

24' 37



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
ZARAGOZA

Implementación de un método analítico  
y validación para cuantificar clorhi-  
drato de clenbuterol en tabletas.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLGO

P R E S E N T A ;

JORGE CASIMIRO RANGEL JARAMILLO

MEXICO, D. F.,

NOVIEMBRE DE 1988

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## I N D I C E

	Pág.
I. INTRODUCCION . . . . .	1
II. FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA . . . . .	4
A. Antecedentes. . . . .	8
B. Extracción por formación de par iónico. . . . .	10
C. Acoplamiento de una sal de diazonio . . . . .	12
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA . . . . .	14
IV. OBJETIVOS . . . . .	16
V. HIPOTESIS . . . . .	17
VI. METODOLOGIA . . . . .	18
VII. MATERIALES Y EQUIPO. . . . .	19
VIII. DESARROLLO EXPERIMENTAL . . . . .	21
1. METODO I . . . . .	22
2. METODO II . . . . .	23
IX. RESULTADOS . . . . .	24
1. Ensayos Preliminares. . . . .	24
2. Linealidad del Sistema. . . . .	31
a. Sensibilidad. . . . .	33
b. Precisión (repetibilidad) y Exactitud . . . . .	35
c. Linealidad . . . . .	39
X. DISCUSION . . . . .	44
XI. CONCLUSIONES . . . . .	46
XII. SUGERENCIAS . . . . .	47
XIII. REFERENCIAS . . . . .	48
APENDICE A . . . . .	51
APENDICE B . . . . .	54

## I. INTRODUCCION

Gran número de fármacos, junto con otras medidas, contribuyen al tratamiento eficaz de trastornos pulmonares, en particular la enfermedad --- pulmonar obstructiva crónica.

Los broncodilatadores con utilidad para abrir las vías respiratorias bloqueadas (1) y los corticosteroides disminuyen en gran parte el proceso inflamatorio (2).

Los grupos de medicamentos en estos tratamientos se clasifican en: - broncodilatadores, espectorantes y mucolíticos. El Clenbuterol es un nuevo broncodilatador, con acción selectiva de los receptores beta-2 adrenérgicos de la musculatura bronquial (3).

Observando tanto estructuras como propiedades químicas de los fármacos, para el control de la calidad, son dos las principales razones por -- las cuales se realizan validaciones de métodos analíticos en la industria farmacéutica, para productos de nuevo uso y que además llevan un estricto control médico.

La primera de ellas y más importante, es que la validación de un método analítico es una parte integral para el control de la calidad.

La segunda es en la actualidad, regida por las regulaciones para las buenas prácticas de manufactura (BPM), que son las requeridas para la validación de métodos analíticos.

Además existen otras razones, como la capacidad de llevar a cabo operaciones basadas en pruebas para material; y así proporcionar a los científicos una comunicación efectiva y la información técnica relativa del caso (4).

Para la implementación y posterior validación se eligieron dos métodos analíticos tentativos; el primero que consiste en la formación de un par iónico con el control del pH y extracción con cuantificación al espectro visible por la formación de color.

El segundo de ellos puesto que presentaba una buena especificidad del fármaco desde el punto de vista de los excipientes en cuanto a su estructura, es el acoplamiento de una sal de diazonio formando un compuesto colorido y cuantificable espectrofotométricamente (6).

Posteriormente se evalúan las condiciones de trabajo; para el método I, se trabajó con las extracciones en el volumen del disolvente, tiempo de agitación, ajuste de pH óptimo de formación del par iónico y la relación en la preparación del reactivo que da origen a la formación del par iónico. Para el método II, se evaluó a las posibles diluciones, las alícuotas de acuerdo a lo anterior, tiempo de adición de reactivos para desarrollo de color, condiciones de reposo antes de la lectura al espectro visible en la luz normal y al amparo de la oscuridad total, además del tiempo de reacción para posterior lectura al espectrofotómetro a una longitud de onda de 500 nm.

Establecidas las condiciones de trabajo (implementación del método), se procede a la validación. Esta fue únicamente realizada para el método - II, puesto que presentó mayor selectividad con respecto al fármaco que el método I, el método finalmente empleado, implica la formación de una sal - de diazonio y acoplamiento para el desarrollo de color con lectura poste - rior en el espectro visible. Dió buenos resultados tanto durante la imple - mentación así como en la validación, puesto que los parámetros marcados pa - ra la validación fueron cubiertos, tomando en cuenta un informe completo - de validación (7).

## II. FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA

Existen diferentes conceptos para el término validación, el cual tiene como objeto la calidad (8).

Se dice que es un protocolo desarrollado durante los pasos críticos - en un proceso de fabricación, el cual requiere control a través de métodos rutinarios de los productos con propiedades químicas (9).

El término validación implica un juicio que proporciona el fundamento para decidir si un método reúne las condiciones necesarias para su aplicación en un análisis químico.

La implementación o desarrollo y validación para procedimientos analíticos, es el proceso con el cual se determina la utilidad de un método analítico; de esta forma permite obtener una metodología adecuada; para con ésta poder darle credibilidad a los datos analíticos obtenidos. Este proceso de decisión se realiza, después de evaluar las características químicas obtenidas con respecto a los requerimientos del problema analítico en una área específica para sus condiciones.

El último uso de la metodología analítica, es producir información -- del análisis del contenido de muestras específicas, para resolver problemas particulares.

El proceso de validación verifica en particular una metodología y se basa sobre juicios de algunas técnicas conocidas que son optimizadas para propósitos de mediciones prácticas (10).

Si el fármaco en cuestión solo es uno y ha sido estudiado en forma -- exhaustiva para realizar pruebas de ensayo, los métodos utilizados son satisfactorios y se encuentran reportados en la literatura, de no ser así -- éstos pueden ser desarrollados a partir de conocimientos básicos del fármaco sometido a estudio, desde el punto de vista de su estructura.

Para algunos fármacos los principales problemas desde el punto de vista analítico son su interacción con excipientes y su difícil separación para ser cuantificados (11).

Se hacen análisis comparativos para determinar el contenido del fármaco en los que la diferencia entre la muestra que es obtenida y el problema original; el cual es medido y comparado con un estándar que es recobrado -- por ensayo.

(En varios métodos, recobro es definido como la razón obtenida entre el estándar por ensayo comparado con un estándar adicionado) (12). La -- aproximación puede presentar un rango de variación para posibles concentraciones, así por medio de la aproximación es determinada a través de un rango que puede ser estudiado desde un 80% para el nivel más bajo del ensayo, hasta el 120% que es el valor máximo para el ensayo.

Procedimientos estadísticos son utilizados para verificar la linealidad del método, esta linealidad es definida como la variación de la cantidad del fármaco recuperado por ensayo, como una función de la cantidad original contenida en la muestra.



Alguna desviación para la linealidad indica que no tiene las propiedades adecuadas para trabajar las muestras con la concentración del fármaco en la cual sufre desviación.

Otros requerimientos para el método incluyen a la reproducibilidad y sensibilidad, la que se define como la cantidad mínima detectable en relación al ruido del aparato comparado con el blanco, éstas pueden ser más flexibles en el requerimiento para una aproximación porque éstas son funciones del ensayo de la precisión, o rango de especificaciones del número de muestras ensayadas.

Para un método el criterio de su utilización es que la desviación estándar relativa del valor de sus resultados no sea mayor del 2%.

Otros criterios para la validación del método es la especificidad, -- que es la comprobación de que la respuesta del método corresponde solo a la sustancia de interés. El ensayo de la especificidad se lleva a cabo realizando la parte experimental a compuestos similares, en cuanto a estructura y pesos moleculares comparados con el fármaco del producto (13).

Cuando se utilizan placebos o estándares cargados, una cantidad conocida es adicionada a una de dos muestras, ambas tratadas del mismo modo, -- son analizadas, el porcentaje para recobro del estándar adicionado es determinado; es importante recordar que la validación de un proceso es planeada y realizada por medio del análisis y deben de obtenerse resultados en base a propiedades.

La validez va a depender de las condiciones de trabajo y control establecidas; así como el plan de muestreo y los datos que se requieren; de este modo son considerados los parámetros (14).

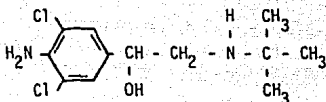
La directriz en la utilización del método a seguir se denomina procedimiento, además, al conjunto de indicaciones para el mismo, en la aceptación o rechazo de resultados es denominado protocolo.

Para la validación de los métodos analíticos es necesario tomar como base un conocimiento científico de los mismos; así la relación entre los factores independientes o que son controlables; las variables de formulaciones o de proceso, y los factores dependientes o de respuesta que son características de calidad del producto, pueden ser establecidas matemáticamente por métodos apropiados de modelos estadísticos, que son por lo general un análisis inferencial y de regresión lineal computarizado (15).

A. Antecedentes.1. CLORHIDRATO DE CLENBUTEROL.

Fórmula Condensada:  $C_{12}H_{18}Cl_2N_2O.HCl$

Fórmula Desarrollada:



Peso Molecular: 313.65 g/mol.

Nombre Químico:

Alcohol 4-amino-*o*-1 (terbutilamino)metil-3,5-diclorobencil.

Descripción:

Polvo cristalino, incoloro de sabor amargo.

Solubilidad:

Fácilmente soluble en agua, metanol y etanol; poco soluble en cloro--  
formo; y prácticamente insoluble en éter y benceno.

Punto de Fusión:

170 - 175°C

pH de una solución al 1% en agua:

5.5 a 6.5

**Pérdida al secado:**

No mayor al 1% determinado a 80°C y a peso constante.

**Cenizas:**

No mayores del 1%.

**Identidad:**

Agregar 1.0 ml de una disolución acuosa al 0.5% de Clorhidrato de --  
Clenbuterol a 1.0 ml de una disolución acuosa al 1% de dimetilaminoben--  
zaldehído. Se produce una coloración amarilla intensa.

### B. Extracción por formación de par iónico.

Existen diversos compuestos de aminas cuaternarias, que se determinan en solución acuosa por formación de una sal o par iónico para el nitrógeno cargado positivamente y una molécula de algún indicador o colorante cargado negativamente, posteriormente se procede a una extracción con disolvente orgánico y se cuantifica espectrofotométricamente la concentración del compuesto extraído. Los tipos de colorantes empleados para este fin son: - púrpura de bromocresol, azul de bromotimol, verde de bromocresol y naranja de metilo. El método es denominado extracción por formación de par iónico o método ácido-base. Para su aplicación es necesario que se cubran los siguientes puntos:

- a. Que la formación del par iónico entre al nitrógeno cargado positivamente del compuesto y el anión de la molécula del colorante sea cuantitativa.
- b. Que la extracción del par iónico sea cuantitativa.
- c. Que el colorante no combinado (añadido en exceso), no se extraiga en la fase orgánica.

Para lograr la formación del par iónico, el pH de la fase acuosa es crítico, debido a que no se debe extraer el colorante no combinado, y dado que para formar el par iónico, el colorante debe estar en forma aniónica, el pH de la fase acuosa debe ser mayor que el pH del colorante ácido. Por otro lado el grupo amino debe estar cargado positivamente, por lo cual el pH debe ser lo suficientemente ácido.

Los compuestos de aminas cuaternarias están cargadas a todos los valores de pH. Los disolventes orgánicos polares en sí se emplean en pequeñas cantidades, e influirán marcadamente en el comportamiento del coeficiente de participación del par iónico (16).

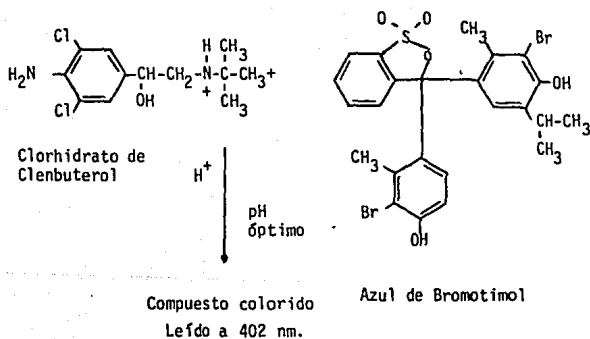


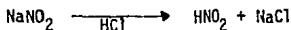
FIGURA 1.

### C. Acoplamiento de una sal de diazonio.

Este es un caso típico de análisis espectrofotométrico, en el cual un compuesto incoloro es convertido en un derivado que absorbe en la región - visible del espectro electromagnético. Para este análisis se conoce la estructura del derivado colorido.

La diazoación de aminas aromáticas primarias, se hace a partir de la amina aromática que reacciona en una solución ácida de ácido nitroso para dar sales de diazonio, que se usan como intermediarios en la síntesis de - los compuestos orgánicos y de manera especial en colorantes, la reacción - que lo ilustra es la siguiente: (17).

Formación del ácido nitroso



Formación de la sal de diazonio con el  
ácido nitroso



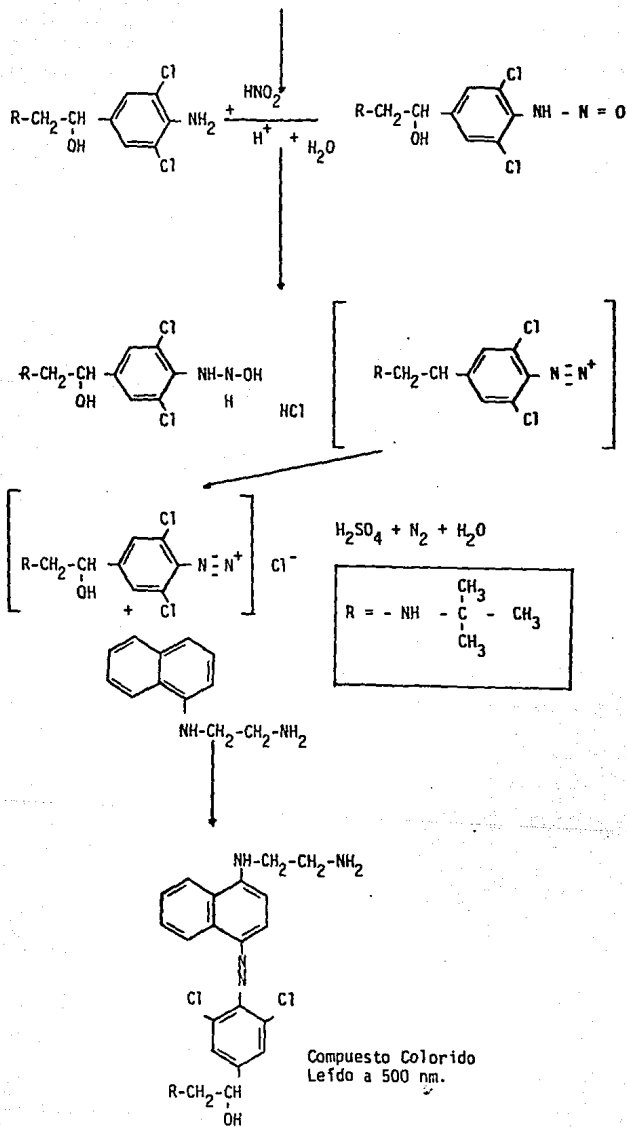


FIGURA 2.



### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como una necesidad de la Industria Farmacéutica, se lleva a cabo la validación de una serie de métodos analíticos, como el del presente trabajo, donde existen problemas en el método de uso rutinario empleado en la cuantificación del activo Clorhidrato de Clenbuterol debido a ciertas interferencias; por lo que se emplea un método en el que se resta la diferencia, utilizando un placebo con la adición de un estándar equivalente al contenido del problema, lo que se conoce como un placebo cargado que no está permitido.

Se adoptó la medida de implementar y validar un método para eliminar dicha adición del estándar equivalente, por ser un método por extracción en el que se presentan interferencias con los excipientes de la formulación de las tabletas, las cuales aún no han sido identificados, ya que se detectaron como impurezas en la cuantificación espectrofotométrica.

Primero se realizan pruebas preliminares para observar la factibilidad de los dos métodos analíticos disponibles (ambos espectrofotométricos). En el método I se desarrolla color por la formación de un par iónico ajustado al pH a 7, usando colorante azul de bromotimol y con extracción posterior empleando benceno, reuniendo los extractos para aforarlos a un volumen final de 25.0 ml con el mismo disolvente.

Preparar una solución de referencia a la misma concentración, y leer ambas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 402 nm, utilizando como blanco benceno.

El método II a probar para ser implementado, es la formación de una sal de diazonio usando ácido clorhídrico y nitrito de sodio. Con posterior adición de sulfamato de amonio, para eliminar el exceso de ácido nitroso formado, para finalmente adicionar el agente acoplante generador de color que es el diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamino, y se prepara una solución de referencia a la misma concentración leyendo ambas en el espectro fotómetro a una longitud de onda de 530 nm, utilizando como blanco ácido clorhídrico 1N.

De este modo teniendo el método que de buenos resultados se procederá a la validación de acuerdo a los parámetros descritos más arriba.

#### IV. OBJETIVOS

##### 1. General:

Implementar y validar un método analítico para cuantificar el Clorhidrato de Clenbuterol en tabletas, empleando diferentes criterios experimentales respecto a las condiciones de trabajo y empleo de métodos analíticos concidos como base de experimentación, para obtener condiciones de trabajo óptimas en la experimentación y lograr con ello una metodología y protocolo de trabajo adecuados a el problema y su solución.

##### 2. Particulares:

Elaborar un plan de trabajo, para argumentar el seguimiento del método analítico, realizando una investigación bibliográfica de los parámetros a determinar para la validación del método.

Implementar un método analítico con las condiciones de trabajo adecuadas, realizando las modificaciones necesarias para lograr un buen rendimiento en el recobro.

Validar un método analítico para cuantificar Clorhidrato de Clenbuterol en tabletas, por medio de un análisis estadístico, de los datos de porcentaje de recobro a partir de la curva de calibración de método espectrofotométrico.

#### V. HIPOTESIS.

Se puede cuantificar espectrofotométricamente el Clorhidrato de Clenbuterol en tabletas sin interferencias de los excipientes, por medio de -- una reacción de diazoación de la amina aromática y posterior acoplamiento del diazocompuesto con un reactivo generador de color.

## VI. METODOLOGIA.

### 1. METODO I.

El método de prueba consiste en la formación de un par iónico, con un colorante básico ajustando el pH a 7 y posterior extracción con benceno, leyendo a 402 nm empleando como blanco benceno.

### 2. METODO II.

Para el método se disuelve el activo en un 40% del volumen final de aforo con etanol, el resto del aforo se realiza, con ácido clorhídrico 1N, las diluciones que se realicen para lograr la concentración ideal de trabajo del activo serán en su totalidad con ácido clorhídrico 1N, después se dejan las muestras en baño de hielo a una temperatura de 5°C, durante 5 minutos, para proceder a agregar con un intervalo de dos minutos cada reactivo; 1.0 ml de nitrito de sodio en disolución acuosa al 0.1%, 1.0 ml de sulfamato de amonio en disolución acuosa al 0.5% y 1.0 ml de diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamino en disolución acuosa al 0.1%.

Se dejan reposar durante treinta minutos, después se lee la absorbancia a 500 nm empleando como blanco ácido clorhídrico 1N.

VII. MATERIAL Y EQUIPO.

<u>1. Materiales.</u>	<u>Descripción.</u>
Barra magnética	2.5 cms.
Embudos de filtración rápida	No. 4.
Embudos de separación	125 ml.
Matraces aforados	10, 25, 100 y 200 ml.
Matraces erlenmeyer	100 ml.
Papel Whatman	No. 41.
Pipetas volúmetricas	1, 2, 3, 4, 5, y 25 ml.
Probeta graduada	100 ml.
Vasos de precipitado	200, 250 y 500 ml.

(Todo el material de vidrio marca PYREX).

2. Sustancias.

Azul de bromotimol (G.R.)	Sigma.
Clorhidrato de Clenbuterol	No. de análisis 1207.
Diclorhidrato de N-(1-Naftil)-etilendiamino. (G.R.)	EASTMAN KODAK Co.
Nitrito de sodio (G.R.)	J. T. Baker.
Sulfamato de amonio (G.R.)	Harleco.

3. Líquidos.

Acido clorhídrico (G.R.)	J. T. Baker.
Benceno (G.R.)	J. T. Baker.
Etanol (G.R.)	J. T. Baker.

<u>4. Equipo</u>	<u>Marca.</u>	<u>Modelo.</u>
Balanza Digital.	Sartorius.	Tipo 1801.
Espectrofotómetro.	Philips.	PYE UNICAM.
Espectrofotómetro.	Beckman.	Mod. No. 25.
Espectrofotómetro.	Beckman.	Mod. Du-64.
Malla		No. 12.
Balanza Granataria.	OHAUS.	1550 SD.

### VIII. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

Se fabricaron "lotes placebo" para un contenido de 85, 95 100, 105 y 115%. Estos lotes placebo fueron realizados por el método del estándar adijonado, al placebo para cada nivel manejado por cuestiones económicas, debido a que un lote de tabletas del producto es de aproximadamente 8 Kg y un contenido de 20 mcg/tableta utilizando para cada lote 1 g de Clorhidrato de Clenbuterol. Por ello con cada uno de los excipientes de la fórmula única empleada en la elaboración de las tabletas, así se prepararon lotes de cada uno de los niveles para manejar ocho repeticiones para cada nivel, tomando como el 100% a 24 mg, para llegar a una concentración final de 60 mcg/ml. Para la preparación de éstos lotes se tamizaron todos los excipientes y el activo a través de malla No. 12, y se realizó un mezclado, sin -- granulación por realizarse una compresión directa, en la fabricación de -- las tabletas.

Fueron analizadas cinco muestras por cada método para ser evaluados -- los métodos, los resultados se dan en la tabla No. 1, donde son señalados ensayos preliminares.

#### 1. METODO 1.

Se pesan con exactitud el equivalente a 20 mg, de Clorhidrato de Clenbuterol, se disuelve en 10 ml de agua deionizada, se agrega 1.0 ml de una disolución de azul de bromotimol-ácido clorhídrico al 1% (1:1), se mezcla y si es necesario se ajusta el pH a 7, se extrae con tres porciones de 10 ml de benceno, los extractos de la fase orgánica se recogen cuantitativa--



mente y se llevan a 25 ml, con benceno, se prepara un blanco benceno para tal propósito.

Finalmente se lee la absorbancia a una longitud de onda de 402 nm --- (19).

## 2. METODO II.

Se pesa con exactitud el polvo equivalente a 20 mg, de Clorhidrato de Clenbuterol y se transfiere a un matraz aforado de 200 ml, se adicionan 80 ml de etanol absoluto, enseguida se agregan 30 ml de ácido clorhídrico 1N, se mezcla bien y se deja reaccionar para dejar libre de los excipientes al activo, se lleva a volumen con ácido clorhídrico 1N, utilizando una barra magnética y agitación mecánica, se mezcla durante quince minutos, se filtra a través de papel filtro Whatman No. 41, y se toma una alícuota de 2.0 ml, del filtrado, se lleva a un matraz aforado de 100 ml, y se afora con ácido clorhídrico 1N, de esta última dilución, se toma una alícuota de 25 ml, donde la concentración final será de 60 mcg/ml.

Esta solución al igual que un estándar (por duplicado) equivalente en volumen y concentración y un blanco de ácido clorhídrico 1N son colocados por separado en matraces erlenmeyer de 100 ml, para desarrollar color, los matraces son cerrados con papel parafilm y colocados en refrigeración durante cinco minutos, enseguida, se adiciona a cada matraz a intervalos de un minuto, 1.0 ml de nitrito de sodio en disolución acuosa al 0.1%, 1.0 ml de sulfamato de amonio en disolución acuosa al 0.5% y 1.0 ml de diclorhidrato de N-(1-Naftil)etilendiamino al 0.1%.

Proteger los matraces de la luz, mantener en oscuridad total (20).

Se deja reposar durante treinta minutos para efectuar la lectura de - absorbancia a 500 nm, utilizando la relación siguiente para el cálculo de la concentración (21).

mg de principio activo/g de granulado.

$$\frac{\text{Abs}(m)}{\text{Abs}(\text{std})} \times \text{Pureza del std (decimales)} \times \frac{W(\text{std})}{W(m)} \times \frac{Fd(m)}{Fd(\text{std})} \times 1000 \text{ mg} = \text{mg/g}$$

donde:

Abs(m) : es la absorbancia de la muestra.

Abs(std) : es la absorbancia del estándar.

W(std) : es el peso del estándar.

W(m) : es el peso de la muestra.

Pureza del estándar en decimales (100% = 1.0).

Fd(m) : es el factor de dilución de la muestra.

Fd(std) : es el factor de dilución del estándar.

Factor de dilución = aforos/alícuotas.

IX. RESULTADOS.1. Ensayos Preliminares.

Tabla 1. Resultados de ensayos preliminares para la evaluación de recobro de Clorhidrato de Clenbuterol entre el Método I y el Método II.

EVALUACION CON TABLETAS DEL CLORHIDRATO DE CLENBUTEROL		
mg adicionados (mg/g)	Método I (mg recuperados)	Método II
125	238.99	124.142
125	239.36	125.056
125	238.63	124.291
125	238.53	125.000
125	240.05	124.049

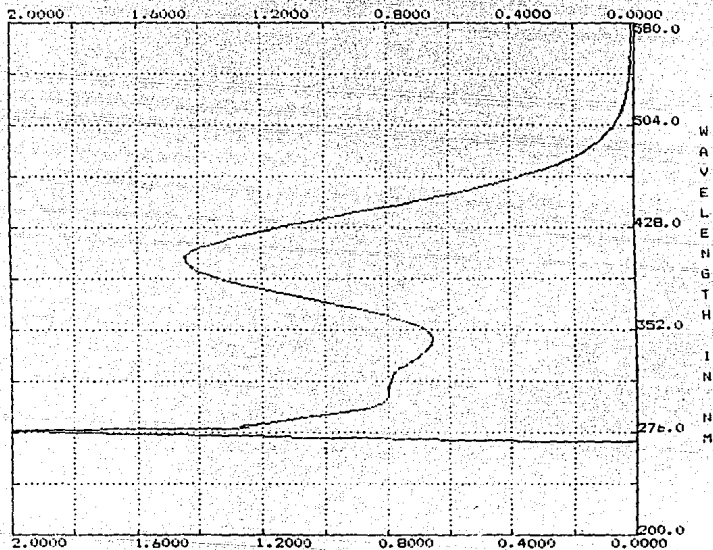
"Muestra de excipiente con interferencia"

POVIDONE 125 mg/g para dar lectura de Abs = 0.216

equivalente a 81.94% de recobro de Clorhidrato de Clenbuterol.

BECKMAN  
DU-64 SPECTROPHOTOMETER

ABSORBANCE



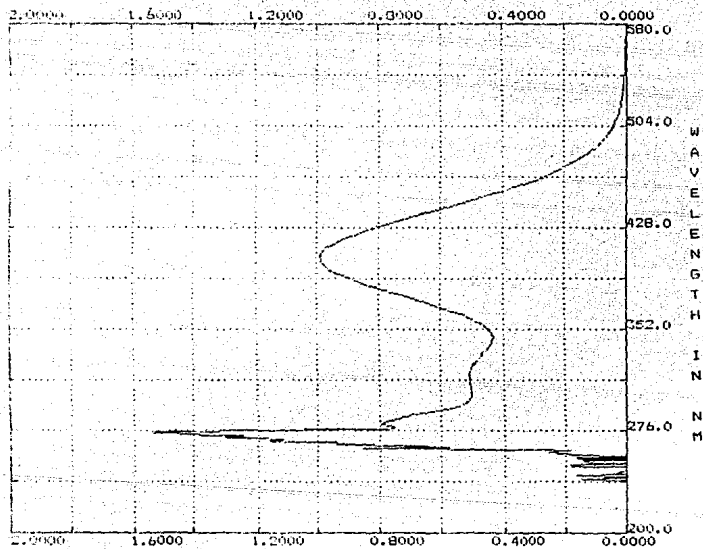
Scan Speed: 750 nm/min

FIGURA 3.

Espectro de absorción del Clorhidrato de Clenbuterol disuelto en benceno (polvo - de tableta) Método I por la formación - de un par iónico.

BECKMAN  
DU-64 SPECTROPHOTOMETER

ABSORBANCE



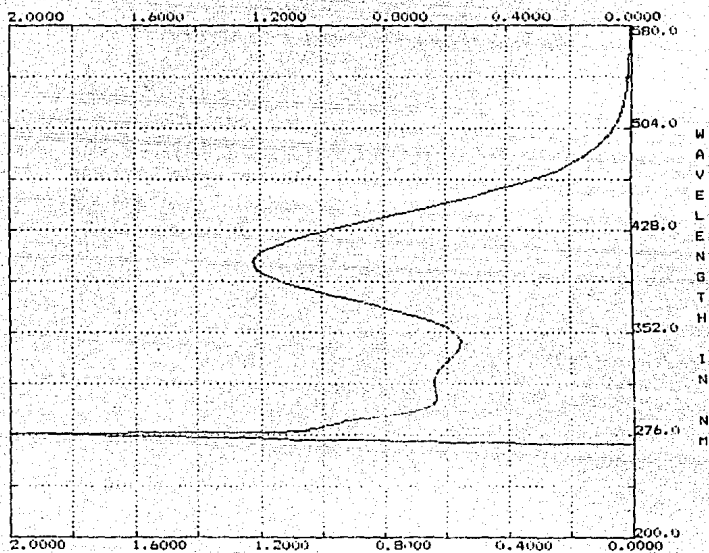
Scan Speed: 750 nm/min

FIGURA 4.

Espectro de absorción de placebo preparado de la fórmula para tabletas de Clorhidrato de Clenbuterol, (método I), formación de un par técnico.

BECKMAN  
DU-64 SPECTROPHOTOMETER

ABSORBANCE



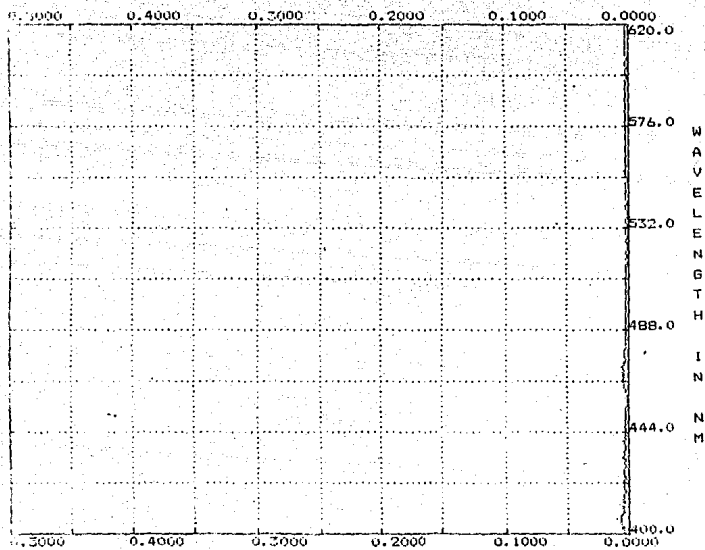
Scan Speed: 750 nm/min

FIGURA 5.

Espectro de absorción para el excipiente de  
interferencia al método I (POVIDONE).

BECKMAN  
DU-64 SPECTROPHOTOMETER

ABSORBANCE



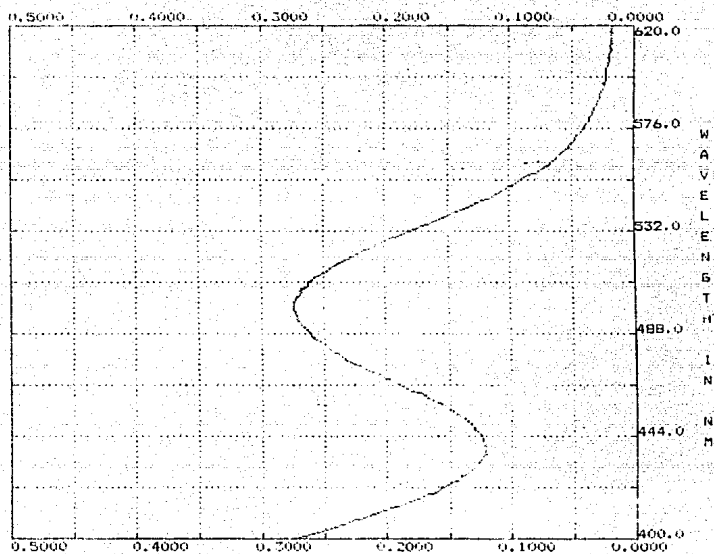
Scan Speed: 750 nm/min

FIGURA 6.

Espectro de absorción para el placebo de la fórmula en la preparación de tabletas del Clorhidrato de Clenbuterol para el Método - 11.

BECKMAN  
DU-64 SPECTROPHOTOMETER

ABSORBANCE



Scan Speed: 750 nm/min

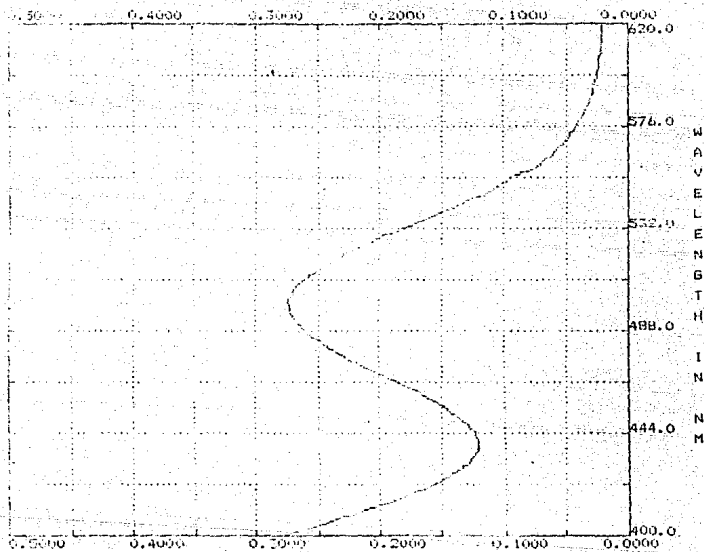
FIGURA 7

Espectro de absorción para estándar de Clorhidrato de Clenbuterol realizado por el método II por la formación de una sal de diazonio.



BECKMAN  
DU-64 SPECTROPHOTOMETER

ABSORBANCE



Scan Speed: 750 nm/min

FIGURA B.

Espectro correspondiente a una muestra de placebo cargado evaluado por el método II, formación de - una sal de diazonio.

2. Linealidad del Sistema.

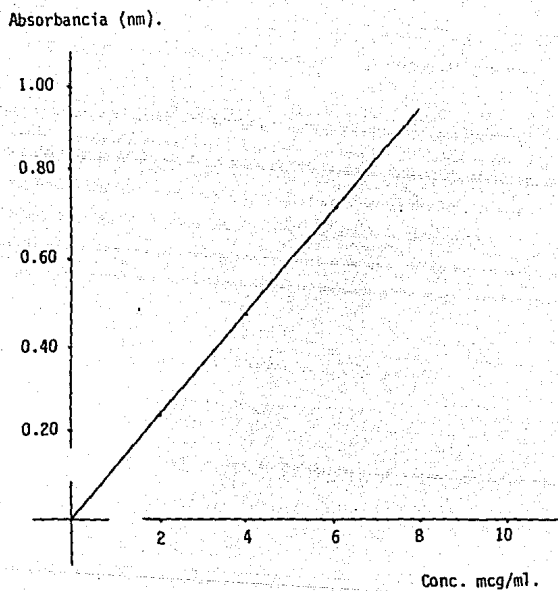
Tabla 2. Linealidad determinada para el sistema con el método II, utilizando el estándar de Clorhidrato de Clenbuterol.

(mcg adicionados)	(mcg recuperados)	(% de recobro)
2	2.01	100.5
4	4.03	100.75
6	6.02	100.33
8	8.05	100.62
10	10.2	102.00

Pendiente (m) = 0.1181

Ordenada al origen (b) = -0.004

Regresión (r) = 0.9999



Curva de calibración con estándar por el Método II.

( $m = 0.1181$ ,  $b = -0.004$  y  $r = 0.9999$ ).

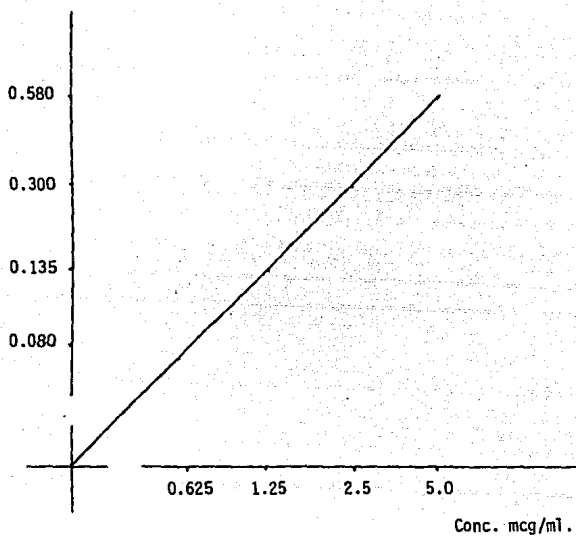
FIGURA 9.

a. Sensibilidad.

Tabla 3. Sensibilidad evaluada a partir de una curva de calibración -  
(Linealidad del Sistema).

Concentración mcg/ml	Absorbancia
5.000	0.580
2.500	0.300
1.250	0.135
0.625	0.080

Absorbancia (nm).



Sensibilidad para el Método II en la cuantificación del  
Clorhidrato de Clenbuterol.

FIGURA 10.

b. Precisión (repetibilidad) y Exactitud.

Tabla 4. Datos de recobro para la evaluación del Clorhidrato de Clenbuterol por el Método II.

(mg adicionados)	(mg recuperados)	(% de recobro)
20.5	20.403	99.52
20.5	20.500	100.00
20.5	20.403	99.52
20.5	20.594	100.45
20.5	20.403	99.52
20.5	20.500	100.00
20.5	20.403	99.52
20.5	20.594	100.45
23.0	22.984	99.93
23.0	22.991	99.96
23.0	23.000	100.00
23.0	23.010	100.04
23.0	23.000	100.00
23.0	22.984	99.93
23.0	22.991	99.96
23.0	23.000	100.00
24.0	24.096	100.40
24.0	24.096	100.40
24.0	24.168	100.70
24.0	24.000	100.00

(CONTINUACION DE LA TABLA 4)

(mg adicionados)	(mg recuperados)	(% de recobro)
24.0	24.288	101.20
24.0	24.048	100.20
24.0	24.000	100.00
20.4	23.952	99.80
25.5	25.500	100.00
25.5	25.510	100.04
25.5	25.487	99.94
25.5	25.492	99.96
25.5	25.542	100.16
25.5	25.500	100.00
25.5	25.601	100.40
25.5	25.510	100.04
28.0	27.952	99.82
28.0	28.044	100.15
28.0	28.044	100.15
28.0	28.142	100.50
28.0	27.952	99.82
28.0	28.044	100.15
28.0	28.142	100.50
28.0	28.044	100.15

Tabla 5. Confrontación de parámetros teóricos y experimentales.

Experimentales	Teórico
$\bar{X}_x = 100.082$	Para confiabilidad
$S_x = 0.3301$	de $\chi^2_1 = 53.203$
$\sigma_x = 0.3260$	de 0.975 con g.l = n-1
$t = 1.570$	de $\chi^2_1 = 57.342$
$\chi^2_1 = 1.062$	de 0.99 con g.l = n-1
C.V. = 0.33%	de t = 2.0301
$\alpha = 0.05$	de 0.975 con g.l = n-1
	de t = 2.438
	de 0.99 con g.l = n-1

Precisión (Repetibilidad).

Prueba de hipótesis.

$$H_0 = \sigma^2 \leq 2\%$$

$$\text{Si } \chi^2_{1\text{cal}} \leq \chi^2_{1\text{teórica.}}$$

$$H_1 = \sigma^2 > 2\%$$

es aceptada  $H_0$



Si es aceptada  $H_0$ . El método es considerado como preciso, pues si es menor del 2%.

Exactitud.

Prueba de hipótesis.

$$H_0 : \mu = 100\%$$

$$\text{si } t_{\text{calculada}} \leq t_{\text{teórica}}$$

$$H_0 : \mu \neq 100\%$$

es aceptada  $H_0$

Si es aceptada  $H_0$ . El método es considerado exacto. pues si es aproximadamente igual al 100%.

Tabla 6. Intervalos de Confianza para Precisión y Exactitud para el -  
Método II.

Confiabilidad	Precisión	Exactitud
0.975	(0.28 - 0.45)	(97.22 - 102.77)
0.990	(0.27 - 0.43)	(97.00 - 102.99)

C. Linealidad.

Tabla 7. Linealidad en la determinación del Clorhidrato de Clenbuterol en tabletas por el Método II.

(mg adicionados)	(mg recuperados)	(% de recobro)
20.5	20.475	99.878
23.0	22.995	99.978
24.0	24.081	100.337
25.5	25.517	100.068
28.0	28.045	100.162

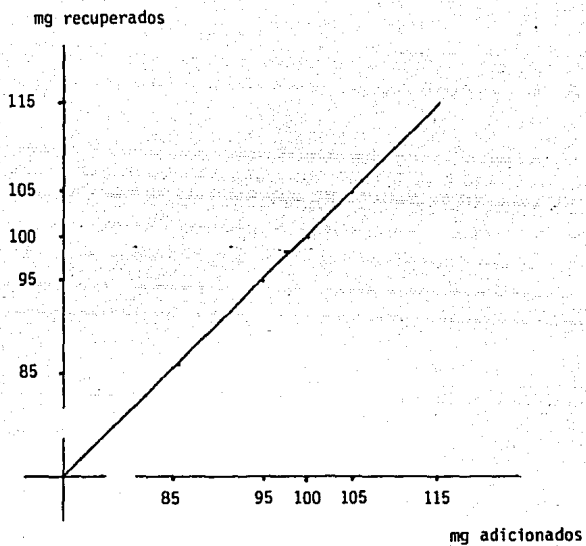
Tabla 8. Resultados del análisis de regresión para el Método II.

---

Parámetro	Datos
Pendiente de la recta (m)	1.008890575
Ordenada al origen (b)	-0.192301910
Coefficiente de correlación (r)	0.99957909

---

---



Línealidad del Método II. En el que se realiza la formación de una sal diazonio.

FIGURA 11.

Linealidad para el Método II.

Tabla 9. Confrontación de parámetros teóricos y experimentales, en la linealidad para el Método II.

Experimentales	Teóricos
Para (b) ordenada al origen.	
$t = -1.664$	Para confiabilidad.
	de $t = 2.02$
	de 0.975 con g.1 n-2
	de $t = 2.42$
	de 0.99 con g.1 n-2
Para (m) pendiente.	
$t = 1.8716$	Para confiabilidad.
	de $t = 2.02$
	de 0.975 con g.1 n-2
$\alpha = 0.05$	de $t = 2.42$
	de 0.99 con g.1 n-2

Linealidad para el Método II.

Prueba de hipótesis: (b) ordenada al origen, (Criterios)

$H_0$  :  $b_0 = 0$                       Si  $t_{\text{calculada}} \leq t_{\text{teórica}}$

$H_1$  :  $b_0 \neq 0$                       es aceptada  $H_0$

Si se acepta  $H_0$ , la ordenada al origen en la linealidad del método es considerada aproximadamente igual con 0.0.

Prueba de Hipótesis: (m) pendiente, (Criterios)

$H_0$  :  $m_0 = 1$                       Si  $t_{\text{calculada}} \leq t_{\text{teórica}}$

$H_0$  :  $m_0 \neq 1$                        $H_0$  es aceptada

Si se acepta  $H_0$ , la pendiente en la linealidad del método es considerada aproximadamente igual a 1.0.

Tabla 7. Linealidad para el Método II, formación de una sal de Diazo-  
nio.

Confiabilidad	Linealidad	
0.975	(0.9483 - 1.0688)	mo
0.99	(0.9484 - 1.0687)	
0.975	(-0.4257 - 0.4257)	bo
0.99	(-0.4719 - 0.08734)	

RECTA DE VALIDACION

$$Y = 1.0088 X + (-0.1923) + (0.0876)$$

## X. DISCUSION.

El método I, presentó inicialmente problemas en la cuantificación, -- puesto que el % de recobro del Clorhidrato de Clenbuterol fue hasta un 192, lo cual indica la presencia de posibles interferencias con alguno (s) de los excipientes de la formulación. Para verificar lo anterior se realizó un ensayo con el excipiente más factible de ocasionar dicha interferencia "Povidone", preparándose una cantidad equivalente a la del activo Clorhidrato de Clenbuterol y llegando a la concentración en la que fue evaluado éste, en la misma longitud de onda. Se encontró como resultado de este ensayo que dicho excipiente dió lectura de absorbancia similar, si no es que la misma, por ello la explicación del recobro de casi 200%.

En el caso del método II, como puede observarse en los resultados preliminares resultó ser específico, en cuanto a la implementación no presentó problemas pues se llevó a cabo de modo que no tuvo variación en su aplicación, y por los resultados en la validación, puede decirse que es un método confiable basándose en los parámetros de la validación como lo son: la linealidad en la cual se observa una buena linealidad, precisión y exactitud, así como la sensibilidad que como ya se maneja actualmente, es evaluada a partir de una curva de calibración y ésta sirve como base a las -- concentraciones elegidas hasta la manejada para la mínima que presenta detección por el aparato siendo el punto de la sensibilidad mínima, y "especificidad" que es aquella que solo detecta lo que queremos que de respuesta a el método, que solo fue evaluada para los excipientes.



## XI. CONCLUSIONES.

Se llevó a cabo la implementación y validación de un Método para uso rutinario, el cual cubre de manera satisfactoria las exigencias de una validación estadística para Productos Farmacéuticos, S.A. de C.V. (Chinoín).

De los dos Métodos sometidos a estudio, como se observa en los resultados, el Método I, no resultó específico respecto a los excipientes por lo tanto, fue descartado.

El Método II, fue implementado, validado y aceptado por cubrir los requisitos de validación.

Como el primer Método no fue específico, no se puede hablar de una comprobación de Métodos.

## XII. SUGERENCIAS.

Serfa conveniente someter el producto a pruebas de estabilidad con el fin de evaluar la especificidad con respecto a productos de degradación y asignar así vida de anaquel al producto, así como validar las condiciones de proceso, pues existe una homogeneidad irregular.

XIII. REFERENCIAS

1. Litter Manuel - "Farmacología Experimental y Clínica"  
7a. Edición, editorial El Ateneo. Capítulo 16 (1986).
2. Bowman W.C. & Rand M.J. FARMACOLOGIA "Bases Bioquímicas y Patológicas Aplicaciones Clínicas". 2a. Edición, editorial Interamericana. México, D.F., Secciones (1130 y 2423), 1985.
3. Goth A. - "Farmacología Médica", 8a. Edición, editorial Interamericana pág. 377. (1979).
4. Loftus B.T. and Nash R.A. - "Pharmaceutical Process Validation"  
Editorial Marcel Dekker Inc. N.Y. (1984) pp. 251-65.
5. Editor Egge and Sprottswoode, 5a. edición., Dictionary of Organic Compound. London, (1984).
6. "The British Pharmacopeia" XIX Rev. British Pharmacopeia Commission., England, (1980).
7. Taylor J.K. "Quality assurance of Chemicals Measurements",  
Anal Chem. 53, (5). 1588 - 96A, (1981).
8. Guerra J. Finkelson M.J. "Validation of Analytical Methods Laboratories" by FDA, Pharmaceutical Technology 3, (7),  
74-78, (1986).

9. Vanderwielen J. Adrianus & Hardwidge A. Edward "Guidelines for assay validation". Pharmaceutical Technology, march 21-24, (1982).
10. "Curso teórico práctico de validación de técnicas analíticas", por AFM, México, Memorias de Congreso (1981).
11. Kratochvil Byron & Taylor J.K. "Sampling for Chemical Analysis" Anal. Chem. 53, (4), 924-38A, (1981).
12. Juárez Rubi R. Licenciatura Q.F.B. "Validación de un Método Analítico para concentrado de cobre". (E.N.E.P. \*Zaragoza\*)- U.N.A.M., México, D.F., pp. 9-12 y 51-54, (1986).
13. ASTM. "Guide for used of terms in reporting data in analytical chemistry". Anal. Chem. 47, (14), 2527, (1982).
14. Taylor John K. "Validation of analytical methods". Anal. Chem. 55, (6), 600-08A, (1983).
15. Resumen de Congresos "Validación de Métodos Analíticos", por AFM, (1981).
16. Kennet A. Connors. "A Textbook of Pharmaceutical Analysis", 2a. Edición A. Wiley-Interscience Publication. U.S.A., 216-20 y 512-14, (1975).

17. HIGUCHI TAKERU. "Pharmaceutical Analysis" 1ra. Edición Interscience Publishers. U.S.A., 413-26 (1961).
18. The United States Pharmacopeia XXI pp. (1130) U.S.A., (1980). United States Pharmacopeia Convention, Inc.
19. Cheng, Dadun; Tao, Aiqun; Yao Xingsu. "Determination of Clenbuterol and Cicloclenbuterol", Nanjing Inst. Mater. Med., Nanjing, Peop. Rep. China. Yaowu Fenxi Zazhi (6), (3), 153-5 (Ch), (1986).
20. Zhou, Yekang. "Improvement in the Colorimetric Determination of Clenbuterol Hydrochloride". (Dep. Qual. Control, Chengdu Pharm. No. 1 Plant, Chengdu, Peop. Rep. China). Yaowu Fenxi Zazhi 4, (2), 113-14, (Ch), (1984).
21. R.M. SANTORO MARIA INES & M. DOS SANTOS MIRZA. "Spectrophotometric Determination of Bromohexine Hydrochloride in Pharmaceutical Preparations". SANTORO ET AL J. ASSOC. OF ANAL. CHEM. 67, (3), 532-34, (1984).

## APENDICE A

La validación del método puede definirse como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

La capacidad se expresa en este caso en términos de parámetros analíticos.

El proceso de validación de un método en particular está basada en -- principios científicos adecuados y ha sido optimizado para propósitos prácticos de medición.

DEFINICIONES

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

RANGO: El rango de un método analítico es el intervalo entre los niveles superior e inferior de la sustancia (incluyendo estos niveles) el cual se ha demostrado que es preciso, exacto y lineal utilizando el método descrito.

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

PRECISION: La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de Desviación Estándar o del Coeficiente de Variación.

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

- a) REPETIBILIDAD: Es la precisión de un método analítico expresado -- como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos aparatos y técnicas.
  
- b) REPRODUCIBILIDAD: Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios utilizando el mismo y/o diferentes equipos.

LIMITE DE DETECCION: Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

LIMITE DE CUANTIFICACION: Es la menor concentración de la sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud -- aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.

ESPECIFICIDAD: Es la medida del grado de interferencia (o ausencia de), en el análisis de mezclas complejas. Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

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



## APENDICE B

$$\text{DESVIACION ESTANDAR (DE)} = \frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1}$$

$$\text{COEFICIENTE DE VARIACION (CV)} = \frac{\text{DE}}{\bar{X}} \times 100$$

$$\text{COEFICIENTE DE CORRELACION (r)} = \frac{n(\sum XY) - \sum X \sum Y}{\sqrt{[n(\sum X^2) - (\sum X)^2][n(\sum Y^2) - (\sum Y)^2]}}$$

$$\text{COEFICIENTE DE DETERMINACION (r^2)} = \frac{(n\sum XY - \sum X \sum Y)^2}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2 \cdot n(\sum Y^2) - (\sum Y)^2}$$

$$\text{PENDIENTE (m)} = \frac{n(\sum XY) - \sum X \sum Y}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2}$$

$$\text{INTERCEPTO (b)} = \frac{(\sum Y \sum X^2) - (\sum X \sum XY)}{n\sum X^2 - (\sum X)^2}$$

$$\text{ERROR EXPERIMENTAL (Ei)} = \sum (Y_i - Y)$$

$$\text{RECTA DE REGRESION (Y)} = m_0 X + b_0$$

$$\text{RECTA DE VALIDACION (Y)} = m_0 X + b_0 + E(1)$$