



Universidad Austral de Chile

**Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia**

**PROFESOR PATROCINANTE: Dr. QF. Juan Pablo Isa Param
INSTITUCIÓN: Instituto Farmacéutico Labomed S.A.**

**PROFESOR CO-PATROCINANTE: Dr. QF. Alejandro Jerez M.
INSTITUCIÓN: Universidad Austral de Chile**

**“Validación de una metodología analítica para clenbuterol clorhidrato
en comprimidos y gotas mediante HPLC”**

**Internado presentado como parte
de los requisitos para optar al
Título de Químico Farmacéutico**

VERÓNICA LILIAN NAVARRO VALDEBENITO

**VALDIVIA - CHILE
2007**

Dedicado a mis padres.

Agradecimientos.

Mi gratitud a Instituto Farmacéutico Labomed S.A. en forma muy especial por aceptarme y permitir llevar a cabo este trabajo en sus dependencias, poniendo a mi disposición todo el conocimiento, experiencia y material necesario para ello.

A continuación quiero destacar a personas que contribuyeron a mi desarrollo como persona y/o profesional y fueron de ayuda en diferentes momentos de mi carrera.

En primer lugar quiero agradecer a quien me da la razón de existir, mi ayuda y refugio en tiempo de necesidad, Dios, gracias por estar conmigo siempre. Tu amor, misericordia y grandeza, no hay conocimiento humano que lo alcance a comprender.

A mis padres, por creer en mí, y por sustentarme, aún sacrificando el poder hacer otras cosas. Los amo.

A Gloria y René, por su oportuna ayuda económica y trabajo cuando lo necesité.

A Gaby, por ayudarme a estudiar y con la rapidez de sus dedos en más de una oportunidad.

A Alex Padilla, por todo su apoyo y disposición en todo cuanto necesité, y sacrificar su tiempo por acompañarme en mis largas jornadas de estudio.

A mis dos grandes amigas de universidad, Angela Carrasco y Caroline Catalán, jamás pensé encontrar amigas como ustedes, gracias a cada una por la linda amistad que me han brindado todos estos años.

A mi amigo de universidad, Javier Alvarez, por su amistad y presta disposición a compartir su conocimiento conmigo.

A mi nueva tía que gané en este periodo, tía Norma y Jorge, por abrir las puertas de su hogar sin siquiera conocerme, y todo el cariño que me brindaron en ese tiempo lejos de mi familia.

A mi amiga Valentina y su esposo Patricio, por contribuir con su hogar, amistad y apoyo espiritual.

A la familia Knüst Pallero, por todo el amor y hospitalidad que me entregaron, son una hermosa familia, reflejo del amor de Dios.

A mi amor, Scott, por estar conmigo en esta última etapa de mi carrera. Eres un regalo en mi vida.

A Juan Pablo Isa, por todo su conocimiento y valioso tiempo entregados.

Al profesor Alejandro Jerez, por hacer el contacto con el laboratorio y ayuda y profesora Annie Marie Nielszen por sus correcciones al trabajo.

Al profesor Humberto Dölz, por su pasión por la carrera transmitida.

A todos los profesores de la carrera de Química y Farmacia, por contribuir con su conocimiento y experiencia en mi formación profesional.

Índice

I.	RESUMEN.....	9
II.	SUMMARY	10
III.	INTRODUCCIÓN	11
	Historia del laboratorio.....	17
	OBJETIVOS.....	23
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
	1. Materiales.....	25
	2. Métodos:	27
V.	METODOLOGÍA DE TRABAJO	28
	1.-Definición de la metodología a validar	28
	2.-Definición del(los) equipo(s) y materiales a utilizar.	28
	3.-Elaboración de los Procedimientos Operativos Estándares (POS) para el proceso de Validación.....	28
	4.-Verificación del funcionamiento del equipo	30
	5.-Trazabilidad de los estándares secundarios y preparación de los reactivos.	30
	6.-Análisis de Parámetros Analíticos.....	30
	7.-Evaluación de resultados en forma estadística.	33
VI.	DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO DE VALIDACIÓN.....	34
VII.	RESULTADOS	35
	1- Trazabilidad de los estándares secundarios y preparación de reactivos.	35
	2-Análisis de parámetros analíticos.	36
	3.-Evaluación de resultados en forma estadística.....	50
VIII.	DISCUSIÓN	51
IX.	CONCLUSIONES	53
X.	REFERENCIAS	54
XI.	ANEXOS.....	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1: Resultados de la valoración potenciométrica del estándar secundario de clenbuterol.....	35
Tabla N°2: Áreas obtenidas por las diferentes concentraciones de estándar de clenbuterol clorhidrato en el parámetro Linealidad.....	36
Tabla N°3: Resultados obtenidos de las inyecciones de estándar de clenbuterol y las muestras de Asmeren Comprimidos® con su porcentaje de recuperación, para el parámetro Exactitud.....	38
Tabla N°4: Resultados obtenidos de las inyecciones de estándar de clenbuterol y las muestras de Asmeren gotas® con su porcentaje de recuperación, para el parámetro Exactitud.....	39
Tabla N° 5: Resultados obtenidos de las valoraciones de estándar de clenbuterol y muestras de Asmeren comprimidos® y Asmeren gotas®, para el parámetro Precisión.....	40
Tabla N° 6: Resultados obtenidos de las inyecciones de estándar de clenbuterol, para el parámetro Sensibilidad.....	41
Tabla N°7: Áreas presentadas por los placebos de Asmeren comprimidos®, a concentraciones de 80, 100 y 120%, en el parámetro Selectividad.....	44
Tabla N°8: Resultados obtenidos de las inyecciones de estándar y muestras de Asmeren comprimidos® (AC) y Asmeren gotas® (AG), en condición original (C.O) y modificada (C.M), y su porcentaje de recuperación, en el parámetro Robustez.....	46

Tabla N°9: Resultados obtenidos de las inyecciones de estándar y muestras de Asmeren comprimidos® (AC) y Asmeren gotas® (AG), en condición original y modificada, y su porcentaje de recuperación, en el parámetro Robustez.....	47
Tabla N°10: Resultados obtenidos de las inyecciones de estándar y muestras de Asmeren comprimidos® (AC) y Asmeren gotas® (AG), en condición original (C.O) y modificada (C.M.), y su porcentaje de recuperación, en el parámetro Robustez.....	48
Tabla N°11: Resultados obtenidos de las inyecciones de estándar y muestras de Asmeren comprimidos® (AC) y Asmeren gotas® (AG), en condición modificada, y su porcentaje de recuperación, en el parámetro Robustez.....	49
Tabla N°12: Resumen de resultados obtenidos en cada parámetro analítico para clenbuterol clorhidrato.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS.

Diagrama de flujo del proceso de validación.....	34
Gráfico N°1: Gráfico de Área promedio v/s concentración de clenbuterol.....	37
Gráfico N°2: Áreas promedio v/s concentraciones de clenbuterol, en el parámetro Sensibilidad.....	41

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

BPM: Buenas prácticas de manufactura.

POS: Procedimiento operativo estándar.

AC: Asmeren comprimidos®.

AG: Asmeren gotas®.

SD: Desviación estándar.

RSD: Desviación estándar relativa.

STD: Estándar.

MTRA: Muestra

I. RESUMEN.

Las validaciones constituyen hoy en día un factor muy importante como parte del cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), dentro del concepto de garantía de calidad de los medicamentos en la industria farmacéutica, constituyendo así, un sistema que asegure el control de todo el proceso de fabricación de los medicamentos de acuerdo a estándares de calidad internacionales.

El siguiente trabajo presenta la validación de una metodología analítica mediante Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) para clenbuterol clorhidrato, en dos formas farmacéuticas, llevada a cabo en el área de control de calidad del Instituto Farmacéutico Labomed S.A. La validación fue desarrollada según el capítulo referido a Validaciones de la USP 27 (Farmacopea de los EEUU), el cual describe los parámetros analíticos a desarrollar en el proceso de una validación, según la categoría a la que corresponda (I, II, III o IV).

Los resultados para cada parámetro analítico (Categoría I) medido fueron: *Linealidad*: $r = 0,9997$, en 5 muestras en triplicado de estándar de clenbuterol a 80, 90, 100, 110 y 120% de lo declarado en la metodología analítica. *Exactitud*: % de recuperación de clenbuterol en muestras de producto a 80, 100 y 120% de lo declarado en la metodología analítica: 100,39%, 98,63%, 101,07%, y 98,76%, 99,87%, 99,19%, en comprimidos y gotas respectivamente. *Precisión*: RSD (desviación estándar relativa) $< 2,0\%$, en 5 muestras para estándar y muestras de producto al 100% de lo declarado en la metodología analítica. *Especificidad*: Las áreas presentadas por los placebos no interfirieron en la determinación de la concentración de clenbuterol. Para hacer más sólida la presente validación fueron desarrollados además *Sensibilidad* y *Robustez*.

Los resultados obtenidos estuvieron dentro de los rangos de aceptación para cada parámetro analítico, motivo por el cual la metodología analítica en estudio se consideró validada.

II. SUMMARY

Introduction: Validations, in today's world, constitute a very important factor as a fulfillment of the Good Manufacturing Practice (GMP), inside of the concept of quality assurance of pharmaceuticals in the pharmaceutical industry, constituting a system that assures the control of every process involved in producing pharmaceuticals that meet the international quality standards.

The following work presents the validation of an analytical method by means of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for clenbuterol clorhidrate in two pharmaceutical forms in the area of quality control in the Instituto Farmacéutico Labomed S.A. The validation was developed in accordance with the chapter concerning Validations of the USP 27 (United States Pharmacopeia), which describes the analytical parameters in order to develop the process of a validation according to the category to which it corresponds (I, II, III or IV).

The results for every analytical parameter (Category I) measured were: *Linearity*: $r = 0.9997$, in 5 samples replicated three times each with the standard of clenbuterol of 80, 90, 100, 110 and 120% according to that which is stated in the analytical methodology. *Accuracy*: Percent of recovery of the clenbuterol in the product samples of 80, 100 and 120% according to the analytical methodology: 100.395%, 98.63%, 101.07%, and 98.76%, 99.87%, 99.19%, in tablets and drops respectively. *Precision*: RSD (Relative Standard Diversion) $< 2.0\%$ in 5 samples of standard clenbuterol and 5 product samples of 100% according to the analytical methodology. *Specificity*: The areas of the placebos did not interfere with the determination of the concentration of clenbuterol. To make the present validation more concrete *Sensibility* and *Hardiness* were developed in addition.

The results obtained were inside the acceptable ranges for every analytical parameter, thus showing that the analytical methodology in study was validated.

III. INTRODUCCIÓN

La calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos ha formado su propia historia a través de los años. En un mundo cada vez más globalizado, se ha generado una mayor competitividad de mercado, exigiendo altos niveles de calidad en los productos, más aún en los medicamentos, donde la salud y vida de las personas está involucrada. Debido a lo anterior, diferentes organismos, nacionales e internacionales, encargados de llevar a cabo la fiscalización en materia de medicamentos, han creado normas y mecanismos por los cuales se obliga a las industrias farmacéuticas a realizar sus procedimientos en forma clara y documentada, dejando al olvido el concepto de error en esta área.

Un organismo de referencia en esta materia es la FDA (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos, creado a principios del siglo XX, el cual comenzó a legislar en respuesta a reacción ante hechos graves y fatales ocurridos en la salud de la población, debido a la falta de inocuidad, pureza y eficacia de los medicamentos.¹

Es así como en el año 1962 nacen las “Buenas Prácticas de Manufactura” (BPM o GMP), que dentro del concepto de garantía de la calidad, constituyen normas que aseguran que los productos se fabriquen de forma uniforme y controlada, de acuerdo con las normas de calidad que se pretende dar a los productos, y conforme a las condiciones exigidas para su comercialización. Las BPM describen los métodos, equipos, instalaciones y controles (incluyendo las pruebas analíticas) requeridas para producir alimentos, medicamentos e instrumentos de uso médico.

El Químico farmacéutico, profesional que cuenta con las bases curriculares en lo que a materia de medicamentos se refiere, por lo que puede desarrollar una planificación para optimizar un determinado proceso, asegurando la calidad y la educación del personal, participando en la industria farmacéutica en los procesos de validación y en la calificación de los equipos.

El concepto de Control de Calidad ha dejado de orientarse a la inspección o vigilancia al final de un proceso. En la actualidad, la función de éste es representada por el Aseguramiento de la Calidad, lo que se traduce en un esfuerzo organizado para diseñar, mantener y asegurar la calidad de los productos a través de todas y cada una de las etapas involucradas en su manufactura, desde la compra y adquisición de materias primas hasta el producto terminado.

Según lo estipulado en las BPM, en lo concerniente al control de la calidad, uno de los requerimientos para este control, consiste en que las metodologías analíticas aplicadas a los productos farmacéuticos sean validadas. Es así como la Industria farmacéutica ha convertido a las validaciones en un mecanismo de control retroactivo de los medios de aseguramiento de la calidad.

La FDA define validación como “El establecimiento de una evidencia documentada, que suministra un alto grado de seguridad, de que un proceso específico elaborará en forma permanente, un producto que cumple unas características y especificaciones de calidad predeterminada” (FDA, 1987), por lo que el objetivo de una validación analítica es asegurar que la metodología escogida para analizar un producto farmacéutico, entregará resultados confiables y reproducibles según el propósito previsto, y que esto será así mientras dicha metodología sea realizada siempre de la misma manera. De ahí que sea necesario definir debidamente tanto las condiciones en que el procedimiento ha de emplearse como el objetivo previsto para el mismo. (OMS, 1992).

La seguridad de cumplir con todas estas regulaciones (BPM), se obtiene a través de un programa de Aseguramiento de la Calidad bien diseñado.

Para generar procedimientos operativos estándares o fijos (POS), se debe conciliar, por parte del laboratorio farmacéutico, una política determinada sobre este tema, y crear los textos de referencia que se utilizarán para determinar los parámetros o pautas de comparación, adoptando los criterios que se refieran a BPM.

Actualmente, la institución encargada en Chile de esta regulación es el Instituto de Salud Pública (ISP), el cual plantea que los procesos dentro de una industria farmacéutica deben estar estandarizados bajo el concepto de validación, adoptando de esta manera las normas y especificaciones de fabricación estipuladas en las BPM de la Organización Mundial de la Salud (OMS). (DS. 1876/1995).

La Farmacopea de los EEUU (27 USP), establece que la validación de una metodología analítica debe establecerse mediante estudios de laboratorio, los que son realizados a través de parámetros analíticos, los cuales son:

Linealidad y rango

Exactitud

Precisión

Selectividad

Límite de detección

Límite de cuantificación

Robustez

Éstos serán aplicados según en qué categoría, de las cuatro existentes, esté el método analítico a estudiar. (*Ver Anexo N°1*).

A continuación se define cada parámetro analítico. (USP 27, 2004)

Linealidad: La linealidad de un método analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean directamente, o a través de transformaciones matemáticas, proporcionales a la concentración de analito en muestras, dentro de un intervalo apropiado de concentración.

Exactitud: Es la proximidad entre los resultados de prueba obtenidos mediante la metodología analítica y el valor de la concentración considerado como verdadero, debiendo establecerse en todo su intervalo.

Precisión: Es el grado de concordancia entre resultados de las pruebas individuales, cuando el método de análisis se aplica repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea.

La precisión se puede catalogar de la siguiente manera:

Reproducibilidad: Es el uso de los procedimientos analíticos en diferentes laboratorios.

Precisión intermedia: Expresa la variación dentro de un laboratorio, al uso de los procedimientos analíticos a diferentes días, equipos, analistas, etc.

Repetibilidad: Se refiere al uso del método analítico en un laboratorio, durante un periodo de tiempo corto, realizado por el mismo analista con el mismo equipo.

Especificidad o Selectividad: Es un atributo o propiedad del método por el cual la respuesta obtenida corresponde exclusivamente al analito que se desea detectar y cuantificar, sin ninguna interferencia por parte de los demás componentes de la matriz.

Sensibilidad: Es la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo o que puede determinarse en una muestra, con razonable precisión y seguridad.

Para evaluar los límites se utiliza:

Límite de Detección o Cantidad mínima Detectable: Hace referencia a la mínima cantidad de analito que puede detectarse en una muestra, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas.

Límite de Cuantificación o Cantidad mínima cuantificable: Es la mínima cantidad de analito presente en una muestra que se puede cuantificar con un grado de confianza previamente establecido (exactitud y precisión).

Robustez o Solidez: Es una medida de la capacidad de la metodología analítica para no resultar afectada por variaciones en los parámetros del método, indicando su confiabilidad durante su uso normal.

Para definir la metodología a validar, es necesario conocer los tipos de validaciones que se pueden realizar, y así identificar cual es la más conveniente para las condiciones del laboratorio y del proceso.

Existen 4 tipos de validaciones descritas, las cuales son (OMS, 1998):

Prospectiva: es a aquella que se basa en datos recopilados de conformidad con un protocolo previamente establecido.

Concurrente: este tipo de validación está basada en los datos recogidos durante la ejecución efectiva de un proceso que ya se ha implementado en una planta de producción. En esta situación,

los datos de validación se reúnen durante varios ciclos del proceso continuo y se evalúan para determinar si éste es válido.

Retrospectiva: es aquella que se realiza cuando un producto se ha venido produciendo por largo tiempo pero no se ha validado de conformidad con un protocolo prospectivo, en algunos casos puede efectuarse una validación retrospectiva cuando la validación concurrente no constituye una opción realista.

Revalidaciones: se deben realizar cuando se producen cambios, como por ejemplo: modificaciones en el método empleado o sustitución de un equipo. Se debe demostrar que los cambios realizados no afectan los resultados en comparación con el método original.

En este caso, luego de identificar las necesidades del laboratorio, el trabajo a realizar será una validación prospectiva de una metodología analítica. La validación prospectiva se refiere a un tipo de validación que es aplicable a procesos nuevos, o a aquellos a los que se le destinan recursos adicionales para obtener la información, son programadas en el tiempo y tienen una planificación previa, por lo que generalmente se realizan en etapas de desarrollo de productos y/o en metodologías analíticas.

Es así como en el área de control de calidad de Laboratorios Labomed S.A. se requiere que las metodologías analíticas aplicadas a los productos farmacéuticos, las cuales identificarán y cuantificarán los principios activos contenidos en ellos sean validadas, dando así garantía de que la técnica aplicada entregará resultados confiables y reproducibles, además de corroborar que todos los procesos de fabricación, anteriormente realizados para la obtención del producto final, fueron correctos.

Actualmente, dentro de las necesidades de Laboratorios Labomed S.A. y según su programa de validación, se requiere contar con una metodología analítica validada para los productos farmacéuticos: Asmeren comprimidos®, Asmeren gotas®.

Historia del laboratorio

Laboratorio LABOMED, Instituto destinado a la producción y comercialización de medicamentos, nace en la ciudad de Santiago en 1947, en calle Irrarázaval, fundado por la familia Lang, con productos vitamínicos, antiespasmódicos y antihipertensivos. Posteriormente, el año 1953, se crea una moderna planta para la época en Carlos Fernández N° 248, esta planta funcionó con un crecimiento expansivo hasta el año 1970, y posteriormente, en 1973, por razones de situación política, se ve en la obligación de vender sus productos a laboratorio PETRIZZIO de propiedad de la familia Olcese, quienes siguieron comercializando los productos de LABOMED en las instalaciones del laboratorio PETRIZZIO ubicado en Marín N° 388.

En el año 1994 se realizaron estudios para construir una entidad independiente, lo que fue posible hasta el año siguiente, con la materialización del proyecto y la construcción de una nueva planta que cumpliera y superara todas las exigencias físicas y tecnológicas que conciernen a productos farmacéuticos, adquiriendo equipos de excelente calidad.

En el año 1996 se inauguró la planta en Av. Eduardo Frei Montalva Km. 21.5, en el cual se llevó a cabo este trabajo de título. Dicha planta fue creada pensando en el crecimiento expansivo del área de fabricación en la excelencia por cuanto a calidad de medicamentos se refiere.

Hoy, diez años después, se ha podido ver el crecimiento de la planta, en una mayor producción, ya sea de productos propios de laboratorios LABOMED S.A., elaborando productos en diversas formas farmacéuticas como son comprimidos, cápsulas, grageas, jarabes y emulsiones farmacéuticas, como también de maquilas para otros laboratorios nacionales, gracias al amplio espacio físico que tiene en la planta de fabricación y a los profesionales que éste posee.

LABOMED cuenta además con licencias de laboratorios internacionales que le permiten ofrecer al mercado chileno en forma permanente, medicamentos de terapéutica avanzada. Dicho

crecimiento ha hecho también necesario la contratación de más personal, como también de un constante mejoramiento o reacomodación del interior de los espacios de la planta según lo solicitado por el ISP (Instituto de Salud Pública de Chile), en el intento de cumplir siempre con todas las normativas vigentes referentes a lograr medicamentos de alta calidad, preparándose con optimismo para enfrentar los desafíos de este nuevo milenio.

Departamentos y Áreas

LABOMED cuenta con oficinas comerciales ubicadas en Marín esquina Lira, donde trabajan cuatro Químicos Farmacéuticos, y una planta en Av. Eduardo Frei Montalva Km. 21.5 donde trabajan otros cuatro Químicos Farmacéuticos.

Del mejoramiento del funcionamiento de la planta se encarga un Químico Farmacéutico con el cargo de Gerente de Planta, quien con sus bases curriculares y experiencia en el área de producción y control de calidad, logra poner en marcha la planta y optimizar su funcionamiento. A su cargo existen tres Químicos Farmacéuticos, encargados del área de Fabricación, Dirección Técnica y Departamento de Control de Calidad, teniendo cada uno a su cargo el manejo del personal dentro de sus respectivas áreas.

Departamento de Control de Calidad

La función principal del departamento de Control de Calidad es controlar la calidad de todo el proceso productivo del laboratorio, este control parte desde las materias primas empleadas, hasta el producto terminado, pasando por los controles que se realizan al producto intermedio, y a sus controles de proceso en envase-empaque. Este departamento depende de la gerencia de la planta y esta a cargo de un Químico Farmacéutico, del cual dependen los analistas, que son los encargados de realizar todos los análisis de los productos y/o materias primas que el laboratorio requiera.

Dentro de este departamento está el área de control microbiológico, que depende del Químico Farmacéutico de control de calidad y lo opera una microbióloga, en esta área se realiza recuento de microorganismos, análisis de agentes patógenos, tales como *Salmonella*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. aureus* y *C. albicans*, además, de todos los controles microbiológicos que se requieren para la aprobación de productos fabricados por LABOMED.

Departamento de Producción

Este departamento se encarga de producir todos los productos de Labomed. Depende de la gerencia de planta y esta a cargo de un Químico Farmacéutico. Las Áreas de fabricación son; comprimidos, cápsulas, grageas, jarabes, suspensiones, emulsiones farmacéuticas, supositorios y sachets.

Las áreas de acondicionamiento son: donde se encuentran las líneas automáticas de blisteado, envasadora de jarabes, de pomos, de sachets, de supositorios con sus correspondientes estuchadoras.

El sub-departamento de bodega es una entidad dependiente del departamento de producción y está a cargo del jefe de bodega. Esta cuenta con una bodega central donde se almacenan todas las

materias primas y material de envase-empaque. Dentro de ésta existe una sub-bodega, de cuarentena, en la cual se almacenan todos los productos intermedios o graneles en espera de liberación por parte del departamento de control de calidad. La otra bodega es de productos terminados, donde se almacenan éstos, antes de ser despachados para su distribución o venta.

Departamento de Desarrollo

Este departamento esta destinado a crear nuevas formulaciones que el laboratorio disponga para su posterior lanzamiento al mercado, ya sea una mejora de un producto existente, un nuevo producto o bien una nueva forma farmacéutica. Este departamento depende de la gerencia de planta y está a cargo de un Químico Farmacéutico el cual utiliza todas las instalaciones de Producción y de Control de Calidad que estime conveniente, como así también el personal que trabaje en distintas áreas.

Fuera de estos tres grandes departamentos, la planta cuenta con diversas áreas que también son de importancia para su buen funcionamiento, siendo estas:

Área de Control en Proceso

Es dependiente del Químico Farmacéutico de control de calidad y su función es realizar e informar a su superior cualquier anomalía que pudiese ser detectada en el proceso de acondicionamiento del granel o de materiales empleados en el envase-empaque, realizando un seguimiento desde su recepción (granel), hasta su despacho a bodega, pasando por todos los pasos cronológicos que a ello concierne.

Área de baño y Vestuario

Esta área depende de la gerencia de planta y está destinada a la limpieza personal de todos los trabajadores, los que deben usar una vestimenta especialmente diseñada por LABOMED, la cual deberán dejar en una exclusiva destinada para ello, cada vez que hagan uso de los servicios higiénicos, teniendo como único objetivo, la máxima reducción de la posible contaminación de la ropa de trabajo de cada operario del laboratorio.

Área de casino

Esta área depende de la gerencia de planta y está destinada a que todo el personal que trabaje en la planta reciba un desayuno y un almuerzo diario.

Área de tratamiento de Aguas

Esta área depende de la gerencia de planta y se encarga de obtener el agua desde un pozo de propiedad de LABOMED, donde es tratada químicamente, con el fin de ser utilizada en todos los procesos de producción y análisis químico. Así mismo, existe un área destinada al tratamiento de aguas servidas con el propósito de proteger el medio ambiente.

Área de computación

Esta área depende de la gerencia de planta y esta destinada a dotar al laboratorio con un sistema computacional aplicable a todos los procesos de manufactura de un producto farmacéutico, y de todos sus pasos intermedios.

Bodega de Archivos y Contra muestras

Esta área esta destinada a almacenar documentos y contra muestras que deben ser guardados por un período de tiempo mínimo establecido por las instituciones fiscalizadoras, para salvaguardar todo compromiso legal que se presente.

Salón de Reuniones

Esta sala está acondicionada por LABOMED para ser empleada en actos sociales, reuniones formales y en las capacitaciones que el personal recibe periódicamente.

OBJETIVOS

GENERALES:

-Llevar a cabo la Validación de una metodología analítica para cuantificar clenbuterol clorhidrato en los productos Farmacéuticos Asmeren comprimidos® y Asmeren gotas®, como parte del programa de validación del Instituto Farmacéutico Labomed.

-Conocer la labor de un Químico Farmacéutico, tanto en el departamento de control de calidad principalmente, como también en las otras áreas o departamentos del laboratorio.

ESPECÍFICOS:

-Recopilar antecedentes bibliográficos que permitan obtener información, sobre el producto farmacéutico, la Validación, la técnica de valoración y las características y funcionamientos de los equipos a utilizar.

-Verificar y/o desarrollar POS (Procedimientos operativos estándar) necesarios para el proceso de Validación de la Metodología analítica.

-Dominar el manejo y uso de un equipo HPLC y de otros equipos y/o materiales empleados en el proceso de validación de la metodología analítica.

-Trazar un estándar secundario, para así conocer exactamente la potencia del estándar con el que se realizaran todos los ensayos analíticos.

-Conocer y aplicar los parámetros analíticos para la Validación de la metodología analítica establecidos en la USP, además de aplicar otros parámetros analíticos que no son considerados imprescindibles, pero se han incluido para otorgar una validación más completa.

-Aplicar un análisis estadístico sobre los datos obtenidos.

-Aplicar la metodología analítica en el producto Farmacéutico de acuerdo al estudio realizado.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

Los materiales utilizados durante la validación de la metodología analítica para clenbuterol en los productos farmacéuticos Asmeren comprimidos® y Asmeren gotas® fueron los siguientes:

Materiales

- Matraces aforados de 5, 25, 50 y 100mL
- Matraz Erlenmeyer de 250 y 500mL
- Pipeta aforada de 1y 5mL.
- Pipeta graduada de 2mL
- Vaso precipitado de 1000 mL.
- Probeta de 100 y 500 mL.
- Papel filtro 0,22µm
- Magneto para agitación
- Columna cromatográfica

Nota: Todo el material de vidrio utilizado fue clase A.

Equipos:

- Balanza analítica Mettler AB204, serie: 1115040819
- Baño Ultrasonido Branson modelo 8210 8210 MT S/S
- HPLC Merck Hitachi Lachrom N°1 : -Interface: D-7000 serie:1125-044

- (Identificación interna Labomed) -Detector: L-7420 serie 0702-0406
-Horno: L-7350 serie: 0053724
-Autosampler: L-7200 serie 1154-081
-Bomba: L7100 serie 714-036
- HPLC Merck Hitachi Lachrom N°2: -Detector: L-4250 serie:0433-029
(Identificación interna Labomed) -Bomba: L-6200 serie: 0531-042
 - Baño Termorregulado GFL 1041 serie 104412965

Reactivos

1. H₃PO₄ 85% serie: K31734073 308
2. Trietilamina serie: S3938352 342
3. Ácido Butansulfónico (sal sódica) serie:110K3724
4. Clenbuterol clorhidrato N°análisis: MP-2
5. Acetonitrilo serie: JA012230
6. Lactosa N° Análisis: MP-1513 lote JP030120 (utilizada en la preparación del parámetro selectividad)
7. Avicel PH101 N° análisis: no determinado (utilizado en la preparación del parámetro selectividad)
8. Almidón N° análisis: no determinado (utilizado en la preparación del parámetro selectividad)
9. Colorante Rojo laca 40 N° análisis: no determinado (utilizado en la preparación del parámetro selectividad)
10. Metilparabeno N° análisis: no determinado (utilizado en la preparación del parámetro selectividad)

11. Propilparabeno N° análisis: no determinado (utilizado en la preparación del parámetro selectividad)
12. Sorbitol 70% N° análisis: no determinado (utilizado en la preparación del parámetro selectividad)
13. PPG N° análisis: no determinado (utilizado en la preparación del parámetro selectividad)
14. Etanol serie: K35318983 543 (utilizado en la preparación del parámetro selectividad)

2. Métodos:

La metodología analítica fue realizada según el capítulo referido a Validaciones de la USP 27, la que recomienda realizar los siguientes parámetros analíticos (categoría I. *Ver Anexo N°1*): Exactitud, Precisión, Especificidad y Linealidad. Cabe señalar que para hacer más sólida la validación se realizó además el Límite de detección, Límite de Cuantificación y robustez.

V. METODOLOGÍA DE TRABAJO

1.-Definición de la metodología a validar

Se debe definir e identificar las necesidades y prioridades del Laboratorio Farmacéutico en su programa de aseguramiento de la calidad, para ello debe evaluarse el producto a validar, su metodología analítica y la disponibilidad para poder realizar esta validación en cuanto a materiales, equipos y bibliografía referente al producto.

Según lo anterior, se definió validar el método analítico de cuantificación de clenbuterol clorhidrato mediante HPLC, en los productos farmacéuticos Asmeren comprimidos® y Asmeren gotas®.

2.-Definición del(los) equipo(s) y materiales a utilizar.

Se realizó la recopilación de antecedentes referentes al equipo a utilizar, siendo éste un HPLC Merck Hitachi Lachrom. Asimismo, se estimaron los materiales (vidrio y reactivos) a usar en el proceso de validación.

Los materiales y equipos utilizados están descritos en Materiales y métodos. (*Ver pág. 25-27*)

3.-Elaboración de los Procedimientos Operativos Estándares (POS) para el proceso de Validación.

Para dar solidez a un proceso de validación, es necesario contar con todos los POS correspondientes para llevar a cabo todas las acciones correctamente, disminuyendo así los errores. Para el desarrollo de éstos, se tomó como referencia el “Manual de Aseguramiento de la Calidad”

del laboratorio LABOMED, documento guía que define la política de validación del laboratorio y el “Manual de procedimientos de Control de Calidad”, el cual define cómo se debe realizar una validación analítica. El propósito de generar POS es facilitar el proceso de validación, debido a que, realizando estos pasos estaremos estipulando los parámetros analíticos a desarrollar, la forma de analizarlos, evaluarlos y por ende, sus rangos de aceptación.

Es así como se procedió a revisar todos los procedimientos operativos estándar, de acuerdo al formato establecido por el departamento de Control de Calidad del Instituto Farmacéutico Labomed y a elaborar aquellos que no estaban descritos, para cada etapa del proceso de validación:

-Validación de metodología analítica mediante valoración volumétrica (CC-VAL-01).

-Validación de metodología analítica mediante HPLC (CC-VAL-11)

-Mantenimiento del equipo HPLC Merck Hitachi Lachrom

-Registro de datos en libro de validación (CC-VAL-03).

-Linealidad (CC-VAL15)

-Exactitud (CC-VAL-14).

-Precisión (CC-VAL-16)

-Robustez (CC-VAL-17)

-Selectividad (CC-VAL-18)

-Sensibilidad; Límite de Detección (CC-VAL-19)

-Sensibilidad; Límite de Cuantificación (CC-VAL-20)

- “Uso de Balanzas” (CC-INS-28).

4.-Verificación del funcionamiento del equipo

Para obtener resultados confiables se realiza, por parte de la empresa que provee de los equipos e insumos del HPLC, una mantención de éste, determinado la precisión instrumental y comprobando que se cumple con las especificaciones técnicas de funcionamiento del equipo.

Se verificó que el equipo estuviese dentro del período de mantención (1 vez al año). Dicha mantención, la realiza una empresa externa, entregando un informe con validez anual que certifica que el equipo está operable en óptimas condiciones; de esta manera entregan un certificado de calibración y de la capacidad de los técnicos autorizados que realizan el mantenimiento de los equipos.

5.-Trazabilidad de los estándares secundarios y preparación de los reactivos.

Es muy importante conocer la potencia de las drogas con la cuales se trabajará, para esto se debe definir el tipo de estándar que se utilizará y el método de estandarización.

Por otro lado, es muy importante dentro de la metodología analítica, la preparación de las soluciones o reactivos, ya que de ellas dependen las propiedades analíticas que se desea evaluar.

6.-Análisis de Parámetros Analíticos

Se desarrollaron los parámetros analíticos estipulados por la farmacopea de los Estados Unidos (USP 27) para la validación de una metodología analítica de un producto farmacéutico, la que recomienda realizar los siguientes parámetros analíticos (categoría I. *Ver Anexo N°1*): Exactitud, Precisión, Especificidad y Linealidad. Cabe señalar que para hacer más sólida esta validación se realizó Límite de detección, Límite de Cuantificación y Robustez.

6.1 Linealidad

Para desarrollar el parámetro Linealidad, se tomó como material referencia el POS de validación denominado “Linealidad” (CC-VAL-15). En este parámetro, se elaboran 5 muestras en triplicado sólo para estándar, en concentraciones de 80, 90, 100, 110 y 120% de lo declarado en la metodología analítica.

Limites de aceptación: $r > 0.99$ y $RSD < 2 \%$, donde r corresponde al coeficiente de correlación lineal y el RSD corresponde a la desviación estándar relativa.

6.2 Exactitud

Para la determinación de la exactitud se tomó como referencia el POS de validación denominado “Exactitud” (CC-VAL-14). En este parámetro, se prepararon 3 muestras de estándar y producto en concentraciones de 80, 100 y 120% de lo declarado en la metodología analítica, con doble inyección por muestra.

Limite de aceptación: Recuperación entre 98.0 – 102.0 % y el RSD entre cada inyección no debe ser superior al 2.0%.

6.3 Precisión

Este parámetro analítico se realizó basado en el análisis que está descrito en el POS de validación denominado “Precisión” (CC-VAL-16). En este parámetro se prepararon 5 muestras para estándar y muestras de Asmeren comprimidos® y Asmeren gotas® en concentraciones al 100% de lo declarado en la metodología analítica.

Limite de aceptación: $RSD < 2.0\%$

6.4 Sensibilidad

El siguiente parámetro analítico se desarrolló de acuerdo a los POS de validación denominados “Límite de detección” y “Limite de cuantificación” CC-VAL-19 y CC-VAL-20, respectivamente.

En este parámetro se elaboraron 5 muestras en triplicado, sólo para estándar (cada una sometida a doble inyección), en concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50% de lo declarado en la metodología analítica

Límite de Aceptación: Sin rango

6.5 Selectividad

Este parámetro analítico se desarrolló de acuerdo a los POS de validación denominado “Selectividad” (CC-VAL-18). Para llevarlo a cabo, se prepararon 3 muestras en quintuplicado de placebo (cada una sometida a doble inyección), a concentraciones de 80, 100 y 120% para clenbuterol de lo declarado en la metodología analítica.

Limite de aceptación: Los excipientes no deben presentar áreas a la longitud de onda a la que se está trabajando, y si las hubiera, éstas no debiesen interferir en la medición de los picos correspondientes a los principios activos.

6.6 Robustez

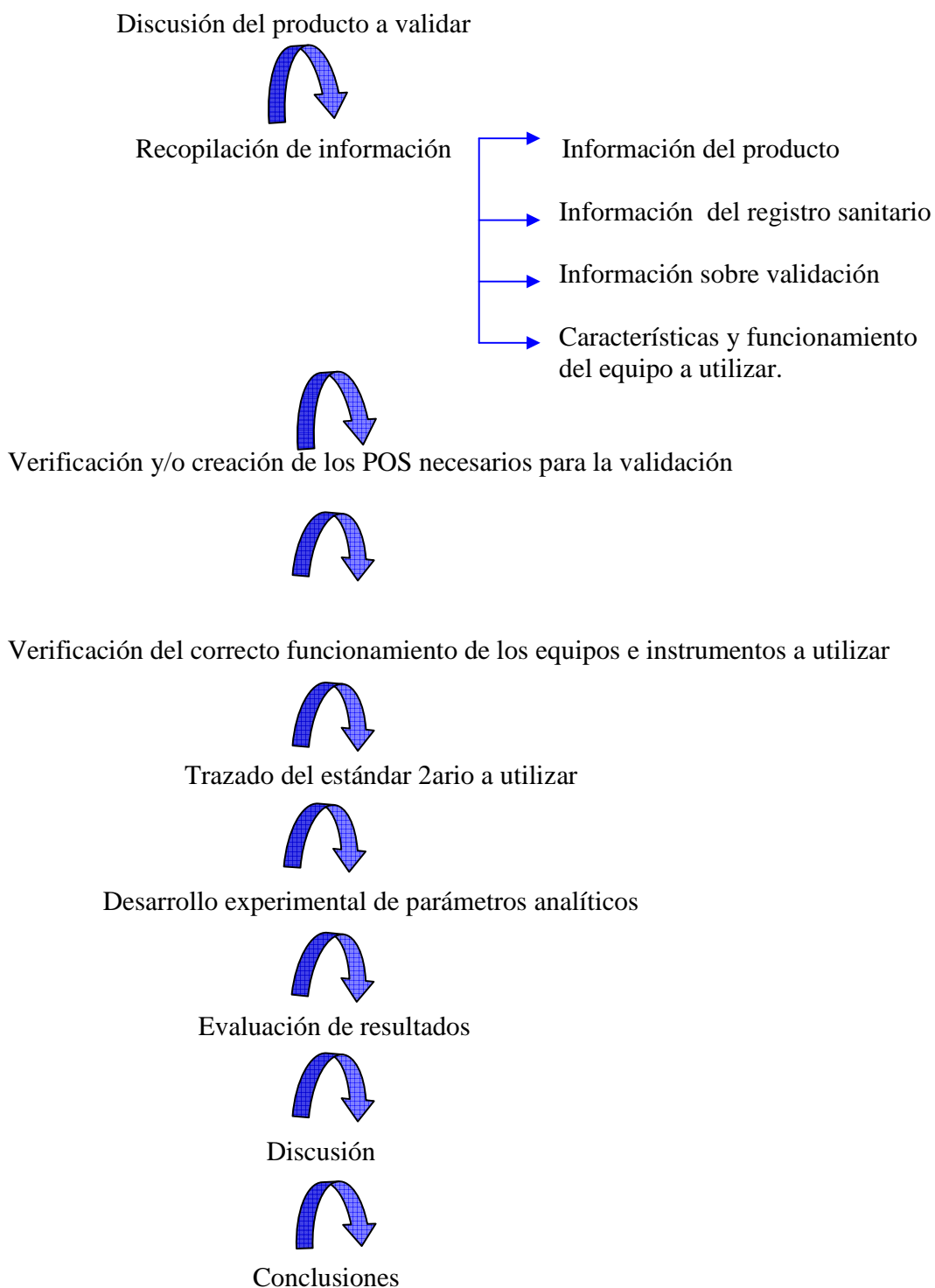
El presente parámetro analítico se desarrolló de acuerdo a los POS de validación denominado “Robustez” CC-VAL-17. En este parámetro, se prepararon muestras y estándares en quintuplicado, en concentraciones de un 100% (cada una sometida a doble lectura), de lo declarado en la metodología analítica, bajo 4 condiciones modificadas.

Limite de aceptación: Recuperación entre 97% y 103%

7.-Evaluación de resultados en forma estadística.

Luego de concluida la parte analítica de la validación, se procedió a evaluar los resultados obtenidos y a determinar a través del análisis de éstos, si cada parámetro analítico es aprobado o rechazado de acuerdo a parámetros preestablecidos, para posteriormente determinar si la metodología analítica queda validada o no.

VI. DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO DE VALIDACIÓN



VII. RESULTADOS

1.- Trazabilidad de los estándares secundarios y preparación de reactivos.

El estándar utilizado, fue estandarizado previamente a la validación de la metodología analítica de los productos farmacéuticos Asmeren comprimidos® y Asmeren gotas®.

Datos de Trazabilidad del estándar secundario de clenbuterol:

-Método: Valoración Potenciométrica

-Valorante: NaOH 0,1M

-Relación: 1mL NaOH 0,1M = 31,37mg clenbuterol

Tabla N°1: Resultados de la valoración potenciométrica del estándar secundario de clenbuterol.

Muestra N°	Peso (mg)	Gasto NaOH (mL)	Potencia (%)	Potencia promedio (%)	RSD promedio (%)
1	250,2	7,9	99,05	101,58	1,75
2	250,2	8,2	102,81		
3	250,1	8,0	100,34		
4	250,0	8,2	102,89		
5	250,2	8,2	102,81		

2.-Análisis de parámetros analíticos.

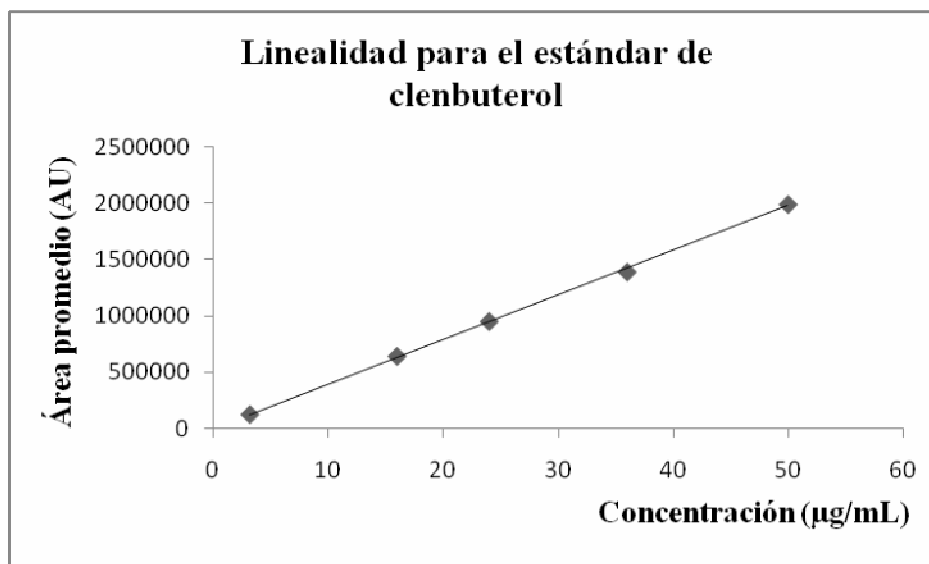
La totalidad de los parámetros analíticos se realizaron basados en los POS elaborados con anterioridad a la fase experimental de la validación.

2.1 Linealidad

Tabla N°2: Áreas obtenidas por las diferentes concentraciones de estándar de clenbuterol clorhidrato en el parámetro linealidad.

Muestra		Promedio áreas entre inyecciones	%RSD entre inyecciones	Promedio áreas	RSD Promedio (%)
Estándar 10% (3,2µg/mL)	1	119109	0,13	119745	1,11
	2	118860	0,85		
	3	121267	0,07		
Estándar 20% (16µg/mL)	1	632481	0,04	638694	1,58
	2	650312	0,06		
	3	633290	1,21		
Estándar 30% (24µg/mL)	1	957776	0,02	949240	1,34
	2	955374	0,02		
	3	934569	0,36		
Estándar 40% (36µg/mL)	1	1354588	0,16	1390858	2,49
	2	1394503	0,16		
	3	1423484	0,17		
Estándar 50% (50µg/mL)	1	1983182	0,11	1993001	2,42
	2	1950527	0,16		
	3	2045293	0,17		

Gráfico N°1: Gráfico de Área promedio v/s concentración de clenbuterol, en el parámetro Linealidad.



Mediante regresión lineal se obtienen los siguientes valores de la ecuación de la recta:

$$Y = a + bx$$

$$a = -6.369,9$$

$$b = 39.655.665,1$$

$$r = 0,9997$$

2.2 Exactitud

Tabla N°3: Resultados obtenidos de las inyecciones de estándar de clenbuterol y las muestras de Asmeren comprimidos® con su porcentaje de recuperación, para el parámetro exactitud.

Muestra		Promedio áreas entre inyecciones	%RSD entre inyecciones	Promedio áreas	RSD Promedio (%)	Recuperación (%) (*)
Estándar 80%	1	115752	0,27	113715	1,97	98,16
	2	114077	0,15			
	3	111316	0,47			
Mtra Asmeren comp. 80%	1	113832	0,13	112903	1,34	
	2	113725	0,37			
	3	111152	0,61			
Estándar 100%	1	138657	0,71	138724	0,16	98,28
	2	138551	0,74			
	3	138965	0,25			
Mtra Asmeren comp. 100%	1	138201	0,09	137791	0,26	
	2	137571	0,41			
	3	137601	0,66			
Estándar 120%	1	168011	0,28	169639	1,19	98,98
	2	169005	0,24			
	3	171902	0,06			
Mtra Asmeren comp. 120%	1	169986	0,01	169564	0,95	
	2	167780	0,02			
	3	170928	0,31			

(*): Para ejemplo de cálculo de Recuperación *ver Anexo 2 a*).

Tabla N°4: Resultados obtenidos de las inyecciones de estándar de clenbuterol y las muestras de Asmeren gotas® con su porcentaje de recuperación, para el parámetro exactitud.

Muestra		Promedio áreas entre inyecciones	%RSD entre inyecciones	Promedio áreas	RSD Promedio (%)	Recuperación (%) (*) ¹
Estándar 80%	1	114278	0,21	114933	1,87	101,63
	2	118305	0,11			
	3	114934	0,60			
Mtra Asmeren gotas 80%	1	111670	0,02	112254	0,46	
	2	112441	0,01			
	3	112651	0,02			
Estándar 100%	1	143581	0,15	144973	1,0	101,82
	2	146436	1,75			
	3	144902	0,30			
Mtra Asmeren gotas 100%	1	142354	0,02	140591	0,96	
	2	140175	0,17			
	3	139112	0,03			
Estándar 120%	1	173488	0,09	174065	0,34	98,14
	2	174028	0,03			
	3	174679	0,03			
Mtra Asmeren gotas 120%	1	168523	0,11	170765	1,62	
	2	169872	0,04			
	3	173900	0,03			

(*)¹: Para ejemplo de cálculo de Recuperación *ver Anexo 2 b*).

Para calcular este parámetro es necesario tener en cuenta los siguientes datos:

- Potencia del estándar 2^{ario} clenbuterol: 100,73%
- Potencia de la muestra (clenbuterol en Asmeren comp.®): 101,85% (serie 508670)
- Potencia de la muestra (clenbuterol en Asmeren gotas®): 96% (serie 505372-1)

Nota: Estos datos fueron obtenidos de las respectivas valoraciones de la materia prima y productos terminados, registrados en sus respectivos boletines de análisis.

2.3 Precisión

Tabla N°5: Resultados obtenidos de las valoraciones de estándar de clenbutrol y muestras de Asmeren comprimidos® y Asmeren gotas®, para el parámetro precisión.

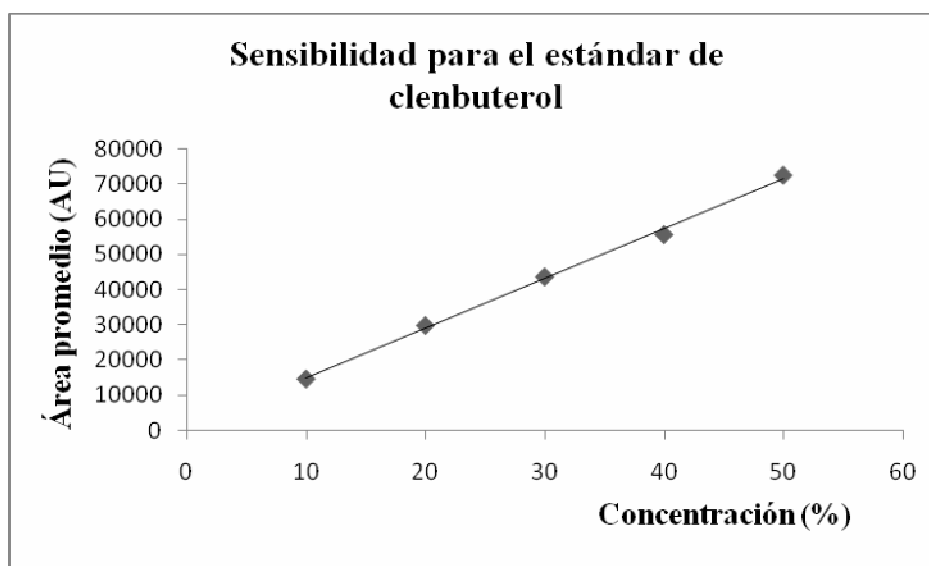
Muestra		Promedio áreas entre inyecciones	RSD entre inyecciones (%)	Promedio áreas	RSD Promedio (%)
Estándar 100%	1	140797	0,54	141268	0,51
	2	141314	0,10		
	3	140470	0,02		
	4	142342	0,17		
	5	141418	1,03		
Mtra Asmeren comp. 100%	1	135093	0,35	134569	1,41
	2	137008	0,25		
	3	134797	0,17		
	4	134214	0,11		
	5	131735	0,15		
Estándar 100%	1	141518	1,01	144552	1,40
	2	145589	0,17		
	3	146682	0,18		
	4	145345	0,09		
	5	143628	0,07		
Mtra Asmeren gotas 100%	1	138979	0,65	139586	0,77
	2	138315	0,01		
	3	139431	0,18		
	4	140075	0,03		
	5	141134	0,23		

2.4 Sensibilidad

Tabla N°6: Resultados obtenidos de las inyecciones de estándar de clenbuterol, para el parámetro sensibilidad.

Muestra		Promedio áreas entre inyecciones	%RSD entre inyecciones	Promedio áreas	RSD Promedio (%)	SD
Estándar 10%	1	14330	1,06	14581	1,88	274
	2	14539	0,79			
	3	14874	1,31			
Estándar 20%	1	30144	1,93	29809	1,68	500
	2	29234	0,84			
	3	30046	0,03			
Estándar 30%	1	44128	0,17	43675	0,90	393
	2	43445	0,02			
	3	43452	0,72			
Estándar 40%	1	55509	0,16	55686	0,63	350
	2	55460	0,22			
	3	56090	0,19			
Estándar 50%	1	71818	0,73	72558	0,99	719
	2	72599	0,27			
	3	73256	0,10			

Gráfico N°2: Áreas promedio v/s concentraciones de clenbuterol, en el parámetro Sensibilidad.



Mediante regresión lineal, se obtienen los siguientes valores:

$$\begin{aligned} a &= 712,5 \\ b &= 1418,31 \\ r &= 0,9988 \end{aligned}$$

Los que son reemplazados en la siguiente ecuación:

$$\mathbf{Y_{bl} = a + bX}$$

$$Y_{bl} = 712,5 + 1418,31 X$$

Luego, si decimos que $X = 0$, se tiene que:

$$\mathbf{Y_{bl} = 712,5}$$

Del cálculo de la regresión lineal entre la desviación estándar (SD) v/s las concentraciones de las muestras, se obtienen los siguientes resultados:

$$\begin{aligned} a &= 225,2 \\ b &= 7,4 \\ r &= 0,678 \end{aligned}$$

Estos valores son reemplazados en la siguiente ecuación:

$$\mathbf{S_{bl} = a + bX}$$

$$S_{bl} = 225,2 + 7,4X$$

Ahora, si decimos que $X = 0$, se tiene que:

$$\mathbf{S_{bl} = 225,2}$$

Con estos datos, podemos calcular los límites antes descritos, el límite de detección y el límite de cuantificación.

$$LD = (I Y_{bl} I + 3x I S_{bl} I) / b_{linealidad}$$

$$LD = \frac{I712,5I + 3 \times I225,2I}{39655665} = 3,5 \times 10^{-5}\%$$

Entonces, como el 100% es de 20µg de clenbuterol, el $3,5 \times 10^{-5}\%$ corresponde a 0,0007µg detectables según metodología analítica.

$$LC = I Y_{bl} I + 10 S_{bl} / b_{linealidad}$$

$$LC = \frac{I712,5I + 10 \times I225,2I}{39655665^*} = 7,5 \times 10^{-5}\%$$

Entonces, como el 100% es de 20µg de clenbuterol, el $7,5 \times 10^{-5}\%$ corresponde a 0,0015µg detectables según metodología analítica.

*: Valor obtenido de la pendiente del parámetro *Linealidad*.

2.5 Selectividad

Tabla N°7: Áreas presentadas por los placebos de Asmeren comprimidos®, a concentraciones de 80, 100 y 120%, en el parámetro Selectividad.

Concentración	Peso (mg)	Área Promedio entre inyecciones	Área Promedio entre muestras	% en relación a la Absorbancia del Std (Exactitud)
Placebo 1 80%	78,4	0	56,6	0,04
Placebo 2 80%	78,4	101		
Placebo 3 80%	78,4	152		
Placebo 4 80%	78,4	0		
Placebo 5 80%	78,4	0		
Placebo 1 100%	98,0	1871	1126	0,81
Placebo 2 100%	98,0	1389		
Placebo 3 100%	98,0	918		
Placebo 4 100%	98,0	740		
Placebo 5 100%	98,0	715		
Placebo 1 120%	117,6	711	1054	0,62
Placebo 2 120%	117,6	723		
Placebo 3 120%	117,6	419		
Placebo 4 120%	117,6	1486		
Placebo 5 120%	117,6	1931		

Nota: Las muestras de placebos de Asmeren gotas® no presentaron áreas a la longitud de onda a la cual se leyeron las muestras.

2.6 Robustez

Las condiciones modificadas de trabajo para clenbuterol fueron las siguientes:

2.6.1.- Estrés Oxidativo:

-Condición original: Sin estrés oxidativo

-Condición Modificada: Los estándares y las muestras fueron sometidas a baño maría a 60°C x 1 hora.

Tabla N°8: Resultados obtenidos de las inyecciones de estándar y muestras de Asmeren comprimidos® (AC) y Asmeren gotas® (AG), en condición original (C.O) y modificada (C.M), y su porcentaje de recuperación, en el parámetro Robustez.

Concentración		Promedio áreas entre inyecciones	RSD entre inyecciones	Promedio Áreas entre muestras	RSD entre muestras (%)	Recuperación (%)
Std 100% C.O	1	144635	0,15	144520	1,34	99,42
	2	145061	0,28			
	3	143973	0,08			
	4	147156	0,05			
	5	141776	0,99			
Std 100% C.M	1	144100	0,86	143683	1,73	
	2	144643	0,05			
	3	143198	0,16			
	4	146620	0,06			
	5	139853	0,18			
Mtra AC 100% C.O	1	129128	0,32	143898	6,38	
	2	141725	0,16			
	3	148606	0,00			
	4	152920	0,13			
	5	147112	0,17			
Mtra AC 100% C.M	1	127585	0,08	144711	7,24	
	2	141740	0,03			
	3	151387	0,21			
	4	152509	0,54			
	5	150336	0,33			
Mtra AG 100% C.O	1	131894	0,11	132348	0,23	
	2	132265	0,20			
	3	132311	0,05			
	4	132623	0,12			
	5	132645	0,21			
Mtra AG 100% C.M	1	134235	0,02	133018	0,58	
	2	132562	0,14			
	3	132237	0,24			
	4	132866	0,17			
	5	133194	0,24			

2.6.2.- Cambio del equipo HPLC

-Condición original: Equipo HPLC1 (Ver Equipos pág.25-26)

-Condición modificada: Equipo HPLC2 (Ver Equipos pág.26)

Tabla N°9: Resultados obtenidos de las inyecciones de estándar y muestras de Asmeren comprimidos® (AC) y Asmeren gotas® (AG), en condición original y modificada, y su porcentaje de recuperación, en el parámetro Robustez.

		Concentración	Promedio Áreas entre inyecciones	RSD entre inyecciones	Promedio áreas entre muestras	RSD entre muestras (%)	Recuperación (%)
Condición original	Std 100%	1	142499	1,17	141578	1,06	
		2	139364	0,40			
		3	142557	1,85			
		4	141893	1,96			
		5	148431	5,57			
	Mtra AC 100%	1	141544	0,16	140752	1,63	98,53
		2	137862	0,40			
		3	143949	0,33			
		4	141016	0,80			
		5	139387	0,23			
	Mtra AG 100%	1	137083	1,64	137530	0,54	101,82
		2	137691	0,47			
		3	138597	0,38			
		4	137658	0,03			
		5	136620	0,15			
Condición Modificada	Std 100%	1	152410	0,79	15789	2,52	
		2	155027	1,70			
		3	160321	0,65			
		4	162063	0,90			
		5	159124	1,20			
	Mtra AC 100%	1	159786	0,27	159277	1,17	100,00
		2	157078	1,04			
		3	161979	0,34			
		4	159511	0,30			
		5	158032	0,30			
	Std 100%	1	148293	0,72	150646	1,97	
		2	146892	1,28			
		3	152324	1,61			
		4	154062	0,89			
		5	151661	0,63			
Mtra AG 100%	1	142071	.05	141341	0,72	98,44	
	2	142770	1,52				
	3	140620	0,85				
	4	140520	0,41				
	5	140725	0,11				

2.6.3.-Estabilidad:

-Condición original: Estándar y muestras inyectados inmediatamente después de ser preparados.

-Condición modificada: Estándar y muestras inyectados luego de 5 días a temperatura ambiente.

Tabla N°10: Resultados obtenidos de las inyecciones de estándar y muestras de Asmeren comprimidos® (AC) y Asmeren gotas® (AG), en condición original (C.O) y modificada (C.M.), y su porcentaje de recuperación, en el parámetro Robustez.

Concentración		Promedio Áreas entre inyecciones	RSD entre inyecciones	Promedio Áreas entre muestras	RSD entre muestras (%)	Recuperación (%)
Std 100% C.O	1	144635	0,15	144520	1,34	98,95
	2	145061	0,28			
	3	143973	0,08			
	4	147156	0,05			
	5	141776	0,99			
Std 100% C.M	1	143684	0,11	143005	1,41	
	2	143441	0,05			
	3	142941	1,23			
	4	145216	0,61			
	5	139743	0,33			
Mtra AC 100% C.O	1	129128	0,32	143898	6,38	
	2	141725	0,16			
	3	148606	0,00			
	4	152920	0,13			
	5	147112	0,17			
Mtra AC 100% C.M	1	127182	0,24	142430	7,03	
	2	137562	0,32			
	3	148527	0,08			
	4	151571	0,20			
	5	147310	0,13			
Mtra AG 100% C.O	1	131894	0,11	132348	0,23	
	2	132265	0,20			
	3	132311	0,05			
	4	132623	0,12			
	5	132645	0,21			
Mtra AG 100% C.M	1	127728	1,99	124990	1,33	
	2	124824	0,23			
	3	124871	0,58			
	4	123255	0,18			
	5	124274	0,03			

2.6.4.- Cambio de Operador.

-Condición original: Verónica Navarro Valdebenito

-Condición modificada: Cristian Parra Garretón

Tabla N°11: Resultados obtenidos de las inyecciones de estándar y muestras de Asmeren comprimidos® (AC) y Asmeren gotas® (AG), en condición modificada, y su porcentaje de recuperación, en el parámetro Robustez.

	Concentración		Promedio Áreas entre inyecciones	RSD entre inyecciones (%)	Promedio áreas entre muestras	RSD entre muestras (%)	Recuperación (%) * ¹
Condición Modificada	Std 100%	1	138208	0,22	141292	0,79	100,02
		2	143451	0,16			
		3	139635	0,02			
		4	142087	0,07			
		5	143078	0,79			
	Mtra AC 100%	1	134660	0,56	135523	2,63	100,71
		2	133584	0,23			
		3	141479	0,08			
		4	132239	0,04			
		5	135654	0,46			
	Mtra AG 100%	1	125741	1,03	118143	16,63	84,64
		2	84546	0,18			
		3	131540	1,16			
		4	131494	0,84			
		5	117391	1,74			

*¹: % de recuperación calculado sobre los valores del parámetro Precisión, considerado como condición original.

3.- Evaluación de resultados en forma estadística

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos en el proceso de Validación comparados con los resultados esperados, para luego decidir si esta metodología analítica cumple o no con lo necesario para ser validada.

Tabla N°12: Resumen de resultados obtenidos en cada parámetro analítico para clenbuterol clorhidrato.

Parámetro	Esperado	Encontrado de clenbuterol		Comentario	
Linealidad	r < 0.990 RSD < 2,0%	r = 0,9997 RSD < 2,0%		Cumple	
Exactitud	RSD < 2,0% Recuperación: 98-102%	AC	AG	AC	AG
		RSD < 2,0% -100,39% -98,63% -101,07%	RSD < 2,0% -98,76,% -99,87% -99,19%	Cumple	Cumple
Precisión	RSD < 2.0%	AC	AG	AC	AG
		< 2.0%	< 2.0%	Cumple	Cumple
Limite de Detección	Sin rango	0,0007µg de clenbuterol		Cumple	
Limite de Cuantificación	Sin rango	0,0015 µg de clenbuterol		Cumple	
Robustez	Recuperación: 97-103%	AC	AG	AC	AG
		1)Std: 99,42% Mtra: 100,56%	99,42% 100,51%	Cumple	Cumple
		2)Mtra:102,07%	94,87%	Cumple	No Cumple
		3)Std:98,95 Mtra:99,69,%	98,95% 94,44%	Cumple	No Cumple
		4)Std: 100,02% Mtra:100,71%	84,64%	Cumple	No Cumple

VIII. DISCUSIÓN

La linealidad del estándar de Clenbuterol, fue desarrollada a concentraciones entre un 80% y 1250% de lo declarado en la metodología analítica de Asmeren comprimidos® y Asmeren gotas®. El menor porcentaje, fue calculado en base al 100% de la uniformidad de contenido requerida para Asmeren Comprimidos® (20µg), y el 1250% corresponde al 120% sobre el valor declarado en la metodología analítica de Asmeren Gotas® existente hasta ese entonces, la que posteriormente fue modificada en el transcurso de este estudio, a fin de lograr concentraciones iguales entre ambas metodologías al tomar muestras de Asmeren comprimidos® y Asmeren gotas®. Debido a lo anterior, finalmente, la linealidad fue realizada y demostrada en un rango más amplio al requerido.

El cambio de equipo a utilizar, es bastante común en un laboratorio, y consistió en inyectar las mismas muestras en otro equipo HPLC. Debido a las diferentes condiciones de inyección, dadas las características propias de cada equipo, como son el volumen del loop, modelo de detector, etc., las áreas no son comparables entre un equipo y otro, por lo que resulta más adecuado calcular la Recuperación de la muestra sobre el estándar, ambos inyectados en el mismo equipo. De esta manera se obtuvieron los porcentajes de recuperación en cada equipo por separado. El resultado obtenido en condición original estuvo dentro del rango aceptado, no así en condición modificada en Asmeren gotas®, lo que pudo deberse a la gran inestabilidad que presentó el equipo en su presión durante el tiempo de inyección. Sin embargo, igualmente fue aceptado, considerando que la concentración de la muestra dada por el equipo (1,88mg/100mL), estaba dentro del límite de aceptación, según hoja de especificaciones de producto terminado (1,8-2,2mg/100mL), además de

considerar que en este equipo se habían realizado y se realizan valoraciones de Asmeren normalmente con resultados dentro de los rangos establecidos.

La estabilidad de la muestra fue medida como una posible variable a ocurrir en el laboratorio. Los resultados mostraron la estabilidad de las muestras de Asmeren comprimidos® luego de transcurridos los días designados para este estudio, no así las muestras de Asmeren gotas®, las que presentaron una leve disminución en su porcentaje de recuperación versus su condición original, indicando una posible inestabilidad de la muestra con el paso de los días, por lo que las muestras debieran en lo posible ser analizadas inmediatamente luego de su preparación, que es lo que se hace habitualmente en el laboratorio.

El cambio de operador, es una variable de frecuente cambio en el laboratorio. En los resultados se pudo observar que sólo el porcentaje de recuperación de las muestras de Asmeren gotas® dio un valor más bajo al esperado, con diferencias de área considerables entre muestras, lo que se refleja en el RSD entre ellas (16,63%). Este resultado sugiere que es necesario cierto entrenamiento en el desarrollo de la metodología analítica, ya que el operador, en esta condición modificada, la realizaba por primera vez.

Las validaciones constituyen un sistema de control, por parte de la autoridad sanitaria al laboratorio y de autocontrol para él mismo. Esto permite asegurar medicamentos de calidad, beneficiando directamente la salud de la población.

IX. CONCLUSIONES

Las metodologías analíticas utilizadas para los productos farmacéuticos Asmeren comprimidos®, y Asmeren gotas® resultaron ser lineales, exactas, precisas y selectivas, cumpliendo así con todos los parámetros analíticos dispuestos por la USP 27 requeridos para una validación.

Con esto queda demostrado que la metodología analítica propuesta por el Instituto Farmacéutico Labomed S.A. para estos productos farmacéuticos está validada.

La validación de la metodología analítica de Asmeren comprimidos®, y Asmeren gotas®, permite al Instituto Farmacéutico Labomed S.A. tener la certeza de estar entregando medicamentos seguros y de calidad a los pacientes que harán uso de sus beneficios terapéuticos.

X. REFERENCIAS

- British pharmacopoeia. (1973). Published on the recommendation of the Medicines Commission pursuant to the Medicines Act 1968. London: Her Majesty's Stationery Office.
- EMEA. (1996). Validation of Analytical Procedures: Validation. London, s.i. 10p.
- European commission. (2001). Working Party on Control of Medicines and Inspections. Final Version of Annex 15 to the EU Guide to Good Manufacturing Practice. Brussels.
- FDA. (1987). Guideline on general principles of process validation. USA, U.S.Food and Drug Administration. 13p.
- Instituto Farmacéutico LABOMED S.A. (2006). (Última revisión). Manual de procedimientos de control de calidad. POS de validación. Santiago, Chile.
- ISP. (1997). Guía para las inspecciones de orden general a los establecimientos sometidos a control sanitario por el Instituto de Salud Pública de Chile. (Disponible en: http://www.ispch.cl/ctrl/doc/gui_gmp.pdf. Consultado el 4 de enero de 2007).
- John P. Swann, Ph. D. (1998). FDA History office. New York, Oxford University Press. (Disponible en: <http://www.fda.gov/oc/history/historyoffda/default.htm>. Consultado el 29 de diciembre de 2006).

- Madrid M. (2005). Validación de la Metodología analítica mediante el uso de cromatografía en el producto farmacéutico Alcolex® solución.
- Madrid M. (2005). Validación de la Metodología analítica mediante el uso de cromatografía en el producto farmacéutico Labosalic® solución.
- Martínez M. (2004). Validación de la Metodología analítica para la cuantificación de sodio y potasio por fotometría de llama, en soluciones parenterales de gran volumen. Tesis QF. Santiago, Univ. de Chile, Fac. Cien. Quim y Farm. 76p.
- Ministerio de Salud, Instituto de Salud Pública de Chile. (1995). Reglamento del Sistema Control de Productos Farmacéuticos, Alimentos de Uso Médico y Cosméticos, D.S. 1876/1995. Título I, VI y VII.
- OMS. (1992). Comité de Expertos de la OMS en Especificaciones para las Preparaciones Farmacéuticas. Buenas Prácticas de Manufactura para la Fabricación de Productos Farmacéuticos. Serie de Informes Técnicos de a OMS 823. Informe 32. Ginebra. 70p.
- OMS. (1996). Prácticas adecuadas de fabricación: Directrices sobre la validación de los procesos de fabricación. Informe 34, Anexo 6. Ginebra. 21p.
- OMS. (1998). Guía de la OMS sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación (PAF). Segunda parte: Validación. Ginebra.

- OPS. (1998). Guía para un Manual de Sistemas de Calidad en un Laboratorio de Prueba. Ginebra. 29p.
- OPS. (2003). Árbol de decisiones para la puesta en práctica de la Guía de Verificación de Buenas Prácticas de Manufactura. (Disponible en <http://www.paho.org/spanish/ad/thse/ev/bpm-arbol-guia.pdf>. Consultado el 16 de marzo de 2007).
- OPS. (2003). Guía de verificación de Buenas Prácticas de Manufactura. 91p. (Disponible en <http://www.paho.org/spanish/ad/thse/ev/guia-verif-bpm-doct-esp.pdf>. Consultado el 16 de marzo de 2007).
- Provoste C. (2003). Validación para betametasona dipropionato mediante el uso de un cromatógrafo HPLC para el producto farmacéutico Labosona® crema.
- United States Pharmacopeia. The National Formulary. USP 27. (2004). Validation of Compendial Methods <1225>. The United States Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville, Maryland.
- Isa J. (2005). Manual de POS de Control de Calidad. Instituto Farmacéutico Labomed S.A.
- Instituto Farmacéutico Labomed S.A. Carpeta de Registro Sanitario del Producto Asmeren comprimidos ® y Asmeren gotas®.
- Index Merk. (1996). Merk & CO.INC. The Merk Index USA.

XI. ANEXOS

Anexo N°1

Categoría I: Métodos analíticos para cuantificación de la mayoría de los principios activos (incluyendo preservantes) en productos farmacéuticos terminados.

Categoría II: Métodos analíticos para la determinación de impurezas o compuestos de degradación de principios activos en productos farmacéuticos terminados.

Categoría III: Métodos analíticos para la determinación de características de rendimiento (ej.: disolución, liberación de principio activo)

Categoría IV: Pruebas de identificación.

Cada categoría necesita diferente información analítica. La Tabla 2 detalla los parámetros analíticos normalmente requeridos para cada categoría.

Tabla: Datos requeridos para la validación de los análisis

Característica de desempeño analítico	Categoría I de Valoración	Categoría II de Valoración		Categoría III de Valoración	Categoría IV de Valoración
		Prueba de Límite Cuantitativa	Prueba de Límite Cualitativa		
Exactitud	Sí	Sí	*	*	No
Precisión	Sí	Sí	No	Sí	No
Especificidad	Sí	Sí	Sí	*	Sí
Límite de detección	No	No	Sí	*	No
Límite de cuantificación	No	Sí	No	*	No
Linealidad	Sí	Sí	No	*	No
Rango	Sí	Sí	*	*	No

*Puede requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

Anexo N°2

a) Concentración 80%

$$\text{Std} = 0,0032\text{mg/mL} \times 100,73\% = 0,00322\text{mg/mL}$$

$$\text{Mtra} = 0,0032\text{mg/mL} \times 101,85\% = 0,00326\text{mg/mL}$$

$$\begin{array}{l} 0,00322\text{mg/mL} \longrightarrow 113715 \\ X \longrightarrow 112903 \end{array} \quad X = 0,003197\text{mg/mL}$$

$$\text{Recuperación} = \frac{0,003197}{0,00326} \times 100 = \mathbf{98,16\%}$$

b) Concentración 100%

$$\text{Std} = 0,004\text{mg/mL} * 100,73\% = 0,00403\text{mg/mL}$$

$$\text{Mtra} = 0,004\text{mg/mL} * 96,00\% = 0,00384\text{mg/mL}$$

$$\begin{array}{l} 0,00403\text{mg/mL} \quad 144973 \\ X \quad 140591 \end{array} \quad X = 0,00391\text{mg}$$

$$\text{Recuperación} = \frac{0,00391}{0,00384} * 100 = \mathbf{101,82\%}$$