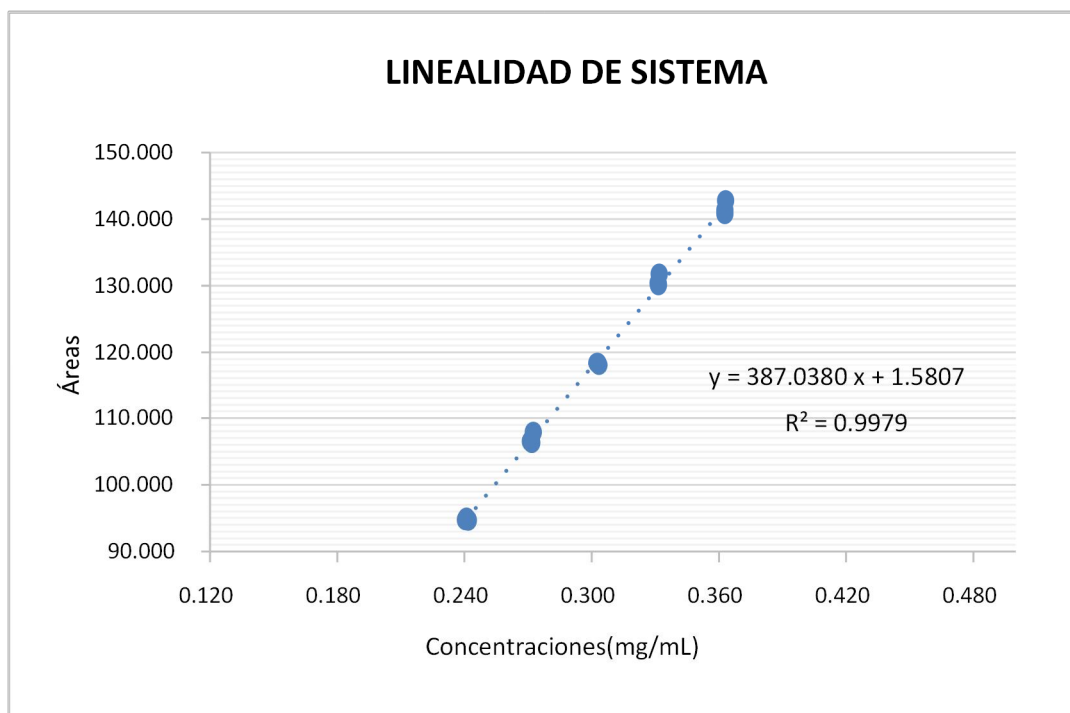


Figura 3: Gráfica de la Linealidad del sistema serie 3 – Ambroxol

Tabla 26: Resultados de la linealidad del sistema para Clenbuterol - Serie 1

Concentración Teórica	Muestras	mg/mL	Áreas	xy	x ²	y ²
		(x)	(y)			
80%	mp1.1	0.000162	1.9038350	0.00030787	0.000000026	3.6
	mp2.1	0.000162	1.8859799	0.00030517	0.000000026	3.6
	mp3.1	0.000161	1.8900855	0.00030404	0.000000026	3.6
90%	mp1.1	0.000182	2.1281452	0.00038633	0.000000033	4.5
	mp2.1	0.000182	2.1393894	0.00039029	0.000000033	4.6
	mp3.1	0.000183	2.1308576	0.00038906	0.000000033	4.5
100%	mp1.1	0.000201	2.3510269	0.00047362	0.000000041	5.5
	mp2.1	0.000202	2.3777543	0.00047948	0.000000041	5.7
	mp3.1	0.000202	2.3672075	0.00047865	0.000000041	5.6
110%	mp1.1	0.000223	2.5995086	0.00058027	0.000000050	6.8
	mp2.1	0.000223	2.6089338	0.00058224	0.000000050	6.8
	mp3.1	0.000222	2.6263541	0.00058403	0.000000049	6.9
120%	mp1.1	0.000242	2.8415181	0.00068777	0.000000059	8.1
	mp2.1	0.000242	2.8341750	0.00068670	0.000000059	8.0
	mp3.1	0.000243	2.8378482	0.00068872	0.000000059	8.1
Σ		0.00303	35.5	0.00732	0.000000625	85.8

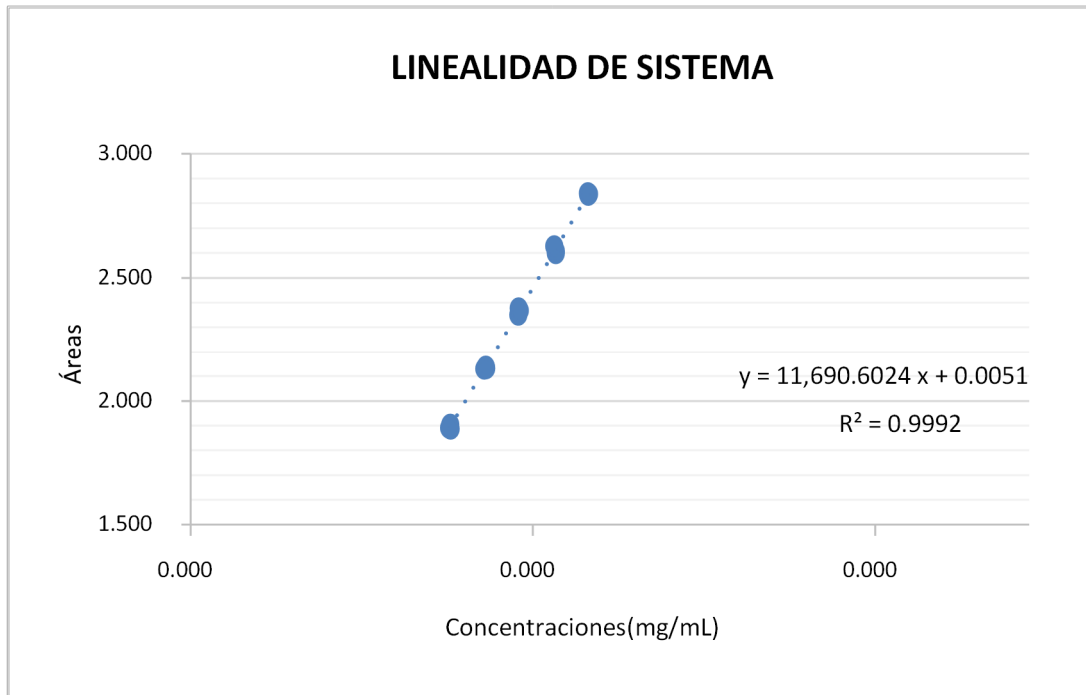


Figura 4: Gráfica de la Linealidad del sistema serie 1 – Clenbuterol

Tabla 27: Resultados de la linealidad del sistema para Clenbuterol - Serie 2

Concentración Teórica	Muestras	mg/mL	Áreas	xy	x ²	y ²
		(x)	(y)			
80%	mp1.2	0.000162	1.9374605	0.00031331	0.000000026	3.8
	mp2.2	0.000162	1.9151180	0.00030989	0.000000026	3.7
	mp3.2	0.000161	1.9227428	0.00030929	0.000000026	3.7
90%	mp1.2	0.000182	2.1527112	0.00039078	0.000000033	4.6
	mp2.2	0.000182	2.1702688	0.00039593	0.000000033	4.7
	mp3.2	0.000183	2.1673535	0.00039572	0.000000033	4.7
100%	mp1.2	0.000201	2.4149332	0.00048649	0.000000041	5.8
	mp2.2	0.000202	2.4081348	0.00048560	0.000000041	5.8
	mp3.2	0.000202	2.4087215	0.00048705	0.000000041	5.8
110%	mp1.2	0.000223	2.6175937	0.00058431	0.000000050	6.9
	mp2.2	0.000223	2.6386426	0.00058887	0.000000050	7.0
	mp3.2	0.000222	2.6655963	0.00059275	0.000000049	7.1
120%	mp1.2	0.000242	2.8541327	0.00069082	0.000000059	8.1
	mp2.2	0.000242	2.8587379	0.00069265	0.000000059	8.2
	mp3.2	0.000243	2.8793429	0.00069879	0.000000059	8.3
Σ		0.00303	36.0	0.00742	0.000000625	88.1

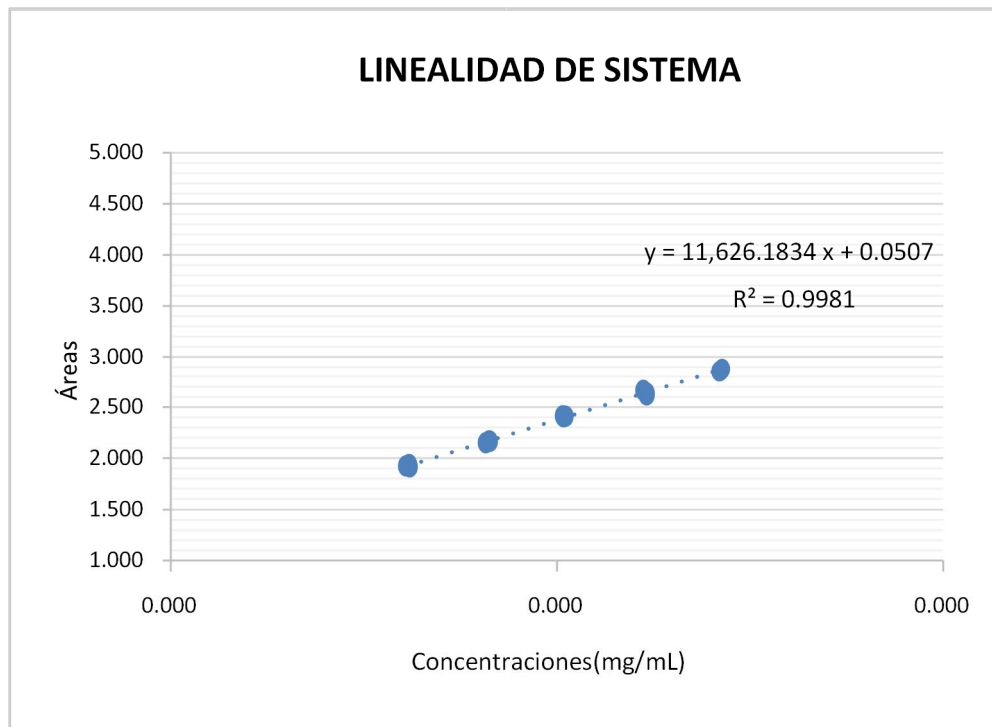


Figura 5: Gráfica de la Linealidad del sistema serie 2 - Clenbuterol

Tabla 28: Resultados de la linealidad del sistema para Clenbuterol - Serie 3

Concentración Teórica	Muestras	mg/mL	Áreas	xy	x ²	y ²
		(x)	(y)			
80%	mp1.3	0.000162	1.9431298	0.00031423	0.000000026	3.8
	mp2.3	0.000162	1.9166059	0.00031013	0.000000026	3.7
	mp3.3	0.000161	1.9116715	0.00030751	0.000000026	3.7
90%	mp1.3	0.000182	2.1349298	0.00038756	0.000000033	4.6
	mp2.3	0.000182	2.1827964	0.00039821	0.000000033	4.8
	mp3.3	0.000183	2.1514700	0.00039282	0.000000033	4.6
100%	mp1.3	0.000201	2.3758168	0.00047861	0.000000041	5.6
	mp2.3	0.000202	2.3953595	0.00048303	0.000000041	5.7
	mp3.3	0.000202	2.4042628	0.00048615	0.000000041	5.8
110%	mp1.3	0.000223	2.6440414	0.00059021	0.000000050	7.0
	mp2.3	0.000223	2.6289479	0.00058671	0.000000050	6.9
	mp3.3	0.000222	2.6658288	0.00059281	0.000000049	7.1
120%	mp1.3	0.000242	2.8381953	0.00068696	0.000000059	8.1
	mp2.3	0.000242	2.8700802	0.00069540	0.000000059	8.2
	mp3.3	0.000243	2.8818945	0.00069941	0.000000059	8.3
Σ		0.00303	35.9	0.00741	0.00000	87.8

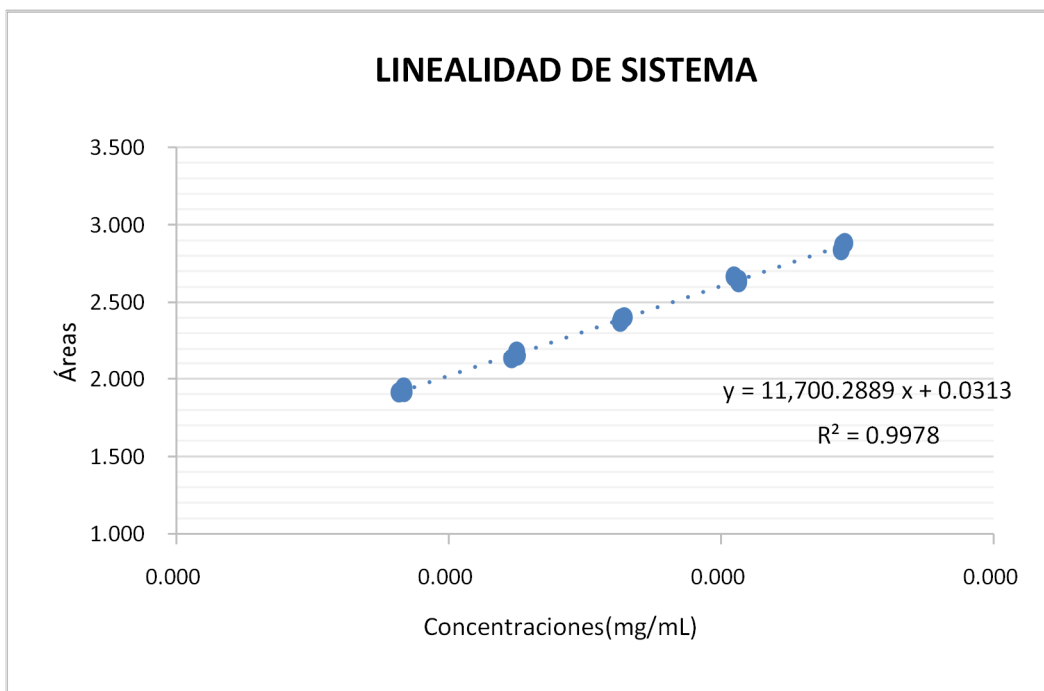


Figura 6: Gráfica de la Linealidad del sistema serie 3 – Clenbuterol

3.3.2 Linealidad del método

Tabla 29: Evaluación de los resultados de la Linealidad del método

Parámetro	Límites	Resultados
Linealidad del método		
- Ecuación de la recta	$y = bx + a$	A: $y = 385.9121X + (1.0461)$ C: $y = 12516.15X + (-0.0907)$
- Coeficiente de Correlación (r)	$r > 0.995$	A: 0.9996 C: 0.9972
- Coeficiente de Determinación (r^2)	$r^2 > 0.990$	A: 0.9992 C: 0.9945
- Test estadístico T Student de verificación de la pendiente "b" o de la Linealidad	$T_{exp} > T_{tablas}$	A: $T_{exp} = 187.214$ $T_{tablas} = 2.048$ C: $T_{exp} = 70.912$ $T_{tablas} = 2.048$

- Test estadístico T Student de verificación de la variable independiente (Intercepto) o de proporcionalidad "a"	$T_{exp} < T_{tablas}$	A: $T_{exp}=0.307$ $T_{tablas}= 2.048$ C: $T_{exp}=0.464$ $T_{tablas}= 2.048$
- Test estadístico T Student del coeficiente de correlación (r)	$Tr > T_{tablas}$	A: $Tr= 187.214$ $T_{tablas}= 2.048$ C: $Tr= 70.912$ $T_{tablas}= 2.048$
- Test Distribución normal de los residuales.	Valor $p \geq 0.05$	A: Valor $p = 0.466$ C: Valor $p = 0.55$

A: Ambroxol **C:** Clenbuterol

Tabla 30: Resultados de la linealidad del método de Ambroxol.

Concentración Teórica	Muestras	mg/mL	Áreas	xy	x ²	y ²
		(x)	(y)			
80%	mp1.1	0.241433	94.3102932	22.76957128	0.05829	8894.4
	mp1.2	0.241433	94.3857624	22.78779200	0.05829	8908.7
	mp2.1	0.241133	94.3105309	22.74136097	0.05815	8894.5
	mp2.2	0.241133	94.4488042	22.77470320	0.05815	8920.6
	mp3.1	0.240134	94.3979945	22.66813828	0.05766	8911.0
	mp3.2	0.240134	94.3956820	22.66758297	0.05766	8910.5
90%	mp1.1	0.273104	106.0224065	28.95514171	0.07459	11240.8
	mp1.2	0.273104	106.0134792	28.95270363	0.07459	11238.9
	mp2.1	0.273753	106.0105249	29.02074163	0.07494	11238.2
	mp2.2	0.273753	106.9721749	29.01024318	0.07494	11230.1
	mp3.1	0.273903	106.1234921	29.06757098	0.07502	11262.2
	mp3.2	0.273903	106.2022284	29.08913711	0.07502	11278.9
100%	mp1.1	0.302178	117.9347123	35.63725132	0.09131	13908.6
	mp1.2	0.302178	117.5723144	35.52774272	0.09131	13823.2
	mp2.1	0.302577	117.6767245	35.60632146	0.09155	13847.8
	mp2.2	0.302577	117.6131474	35.58708446	0.09155	13832.9
	mp3.1	0.303127	117.5950063	35.64621442	0.09189	13828.6
	mp3.2	0.303127	117.6823194	35.67268137	0.09189	13849.1
110%	mp1.1	0.332251	129.1440864	42.90820711	0.11039	16678.2
	mp1.2	0.332251	129.8754385	43.15120600	0.11039	16867.6
	mp2.1	0.331651	129.7760571	43.04039091	0.10999	16841.8
	mp2.2	0.331651	130.0895537	43.14436245	0.10999	16923.3
	mp3.1	0.331352	129.2972291	42.84283275	0.10979	16717.8
	mp3.2	0.331352	129.2922901	42.84119620	0.10979	16716.5
120%	mp1.1	0.361125	140.2821169	50.65933668	0.13041	19679.1
	mp1.2	0.361125	140.5202527	50.74533340	0.13041	19745.9
	mp2.1	0.361374	140.3381949	50.71464080	0.13059	19694.8
	mp2.2	0.361374	140.6834090	50.83939237	0.13059	19791.8
	mp3.1	0.362024	140.2663952	50.77978533	0.13106	19674.7
	mp3.2	0.362024	140.3774185	50.81997841	0.13106	19705.8
Σ		9.06224	3528.6	1086.66865	2.79128	423056.3

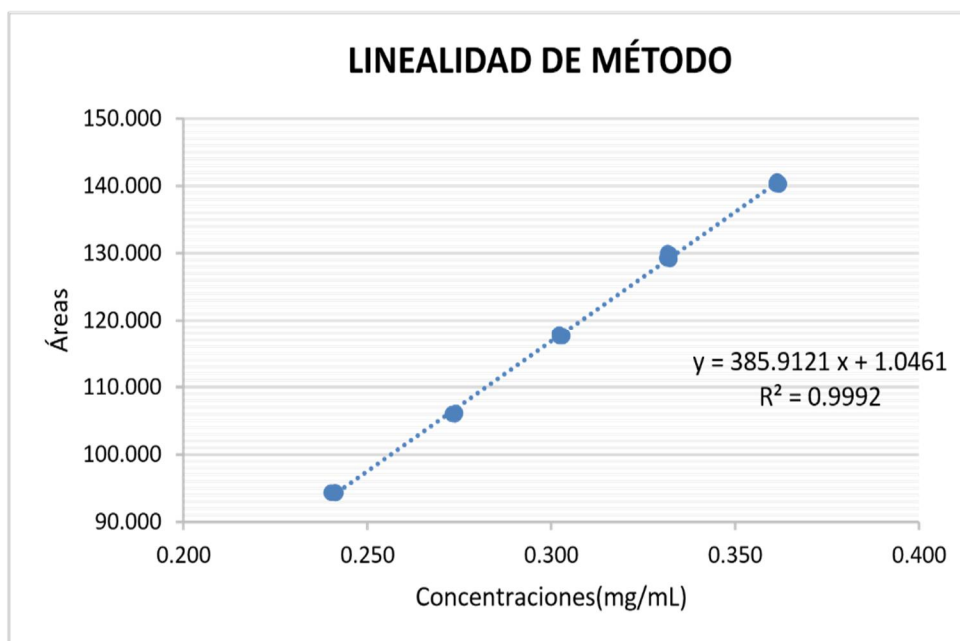


Figura 7: Gráfica de la Linealidad del método – Ambroxol

Tabla 31: Resultados de la linealidad del método de Clenbuterol

Concentración Teórica	Muestras	mg/mL	Áreas	xy	x ²	y ²
		(x)	(y)			
80 %	mp1.1	0.000162	1.9372605	0.00031308	0.00000026	3.8
	mp1.2	0.000162	1.9740439	0.00031903	0.00000026	3.9
	mp2.1	0.000162	1.9546017	0.00031618	0.00000026	3.8
	mp2.2	0.000162	1.9669386	0.00031818	0.00000026	3.9
	mp3.1	0.000162	1.9226036	0.00031139	0.00000026	3.7
	mp3.2	0.000162	1.9142141	0.00031003	0.00000026	3.7
90 %	mp1.1	0.000182	2.1594602	0.00039255	0.00000033	4.7
	mp1.2	0.000182	2.2111137	0.00040194	0.00000033	4.9
	mp2.1	0.000181	2.1982538	0.00039850	0.00000033	4.8
	mp2.2	0.000181	2.1727120	0.00039387	0.00000033	4.7
	mp3.1	0.000181	2.1625782	0.00039128	0.00000033	4.7
	mp3.2	0.000181	2.1651677	0.00039175	0.00000033	4.7
100 %	mp1.1	0.000202	2.4127478	0.00048847	0.00000041	5.8
	mp1.2	0.000202	2.4865313	0.00050340	0.00000041	6.2
	mp2.1	0.000203	2.3998576	0.00048598	0.00000041	5.8
	mp2.2	0.000203	2.4054995	0.00048712	0.00000041	5.8
	mp3.1	0.000202	2.4400672	0.00049290	0.00000041	6.0
	mp3.2	0.000202	2.4033476	0.00048548	0.00000041	5.8
110 %	mp1.1	0.000223	2.6993149	0.00060214	0.00000050	7.3
	mp1.2	0.000223	2.6947789	0.00060113	0.00000050	7.3
	mp2.1	0.000223	2.6798446	0.00059834	0.00000050	7.2
	mp2.2	0.000223	2.7091499	0.00060488	0.00000050	7.3
	mp3.1	0.000224	2.6913255	0.00060279	0.00000050	7.2
	mp3.2	0.000224	2.7052215	0.00060590	0.00000050	7.3
120 %	mp1.1	0.000241	2.9129509	0.00070287	0.00000058	8.5
	mp1.2	0.000241	2.9377085	0.00070884	0.00000058	8.6
	mp2.1	0.000241	2.9316351	0.00070723	0.00000058	8.6
	mp2.2	0.000241	3.0050904	0.00072495	0.00000058	9.0
	mp3.1	0.000241	2.9268740	0.00070418	0.00000058	8.6
	mp3.2	0.000241	2.9395754	0.00070723	0.00000058	8.6
Σ		0.00606	73.1	0.01507	0.000001248	182.0

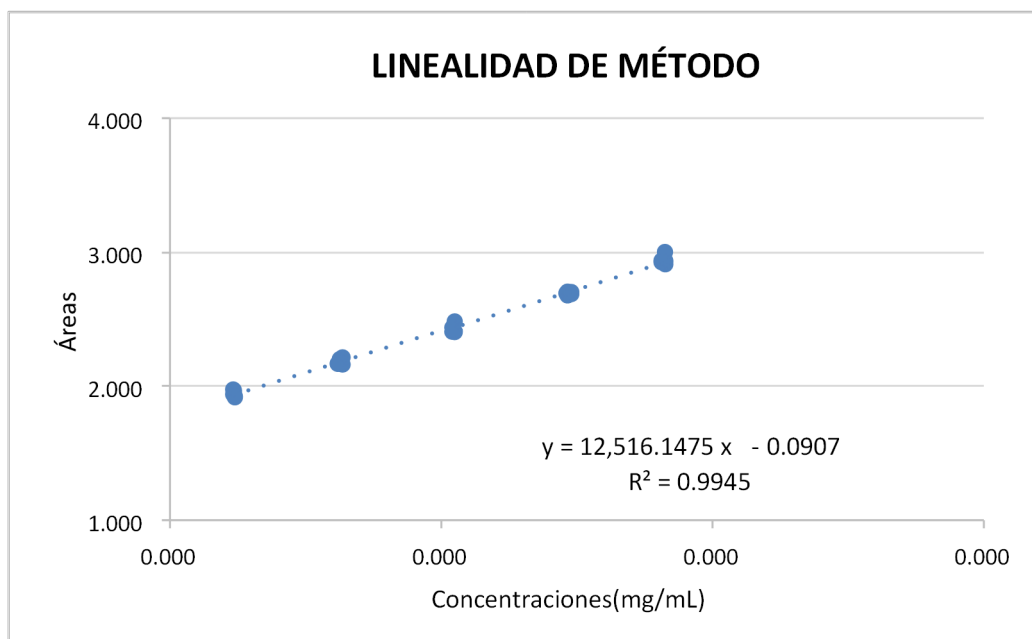


Figura 8: Gráfica de la Linealidad del método – Clenbuterol

3.4 Exactitud del método

Tabla 32: Evaluación de los Resultados de la Exactitud del Método

Parámetro	Límites	Resultados
Exactitud del método:		
- Porcentaje de recuperación (%R)	98% - 102%	A: 100.1% C: 100.5%
- Coeficiente de variación (CV)	CV ≤ 2.0%	A: 0.4% C: 1.4%
- Test de Hipótesis	Texp < Ttablas	A: Texp=1.738 Ttablas= 2.056 C: Texp=1.945 Ttablas=2.056

A: Ambroxol **C:** Clenbuterol

Tabla 33: Resultados de la exactitud del método para Ambroxol.

Concentración Teórica	Muestras	Peso Añadido	Áreas	Placebo (mL)	(mg) de Analito hallado	Porcentaje de Recuperación (%R)
		W (mg)				
80%	mp1.1	24.16500	94.3652000	20.00	24.252	100.36
	mp1.2	24.16500	94.4335673	20.00	24.269	100.43
	mp1.3	24.16500	94.3078779	20.00	24.237	100.30
	mp2.1	24.13500	94.3832884	20.00	24.256	100.50
	mp2.2	24.13500	94.4990548	20.00	24.286	100.63
	mp2.3	24.13500	94.3406015	20.00	24.246	100.46
	mp3.1	24.03500	94.4347947	20.00	24.270	100.98
	mp3.2	24.03500	94.4500228	20.00	24.274	100.99
	mp3.3	24.03500	94.3369437	20.00	24.245	100.87
100%	mp1.1	30.24500	118.0866644	20.00	30.348	100.34
	mp1.2	30.24500	117.7958986	20.00	30.274	100.09
	mp1.3	30.24500	117.7251426	20.00	30.255	100.03
	mp2.1	30.28500	117.8041182	20.00	30.276	99.97
	mp2.2	30.28500	117.8090712	20.00	30.277	99.97
	mp2.3	30.28500	117.7288242	20.00	30.256	99.91
	mp3.1	30.34000	117.7456699	20.00	30.261	99.74
	mp3.2	30.34000	117.8257985	20.00	30.281	99.81
	mp3.3	30.34000	117.7656940	20.00	30.266	99.76
120%	mp1.1	36.14500	140.5306032	20.00	36.116	99.92
	mp1.2	36.14500	140.6426443	20.00	36.145	100.00
	mp1.3	36.14500	140.6096436	20.00	36.137	99.98
	mp2.1	36.17000	140.4613397	20.00	36.099	99.80
	mp2.2	36.17000	140.8295899	20.00	36.193	100.06
	mp2.3	36.17000	140.4323757	20.00	36.091	99.78
	mp3.1	36.23500	140.5010807	20.00	36.109	99.65
	mp3.2	36.23500	140.5376161	20.00	36.118	99.68
	mp3.3	36.23500	140.4672481	20.00	36.100	99.63
Promedio (R_{prom})						100.1
Desviación Estándar (S)%						0.4
Coefficiente de Variación (CV)%						0.4

Tabla 34: Resultados de la exactitud del método para Clenbuterol

Concentración Teórica	Muestras	Peso Añadido	Áreas	Placebo (mL)	(mg) de Analito hallado	Porcentaje de Recuperación (%R)
		W (mg)				
80%	mp1.1	16.14500	1.9372605	20.00	16.09338959	99.68
	mp1.2	16.14500	1.9740439	20.00	16.39896006	101.57
	mp1.3	16.14500	1.9695454	20.00	16.36158970	101.34
	mp2.1	16.16000	1.9546017	20.00	16.23744802	100.48
	mp2.2	16.16000	1.9669386	20.00	16.33993425	101.11
	mp2.3	16.16000	1.9244274	20.00	15.98678128	98.93
	mp3.1	16.18000	1.9226036	20.00	15.97163044	98.71
	mp3.2	16.18000	1.9142141	20.00	15.90193641	98.28
	mp3.3	16.18000	1.9573472	20.00	16.26025569	100.50
100%	mp1.1	20.22500	2.4127478	20.00	20.04340167	99.10
	mp1.2	20.22500	2.4865313	20.00	20.65634278	102.13
	mp1.3	20.22500	2.4973634	20.00	20.74632821	102.58
	mp2.1	20.23000	2.3998576	20.00	19.93631901	98.55
	mp2.2	20.23000	2.4054995	20.00	19.98318792	98.78
	mp2.3	20.23000	2.4068127	20.00	19.99409706	98.83
	mp3.1	20.18000	2.4400672	20.00	20.27035192	100.45
	mp3.2	20.18000	2.4033476	20.00	19.96531146	98.94
	mp3.3	20.18000	2.4470537	20.00	20.32839081	100.74
120%	mp1.1	24.10500	2.9129509	20 mL	24.199	100.39
	mp1.2	24.10500	2.9377065	20 mL	24.404	101.24
	mp1.3	24.10500	2.9586972	20 mL	24.579	101.97
	mp2.1	24.10000	2.9316351	20 mL	24.354	101.05
	mp2.2	24.10000	3.0050904	20 mL	24.964	103.59
	mp2.3	24.10000	2.9680379	20 mL	24.656	102.31
	mp3.1	24.03500	2.9268740	20 mL	24.314	101.16
	mp3.2	24.03500	2.9395754	20 mL	24.420	101.60
	mp3.3	24.03500	2.8992971	20 mL	24.085	100.21
Promedio (R_{prom})						100.5
Desviación Estándar (S)%						1.4
Coefficiente de Variación (CV)%						1.4

3.5 Precisión del método

Tabla 35: Evaluación de los resultados de la Precisión del Método

Parámetro	Límites	Resultados
Precisión del método:		
- Repetibilidad	CV \leq 2.0% Valor p \geq 0.05	A: 0.16% p= 0.102 C: 0.41% p= 0.159
- Precisión intermedia entre analistas y equipos	CV \leq 2.0%	A: Entre analista: 0.23% Entre equipos: 0.48% C: Entre analista: 1.00% Entre equipos: 1.08%
- Prueba de Normalidad (P.I. diferente analista)	Valor p \geq 0.05	A: Entre analista: Analista 1: Valor p = 0.930 Analista 2: Valor p = 0.243 C: Entre analista: Analista 1: Valor p = 0.384 Analista 2: Valor p = 0.828
- Prueba de varianza iguales (P.I. diferentes analistas)	Valor p \geq 0.05	A: Valor p = 0.352 C: Valor p = 0.047
- Prueba de medias (T de 2 muestras) (P.I. diferentes analistas)	Valor p \geq 0.05 Las medias son iguales, Si valor p < 0.05 las medias son diferentes	A: Valor p = 0.727 C: Valor p = 0.671 En ambos las medias son iguales.
- Prueba de normalidad de grupos (P.I. diferentes equipos)	Valor p \geq 0.05	A: Entre equipos: ASCL-001: Valor p= 0.158 CCCL-007: Valor p= 0.057

<p>- Prueba de varianzas (P.I. Diferentes equipos)</p> <p>- Prueba de medias (ANOVA) (P.I. diferentes equipos)</p>	<p>Valor $p \geq 0.05$ varianzas iguales</p> <p>Valor $p < 0.05$ varianzas diferentes.</p> <p>Valor $p \geq 0.05$ las medias son iguales, si valor de $p < 0.05$ las medias son diferentes.</p>	<p>CCCL-005: Valor $p = 0.930$</p> <p>C: Entre equipos: ASCL-001: Valor $p = 0.384$ CCCL-007: Valor $p = 0.227$ CCCL-005: Valor $p = 0.486$</p> <p>A: Entre equipos: Valor $p = 0.006$</p> <p>C: Entre equipos: Valor $p = 0.098$</p> <p>A: Entre equipos: Valor $p = 0.905$</p> <p>C: Entre equipos: Valor $p = 0.854$ Las medias son iguales.</p>
--	---	--

A: Ambroxol

C: Clenbuterol

Tabla 36: Resultados de Precisión: Repetibilidad en Ambroxol

Concentración Teórica	Muestras	mg DE ANALITO AÑADIDO	ÁREA STD	PLACEBO (mL)	mg ANALITO HALLADO	PORCENTAJE DE ANALITO (%p.a.)
100%	mp1.1	30.21	117.81848	20.0	29.968	100.8
	mp1.2	30.21	117.895243	20.0	29.988	100.7
	mp2.1	30.16	117.896700	20.0	29.988	100.6
	mp2.2	30.16	117.891385	20.0	29.987	100.6
	mp3.1	30.15	117.384887	20.0	29.858	101.0
	mp3.2	30.15	117.356292	20.0	29.851	101.0
	mp4.1	30.16	117.462222	20.0	29.878	100.9
	mp4.2	30.16	117.37950	20.0	29.857	101.0
	mp5.1	30.28	117.87293	20.0	29.982	101.0
	mp5.2	30.28	117.92985	20.0	29.997	100.9
	mp6.1	30.11	117.51839	20.0	29.892	100.7
	mp6.2	30.11	117.42787	20.0	29.869	100.8
Promedio (X)						100.84
Desviación Estándar (S) %						0.16
Coefficiente de Variación (CV)%						0.16

Tabla 37: Resultados de Precisión: Repetibilidad en Clenbuterol

Concentración Teórica	Muestras	mg DE ANALITO AÑADIDO	ÁREA STD	PLACEBO (mL)	mg ANALITO HALLADO	PORCENTAJE DE ANALITO (%p.a.)
100%	mp1.1	20.11	2.4444762	20	20.044	100.3
	mp1.2	20.11	2.4458975	20	20.055	100.3
	mp2.1	20.14	2.4526163	20	20.110	100.1
	mp2.2	20.14	2.4329905	20	19.950	101.0
	mp3.1	20.09	2.4391420	20	20.000	100.4
	mp3.2	20.09	2.4396914	20	20.005	100.4
	mp4.1	20.18	2.4271940	20	19.902	101.4
	mp4.2	20.18	2.4326008	20	19.946	101.2
	mp5.1	20.15	2.4359085	20	19.973	100.9
	mp5.2	20.15	2.4467241	20	20.062	100.4
	mp6.1	20.14	2.4302941	20	19.927	101.1
	mp6.2	20.14	2.4307278	20	19.931	101.0
Promedio (X)						100.72
Desviación Estándar (S) %						0.41
Coefficiente de Variación (CV)%						0.41

Tabla 38: Resultados de Precisión Intermedia: Diferentes analistas para Ambroxol.

EQUIPO			
Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC) - CCCL-005			
MUESTRA Concentración Teórica	DETERMINACIÓN mg/5mL DE DOSIS UNITARIA:		
	Muestras	PRIMER ANALISTA	SEGUNDO ANALISTA
Precisión 100%	mp1	F.Camones 7.43879	K.Vidal 7.4039
	mp2	7.41362	7.4138
	mp3	7.42116	7.4380
	mp4	7.45228	7.4476
	mp5	7.43542	7.4519
	mp6	7.42714	7.4556
PROMEDIO (X)		7.431	7.435
DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S)%		0.0138	0.0214
COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV) %		0.2	0.3
PROMEDIO TOTAL ENTRE ANALISTAS			
7.433 mg/5mL			
DESVIACIÓN ESTÁNDAR TOTAL ENTRE ANALISTAS %			
0.017281			
COEFICIENTE DE VARIACIÓN TOTAL ENTRE ANALISTAS(CV)%			
0.23			

Tabla 39: Resultados de Precisión Intermedia: Diferentes equipos para Ambroxol.

ANALISTA:		F.Camones		
MUESTRA Concentración Teórica	Muestras	Ambroxol Clorhidrato		
		CCCL-005	CCCL-007	ASCL-001
Precisión 100%	mp1	7.4388	7.4273	7.4388
	mp2	7.4136	7.4278	7.441
	mp3	7.4212	7.386	7.4333
	mp4	7.4523	7.5413	7.4487
	mp5	7.4354	7.3921	7.3957
	mp6	7.4271	7.3754	7.4046
PROMEDIO (X)		7.4314	7.4250	7.4270
DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S) %		0.0138	0.0610	0.0216
COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV) %		0.19	0.82	0.29

PROMEDIO TOTAL ENTRE EQUIPOS	7.428	mg/5mL
DESVIACIÓN ESTÁNDAR TOTAL ENTRE EQUIPOS %	0.03598	
COEFICIENTE DE VARIACIÓN TOTAL ENTRE EQUIPOS(CV)%	0.48	

Tabla 40: Resultados de Precisión Intermedia: Diferentes analistas para clenbuterol.

EQUIPO				Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC) - CCCL-005	
MUESTRA Concentración Teórica	Muestras	DETERMINACIÓN mg/5mL DE DOSIS UNITARIA:			
		PRIMER ANALISTA	SEGUNDO ANALISTA		
Precisión 100%	mp1	F.Camones	K.Vidal		
	mp2	0.00502	0.00502		
	mp3	0.00496	0.00506		
	mp4	0.00496	0.00501		
	mp5	0.00500	0.00493		
	mp6	0.00501	0.00487		
PROMEDIO (X)		0.00499	0.00497		
DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S)%		0.0000	0.0001		
COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV) %		0.5	1.4		

PROMEDIO TOTAL ENTRE ANALISTAS	0.005	mg/5mL
DESVIACIÓN ESTÁNDAR TOTAL ENTRE ANALISTAS %	0.000050	
COEFICIENTE DE VARIACIÓN TOTAL ENTRE ANALISTAS(CV)%	1.0	

Tabla N°41: Resultados de Precisión Intermedia: Diferentes equipos para Clenbuterol.

ANALISTA:		K.Vidal		
MUESTRA Concentración Teórica	Muestras	Clenbuterol Clorhidrato		
		CCCL-005	CCCL-007	ASCL-001
Precisión 100%	mp1	0.00502	0.00489	0.0051
	mp2	0.00496	0.00498	0.0050
	mp3	0.00496	0.0050	0.0049
	mp4	0.00500	0.00507	0.0050
	mp5	0.00501	0.00495	0.0049
	mp6	0.00499	0.00497	0.0050
PROMEDIO (X)		0.0050	0.0050	0.0050
DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S) %		0.0000	0.0001	0.0001
COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV) %		0.51	1.17	1.51

PROMEDIO TOTAL ENTRE EQUIPOS	0.005	mg/5mL
DESVIACIÓN ESTÁNDAR TOTAL ENTRE EQUIPOS %	0.00005	
COEFICIENTE DE VARIACIÓN TOTAL ENTRE EQUIPOS(CV)%	1.1	

3.6 Límite de Detección y límite de cuantificación

Tabla 42:

Evaluación de los resultados de Límite de Detección y Cuantificación

Parámetro	Límites	Resultados
Límite de Detección y Cuantificación		
- Coeficiente de correlación	$r \geq 0.995$	A: 0.9999 C: 0.9999
- Coeficiente de Determinación.	$r^2 \geq 0.990$	A: 0.9998 C: 0.9999
- Límite de detección	Concentración mínima aceptable del analito que es detectable.	A: 1.9052ppm o 0.0019052mg/mL. C: 0.001949ppm o 0.0000019mg/mL.

- Límite de cuantificación	Concentración mínima aceptable de un analito que es cuantificable.	A: 2.3003ppm o 0.0023003mg/mL C: 0.004971ppm o 0.0000050mg/mL.
----------------------------	--	---

A: Ambroxol C: Clenbuterol

Tabla 43: Resultados de Límite de cuantificación y detección para ambroxol.

Concentración Teórica	Muestras	mg/mL inyect. (x)	Áreas (y)	xy	x ²	y ²
12.5 %	mp1	0.03752	15.3467433	0.5758282	0.00140784	235.5225299
	mp2	0.03753	15.3699988	0.5767776	0.00140822	236.2368631
25.0 %	mp1	0.07504	30.4229863	2.2830139	0.00563136	925.5580924
	mp2	0.07508	30.3570456	2.2792788	0.00563736	921.5502176
50.0 %	mp1	0.15041	59.5420528	8.9559884	0.02262452	3545.256052
	mp2	0.15076	59.4814685	8.9676754	0.02272984	3538.045095
75.0 %	mp1	0.22555	88.2284958	19.8996571	0.05087137	7784.267462
	mp2	0.22705	88.2284958	20.0318807	0.05154965	7784.267462
Σ		0.97894	386.97729	63.57010	0.16186	24970.704

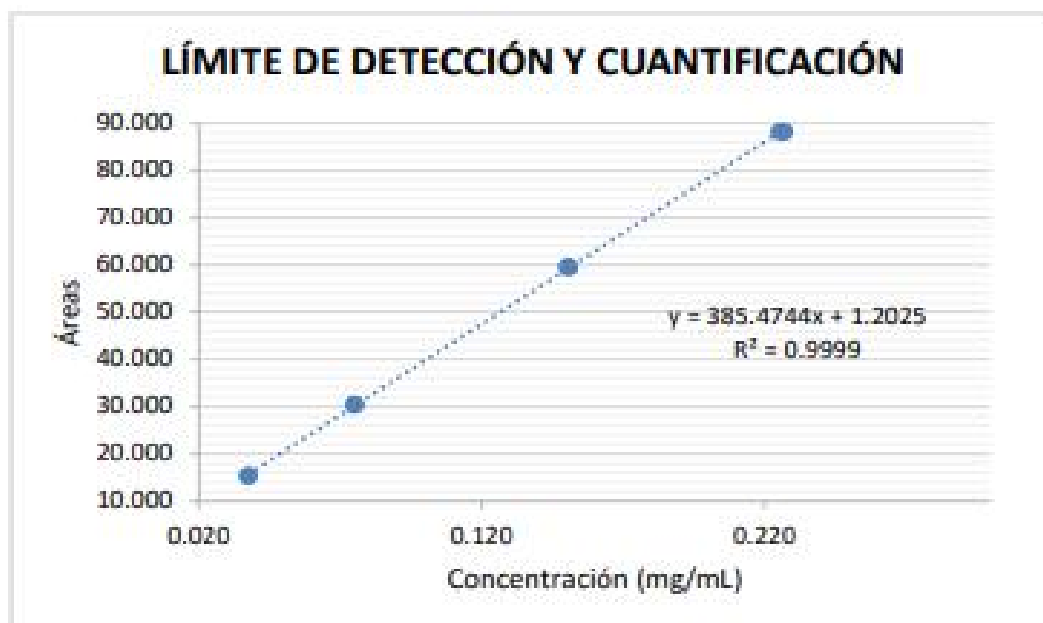


Figura 9: Gráfica del Límite de detección y cuantificación para ambroxol

Tabla 44: Resultados de Límite de cuantificación y detección para clenbuterol.

Concentración Teórica	Muestras	mg/mL inyect. (x)	Áreas (y)	xy	x ²	y ²
12.5 %	mp1	0.000025	0.3104981	0.0000078	0.000000001	0.0964091
	mp2	0.000025	0.2983779	0.0000075	0.000000001	0.0890294
25.0 %	mp1	0.000050	0.6156355	0.0000310	0.000000003	0.3790070
	mp2	0.000050	0.6096278	0.0000306	0.000000003	0.3716461
50.0 %	mp1	0.000101	1.2031586	0.0001211	0.000000010	1.4475906
	mp2	0.000101	1.2012135	0.0001211	0.000000010	1.4429138
75.0 %	mp1	0.000151	1.7900275	0.0002698	0.000000023	3.2041983
	mp2	0.000151	1.7900275	0.0002706	0.000000023	3.2041983
Σ		0.00065	7.81857	0.00086	0.00000007	10.23499

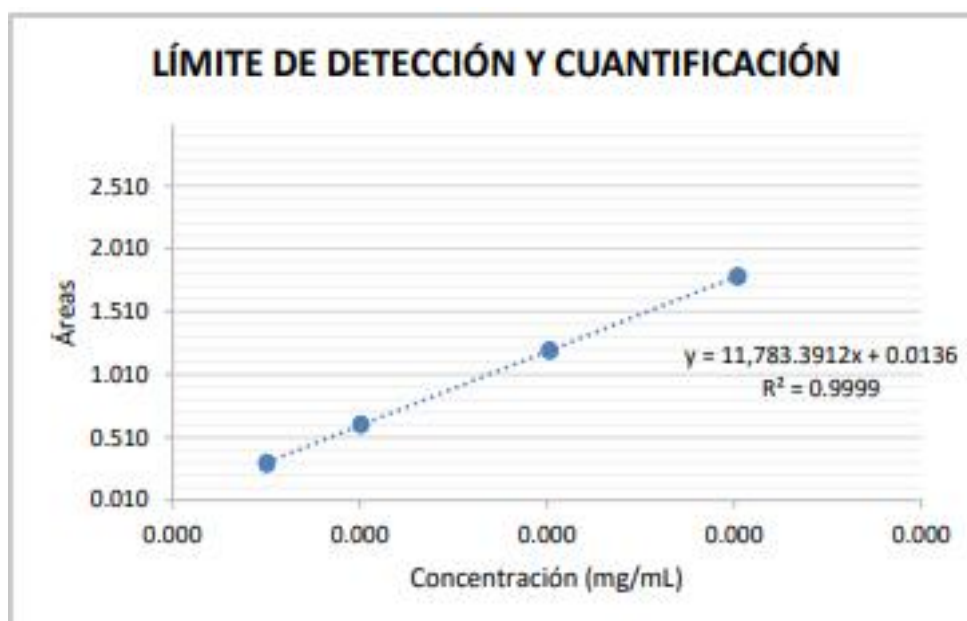


Figura 10: Gráfica del Límite de detección y cuantificación para clenbuterol.

3.7 Robustez

Tabla 45: Evaluación de los resultados de Robustez

Parámetro	Límites	Resultados
Robustez:		
- Condiciones normales	Alteración de resultado $\leq 2.0\%$	A: Producto terminado: 0.0% C: Producto terminado: 0.0%
- Variaciones cromatográficas:		
• T 35°C en la columna.	Alteración de resultado $\leq 2.0\%$	A: Producto terminado: 0.4% C: Producto terminado: 0.4%
- Variación en las condiciones de almacenamiento de la solución estándar y muestra:		
• Condición 24 horas de reposo.	Alteración de resultado $\leq 2\%$	A: Producto terminado: 1.8% C: Producto terminado: 1.1%
• Condición 24 horas en refrigeración.	Alteración de resultado $\leq 2\%$	A: Producto terminado: 0.7% C: Producto terminado: 0.5%
• Condición 48 horas en refrigeración.	Alteración de resultado $\leq 2\%$	A: Producto terminado: 0.5% C: Producto terminado: 0.7%

A: Ambroxol

C: Clenbuterol

Tabla 46: Resultados de Robustez en Ambroxol

ESTÁNDAR (Analito)					MUESTRA:	PRODUCTO TERMINADO	RESULTADOS			
Condiciones	Peso (mg)	Áreas	Promedio de Áreas	RSD	Cantidad de Ambroxol	7.50 mg /5mL		mg analito Hallado	% p.a. Encontrado	% Alteración
					Vol(mL) de PT añadido	Áreas	Promedio de Áreas			
Normales	30.30 mg	7.846310	7.84128	0.38	5.0 mL	8.170446	8.183812	7.90mg	105.3	0.0
		7.878816				8.197178				
		7.815728			5.0 mL	8.061392	8.082299	7.80mg	104.0	0.0
		7.806403				8.103206				
		7.859120								
Variaciones Cromatográficas										
Variación de la Temperatura de la Columna de 30 °C a 35 °C	30.30 mg	7.905713	7.88292	0.21	5.0 mL	8.133823	8.150627	7.83mg	104.3	0.3
		7.890097				8.167431				
		7.880035			5.0 mL	8.128310	8.134722	7.81mg	104.1	0.5
		7.879400				8.141134				
		7.859378								
								CRITERIO DE ACEPTACIÓN		≤ 2.0%
Variación en las Condiciones de Almacenamiento de las Soluciones estándar y muestra										
Variación - Muestra en Reposo 24 Horas (T°C ambiente < 30°C)	30.30 mg	7.8304695	7.83607	0.13	5.0 mL	8.3228886	8.322477	8.04mg	107.2	2.0
		7.8300292				8.3220654				
		7.8494455			5.0 mL	8.2527776	8.254830	7.97mg	106.3	1.6
		7.8267010				8.2568814				
		7.8436907								
Variación - Muestra en Refrigeración 24 Horas (T°C de 2 a 8 °C)	30.00 mg	8.0895539	8.13355	0.43	5.0 mL	8.4708871	8.417157	7.83mg	104.4	0.2
		8.1401503				8.3634275				
		8.1833303			5.0 mL	8.3559184	8.340845	7.76mg	103.5	1.2
		8.1160384				8.3257709				
		8.1386864								
Variación - Muestra en Refrigeración 48 Horas (T°C de 2 a 8 °C)	30.30 mg	8.0795539	8.10755	0.34	5.0 mL	8.6708871	8.467157	7.90mg	105.4	0.7
		8.1101503				8.2634275				
		8.0833303			5.0 mL	8.3559184	8.390845	7.83mg	104.4	0.2
		8.1460384				8.4257709				
		8.1186864								

Tabla 47: Resultados de Robustez en Clenbuterol

ESTÁNDAR (Analito)					MUESTRA:	PRODUCTO TERMINADO	RESULTADOS					
Condiciones	Peso (mg)	Áreas	Promedio de Áreas	RSD	Cantidad de Clenbuterol	0.005 mg /5mL						
					Vol.(mL) de PT añadido	Áreas	Promedio de Áreas	mg analito Hallado	% p.a. Encontrado	% Alteración		
Normales	20.155 mg	2.349061	2.34761	0.17	5.0 mL	2.392283	2.389213	0.005mg	102.66	0.0		
		2.347998				2.386142						
		2.350383				5.0 mL	2.387963	2.387628	0.005mg	102.60	0.0	
		2.350022					2.387294					
		2.340608										
Variaciones Cromatográficas												
Variación de la Temperatura de la Columna de 30 °C a 35 °C	20.155 mg	2.302589	2.29415	0.30	5.0 mL	2.340929	2.341816	0.005mg	102.97	0.3		
		2.298557				2.342703						
		2.289333			5.0 mL	2.318857	2.325665	0.005mg	102.26	0.4		
		2.285162				2.332473						
		2.295120										
									CRITERIO DE ACEPTACIÓN			
≤ 2.0%												
Variación en las Condiciones de Almacenamiento de las Soluciones estándar y muestra												
Variación - Muestra en Reposo 24 Horas (T°C ambiente < 30°C)	20.155 mg	2.3969965	2.39685	0.27	5.0 mL	2.4141035	2.412952	0.005mg	101.6	1.1		
		2.4065414				2.4118012						
		2.3975418			5.0 mL	2.4056436	2.411241	0.005mg	101.5	1.1		
		2.3890862				2.4168384						
		2.3940931										
Variación - Muestra en Refrigeración 24 Horas (T°C de 2 a 8 °C)	20.185 mg	2.3985967	2.40168	0.46	5.0 mL	2.4467666	2.440878	0.005mg	102.5	0.1		
		2.4149854				2.4349888						
		2.4069058			5.0 mL	2.4272597	2.423928	0.005mg	101.8	0.8		
		2.3852110				2.4205968						
		2.4027249										
Variación - Muestra en Refrigeración 48 Horas (T°C de 2 a 8 °C)	20.155 mg	2.4045187	2.40341	0.50	5.0 mL	2.4147391	2.423524	0.005mg	101.7	0.9		
		2.4079251				2.4323096						
		2.4156748			5.0 mL	2.4440622	2.431648	0.005mg	102.1	0.6		
		2.3832826				2.4192342						
		2.4056265										

3.8 Rango

Tabla 48: Evaluación de los resultados de Rango.

Parámetro	Límites	Resultados
Rango	80% - 120%	A: 80% - 120% C: 80% - 120%

IV. DISCUSIÓN

4.1. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

- La técnica analítica para la identificación y cuantificación por HPLC de ambroxol clorhidrato 7,5mg + clenbuterol 0,005mg/5mL en jarabe, dada que no figura en ningún libro oficial, debe ser validada con antelación al manejo habitual. Por ello, al realizar el desarrollo de la validación con los ensayos, procedimientos y evaluación de los resultados obtenidos, nos ha permitido poder corroborar el alto grado de confiabilidad, eficacia, calidad y seguridad que la técnica presenta.⁹
- La adecuación del sistema conocido también como aptitud del sistema, posibilita que antes de poner en marcha cualquier actividad cromatográfica, nos asegure que el equipo se encuentra en óptimas condiciones para ser usado⁸. La aptitud del sistema consistió en evaluar áreas, tiempo de retención, asimetría y platos teóricos de dos estándares tanto para ambroxol como para clenbuterol, donde se determinó el promedio, el coeficiente de variación, desviación estándar y los resultados cumplieron con los límites establecidos como se puede apreciar en las tablas 14,15,16,17.
- Al evaluar el parámetro de Especificidad se obtuvo resultados por Identificación y por degradación. La técnica analítica resultó ser específica, puesto que los analitos y producto terminado no evidenciaron interferencia con probables componentes que pudieran alterar, y nos permitió su identificación, cumpliendo con los criterios de aceptación del porcentaje (%) interferencia $\leq 2\%$. La especificidad por identificación empleó soluciones de la fase móvil, los componentes de la fórmula (estándar mixto, analito puro, otros), las soluciones de trabajo (estándar mixto, producto terminado), y el placebo como se puede observar en la tabla 18 y anexo A5 (figuras 13,14,15,16,17,18). Los resultados presentan ausencia de interferencia tanto para Ambroxol como para Clenbuterol con las soluciones utilizadas en la fase móvil. En los componentes de la fórmula, la corrida no evidenció interferencia, pero se identificaron los picos de Ambroxol a los 47.4 min de retención y para clenbuterol de 22.9 min en el estándar mixto y los analitos.

En la corrida con las soluciones de trabajo, en el estándar mixto se identificaron picos de Ambroxol a los 47.7 min de retención y con clenbuterol a los 23.1 min. Asimismo, en la corrida con el producto terminado no presentó interferencia y los picos de identificación para ambroxol fue en un tiempo de retención de 47.7 min y para clenbuterol a los 23.0 min. Con el placebo no mostró evidencia interferencia.

En la especificidad por degradación, al ser sometidos los analitos, placebo y producto terminado a condición normal, degradación por hidrólisis acida, básica, oxidativa, por termólisis, por fotólisis; evaluamos los resultados como indica la tabla 19, y mostró que el ambroxol frente a una hidrólisis oxidativa, la solución del analito se ve afectado, presentando una interferencia mayor del 2.0% en su degradación (ver tabla 20). Asimismo, clenbuterol al ser sometido a estas condiciones antes descritas, no detectaron picos que interfieran con el pico principal en sus cromatogramas correspondientes, sin embargo, en la degradación por termólisis y fotólisis con luz UV, hidrólisis ácida, básica, oxidativa, afectaron la solución del analito y presentó una interferencia mayor al 2.0% en su degradación (ver tabla 21). La solución del producto terminado se vio también afectado frente a las condiciones de degradación por hidrólisis ácida, básica, y por fotólisis con luz natural a una exposición de 24 horas, donde la interferencia fue mayor en un 2.0% en su degradación (ver tabla 21). Para Acosta Neira y Nina Flores también presentaron las mismas observaciones, entonces se puede pensar que someter las muestras o producto terminado a estas condiciones podrían advertir que el producto se degrade y pierda su acción.⁹

➤ La USP vigente, la ICH y guías de calidad de las autoridades reguladoras en los países de alta vigilancia sanitaria, establece que la linealidad debe ser evaluada por la linealidad del sistema y linealidad del método, donde nuestros resultados mostraron que el método analítico es lineal. En la linealidad del sistema, los resultados tratados fueron directamente proporcionales a la concentración del analito, dentro de un rango conocido (80% a 120%), donde se trabajó con tres series, analizadas por triplicado y con un sistema de estándares al 80%,90%,100%,110%,120%.^{3,6} Como resultado de las lecturas del

coeficiente de correlación(r) para ambroxol en las tres series(1,2,3) fue de 0.9997; 0.9993 y 0.9990 respectivamente y para clenbuterol en las tres series (1,2,3) fue de 0.9996; 0.9991 y 0.9989 respectivamente. Asimismo, en la linealidad del método el coeficiente de correlación (r) para ambroxol fue 0.9996 y para clenbuterol 0.9972. Siendo el límite aceptable de $r \geq 0.995$.

➤ Según la farmacopea vigente (USP), registros de la ICH, denotan que el parámetro de exactitud debe calcularse obteniendo el porcentaje de recuperación entre el analito hallado y el analito añadido. Siendo nuestro porcentaje de recuperación para ambroxol clorhidrato 100.1% y para clenbuterol 100.5%, en un límite de 98% a 102%. Sin embargo, para Acosta Neira y Nina Flores, el porcentaje de recuperación fue de 99.87% para ambroxol clorhidrato y 99.87% para clenbuterol clorhidrato en un rango de 97% a 103%. Estos resultados comparados con nuestro estudio son similares dentro del rango permitido.⁹ Asimismo, para Tapia, a pesar de trabajar en su análisis con solución oral gotas, el porcentaje de recuperación en ambroxol clorhidrato fue de 100.17%, dicho valor se encontró dentro del rango aceptable.¹⁹

➤ El parámetro de precisión según los libros oficiales y criterios técnicos de evaluación de un dossier de especialidades farmacéuticas, Directiva sanitaria N° 001 MINS/DIGEMID, debe ser evaluado en repetibilidad, y precisión intermedia (con diferentes analistas, diferentes equipos, diferentes días, etc.). La repetibilidad se dio en funcionamiento sucesivos en un solo día y bajo las mismas condiciones de medición, siendo repetible nuestra técnica analítica, la cual tuvo un coeficiente variación (CV) para ambroxol de 0.16%, y para clenbuterol 0.41%, cumpliendo los límites de aceptación de $CV \leq 2\%$. La repetibilidad del método para el estudio Guillen Gonzales en sus resultados, mostraron un CV de 0.47% para ambroxol y 1.68% para clenbuterol. Ambos estudios a pesar que no tienen los mismos resultados, cumplen con los criterios aceptables⁸. La precisión intermedia se realizó tanto entre diferentes analistas como diferentes equipos, donde el CV para ambroxol fue de 0.23% y 0.48% respectivamente, y el CV para clenbuterol fue de 1.00% y 1.08% respectivamente. Como resultado de esta evaluación se evidencia que la técnica analítica es precisa en las condiciones propuestas.

- El límite de detección que es la concentración mínima aceptable del analito que se puede detectar, para ambroxol fue de 1.9052ppm y para clenbuterol 0.001949ppm. El límite de cuantificación, que es la concentración mínima aceptable del analito que se puede cuantificar, para ambroxol fue de 2.3003ppm y para clenbuterol 0.004971ppm. Asimismo, se evalúa el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación. Donde el límite de aceptación para el coeficiente de correlación es $r \geq 0.995$, y como resultado para ambroxol y clenbuterol se obtuvo 0.9999. El límite de aceptación del coeficiente de determinación $r^2 \geq 0.990$, lo cual para ambroxol mostró un resultado de 0.9998 y para clenbuterol 0.9999. Sin embargo, para la USP y la ICH este parámetro, su evaluación no es exigida.^{3,6,8}
- Siendo la robustez un parámetro que puede ser incluido o no en la validación de un procedimiento analítico, este nos indica resultados aceptables, precisos y exactos al someterlos a una variedad de condiciones^{6,7}. El método resultó ser robusto frente a condiciones normales y a modificaciones cromatográficas (Temperatura 35°C de la columna cromatográfica Zorbax XDB-C18) tanto para ambroxol como para clenbuterol, presentando una alteración del resultado $\leq 2\%$ como límite permitido como se observa en la tabla 45; Frente a la exposición de diferentes condiciones de almacenamiento (reposo por 24 horas a temperatura ambiente que se consideró hasta los 30°C y refrigeración por 24 y 48 horas que osciló entre 2°C - 8°C), los activos en estudio estuvieron dentro del límite establecido.
- En la tabla 48, se puede apreciar que, mediante ensayos analíticos ya antes evaluados como son exactitud, precisión y linealidad, el rango de nuestra técnica analítica es de 80% al 120%. Rango comprendido entre las concentraciones máximas y mínimas del analito estudiado.

4.2. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que:

1. Se validó la técnica analítica de referencia para la identificación y cuantificación por HPLC de ambroxol clorhidrato 7,5mg + clenbuterol clorhidrato 0,005mg/5mL en jarabe, cumpliendo con todos los parámetros exigidos.
2. Del mismo modo, se determinaron los parámetros de validación de la técnica analítica para la identificación y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución de ambroxol clorhidrato 7,5mg + clenbuterol clorhidrato 0,005mg/5mL en jarabe, y estos luego de aplicarse los procedimientos correspondientes, mostraron como resultado que:
 - En la Especificidad, la técnica analítica es específica, identificándose no haber interferencia con el pico del analito estudiado. El tiempo de retención de Ambroxol clorhidrato fue de 47.7 min y Clenbuterol clorhidrato 23.0 min. Asimismo, las soluciones de placebo, analito y producto terminado tanto de Ambroxol como Clenbuterol sometidas a degradación por condición normal, hidrólisis acida, básicas, oxidativas, termólisis, fotólisis por luz natural y UV, no detectaron picos de interferencias con el pico principal en sus cromatogramas correspondientes.
 - En la Linealidad, la técnica demuestra que el parámetro es lineal, y los datos evidencian distribución normal, la cual estuvo comprendida en un rango del 80% - 120%, donde en la linealidad del sistema, el coeficiente correlación (r) para ambroxol clorhidrato en las tres series (1,2,3) fueron de 0.9997; 0.9993 y 0.9990 respectivamente y para clenbuterol en las tres series (1,2,3) se obtuvieron 0.9996; 0.9991 y 0.9978 respectivamente. En la linealidad del método, el coeficiente de correlación (r) fue de 0.9996 para ambroxol y 0.9972 para clenbuterol, siendo el criterio de aceptación $r \geq 0.995$.
 - En la Precisión, se concluye que, para este parámetro la prueba de repetibilidad tuvo un coeficiente de variación para ambroxol de 0.16% y para clenbuterol 0.41%; la precisión intermedia de

diferentes analistas y diferentes equipos para ambroxol fue de 0.23% y 0.48% respectivamente. Asimismo, la precisión intermedia de diferentes analistas y diferentes equipos para clenbuterol fue de 1.00% y 1.08% respectivamente.

- En la Exactitud, la técnica es exacta con un porcentaje de recuperación de 100.1% para ambroxol clorhidrato y 100.5% para clenbuterol clorhidrato.
 - En el Límite de Detección y Cuantificación, se llegó a concluir que, para el límite de detección la concentración encontrada en ambroxol fue de 1.9052ppm y en clenbuterol 0.001949ppm; del mismo modo, el límite de cuantificación encontrado en ambroxol fue de 2.3003ppm y en clenbuterol 0.004971ppm.
 - En la Robustez, se concluye que, la técnica analítica demostró ser robusta, evidenciándose que las soluciones de los analitos y producto terminado sometidas a condiciones normales, a modificación del sistema cromatográfico (temperatura de la columna), a variaciones en las condiciones de almacenamiento de las soluciones estándar y muestra, los resultados cumplieron con criterios de aceptación.
 - En el Rango, concluimos que luego de aplicarse el procedimiento analítico y cumpliendo satisfactoriamente los parámetros de exactitud, precisión y linealidad, este intervalo oscila dentro de los límites de aceptación.
3. En cuanto a la técnica analítica propuesta se concretó que ella es confiable, reproducible y aplicable en los equipos y productos de laboratorios S. J. Roxfarma S.A, pudiéndose utilizar en los análisis de rutina.
 4. Los resultados de las pruebas obtenidas cumplieron con los criterios de aceptación, por lo que se documentó la validación de la técnica analítica propuesta.

4.3. RECOMENDACIONES

- ✓ Se recomienda implementar como parte de un procedimiento habitual en los laboratorios, la validación de las técnicas o procedimientos analíticos de los principios activos que se comercializan, ello permitirá que sus productos farmacéuticos mantengan la confiabilidad y sean reproducibles.
- ✓ En la aplicación y desarrollo del procedimiento analítico se debe seguir tal cual indica la técnica y protocolo analítico. Entre los cuales se debe tener en cuenta: Acondicionar el sistema cromatográfico durante una hora antes de iniciar el análisis, en la preparación de la fase móvil se recomienda mezclar y gasificar durante diez minutos.
- ✓ El analista que empieza a desarrollar la validación de la técnica debe concluirlo hasta el final, esto evitará errores y confusiones en los resultados que se puedan obtener.
- ✓ Se recomienda no someter los principios activos estudiados a condiciones que afecten su degradación.
- ✓ Se recomienda que cualquier cambio en la metodología de la técnica validada, esta debe ser revalidada.
- ✓ Cualquier cambio en la fórmula con respecto a los proveedores se debe realizar un estudio (análisis de riesgo) para ver el impacto que repercute sobre en el producto final.
- ✓ Se recomienda a los futuros profesionales realizar estudios de investigación sobre validaciones de métodos o técnicas analíticas en la industria farmacéutica, con el propósito de aprender, de estar calificado, ser competente y aptos en la realización de dichos procesos, mejorando así las operaciones del control de calidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Food and Drug Administration. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry. July 2015. Disponible en: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/analytical-procedures-and-methods-validation-drugs-and-biologics>
2. Suarez J." Validación del método analítico de valoración de Sulfametoxazol en suspensión oral producido por FARBIOVET S.A. por HPLC". Tesis. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba – Ecuador 2015. [Consultado: 2021 enero 3]. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/4417>
3. The United States Pharmacopoeia and National Formulary: USP43/NF38, Section 1225: Validation of Compendia Methods, USP Convention Inc. Rockville, MD, 2149, 2019.
4. Lovatón Carbajal E. "Validación de un método analítico para cuantificación de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL polvo para suspensión oral por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)". Tesis para optar el título de químico farmacéutico y bioquímico. Universidad Inca Garcilaso de la Vega. Lima-Perú. [Consultado: 2021 enero 4]. Disponible en: <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/2038>
5. MINSA.D.S. 021-2018. Decreto Supremo que modifica el reglamento para el Registro, Control y Vigilancia Sanitaria de Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios y aprueba el Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Farmacéuticos. Perú. 2018. [En línea][Consultado: 2021 enero 17] Disponible en: ¡Error! Referencia de hipervínculo no válida.

6. DIGEMID. “Validación de técnicas analíticas propias del producto terminado”. [Consultado 2021 enero 17]. Disponible en: <http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/EPFarma/MBP/ManualBuenasPracticas3.pdf>
7. MINSA.R.M.234-2019. Norma técnica que regula la información mínima que debe contener el documento de validación de técnicas analíticas propias [Consultado 2021 febrero 1] Disponible en: https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/298618/Resoluci%C3%B3nMinisterial_N_234-2019-MINSA.PDF
8. Guillen J,” Desarrollo y validación de un método para la determinación simultánea de ambroxol y clenbuterol en jarabe por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)”. Trabajo Especial de Grado para optar al título de Licenciado en Química. Universidad Central de Venezuela.2019. [Consultado 2021 junio 2]. Disponible en: <http://saber.ucv.ve/handle/10872/20409>
9. Acosta M, Nina S.” Validación de una Técnica Analítica por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) y Cálculo de la Incertidumbre para los ensayos de Ambroxol clorhidrato y clenbuterol clorhidrato en un jarabe. Arequipa - 2013”. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Católica de Santa María. Arequipa – 2014. [Consultado: 2021 junio 2]. Disponible en: <http://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/handle/UCSM/4408>
10. Vargas J, Chipantiza L. “Validación de un método cromatográfico para cuantificación de ciprofloxacina en tabletas”. Tesis para optar al título de química farmacéutica. Universidad de Guayaquil-Ecuador.2017. [Consultado 2021 febrero 21] Disponible en: <http://repositorio.uq.edu.ec/bitstream/redug/21904/1/BCIEQ-T-0220%20Vargas%20Quinteros%20Elizabeth%3B%20Chipantiza%20Obando%20Laina%20Nicole.pdf>.

11. Morales J. “Desarrollo de un método para la cuantificación de Clenbuterol y Ambroxol en jarabes para la tos por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Tesis para optar el título de químico. Universidad de San Carlos. Guatemala-2017. [Consultado: 2021 junio]. Disponible en: <https://biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/tesis/Q232.pdf>

12. García A, Soberón E, Cortez M, Rodríguez R, Herrera J, Alcántara A. “Guía de Validación de métodos analíticos” 2012 May. [Consultado: 2021 enero 17]. Disponible en: http://www.academia.edu/4513278/Guia_de_Validacion_de_metodos_analiticos_editada_por_QFB_de_Mexico

13. Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”. Prospecto para el producto Ambroxol - Clenbuterol. Venezuela - 2017. [Consultado:2021 junio 2]. Disponible en: http://citas.inhrr.gob.ve/sistemas_inhrr/SRCFFA/archivos/20170725091527_5000.pdf

14. Guarniz D. “Validación del método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación de ambroxol clorhidrato en polvo para suspensión oral”. Tesis I para optar el título de químico farmacéutico. Universidad Nacional de Trujillo .2016. [Consultado: 2021 enero 24] Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/3715>

15. Eurolab España P. Morillas y colaboradores. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados. (1°ed.2016). [Consultado: 2021 enero 31]. Disponible en: www.eurachem.org.

16. Palomino J. “Validación de un método analítico para la valoración de clorhidrato de terbinafina en gel al 1% por cromatografía líquida de alta

- performance (HPLC). Tesis para optar el título profesional de químico farmacéutico y bioquímico. Universidad Inca Garcilaso de la Vega.Lima-Perú.2017.[Consultado: 2021 febrero 6]. Disponible en: <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/1695>
- 17.**Nuévalos L. “Desarrollo moral y valores ambientales”. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.2008. [Consultado: 2021 enero 31]. Disponible en: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/10210/nuevalos.pdf>
- 18.**Parra Z. “Desarrollo y Validación de un método analítico por HPLC para la determinación simultánea de clorhidrato de ambroxol y loratadinas en jarabes”. Tesis para optar el título de químico. Universidad Central de Venezuela. 2017. [Consultado: 2021 junio]. Disponible en: <https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/193898>
- 19.**Tapia W. “Validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para cuantificación de ambroxol clorhidrato 7,5mg/mL solución oral gotas”. Informe de investigación tipo III. Universidad Nacional de Trujillo.2011.[Consultado: 2021 agosto]. Disponible en: <https://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/2278>
- 20.**Leyva E. “Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación por HPLC de Clenbuterol clorhidrato en solución oral-gotas, y análisis comparativo de productos comercializados en el Perú”. Tesis para optar el título profesional para químico farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2009.[Consultado:2021 agosto]. Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/1606>

ANEXOS

ANEXO A: INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

Anexo A1: Parámetros de desempeño analítico que debe una validación de técnicas analíticas propias.

Parámetros de Desempeño Analítico		Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
			Análisis Cuantitativo	Pruebas de Límite		
Exactitud		SI	SI	*	**	NO
Precisión	Repetibilidad	SI	SI	NO	SI	NO
	Precisión intermedia	SI#	SI#	NO	SI#	NO
Especificidad		SI	SI	SI	**	SI
Límite de Detección		NO	NO	SI	*	NO
Límite de Cuantificación		NO	SI	NO	*	NO
Linealidad		SI	SI	NO	**	NO
Intervalo/Rango		SI	SI	*	*	NO

* Puede requerirse, dependiendo de la naturaleza del método.

** Puede ser no necesaria en algunos casos

En casos donde la reproducibilidad ha sido realizada, la precisión intermedia no es necesaria.

Anexo A2: Hoja de trabajo utilizada en la validación de los parámetros.

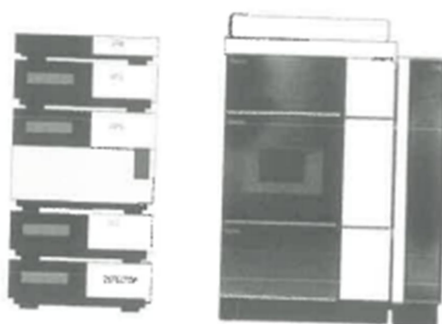
ÁREA DE CONTROL DE CALIDAD	
HOJA DE TRABAJO	
Producto :	
Presentación :	
Lote :	Solicitud de Análisis N° :
Técnica Analítica (TA) :	Fecha Inicio de Análisis :
Especificación Básica (EB) :	Fecha Final de Análisis :
Validación de Métodos Analíticos - Valoración	APTITUD DE SISTEMA
Datos del estándar:	
<i>Principio activo</i> :	Factor Estándar (Fst) :
<i>Estándar tipo</i> :	
<i>Nº Análisis</i> :	Formula =
<i>Potencia (t/c)</i> :	
<i>F. Reanálisis</i> :	Fst1 =
<i>F. Vencimiento</i> :	Fst2 =
<i>Peso Estándar (Wst 1):</i>	
<i>Peso Estándar (Wst 2):</i>	
<i>Principio activo</i> :	Factor Estándar (Fst) :
<i>Estándar tipo</i> :	
<i>Nº Análisis</i> :	Formula =
<i>Potencia (t/c)</i> :	
<i>F. Reanálisis</i> :	Fst1 =
<i>F. Vencimiento</i> :	Fst2 =
<i>Peso Estándar (Wst 1):</i>	
<i>Peso Estándar (Wst 2):</i>	
<i>Principio activo</i> :	Factor Estándar (Fst) :
<i>Estándar tipo</i> :	
<i>Nº Análisis</i> :	Formula =
<i>Potencia (t/c)</i> :	
<i>F. Reanálisis</i> :	Fst1 =
<i>F. Vencimiento</i> :	Fst2 =
<i>Peso Estándar (Wst 1):</i>	
<i>Peso Estándar (Wst 2):</i>	
Observaciones :	
Conclusión:	El producto analizado es <input type="checkbox"/> CONFORME ó <input type="checkbox"/> NO CONFORME con las especificaciones y métodos analíticos establecidos.
Nombre y Firma	Nombre y Firma
ANALISTA	RESPONSABLE FQ

Anexo A3: Certificados de calificación y verificación de instalación operacional del equipos e instrumentos.



CONSTRUIMOS
SOLUCIONES
INTEGRALES

REPORTE DE CALIFICACIÓN DE INSTALACIÓN Y VERIFICACIÓN OPERACIONAL DE SISTEMA CROMATOGRÁFICO



Información del cliente			
Compañía	Laboratorio Roxfarma S.A.		
Dirección	Av. Alfredo Mendiola 5648		
Responsable	Yuritza Mendoza	E-mail	-
Teléfono	6139100	Código Equipo	ASCL-001
Fecha	1/7/2020	N° Ticket	ST2020-174
Sistema	Thermo Scientific - UltiMate 3000	Responsable RPA	Eli Cardenas

Información de los módulos instalados		
Módulo	Modelo	Número de serie
* Software de Control	Chromeleon 7.2	172538
* Bandeja de Solventes	SR-3000	-
* Módulo de Bomba	LPG-3400RS	8162616
* Módulo de Automuestreador	WPS-3000TSL	8161288
* Módulo de Columna	TCC-3000RS	6023440
* Módulo Detector UV	No aplica	
* Módulo Detector DAD	DAD-3000RS	8144164
* Módulo Detector FLD	No aplica	
* Módulo Detector RI	No aplica	
* Módulo Detector Corona	No aplica	
* Módulo Detector Electroquímico	No aplica	
* Módulo de Automuestreador 2	No aplica	
* Módulo de Colector de Fracciones	No aplica	
* Módulo Detector de Masas	No aplica	

→ Av. Guardia Civil N° 657 - 661 / 6to. piso / San Borja

→ rpasa@paperu.com

→ (511) 451 2457 / 452 0789 / 451 9648 / 561 0781

→ paperu.com

ThermoFisher SCIENTIFIC

Performance Qualification

• Precision of the Stand. Gradient C-D

• Instruments and Fluidics

Instrument Name	Model	Supplier's Name	Serial Number
Pump	LPG-3400RS	Thermo Scientific	8162616
UV Detector	DAD-3000RS	Thermo Scientific	8144164
Chromeleon Datasystem	V. 7.2.9 Build 11323	Thermo Scientific	172538

Accessories	Description
Back Pressure Device	Capillary (L:15 m; ID:0,18 mm)
Solvent C for Gradient	Water (HPLC-Grade)
Solvent D for Gradient	Water + 0,1% Acetone

• Additional Information

Customer: Laboratorio Roxfarma
Operator: Ing. Eli Cardenas
Reactivos para Analisis SAC

Execution Date: 2020-Jul-01
Next Qualification: 2021-Ene.

• Limits and Test Results

	Limit	Observed max. SD	Result of all Steps
Gradient Precision	<= 0.500 %	0.093 %	Test passed

• Signatures

	Signature	Date
Submitter / Operator:		
Reviewer: Eli Cardenas S.  Soporte Técnico	
Approver (e-sig. only):		

LABORATORIO DE CALIBRACIÓN ACREDITADO POR
EL ORGANISMO PERUANO DE ACREDITACIÓN
INACAL – DA CON REGISTRO N° LC - 021



Registro N° LC - 021



QSI PERÚ S.A.
LABORATORIO DE CALIBRACIÓN
Av. República de Panamá 2577 La Victoria - Lima - Línea Gratuita: 0-800-70863
e-mail: sat.pe@qsiindustrial.biz
web: http://www.qsiindustrial.biz

El contenido de este documento sólo puede publicarse o reproducirse de forma completa

CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN : BM0401 2020 OS EX - 17449 - 2

Solicitante : LABORATORIO FARMACÉUTICO SAN JOAQUIN - ROXFARMA S.A.

Dirección : Av. Alfredo Mendiola 5648 - Los Olivos

OBJETO DE CALIBRACIÓN : BALANZA
Marca : METTLER TOLEDO
Modelo : XPR206DR
Serie : B927894639
Procedencia : SUIZA
Identificación : CCBA-009
Capacidad Máxima : 81 g / 220 g
División de escala (d) : 0,000005 g / 0,00001 g
División de verificación (e) : 0,001 g
Tipo : ELECTRÓNICA
Ubicación : SALA DE BALANZAS

FECHA DE CALIBRACIÓN : 2020-07-23

MÉTODO DE CALIBRACIÓN

Comparación directa con pesas patrones de acuerdo al Procedimiento de Calibración de Balanzas de Funcionamiento no Automático Clase I y Clase II. PC - 011 del SNM-INDECOPI, Cuarta Edición abril 2010.

LUGAR DE CALIBRACIÓN : SALA DE BALANZAS
Av. Alfredo Mendiola 5648 - Los Olivos

CONDICIONES AMBIENTALES

	Inicial	Final
Temperatura	25,4 °C	25,5 °C
Humedad Relativa	60,3 %	60,7 %

INCERTIDUMBRE

La incertidumbre reportada en el presente certificado es la incertidumbre expandida de medición que resulta de multiplicar la incertidumbre estándar por el factor de cobertura $k=2$. La estimación de la incertidumbre se realizó según el Procedimiento de Calibración de Balanzas de Funcionamiento no Automático Clase I y Clase II. PC - 011 del SNM-INDECOPI, Cuarta Edición abril 2010. Generalmente, el valor de la magnitud está dentro del intervalo de los valores determinados con la incertidumbre expandida con una probabilidad de aproximadamente 95 %.

Fecha de Emisión

Coordinador

2020-07-27


Carlos Mateo Villanueva

Certificado de Calibración

LTC20-0067

ORDEN DE TRABAJO	: OT20-0125
CLIENTE	: LABORATORIO FARMACEUTICO SAN JOAQUIN - ROXFARMA S.A.
DIRECCIÓN	: AV. ALFREDO MENDIOLA 5648 URB. INDUSTRIAL INFANTAS - LOS OLIVOS
LUGAR DE CALIBRACIÓN	: SALA DE MATERIALES PARA ANÁLISIS Y SUMINISTROS
INSTRUMENTO CALIBRADO	: REFRIGERADORA
MARCA / FABRICANTE	: MIYAGUI
MODELO	: CGS-100
SERIE	: NO INDICA
PROCEDENCIA	: NO INDICA
IDENTIFICACIÓN	: CCRF-008
VENTILACIÓN	: FORZADA
POSICIÓN SELECTOR VENTILACIÓN	: —
INDICADOR	: DIGITAL
ALCANCE / Div. Min. INDICADOR	: [-2 a 15]°C / 0,1 °C
SELECTOR	: DIGITAL
ALCANCE / Div. Min. SELECTOR	: [-2 a 15]°C / 0,1 °C
UBICACIÓN	: SALA DE MATERIALES PARA ANÁLISIS Y SUMINISTROS
TEMPERATURA DE TRABAJO	: 5 °C ± 3 °C
FECHA DE CALIBRACIÓN	: 2020-04-22
FECHA DE EMISIÓN	: 2020-04-26

El presente Certificado de Calibración evidencia la trazabilidad del proceso de calibración con patrones Nacionales o Internacionales, los cuales representan las unidades de medida de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI) y no debe utilizarse como certificado de conformidad con normas de producto.

MULTI SERVICE GROUP E.I.R.L. como organismo de evaluación de la conformidad de tercera parte ejecuta servicios de calibración a la vez que calibra y mantiene sus patrones de referencia con la finalidad de garantizar la trazabilidad de las mediciones.

Con el fin de asegurar la calidad de sus mediciones, el usuario deberá recibir sus instrumentos a intervalos apropiados.

La incertidumbre reportada en el presente certificado es la incertidumbre expandida de medición, que resulta de multiplicar la incertidumbre estándar por el factor de cobertura $k=2$. La incertidumbre fue determinada según la "Guía para la Expresión de la Incertidumbre de la Medición". Generalmente, el valor de la magnitud está dentro del intervalo de los valores determinados con la incertidumbre expandida con una probabilidad de aproximadamente 95%.

Los resultados reportados son válidos para las condiciones y momento en que se realizó la calibración. Al solicitante le corresponde disponer en su momento la recalibración.

MULTI SERVICE GROUP E.I.R.L. no se responsabiliza por cualquier daño derivado del uso inadecuado del equipo calibrado, así como de una incorrecta interpretación de los resultados del presente certificado.

Sello




 Director de Laboratorio
 Dante Abelino Pérez

MULTI SERVICE GROUP E.I.R.L.

PROHIBIDA LA REPRODUCCIÓN DE ESTE DOCUMENTO SALVO AUTORIZACIÓN EXPRESA DE MSG.
 Jr. Las Gravas Nro. 1853 Urb. Flores 78 - Lima 36 Telf.: 01 682 4729 / RPC: 992 367 283
 operaciones@msgperu.com / metrologia@msgperu.com / ventas@msgperu.com / www.msgperu.com

Anexo A4: Cromatogramas – Aptitud del Sistema

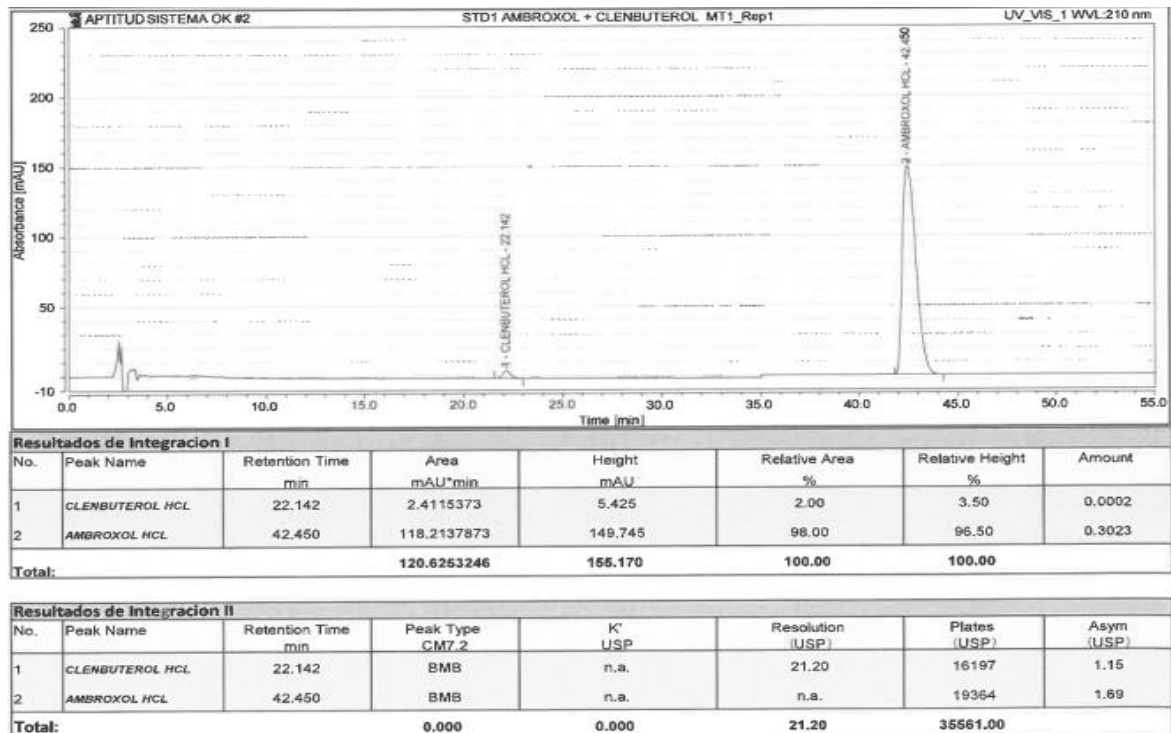


Figura 11: Cromatograma de Ambroxol + Clenbuterol en aptitud del sistema del estándar 1.

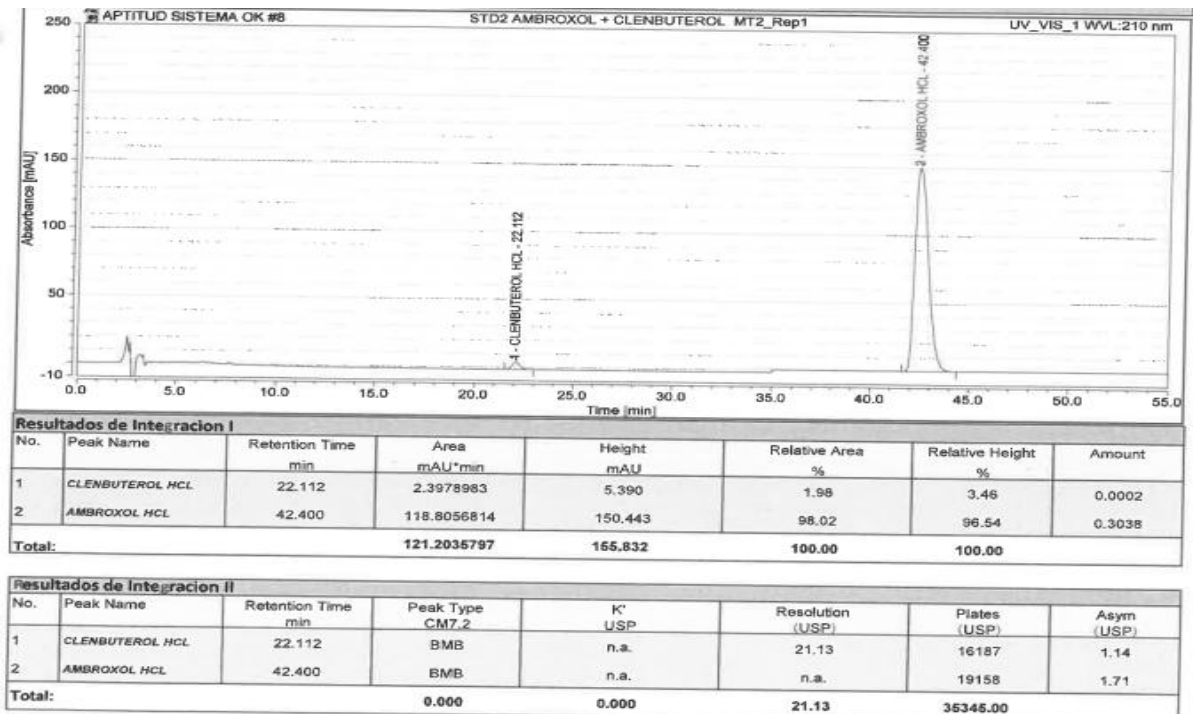


Figura 12: Cromatograma de Ambroxol + Clenbuterol en aptitud del sistema del Estándar 2

Anexo A5: Cromatogramas – Especificidad por identificación

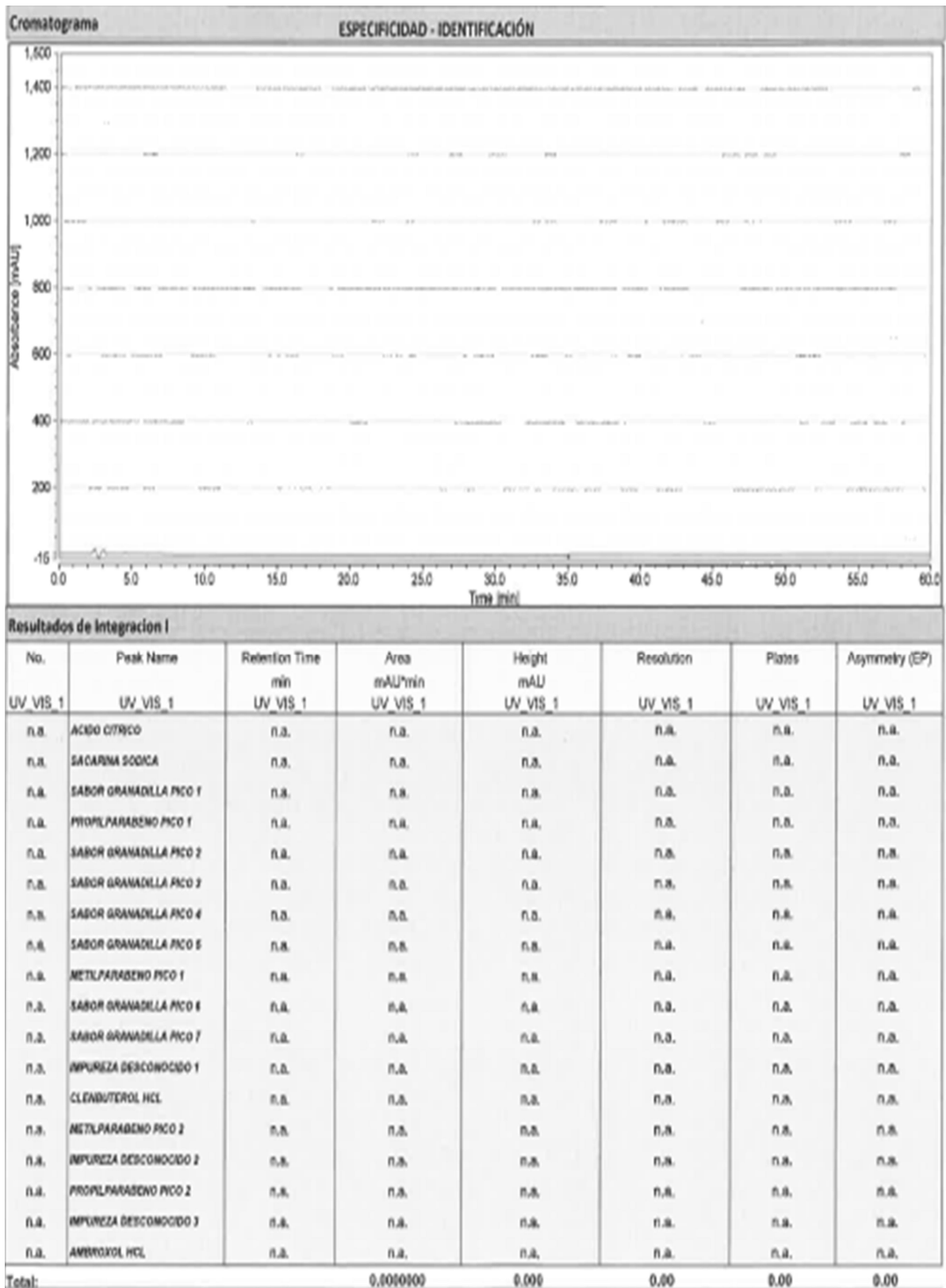


Figura 13: Especificidad por identificación de la fase móvil

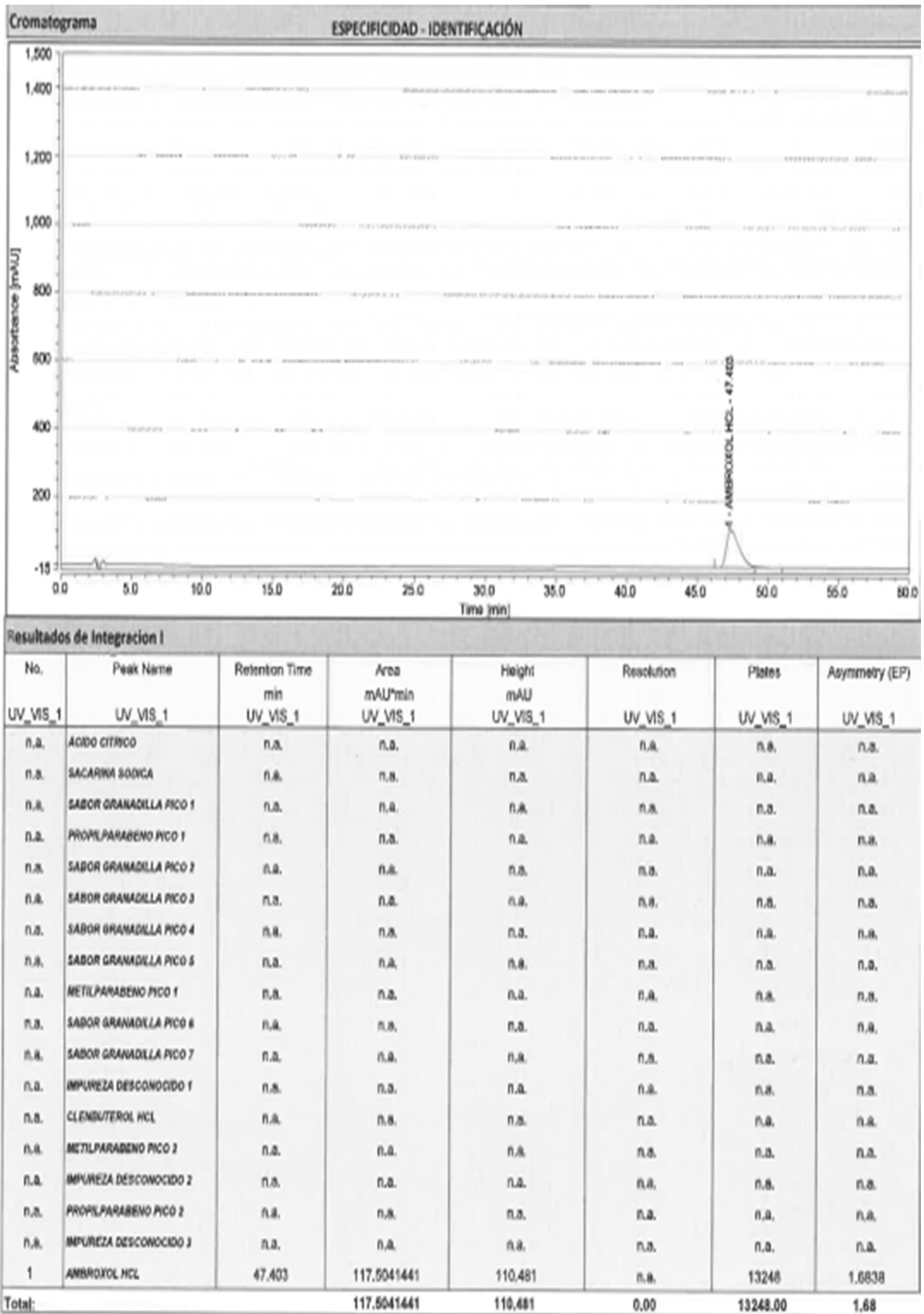


Figura 14: Especificidad por identificación del analito Ambroxol

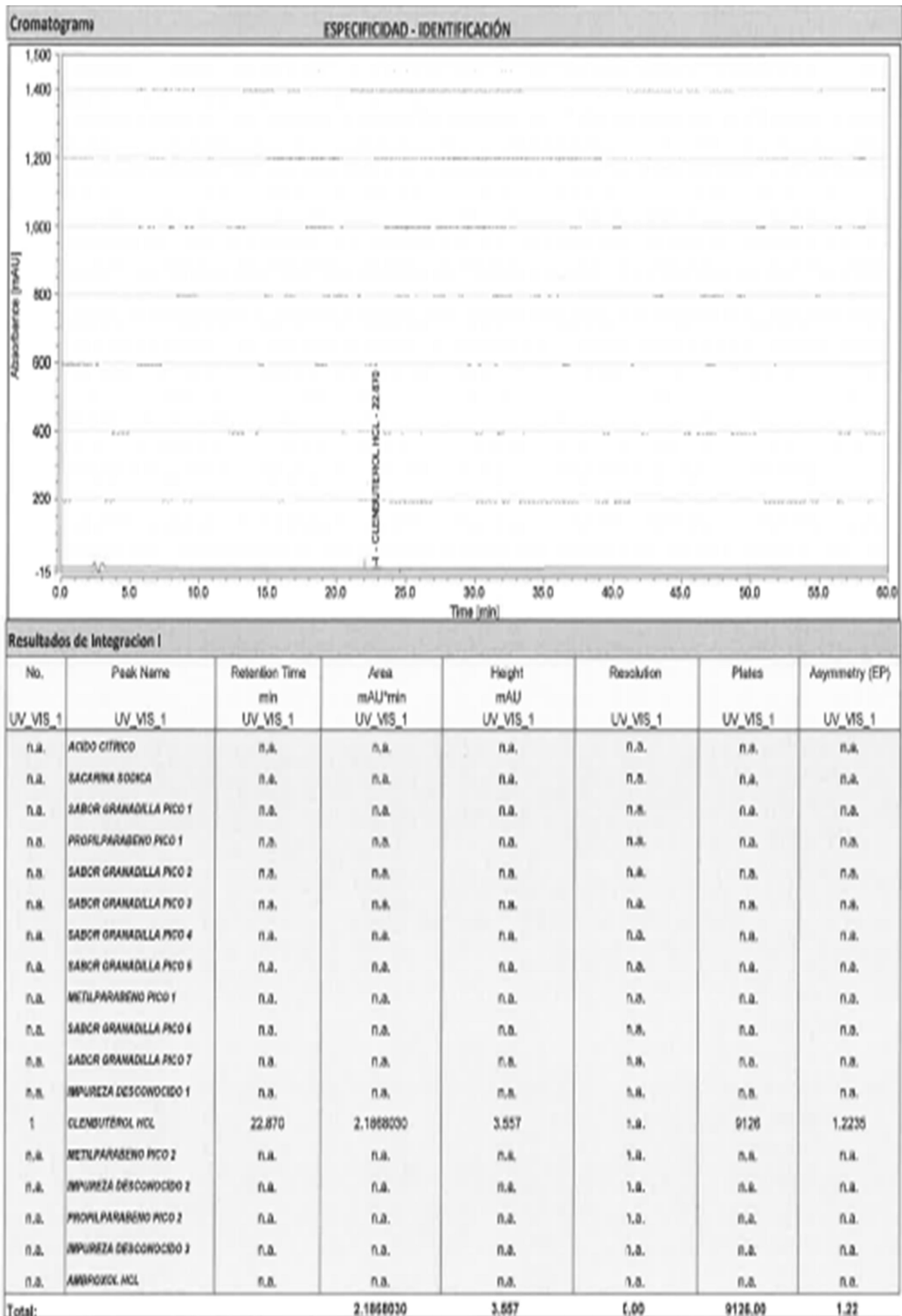


Figura 15: Especificidad por identificación del analito Clenbuterol

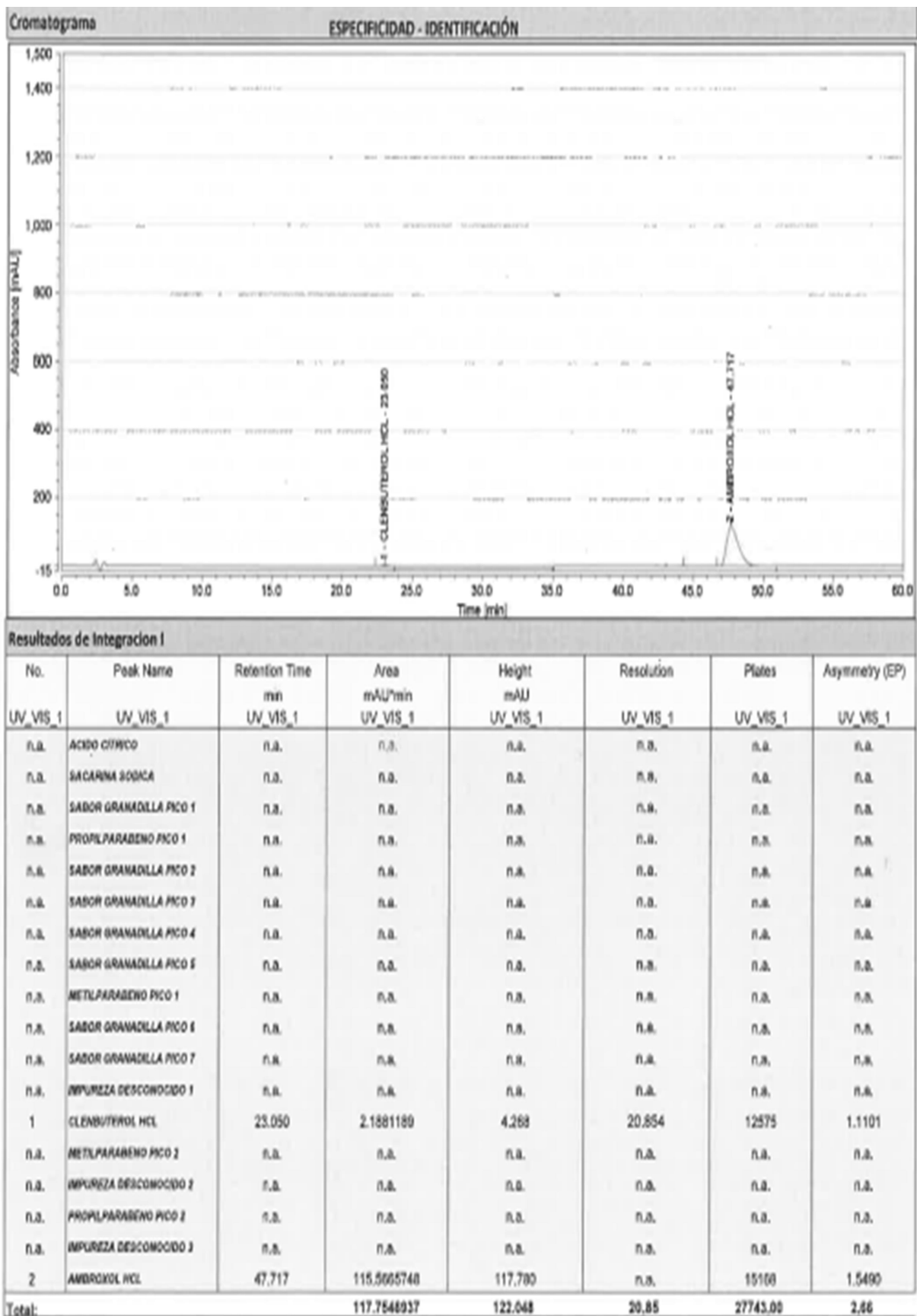
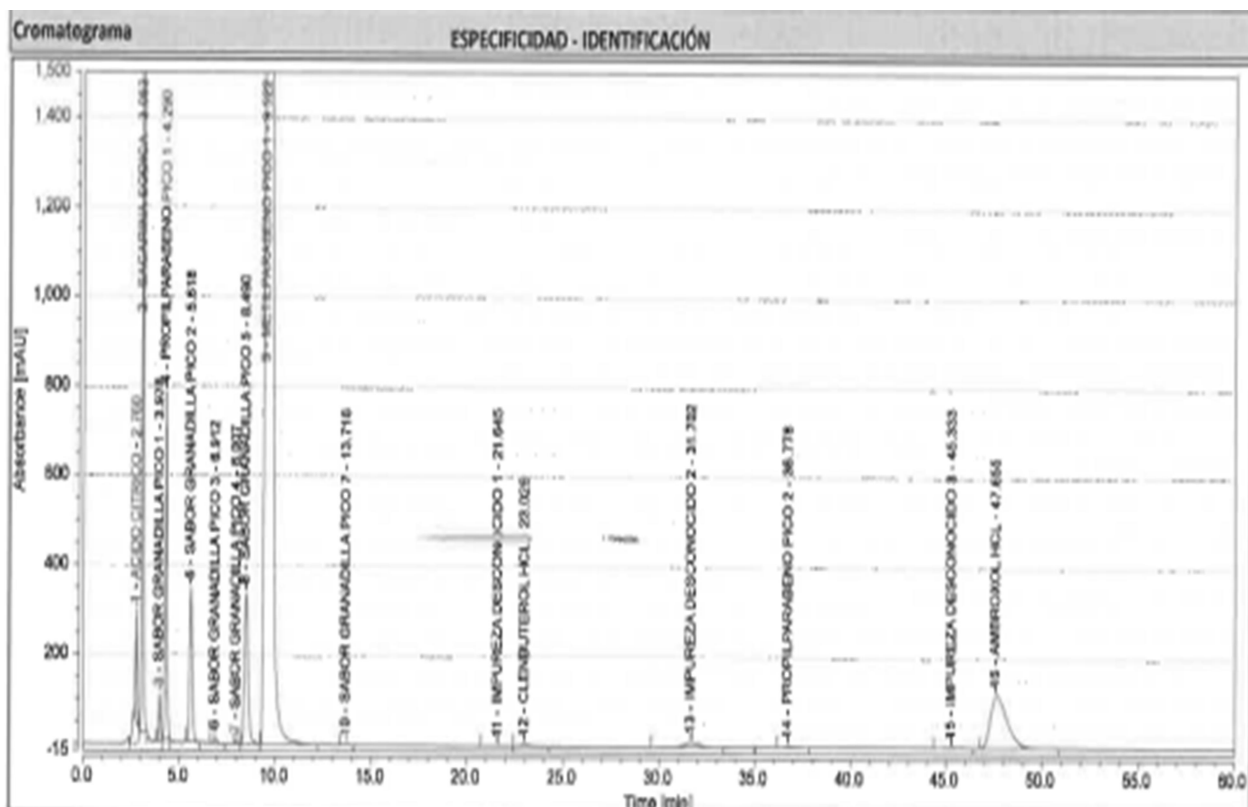


Figura 16: Especificidad por identificación del Estándar mixto



Resultados de Integración I

No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Resolution	Plates	Asymmetry (EP)
UV_VIS_1	UV_VIS_1	UV_VIS_1	UV_VIS_1	UV_VIS_1	UV_VIS_1	UV_VIS_1	UV_VIS_1
1	ACIDO CITRICO	2.760	21.1898703	250.833	2.791	7658	1.3288
2	SACARINA SODICA	3.063	143.9897970	2040.403	7.698	20841	1.3578
3	SABOR GRANADILLA PICO 1	3.978	10.5435633	102.424	1.900	10355	1.0328
4	PROPILPARABENO PICO 1	4.290	85.3862903	776.828	6.801	10075	1.3754
5	SABOR GRANADILLA PICO 2	5.618	49.3950733	344.304	5.393	10369	1.3571
6	SABOR GRANADILLA PICO 3	6.912	2.2643098	13.457	4.046	11284	1.3547
7	SABOR GRANADILLA PICO 4	8.007	0.8404814	4.960	1.579	12856	1.2213
8	SABOR GRANADILLA PICO 5	8.490	73.6540483	338.619	2.275	10501	1.3436
9	METILPARABENO PICO 1	9.522	1841.8040402	5000.038	7.831	4340	1.9608
n.a.	SABOR GRANADILLA PICO 6	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
10	SABOR GRANADILLA PICO 7	13.716	0.2882217	0.946	11.726	12216	1.0283
11	IMPUREZA DESCONOCIDO 1	21.645	0.5689712	0.988	1.638	10155	0.9387
12	CLENBUTEROL HCL	23.025	2.3452458	4.301	8.163	12232	1.1784
n.a.	METILPARABENO PICO 2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
13	IMPUREZA DESCONOCIDO 2	31.702	9.5979605	10.875	4.647	9531	0.9224
14	PROPILPARABENO PICO 2	36.778	1.1195797	1.900	8.733	27213	1.2722
15	IMPUREZA DESCONOCIDO 3	45.333	0.7613479	1.105	1.763	28577	1.1914
16	AMBUROXOL HCL	47.655	118.2357390	119.114	n.a.	14790	1.5593
Totak:			2361.9645697	9011.464	76.99	212992.00	20.42

Figura 17: Especificidad por identificación del producto terminado

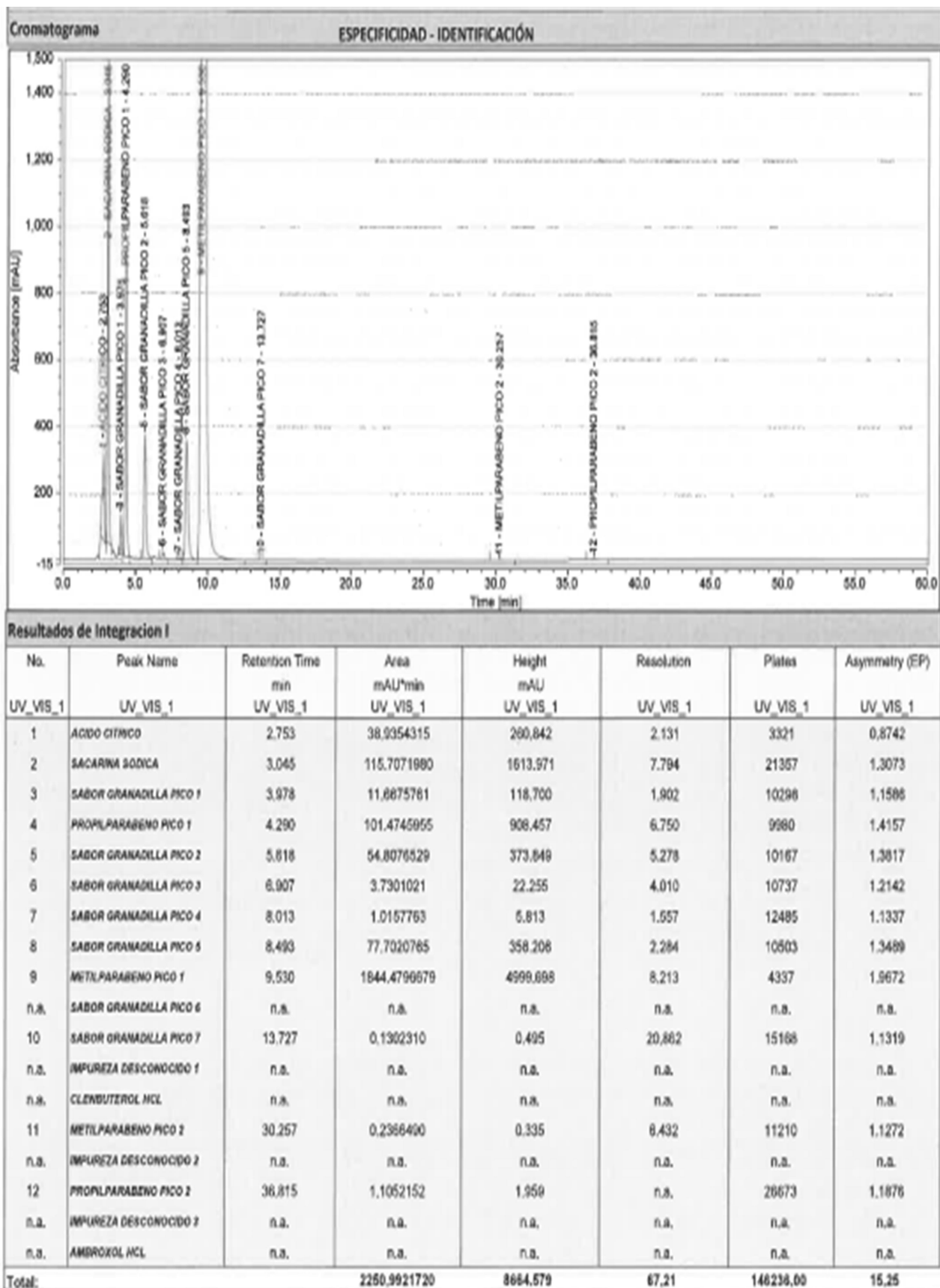


Figura 18: Especificidad por identificación del Placebo

ANEXO B:

MATRIZ DE CONSISTENCIA

Título: VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN DE AMBROXOL CLORHIDRATO 7,5mg + CLENBUTEROL CLORHIDRATO 0,005mg/5mL EN JARABE.		
FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS
Problema General	Objetivo General	Hipótesis General
¿La técnica analítica para la identificación y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución de ambroxol clorhidrato 7,5mg + clenbuterol clorhidrato 0,005mg/5mL jarabe que se propone cumplirá con las especificaciones establecidas para la validación?	Validar la técnica analítica para identificación y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución de ambroxol clorhidrato 7,5mg + clenbuterol clorhidrato 0,005mg/5mL en jarabe.	La validación de la técnica analítica para la identificación y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución de ambroxol clorhidrato 7,5mg + clenbuterol clorhidrato 0,005mg/5mL en jarabe cumplen con los parámetros establecidos.
Problemas Específicos	Objetivos Específicos	Hipótesis Específicas
¿Se logrará desarrollar los parámetros de validación de la técnica analítica por cromatografía líquida de alta resolución de ambroxol clorhidrato 7,5mg + clenbuterol clorhidrato 0,005mg/5mL en jarabe según establece la USP vigente con referencia a exactitud, precisión, especificidad, límite de detección y cuantificación, linealidad, robustez y rango?	Determinar los parámetros de validación de la técnica analítica para identificación y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución de ambroxol clorhidrato 7,5mg + clenbuterol clorhidrato 0,005mg/5mL en jarabe.	El proceso validación de la técnica analítica para identificación y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución de ambroxol clorhidrato 7,5mg + clenbuterol clorhidrato 0,005mg/5mL en jarabe, cumplen con las exigencias en todos los parámetros de validación: Exactitud, precisión, especificidad, límite de detección y cuantificación, linealidad, robustez y rango.
¿Se podrá comprobar que la técnica analítica para la identificación y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución de ambroxol clorhidrato 7,5mg + clenbuterol clorhidrato 0,005mg/5mL en jarabe, es aplicable en los equipos y productos de laboratorios farmacéuticos S.J. Roxfarma?	Comprobar si la técnica analítica de referencia para la identificación y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución de ambroxol clorhidrato 7,5mg + clenbuterol clorhidrato 0,005mg/5mL en jarabe, es aplicable en los equipos y productos de laboratorios farmacéuticos S.J. Roxfarma.	La técnica analítica para la identificación y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución de ambroxol clorhidrato 7,5mg + clenbuterol clorhidrato 0,005mg/5mL en jarabe, es aplicable en los equipos y productos de laboratorio farmacéuticos S.J. Roxfarma.
¿Serán confiables los resultados de la validación de la técnica analítica para la identificación y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución de ambroxol clorhidrato 7,5mg + clenbuterol clorhidrato 0,005mg/5mL en jarabe?	Documentar que los resultados de las pruebas obtenidas en la técnica analítica son confiables y cumplen con los criterios de aceptación para la validación por cromatografía líquida de alta resolución de ambroxol clorhidrato 7,5mg + clenbuterol clorhidrato 0,005mg/5mL en jarabe.	Los resultados de las pruebas obtenidas en la técnica analítica son confiables y cumplen con los criterios de aceptación para la validación por cromatografía líquida de alta resolución de ambroxol clorhidrato 7,5mg + clenbuterol clorhidrato 0,005mg/5mL en jarabe.
<p>Metodología: ENFOQUE: Cuantitativo, prospectivo y longitudinal. DISEÑO: Experimental POBLACION: Lote industrial de 1200L de ambroxol clorhidrato 7,5mg + clenbuterol clorhidrato 0,005mg/5mL en jarabe comercializados por laboratorios S.J. Roxfarma. MUESTRA: 10 frascos de 120mL de ambroxol + clenbuterol jarabe, que es el 0.1% de la población. TECNICA: - HPLC. INSTRUMENTO: Hojas de trabajo o ficha de registro, Excel, Formato minitab 18.</p>		

ANEXO C: OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Operacionalización de variable independiente

VARIABLE 1	DEFINICION CONCEPTUAL DE LA VARIABLE	DEFINICION OPERACIONAL DE LA VARIABLE	DIMENSIONES	INDICADOR	VALOR FINAL DE LA VARIABLE
Identificación y cuantificación de ambroxol clorhidrato 7,5mg + y clenbuterol clorhidrato 0,005mg/mL en jarabe.	La identificación y cuantificación de un principio activo son procedimientos que requieren de análisis necesarios para obtención resultado optimo, haciendo uso de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).	La identificación y cuantificación de ambroxol + clenbuterol en jarabe se realiza aplicando la técnica analítica mediante el uso del HPLC, que nos permite tener resultados exactos y fiables.	Técnica analítica	Criterios de aceptación según USP vigente.	✓ Cumple ✓ No cumple

Operacionalización de variable dependiente

VARIABLE 2	DEFINICIÓN CONCEPTUAL DE LA VARIABLE	DEFINICIÓN OPERACIONAL DE LA VARIABLE	DIMENSIONES	INDICADOR	VALOR FINAL DE LA VARIABLE
Validación de la técnica analítica por HPLC	<p>Validación de Métodos analíticos es el proceso por el cual queda establecido por estudios experimentales y/o de laboratorio, que la capacidad del método y características de desempeño cumple con los requisitos para la aplicación analítica deseada.¹</p> <p>Los parámetros requeridos para la validación son:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Exactitud ✓ Precisión ✓ Linealidad ✓ Especificidad ✓ Límite de cuantificación ✓ Límite de detección. ✓ Robustez ✓ Rango 	<p>La validación de la técnica analítica por HPLC es un procedimiento documentado mediante pruebas en el laboratorio, basado en confirmación de los resultados que se esperan cumpliendo con los criterios de aceptación de los parámetros de desempeño.¹⁶</p>	<p>Parámetros de desempeño:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aptitud del sistema: - Especificidad: <ul style="list-style-type: none"> ▪ E. Por identificación. ▪ E. Por degradación. - Linealidad: <ul style="list-style-type: none"> ▪ L.del sistema ▪ L. del método - Exactitud - Precisión: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Repetibilidad. ▪ P. Intermedia diferente analista ▪ P. Intermedia diferente equipo. - Límite de identificación y cuantificación - Rango 	Criterios de aceptación según USP vigente.	<p>✓ Conforme</p> <p>✓ No conforme</p>

ANEXO D: Carta de aprobación para la ejecución del proyecto de tesis.



"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

San Juan de Lurigancho 28 de abril del 2022

CARTA N°79-2022/ EPFYB-UMA

Sres.
Laboratorio Farmacéutico San Joaquín – Roxfarma S.A.
Lima
Presente. –

De mi especial consideración:

Es grato dirigirme a usted para saludarlo en nombre propio y de la Universidad María Auxiliadora, a quien represento en mi calidad de Director de la Escuela de Farmacia y Bioquímica.

Sirva la presente para pedir su autorización a que los bachilleres: VIDAL SANCHEZ, Karen Priscila, DNI 42360595 y CAMONES VARGAS, Flor Ana, DNI 47555129 puedan recopilar datos para su proyecto de tesis titulado: "**VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN DE AMBROXOL CLORHIDRATO 7,5+CLENBUTEROL CLORHIDRATO 0,005mg/5mL EN JARABE**".

Sin otro particular, hago propicio la ocasión para expresarle los sentimientos de mi más alta consideración y estima.

Atentamente,



Dr. Jhonne Samanego Joaquín
Director de la Escuela Profesional de
Farmacia y Bioquímica



Av. Canto Bello 431, San Juan de Lurigancho
Tel: 389 1212
www.umaperta.edu.pe

LGC/jlr

ANEXO E: Fotografías del trabajo de campo



Figura 19: Tesistas preparando las soluciones de trabajo para el desarrollo de la validación de la técnica analítica.



Figura 20: Tesista analizando las muestras antes de introducir al cromatógrafo líquido de alta resolución.



Figura 21: Tesistas evaluando los resultados generados por el cromatógrafo.