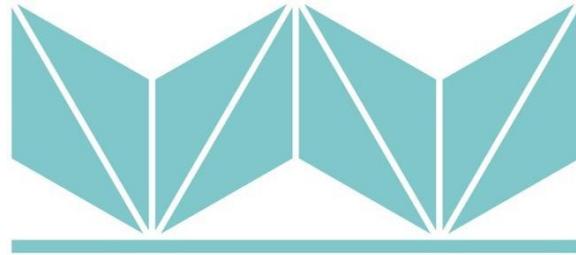




**Universidad
Norbert Wiener**

**UNIVERSIDAD PRIVADA NORBERT WIENER
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



Universidad Norbert Wiener

**“VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN
DE LEVOCETIRIZINA DICLORHIDRATO 5 mg/mL SOLUCION ORAL
GOTAS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRECISION
(HPLC)”**

AUTORES: Daniel Martín Núñez Soto

Germán Antonio Flores Palma

ASESORES: Guillermo Ramos Antonio

Chávez Jacobo Nolbert

DEDICATORIO

A: **Jehová Dios**, por darnos fortaleza,
Y ser nuestra esperanza; y de esa
manera permitir la realización de este
proyecto, pues con tu sabiduría has
sabido guiarnos y lo seguirás haciendo
hasta cumplir nuestras metas.

Los Autores

A mi querida madre Isolina Soto
Flores y mi esposa Carlota Taype
Janampa por su apoyo y confianza.
Por ayudarme a conseguir mis
objetivos como persona y estudiante.
Gracias por hacer de mí una mejor
persona y a través de sus consejos,
enseñanzas y amor.

Daniel Martín Núñez Soto

A la Señora: Lorenza Palma Ramos el
ser más maravilloso que me ha dado
Dios, ejemplo de madre, quien me
guía a cada instante con sus sabios
consejos.

Gracias madre por el inmenso amor,
comprensión, apoyo y confianza que
me brindas en todo momento.

Me faltan las palabras para expresar el
inmenso amor y gratitud que siento
por ti.

Germán Antonio Flores Palma

AGRADECIMIENTO

Nuestro amplio agradecimiento para el Q.F. **Antonio Guillermo Ramos Jaco** y en forma especial al Q.F. **Chávez Jacobo Nolbert** por su valiosa orientación quienes con su excelente respaldo e interés se hizo posible la realización de este estudio.

A los integrantes del jurado calificador, por su correcta evaluación, asesoría y colaboración en la elaboración final de nuestra tesis:

PRESIDENTE:

Mg. Villanueva Vílchez Hugo

SECRETARIO:

Mg. De Lama Carrillo Gerardo

VOCAL:

Q.F. Guevara Ortega Freddy

PRESENTACIÓN

Señores Miembros del Jurado Dictaminador:

De Conformidad Con Las Disposiciones Legales Y Vigentes Del Reglamento De Grados Y Títulos De La Facultad De Farmacia Y Bioquímica De La Universidad Privada Norbert Wiener Sometemos A Vuestro Elevado Criterio El Presente Informe De Validación Tesis Titulado

“VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LEVOCETIRIZINA DICLORHIDRATO 5 mg/mL SOLUCION ORAL GOTAS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRECISION (HPLC)”

Esperando vuestra aprobación, señores miembros del jurado dejamos a su criterio la calificación del presente informe de investigación.

Lima, 26 Noviembre del 2018.

RESUMEN

La validación de una metodología analítica es parte integral del sistema de control de calidad, puesto que confiere fiabilidad a los resultados analíticos obtenidos en un laboratorio de análisis, a fin de asegurar que un medicamento cumpla los parámetros de calidad establecidos. En este trabajo presentamos la validación de un método analítico para la cuantificación de Levocetirizina diclorhidrato en una solución oral gotas por Cromatografía Líquida de Alta Precisión. Los parámetros estadísticos empleados en la validación son: La linealidad; que mide la capacidad del método analítico para producir resultados que son proporcionales a la concentración del analito, lo cual queda demostrado en la validación al obtener un coeficiente de correlación $r = 0.998$ para sistema y 0.9996 para método, siendo el valor mínimo permisible de 0.995 . La exactitud mide la proximidad de los resultados obtenidos por este método y el valor real. Al aplicar el test de student para demostrar la exactitud del método analítico se obtuvo un t_{exp} (1.1444) que es menor al t de las tablas (2.306); por tanto no existe diferencia significativa entre la recuperación media y la cantidad añadida, es decir que el porcentaje de recuperación es próximo al 100%. La precisión del método analítico es el grado de concordancia o de dispersión de los resultados de la prueba. Los valores de RSD obtenidos, (0.19% para repetibilidad y 0.52% para precisión intermedia), nos demuestran la precisión del método analítico donde el valor máximo permitido es un $RSD = 2.0\%$. La especificidad determina la capacidad del método analítico de medir el contenido de Levocetirizina Clorhidrato, sin interferencias de parte de los excipientes o productos de degradación del principio activo. En el método analítico se obtuvo picos cromatográficos de levocetirizina clorhidrato con tiempos de retención similares para la muestra y el Standar, por lo tanto el método es específico. El Standard y el análisis del placebo nos demuestra que ningún excipiente interfiere con el pico del principio activo, como tampoco se ha detectado la presencia de productos de degradación de levocetirizina clorhidrato al realizar el análisis del principio activo sometido a diferentes procedimientos de degradación forzada, por lo tanto el método es selectivo.

Palabras Claves: Levocetirizina clorhidrato, Cromatografía líquida de alta Precisión, Validación, Método analítico

ABSTRACT

The validation of an analytical methodology is an integral part of the quality control system, since it confers reliability to the analytical results obtained in an analytical laboratory, in order to ensure that a drug meets the established quality parameters. In this work we present the validation of an analytical method for the quantification of Levocetirizine dihydrochloride in an oral solution drops by High Accuracy Liquid Chromatography. The statistical parameters used in the validation are: Linearity; which measures the ability of the analytical method to produce results that are proportional to the concentration of the analyte, which is demonstrated in the validation by obtaining a correlation coefficient $r = 0.998$ for system and 0.9996 for method, being the minimum permissible value of 0.995 . Accuracy measures the proximity of the results obtained by this method and the real value. When applying the student test to demonstrate the accuracy of the analytical method, we obtained a t_{exp} (1.1444) that is less than the t of the tables (2.306); therefore, there is no significant difference between the average recovery and the added amount, that is, the recovery percentage is close to 100% . The precision of the analytical method is the degree of concordance or dispersion of the test results. The values of RSD obtained, (0.19% for repeatability and 0.52% for intermediate precision), show us the precision of the analytical method where the maximum value allowed is an $RSD = 2.0\%$. The specificity determines the ability of the analytical method to measure the content of Levocetirizine Hydrochloride, without interference from the excipients or degradation products of the active principle. In the analytical method, chromatographic peaks of levocetirizine hydrochloride were obtained with similar retention times for the sample and the Standard, therefore the method is specific. Standard and placebo analysis show that no excipient interferes with the peak of the active principle, nor has the presence of degradation products of levocetirizine hydrochloride been detected when carrying out the analysis of the active principle subjected to different procedures of forced degradation, for therefore the method is selective.

Key Words: Levocetirizine hydrochloride, High Precision Liquid Chromatography, Validation, Analytical method

ÍNDICE

PÁGINAS PRELIMINARES

	Pág.
CARATULA.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
PRESENTACIÓN.....	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
INDICE GENERAL.....	viii
INDICE TABLAS.....	x
INDICE DE ESQUEMAS.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Planteamiento del problema.....	3
1.2 Hipótesis.....	4
1.3 Objetivos.....	4
1.3.1 Objetivo general.....	4
1.3.2 Objetivo específico.....	4
1.4 Variables.....	4
1.4.1 Variables dependientes.....	4
1.4.2 Variables independientes.....	4

II.	MARCO TEORICO.....	5
2.1	Antecedentes del estudio	9
2.2	Validación.....	11
2.2.1	Exactitud.....	15
2.2.2	Precisión	15
2.2.3	Especificidad.....	16
2.2.4	Límite de detección	16
2.2.5	Límite de cuantificación.....	16
2.2.6	Linealidad.....	17
2.2.7	Rango	17
2.2.8	Robustez.....	17
2.3	Verificación.....	18
2.4	Especificidad e interferencia del placebo	18
2.5	Cromatografía de líquidos.....	19
2.6	Propiedades Farmacológicas y Química del Analito	20
2.6.1	Antihistamínico.....	20
2.6.2	Levocetirizina.....	20
III.	MATERIAL Y MÉTODO.....	22
3.1	Equipos y materiales.....	22
3.2	Descripción del método.....	23
3.3	Parámetros de validación a desarrollar y especificaciones.....	27
3.3.1	Adecuabilidad del sistema.....	27
3.3.2	Especificidad.....	27
3.3.3	Exactitud.....	32

3.3.4 Precision.....	33
3.3.5 Linealidad.....	34
3.3.6 Robustez.....	37
3.3.7 Rango.....	37
IV. RESULTADOS.....	38
V. DISCUSIÓN.....	51
VI. CONCLUSIONES.....	53
VII. RECOMENDACIONES	54
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	55
IX. ANEXOS.....	57

ÍNDICE DE TABLA

1. Tabla N° 1. Categorías de Validación.....	13
2. Tabla N° 2. Exactitud	32
3. Tabla N°3. Linealidad del Sistema	34
4. Tabla N° 4. Linealidad del Método	36
5. Tabla N° 5. Resultados	38
6. Tabla N° 6. Resultados para Levocetirizina Diclorhidrato	41
7. Tabla N° 7: Resultados para Levocetirizina Diclorhidrato	41
8. Tabla N° 8: Resultados para Placebo, Fase móvil, Diluyente	42
9. Tabla N° 9: Resultados para Muestra Problema	42
10. Tabla N° 10: Resultados para Degradación del placebo	43
11. Tabla N° 11: Resultados para Degradación de la MP	44

12.	Tabla N° 12: Resultados para Levocetirizina Diclorhidrato	45
13.	Tabla N° 13: Resultados para Test de Student	45
14.	Tabla N° 14: Resultados para Test de Cochran	46
15.	Tabla N° 15 : Resultados para Levocetirizina Diclorhidrato	46
16.	Tabla N° 16: Resultados para Retetibilidad	47
17.	Tabla N° 17: Resultados para Precisión intermedia	47
18.	Tabla N° 18: Resultados para Linealidad del sistema	48
19.	Tabla N° 19: Resultados para Linealidad del método	49
20.	Tabla N° 20 Resultados para Levocetirizina Diclorhidrato.....	50
21.	Tabla N° 21: Resultados para Levocetirizina Diclorhidrato	50

ÍNDICE DE ESQUEMA

1.	ESQUEMA N°1 Diagrama del flujo del proceso analítico.....	26
2.	ESQUEMA N°2 curva de calibración de la Linealidad del sistema.....	35
3.	ESQUEMA N°3 curva de calibración de la Linealidad del método	37

I. INTRODUCCIÓN

Es necesario adquirir conocimiento científico y tecnológico que nos permita contribuir y satisfacer las demandas de la sociedad y proporcionar solución a problemas de salud, por medio de medicamentos que en las últimas décadas son reemplazados por fármacos específicos. Los mismos que son elaborados por grandes laboratorios e industrias farmacéuticas; quienes tienen que estar atentos y cumplir con Buenas Prácticas de Manufactura y de Laboratorio, así como el control de calidad del producto fabricado es indispensable para garantizarle al consumidor un medicamento confiable y seguro⁽¹⁾.

El continuo y rápido crecimiento del mercado farmacéutico exige que los laboratorios farmacéuticos se preparen y busquen la calidad en sus productos y procesos, para poder así utilizarlo como una ventaja frente a su competencia. Lo que requiere la necesidad de obtener certificaciones que garanticen la calidad del producto, como por ejemplo la certificación ISO 9001, el mismo que requiere la validación de los métodos analíticos con el que se realiza el control de calidad de sus productos⁽¹⁾.

Las Diferencias entre distintas formas farmacéuticas, tipo y calidad de las materias primas empleadas por cada fabricante, hacen necesario validar la metodología para cada producto en particular. El diseño de este nuevo método sirve de guía a la industria farmacéutica para la cuantificación simultánea de cinco principios activos como materia prima y en un producto terminado; basándose en la cromatografía líquida de alta resolución como una técnica automatizada que permite analizar de forma rápida y eficiente la separación, cuantificación y detección de las muestras por medio de la identificación de los picos en los cromatogramas. Los resultados obtenidos fueron evaluados con un programa informático que integra tanto criterios de estadística y aceptación que especifica cada requisito, que permite generar resultados verídicos para asegurar y validar un método analítico de medicamentos que puede ser aprobado y autorizado⁽²⁾.

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece por medio de un estudio y programa documentado que ese método posee todos los requisitos para un determinado análisis de un producto. La validación es parte integral de las buenas prácticas de manufactura (BPM) y del desarrollo de un método de análisis puesto que sin fiabilidad de los resultados analíticos es imposible asegurar que un medicamento cumpla con las especificaciones exigidas, además contribuye a garantizar la calidad y asegurar las propiedades de calidad de un producto determinado. La calidad de los resultados analíticos debe ser respaldada mediante la fiabilidad y reproducibilidad de los métodos analíticos utilizados en su obtención y esta demostración debe estar debidamente documentada con el detalle de la preparación de las muestras efectuadas y datos obtenidos. ⁽²⁾.

La validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas y demostrativas de que un método de análisis es lo suficientemente fiable y reproducible para producir el resultado previsto dentro de los intervalos definidos. La validación de un método analítico es un requisito necesario para cumplir con las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y así asegurar la calidad del medicamento. ⁽¹⁾

Para el desarrollo de un nuevo producto es necesaria la utilización de métodos analíticos que permitan cuantificar el producto en forma de producto terminado, materia prima o como principio activo de la formulación con un alto grado de confiabilidad, altos estándares de calidad de la producción.

Por lo cual se realizará una validación de un nuevo método analítico de Levocetirizina Diclorhidrato 5mg/mL Solución oral gotas elaborada en el área de desarrollo e investigación de la industria farmacéutica. Es un producto nuevo que se elaborara con altos estándares de calidad del producto, lo cual logre garantizar la calidad del producto. La validación de un método analítico es el proceso por el cual queda establecido por estudios experimentales que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada. Ésta se fundamenta en la determinación de diversos parámetros que se aplican de acuerdo con la categoría a la que pertenezcan.

I.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las empresas de la Industria Médico-Farmacéutica tienen como prioridad asegurar la calidad de sus productos , dentro de la Industria Farmacéutica se debe garantizar la fiabilidad de datos obtenidos mediante los análisis ya que a partir del resultado proporcionado se tomarán desiciones futuras con respecto al producto. Por lo tanto nos interesa mantener un método que sea estable, capaz y robusto. ⁽³⁾

Un método validado nos da la seguridad de ello, dado que estas características son esenciales para mantener altos niveles de calidad en los resultados del análisis.

Entonces, para la cuantificación de Levocetirizina Diclorhidrato solución oral gotas por cromatografía líquida de alta Precisión (HPLC), Se determinara si el método Analítico cumple con los parámetros de desempeño de la validación.

Por lo tanto se inicio la validacion de un metodo analitico por HPLC ya que validando aseguramos que se cumpla con los requerimientos preestablecidos, confirmando su precisión y exactitud. validando aseguramos que las modificaciones de las condiciones normales de ensayo y medio ambiente operacional no afecten negativamente el resultado final .

Las características de desempeño de un método analítico se expresan en función de los parámetros analíticos. Los parámetros analíticos considerados en la validación son los siguientes:

- Exactitud
- Precisión
- Especificidad
- Límite de Detección
- Límite de Cuantificación
- Linealidad
- Robustez
- Rango (Intervalo)

la validación de un método analítico es dejar evidencia, mediante documentación, del cumplimiento de las condiciones de exactitud, precisión y confiabilidad, así como de la integridad y recuperabilidad de los resultados de los ensayos efectuados. De este modo queda demostrado que se puede confiar en un método para producir el resultado esperado dentro de límites definidos.

1.2 HIPÓTESIS.

El Método Analítico de cuantificación por HPLC de Levocetirizina Diclorhidrato 5mg/mL Solución oral gotas cumple con los parámetros de Validación.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Validar el método analítico para la cuantificación de Levocetirizina Diclorhidrato 5mg/mL Solución oral gotas por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC).

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar los parámetros de la validación de: Adecuabilidad, Especificidad, Exactitud, Precisión, Linealidad, Robustez, del método de cuantificación de Levocetirizina Diclorhidrato 5mg/mL Solución oral gotas con los resultados obtenidos del análisis.

1.3 VARIABLES:

1.4.1 VARIABLES DEPENDIENTES

Análisis Cuantitativo de Levocetirizina Diclorhidrato

1.4.2 VARIABLES INDEPENDIENTES

Validación de la cuantificación en Cromatografía líquida de alta precisión (HPLC).

II. MARCO TEÓRICO

En la actualidad los laboratorios de control de la calidad de la Industria Médico-Farmacéutica se ocupan de analizar si un producto cumple o no con sus requisitos de calidad mediante la utilización de métodos analíticos establecidos para cada uno de ellos y también se esfuerzan para validar cada método analítico utilizado en el control de la calidad de sus productos. Usando este criterio el laboratorio de control químico inició la validación de sus métodos analíticos con la que interviene en el control de la calidad de Productos Farmaceuticos que se encuentra en fase de desarrollo, y posteriormente será sometido a un estudio de estabilidad.^(1, 2)

De acuerdo a las BPM, un medicamento es, en sí mismo, un producto complejo que requiere un protocolo de estandarización que sólo puede garantizarse mediante la utilización de métodos de análisis apropiados. El empleo de estos métodos se extiende no sólo a las diferentes etapas de su fabricación, sino también a las de investigación, desarrollo y farmacoterapia.⁽⁵⁾

Las Buenas Prácticas de Manufactura establecen que todas las operaciones, procesos, métodos o técnicas deben ser reguladas o estrictas y deben ser cumplidas y supervisadas por profesionales con la suficiente responsabilidad.

Los estudios de validación constituyen una parte esencial de las BPM, deben efectuarse conforme a protocolos definidos de antemano. Siempre que sea factible, la validación debe completarse antes de la entrega o implementación del producto. Debe prepararse y archivarse un reporte escrito que resuma los resultados y las conclusiones registradas.⁽⁶⁾

Deben establecerse procesos y procedimientos sobre la base de un estudio de validación. Los cuales se sometan periódicamente a una revalidación para asegurar que con ellos se puedan seguir obteniendo los resultados deseados. Se debe prestar especial atención a la validación de los procedimientos del proceso, limpieza y de los métodos analíticos.

Para conocer la importancia que los métodos de análisis representan en el ciclo de vida de un medicamento, basta con aproximarse a las diferentes etapas de su elaboración.

En este sentido, las técnicas analíticas desempeñan una función determinante en todos los estudios de la vida de un fármaco, es decir, en la investigación, el desarrollo de un nuevo compuesto, el estudio de la forma farmacéutica idónea y en la producción y el control, así como en el conocimiento del estado de conservación en el tiempo.

Sin embargo, en el mercado farmacéutico actual existen varios medicamentos de gran demanda por la población, cuyas técnicas de análisis no se encuentran publicadas en las obras oficiales que generalmente se consultan, a saber: Farmacopea americana, británica, europea y japonesa. Esto hace necesario desarrollar nuevas técnicas de análisis en el laboratorio con el fin de separar y cuantificar los principios activos de dichos medicamentos.

En los últimos años la cromatografía de líquidos de alta resolución, también llamada HPLC por sus siglas en inglés (*High Performance Liquid Chromatography*), ha adquirido una importancia relevante en el análisis químico cuantitativo. Es por eso que la mayoría de laboratorios farmacéuticos cuentan con el equipo necesario para este tipo de cromatografía.

Es la técnica de separación más ampliamente utilizada, presentando ventajas sobre los métodos tradicionales. Entre ellas están: que se obtienen tiempos de análisis más rápidos, pueden separarse sustancias de mezclas complejas con alta resolución, ejecución de los análisis con facilidad y exactitud, obteniéndose errores relativos menores al 1% y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general.⁽⁸⁾

El proceso de validación permite el conocimiento de las características de funcionamiento del método y proporciona un alto grado de confianza en el mismo y en los resultados obtenidos al aplicarlo.

Los documentos de la ICH (International Conference on Harmonization) establecen los procedimientos necesarios para llevar a cabo la validación de los métodos analíticos. En ellas se indican las características del método que deben ser consideradas para la validación, que son:

Especificidad: es la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz.

Exactitud: es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante el procedimiento analítico y el valor verdadero. La exactitud de un procedimiento analítico debe establecerse en todo su intervalo.

Precisión: expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas. La precisión intermedia (también conocida como tolerancia o fortaleza) expresa la variación dentro de un laboratorio, por ejemplo en diferentes días, con diferentes analistas o con equipo diferente dentro del mismo laboratorio.

Límite de detección: es una característica de las pruebas de límite. Es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede detectarse, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas. Se expresa habitualmente en forma de concentración de analito en la muestra.

Límite de cuantificación: es una característica de las valoraciones cuantitativas de compuestos que se encuentran en baja concentración en la matriz de una muestra. Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas. Se expresa habitualmente en forma de concentración de analito en la muestra.

Linealidad e intervalo: la linealidad es la capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado, es decir se refiere a la linealidad de la relación entre la concentración y la medida de valoración. El intervalo o rango es la amplitud entre la concentración inferior y superior en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el procedimiento según se describe por escrito.

Robustez: es una medida de la capacidad del procedimiento analítico para no ser afectado por variaciones pequeñas, aunque deliberadas, en los parámetros del procedimiento indicado en la documentación, y provee una indicación de su aptitud durante condiciones normales de uso.

Para el caso de la ICH, estas aconsejan sobre la necesidad de realizar una nueva validación en las siguientes circunstancias: cambios en la síntesis del fármaco, cambios en la composición del producto farmacéutico y cambios en el procedimiento analítico.⁽⁹⁾

El laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto. El laboratorio debe registrar los resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la validación y una declaración sobre la aptitud del método para el uso previsto.⁽¹⁰⁾

Basado en este criterio se inició la validación de un método analítico por HPLC con que interviene en el control de calidad de un nuevo producto desarrollado. Es un medicamento cuyo principio activo es la Levocetirizina Diclorhidrato en forma de solución oral gotas.

Sin embargo, el método de análisis no se encuentra publicado en las obras oficiales a las que generalmente se consulta, a saber: Farmacopea Americana y Británica. Esto hizo necesario desarrollar un nuevo método de análisis en el laboratorio para separar y cuantificar dicho principio activo.⁽¹¹⁾

Por ser una técnica desarrollada internamente, debe ser validada de acuerdo a los requerimientos establecidos en la USP40-NF35 (Farmacopea Americana) y la International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Con este procedimiento se probará la confiabilidad del método analítico para asegurar la calidad, eficacia e inocuidad del medicamento. Por tanto, al validar este método analítico, se obtendrá un procedimiento específico para el análisis en las condiciones descritas.

2.1. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

Sin duda, una de las aplicaciones más importantes de las técnicas instrumentales en farmacia es la determinación cuantitativa de compuestos. Existen numerosos métodos que se emplean asiduamente con este fin, siendo necesario conocer las posibilidades y limitaciones de cada uno de ellos para seleccionar el más adecuado para el análisis que se desee realizar. En ocasiones se pueden asociar dos o más técnicas para resolver problemas concretos.

Para desarrollar una técnica analítica de cuantificación es necesario, en primer lugar, establecer el método analítico más conveniente a ser utilizado. El desarrollo de la técnica de validación para materias primas y productos terminados es una tarea que se viene desarrollando en diferentes laboratorios farmacéuticos peruanos, en los últimos años, debido a las exigencias de altos estándares de calidad y la mejora continua de la producción de los medicamentos se tiene que tener resultados confiables, de los cuales se tienen las siguientes tesis realizadas:

Flores, (1) realizó una validación de un método analítico de cromatografía líquida de alta performance para la cuantificación de Adapaleno en Alviera 0.1% crema tópica, concluyendo que el método analítico para la cuantificación del Adapaleno en Alviera 0.1% crema tópica cumple con los parámetros de linealidad, exactitud, especificidad, robustez, repetibilidad y precisión intermedia del nuevo método de análisis de acuerdo a los parámetros solicitados.

Jessica, (2) efectuó una validación de método analítico de valoración de Naproxeno sódico 550 mg tableta por cromatografía líquida de alta performance, para lo cual utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta performance (HPLC) establecido en la USP 28. Los parámetros estadísticos empleados en la validación son: La linealidad; lo cual queda demostrado en la validación al obtener un coeficiente de correlación $r = 0.99992$, siendo el valor mínimo permisible de 0.997. La exactitud: Al aplicar el test de student para demostrar la exactitud del método analítico se obtuvo un t_{exp} (1.1932) que es menor al t de las tablas (2.306); por lo tanto no existe diferencia significativa entre la recuperación media y la cantidad añadida de analito, es decir que el porcentaje de

recuperación del analito es muy cercano al 100%. La precisión del método analítico es el grado de concordancia o de dispersión de los resultados de la prueba. Los valores de RSD obtenidos, (0.17% para repetibilidad y 0.16% para precisión intermedia), nos demuestran la precisión del método analítico donde el valor máximo permitido es un RSD = 2.0%.

Mendoza, (3) desarrolló una validación del método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación cuantitativa de Levofloxacin de 500mg/100ml inyectable para infusión, concluyendo que cumple con las exigencias dadas por la USP 31 en todos los parámetros de la validación. Los resultados son proporcionales a la concentración del analito en la muestra, por lo tanto el método es lineal; es preciso porque nos permite obtener resultados repetitivos y reproducibles; es exacto porque permite la recuperación de la totalidad del analito presente en la muestra y es selectivo porque permite el análisis del principio activo sin la interferencia de los excipientes presentes en la tableta.

Jorge, (4) realizó una validación del método analítico de valoración de amoxicilina en polvo para suspensión oral producido por Betapharma S.A. mediante HPLC, determinando que el método analítico utilizado para la valoración de Amoxicilina en polvo para suspensión oral mediante (HPLC), cumple con los requerimientos para los que fue diseñado, esto fue establecido gracias a diferentes parámetros y los resultados fueron satisfactorios para todos los análisis para la precisión del método se obtuvo un RSD de 1,33 por debajo del límite de 3,9 permitido. En cuanto a la precisión entre días, se obtuvo un RSD de 2,04 por debajo de 3,9 que es el límite permitido. Con respecto a la precisión entre analistas se obtuvo un RSD de 1,66 que está por debajo del límite permitido que es de 3,9. En la determinación de la linealidad se obtuvo un R2 de 0,994 que está por arriba del 0,99 planteado inicialmente. En la determinación de la recuperación del método se obtuvo un porcentaje de 97,94% que está dentro de los parámetros establecidos entre 97.5% y 102,5%. En cuanto a la robustez del método se obtuvo un RSD (Desviación estándar relativa) de 1,5 que se encuentra por debajo de 3,9 que es el límite permitido.

2.2. VALIDACIÓN:

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se demuestra por medio de un estudio y programa documentado que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas para un terminado análisis de un producto. La validación es parte integral de las buenas prácticas de manufactura (BPM) y del desarrollo de un método de análisis puesto que sin fiabilidad de los resultados analíticos es imposible asegurar que un medicamento cumpla con las especificaciones exigidas, además contribuye a garantizar la calidad y asegurar las propiedades de calidad de un producto determinado. La calidad de los resultados analíticos debe ser respaldada mediante la fiabilidad y reproducibilidad de los métodos analíticos utilizados en su obtención y esta demostración debe estar debidamente documentada con el detalle de la preparación de las muestras efectuadas y datos obtenidos. (5, 6,8)

La validación verifica que el método de ensayo sirve para determinar si el procedimiento puede ser utilizado para su propósito previsto, en condiciones de uso reales para un fármaco específico y/o matriz de un producto farmacéutico determinado. El proceso de validación desarrolla el método analítico estableciendo la evidencia documental de que el procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos establecidos. El objetivo de la validación de un método analítico es dejar evidencia, mediante documentación, del cumplimiento de las condiciones de exactitud, precisión y confiabilidad, así como de la integridad y recuperabilidad de los resultados de los ensayos efectuados. De este modo queda demostrado que se puede confiar en un método para reducir los resultados esperados dentro de límites definidos. (13, 14)

La validación de un procedimiento se puede determinar por la evaluación de su especificidad, linealidad, intervalo, exactitud, precisión y robustez.

El objetivo de la validación de un método es demostrar que el procedimiento de medición sea adecuado para su propósito esperado, incluyendo la determinación cuantitativa del componente principal en un fármaco o forma farmacéutica (valoraciones de Categoría I), la determinación cuantitativa de impurezas o límites de prueba (Categoría II) y las pruebas de

identificación (Categoría IV). Dependiendo de la categoría de la prueba (ver la Tabla 1. En el capítulo Validación de Procedimientos Farmacopeicos capítulo general (1225)), El proceso de validación del método analítico requiere el análisis de linealidad, intervalo, exactitud, especificidad, precisión, límite de cuantificación y robustez. ⁽²⁾

Las características de desempeño que demuestran la aptitud de un método son similares a las requeridas para cualquier procedimiento analítico. El capítulo general (1225) trata los principios generales aplicables. Los criterios de aceptación específicos para cada parámetro de validación deben ser congruentes con el uso pretendido del método. Las muestras para validación deben ser independientes del conjunto de calibración.⁽²⁾

La validación de un método analítico es el proceso que establece mediante estudios en laboratorios, que las características de desempeño del método cumplen los requisitos adecuados de exactitud y confiabilidad para las aplicaciones analíticas previstas. Las características de desempeño analítico habituales que deben considerarse en la validación de los tipos de métodos descritos son: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad e intervalo y robustez⁽²⁾

Características Analíticas Típicas Utilizadas para la Validación de Métodos

- Exactitud
- Precisión
- Especificidad
- Límite de Detección
- Límite de Cuantificación
- Linealidad
- Robustez
- Rango (Intervalo)

Datos Requeridos para la Validación:

Los requisitos de las pruebas farmacopeicas varían desde determinaciones analíticas muy rigurosas hasta evaluaciones subjetivas de atributos. Considerando esta amplia variedad, es lógico que diferentes procedimientos de prueba requieran diferentes esquemas de validación. Las categorías de prueba más habituales para las que se exigen datos de

validación. Estas categorías se indican a continuación:

Categoría I: Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.

Categoría II: Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos procedimientos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.

Categoría III: Procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño (p.ej. disolución, liberación de fármacos, etc.).

Categoría IV: Pruebas de identificación.

Para cada categoría, se requiere diferente información analítica. En la tabla 1 Indican los datos que normalmente se requieren para cada una de estas categorías.

Tabla N° 01

Categorías de validación

Características de Desempeño analítico	Categoría I de valoración Prod.Termi. Graneles, conservante	Categoría II de valoración		Categoría III de valoración (características de desempeño, disolución)	Categoría IV de valoración (pruebas de identificación)
		Prueba de límite Cuantitativa (impurezas en fármacos)	Prueba de límite Cualitativa (metales pesados, etc.)		
Exactitud	SI	SI	*	*	NO
Precisión	SI	SI	NO	SI	NO
Especificidad	SI	SI	SI	*	SI
Límite de detección	NO	NO	SI	*	NO
Límite de cuantificación	NO	SI	NO	*	NO
Linealidad	SI	SI	NO	*	NO
Intervalo	SI	SI	*	*	NO

Los procedimientos generales ya establecidos (p.ej., determinación volumétrica de agua, endotoxinas bacterianas) deben verificarse para establecer su aptitud para el uso, tal como su exactitud (y la ausencia de posibles interferencias) cuando se utilizan para un producto nuevo o materia prima nueva.

Al validar métodos de propiedades físicas, se deben considerar las mismas características de desempeño requeridas para cualquier procedimiento analítico. Asimismo, se debe evaluar el uso de las características de desempeño para cada caso en particular, a fin de determinar que el procedimiento es adecuado para el uso previsto. Los criterios de aceptación específicos para cada parámetro de validación deben ser congruentes con el uso previsto para el método. Los métodos físicos también se pueden clasificar en las cuatro categorías de validación. Por ejemplo, la validación de un método espectroscópico cuantitativo puede implicar la evaluación de Características de Desempeño Analítico de Categoría I, dependiendo de los requisitos del método. Las mediciones de propiedades físicas cualitativas, tales como tamaño de partícula, área superficial, densidad aparente y densidad por asentamiento, las cuales pueden tener un impacto sobre las características de desempeño, generalmente se ajustan mejor a la Categoría II/. Las Características de Desempeño Analítico de Categoría IV por lo general se aplican a la validación de métodos espectroscópicos de identificación cualitativa. No obstante, las diversas técnicas se pueden usar para distintos propósitos, y el uso específico del método y las características del material en análisis se deben considerar al aplicar definitivamente una categoría a un tipo de método en particular.

La validez de un procedimiento analítico puede verificarse sólo mediante estudios de laboratorio. Por lo tanto, la documentación de la conclusión exitosa de dichos estudios constituye un requisito básico para determinar si un procedimiento es adecuado para sus aplicaciones previstas. Los procedimientos farmacopeicos oficiales también están sujetos a reglamentos que requieren la demostración de aptitud en las condiciones reales de uso (ver Verificación de Procedimientos Farmacopeicos (1226) para los principios relativos a la verificación de procedimientos farmacopeicos). Cualquier propuesta de procedimientos farmacopeicos analíticos nuevos o revisados debe ir acompañada de la documentación adecuada. ^(2, 21)

2.2.1 EXACTITUD

Para valoraciones de Categoría I o pruebas de Categoría II, los analistas pueden determinar la exactitud realizando estudios de recuperación mediante el uso de la matriz apropiada que tenga concentraciones conocidas agregadas de elementos. Asimismo, se puede usar un material estándar certificado apropiado provisto por la USP. Además, se considera una práctica aceptable comparar los resultados de la valoración obtenidos usando el método que se está validando con aquéllos obtenidos de un método analítico establecido. Cuando los analistas usan el método de estándar agregado, las evaluaciones de exactitud se basan en la concentración calculada a partir de la intersección de la curva, con el eje de concentración a ordenada cero, no en la recuperación calculada a partir de las adiciones de estándares individuales.⁽¹⁵⁾

Criterios de aceptación: Recuperación de 98,0 -102,0% para valoración de fármacos y formas farmacéuticas, recuperación del 70,0 -150,0% para análisis de impurezas. Estos criterios de aceptación deben cumplirse en todo el intervalo validado.

2.2.2 PRECISIÓN

a) Repetibilidad:

Los analistas deben evaluar el método analítico midiendo las concentraciones de seis estándares distintos al 100% de la concentración de prueba de la valoración. Alternativamente, los analistas pueden medir las concentraciones de tres determinaciones repetidas de tres muestras distintas a diferentes concentraciones. Las tres concentraciones deben ser lo suficientemente cercanas de modo que la repetibilidad sea constante en todo el intervalo de concentración. En este caso, se combina la repetibilidad a las tres concentraciones para compararla con los criterios de aceptación.⁽²⁰⁾

Criterios de aceptación: La desviación estándar relativa es no más de 1,0% para la valoración de fármacos, no más de 2,0% para la valoración de formas farmacéuticas y no más de 20,0% para el análisis de impurezas.

b) Precisión Intermedia:

Los analistas deben establecer el efecto de eventos aleatorios sobre la precisión analítica del método. Las variables típicas incluyen realizar el análisis en días distintos, usando diferentes instrumentos, o que dos o más analistas realicen el método. Como mínimo, cualquier combinación de al menos dos de estos factores para totalizar seis experimentos proveerá una estimación de la precisión intermedia.⁽²¹⁾

Criterios de aceptación: La desviación estándar relativa es no más de 1,0% para la valoración de fármacos, no más de 3,0% para la valoración de formas farmacéuticas y no más de 25,0% para el análisis de impurezas.

2.2.3 ESPECIFICIDAD

El procedimiento debe poder determinar de manera inequívoca cada analito elemental en presencia de otros componentes que se esperan encontrar, incluyendo cualquier componente de la matriz.

2.2.4 LÍMITE DE DETECCIÓN

Se entiende por límite de detección la mínima cantidad del analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar bajo dichas condiciones experimentales. El límite de detección es por tanto un término sólo cualitativo. En ambos términos se encuentra un rango de concentraciones en las que si bien no puede cuantificarse el analito en cuestión con razonable certeza, si puede detectarse su presencia sin incurrir en falsos positivos.⁽⁷⁾

2.2.5 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

El límite de cuantificación se puede estimar calculando la desviación estándar de no menos de 6 mediciones repetidas de un blanco y multiplicando por 10. Se pueden usar otros enfoques adecuados (ver (1225)). Para confirmar la exactitud, se debe realizar una medición de una muestra de prueba preparada a partir de una matriz de muestra representativa y a la que se le agregan cantidades conocidas de tal manera que la concentración sea similar a la concentración de límite de cuantificación.⁽⁸⁾

2.2.6 LINEALIDAD

Los analistas deben demostrar una relación lineal entre la concentración del analito y la respuesta corregida preparando no menos de cinco estándares a concentraciones que abarquen la concentración anticipada de la muestra de prueba. Posteriormente, la curva estándar debe evaluarse usando métodos estadísticos apropiados tales como la regresión de cuadrados mínimos. Se deben determinar el coeficiente de correlación (R), la ordenada al origen y la pendiente de la línea de regresión.

Criterios de aceptación: R no menos de 0,995 para valoraciones de Categoría I y no menos de 0,99 para pruebas cuantitativas de Categoría II.

2.2.7 RANGO

El Rango se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior (cantidades) de analito en la muestra (incluyendo concentraciones superior e inferior) para el que se ha demostrado que el procedimiento analítico tiene un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad. El intervalo se demuestra cumpliendo con los requisitos de linealidad y exactitud.^(2,3)

Criterios de aceptación: Para criterios de aceptación centrados en 100,0 - 80,0 -120,0%. Para criterios de aceptación no centrados: 10% por debajo del límite inferior de la especificación hasta 10% por encima del límite superior de la especificación. Para uniformidad de contenido: 70,0-130,0%. Para la Categoría **II** los requisitos del intervalo son 50,0 -120,0% de los criterios de aceptación.

2.2.8 ROBUSTEZ

La confiabilidad de una medición analítica se debe demostrar realizando cambios deliberados a los parámetros experimentales. Para esto puede incluir la medición de la estabilidad del analito en condiciones de almacenamiento especificadas.

Criterios de aceptación: La medición de la respuesta de un estándar o de una muestra después de un cambio en los parámetros experimentales no debe diferir de la medida obtenida con el mismo estándar usando parámetros establecidos en más de $\pm 2,0\%$ para una valoración de una forma farmacéutica y no más de $\pm 20,0\%$ para un análisis de impurezas.

2.3 VERIFICACIÓN

El objetivo de una verificación de un método es demostrar que el procedimiento descrito en la monografía, se está llevando a cabo con una exactitud, sensibilidad y precisión adecuadas. Puede ser necesario desarrollar y validar un procedimiento alternativo conforme a lo permitido en las Advertencias Generales 6.30 de la USP40-NF35. Aunque no se requiere la revalidación completa de un método farmacopeico, la verificación de métodos farmacopeicos debe incluir por lo menos la ejecución de los parámetros de validación para especificidad, exactitud, precisión y límite de cuantificación, cuando resulte apropiado, según se indica en la sección Validación (anterior).⁽²⁾

2.4 ESPECIFICIDAD E INTERFERENCIA DEL PLACEBO

Es necesario para demostrar que los resultados no están indebidamente afectados por los ingredientes del placebo, otros fármacos activos o productos de degradación.

El placebo está constituido por todos los excipientes y recubrimientos sin el ingrediente activo. La interferencia del placebo puede determinarse pesando las muestras de la mezcla del placebo y disolviéndolas o dispersándolas en el medio de disolución a las concentraciones que se puedan encontrar durante la prueba.

Es preferible realizar este experimento a 37C° comparándolo al 100% del estándar, por la fórmula:

$$100C(Ap/As)(V/L)$$

En donde C es la concentración, en mg por ml, del estándar; Ap y As son las absorbancias del placebo y del estándar, respectivamente; V es el volumen, en ml, del medio; y L es el valor declarado, en mg.

La interferencia no debe exceder de 2%.

- Elegir otra longitud de onda.
- Sustraer la línea de base empleando una longitud de onda mayor o utilizar HPLC.

Cuando están presentes otros fármacos activos o hay significativos niveles de degradación, es necesario demostrar que éstos no afectan demasiado los resultados.

Un procedimiento para lograrlo es medir la matriz en presencia y ausencia del otro fármaco activo o producto de degradación: toda interferencia no debe exceder de 2%. ⁽¹⁾

2.5 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS (HPLC)

Cromatografía líquida de alta presión y de cromatografía de alta resolución. La cromatografía de líquidos es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida.^(14,19)

a) Fase estacionaria:

Las separaciones se logran por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada. Las fases estacionarias más comúnmente usadas son la sílice modificada o el micro perlas de polímeros. Las micro perlas se modifican agregando hidrocarburos de cadena larga. El tipo de relleno específico necesario para completar un análisis se indica mediante la designación “L” en la monografía individual, el tamaño de las micro perlas también se describen en la monografía.

b) Columna cromatográfica:

El término columna incluye columnas de acero inoxidable, de aceros inoxidables con recubierta interno y poliméricas, rellenas con una fase estacionaria. La longitud y el diámetro de la columna afectan la separación y por tanto, las dimensiones típicas de columna se incluyen la monografía individual.

c) Fase móvil:

La fase móvil es un disolvente o mezcla de disolventes, según se define en la monografía individual.

d) Aparato:

Un cromatógrafo de líquidos consta de un recipiente que contiene la fase móvil, una bomba para forzar el paso de la fase móvil a través del sistema a alta presión, un inyector para introducir la muestra en la fase móvil, una columna cromatográfica, un detector y un dispositivo de recolección de datos.

e) Elución en gradiente:

Se denomina elución en gradiente o programación del disolvente a la técnica de cambiar continuamente la composición del disolvente durante la cromatografía. El perfil de elución en gradiente se presenta en la monografía individual como una tabla de gradientes, que indica el tiempo y la composición proporcional de la fase móvil en el tiempo indicado.

2.6 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS Y QUÍMICA DEL ANALITO

2.6.1 ANTIHISTAMÍNICO

Los antihistamínicos son fármacos empleados en el tratamiento de las enfermedades alérgicas; están entre los medicamentos más prescritos a la población general, y muchos de ellos se pueden adquirir sin receta médica. Son un grupo de fármacos cuya acción farmacológica consiste en inhibir los efectos de la histamina. Ésta es una sustancia química presente en todos los tejidos corporales, que interviene en muchos procesos fisiológicos, desde las reacciones alérgicas a la secreción ácida del estómago; y a nivel del sistema nervioso central (SNC), determina en gran parte la sensación de hambre y los ritmos sueño-vigilia. Para ello, la histamina actúa a través de tres tipos distintos de receptores: H1, H2, y H3. Los antihistamínicos propiamente dichos son los inhibidores específicos de los receptores H1, y el término antihistamínico se reserva pues para estos fármacos; aunque también existen inhibidores de los receptores H2, que inhiben la secreción ácida del estómago y se usan en las úlceras, gastritis y enfermedades por reflujo.^(15,16)

2.6.2 LEVOCETIRIZINA

La Levocetirizina pertenece al grupo de los antihistamínicos de segunda generación. Se trata de un enantiómero (R) de la cetirizina y, al igual que ésta, es un antagonista competitivo potente y selectivo de los receptores histamínicos H₁. Por este mecanismo reduce o previene los efectos biológicos de la histamina. Inhibe la contracción del músculo liso de las vías respiratorias y del árbol vascular, bloquea el incremento de la permeabilidad capilar, la formación de edema y pápulas desencadenados por la histamina, y suprimen el prurito. No cruza, o lo hace en cantidades limitadas, la barrera hematoencefálica por lo que sus efectos sedantes o anticolinérgicos no se presentan.^(15,16)

a) Farmacocinética:

Levocetirizina tiene una buena absorción, con una concentración máxima a las 0,9 horas de su administración. Los alimentos no influyen en su absorción. Se une a proteínas plasmáticas en un 90%. Se metaboliza menos del 14% de la dosis. Se elimina predominantemente en forma inalterada por vía renal (85,4%). La vida media en plasma y en adultos es de $7,9 \pm 1,9$ horas (Benedetti y cols. Eur J Clin Pharmacol. 2001;57:571-82).

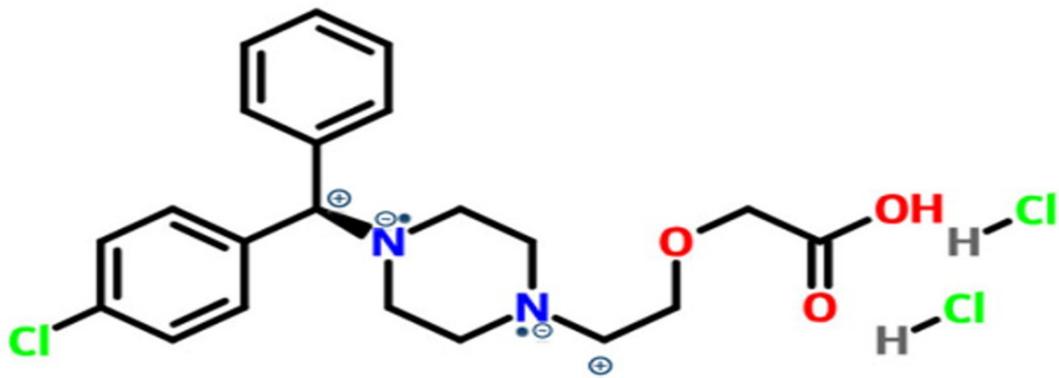
b) Farmacodinamia:

Levocetirizina es un antagonista de segunda generación de los receptores H1. Los antihistamínicos actúan como antagonistas competitivos de la histamina: se unen al receptor H1 sin activarlo e impiden así que la histamina se una y los active. Los antihistamínicos como grupo no inactivan químicamente a la histamina, ni la antagonizan desde el punto de vista fisiológico, ni previenen de ninguna forma su liberación (Gillard y cols. Mol Pharmacol. 2002;61:391-9).

c) Indicaciones:

La Levocetirizina está indicada en el tratamiento de: rinitis alérgica estacional (incluyendo los síntomas oculares); rinitis alérgica perenne y urticaria crónica idiopática.

d) Fórmula Estructural Química de la Levocetirizina:



III MATERIAL Y MÉTODO:

3.1 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

Equipos

- Balanza Analítica
- Cromatógrafo Líquido de Alta Precisión (HPLC)

Materiales

- Matraz volumétrico de 25mL
- Matraz volumétrico de 50mL
- Pipeta volumétrica de 5mL
- Membrana filtrante de 0,45µm PVDF.
- Columna Cromatográfica: Eclipse XDB-C18 250mm x 4.6mm (5µm) o similar.

Reactivos

- Acetonitrilo grado HPLC
- Ácido Ortofosfórico al 85%
- Ácido Sulfúrico
- Ácido Clorhídrico
- Peróxido de Hidrogeno
- Hidróxido de Sodio

Otros

- Estándar de Referencia: Levocetirizina Diclorhidrato.
- Placebo (Todos los componentes de LEVOCETIRIZINA 5mg/mL Solución, excluyendo el activo Levocetirizina Diclorhidrato). Las proporciones son las mismas que en la fórmula de elaboración del producto.)
- Producto Terminado LEVOCETIRIZINA 5mg/mL Solución

3.2. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

METODO EXPERIMENTAL CUANTITATIVO

3.2.1 CONDICIONES DE TRABAJO:

Condiciones normales de trabajo establecidas para Control de Calidad (Temperatura ≤ 25 °C y Humedad Relativa ≤ 70 %).

3.2.2 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO:

Proceder según la a la técnica analítica de LEVOCETIRIZINA 5mg/mL Solución N° T-PRN212.01 (15 de Octubre del 2013).

CONTENIDO:

LEVOCETIRIZINA DICLORHIDRATO

Método: Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC)

Sistema Cromatográfico:

Columna : Eclipse XDB-C18 250mm x 4.6mm (5 μ m) o similar.

Flujo : 1,5 mL/min

Longitud de Onda : 230nm

Volumen de Inyección : 10 μ L

Temperatura : 30°C

Tiempo de Corte : 10 minutos aproximadamente (*1,3 veces el tiempo de retención del pico de Levocetirizina Diclorhidrato*).

FASE MÓVIL: Acetonitrilo / Buffer (35:65)

Buffer: En un recipiente adecuado para 1L, adicionar exactamente 2,9 mL de Ácido Ortofosfórico al 85% y llevar a volumen de 1L con Agua. Homogenizar.

Medir en probetas separadas los volúmenes indicados y mezclar en un recipiente adecuado. Filtrar por filtro de membrana PDVF de 0,45µm de tamaño de poro o equivalente.

Diluyente: Acetonitrilo / Solución A / Agua (100:1:100)

Solución A: Ácido Sulfúrico 2N / Agua (2:33)

Ácido Sulfúrico 2N: En un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 50 mL de Agua y colocar en un Baño de Hielo durante 10 minutos. Agregar, lentamente por las paredes, 5,4 mL de Ácido Sulfúrico (concentrado) y agitar por rotación. Enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con Agua. Homogenizar.

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO

Preparación de la Solución Estándar de Referencia

(concentración final aproximada: Levocetirizina Diclorhidrato 0,1 mg/mL)

En un matraz volumétrico de 50 mL, pesar exactamente alrededor de 25 mg de Levocetirizina Diclorhidrato Estándar de Referencia, adicionar 35 mL de Diluyente y llevar al Baño de Ultrasonido, con agitación constante, hasta disolución total. Llevar a volumen con Diluyente y homogenizar.

Transferir volumétricamente 5mL de la solución anterior, a un matraz volumétrico de 25 mL y llevar a volumen con Diluyente. Homogenizar.

Preparación de la Solución Muestra

(concentración final aproximada: Levocetirizina Diclorhidrato 0,1 mg/mL)

En un matraz volumétrico de 50 mL, pesar exactamente alrededor de 5 mL de Solución (equivalente a 25 mg de Levocetirizina Diclorhidrato), adicionar 35 mL de Diluyente y agitar por rotación durante 30 segundos. Llevar a volumen con Diluyente y homogenizar.

Transferir volumétricamente 5 mL de la solución anterior, a un matraz volumétrico de 25 mL y llevar a volumen con Diluyente. Homogenizar.

Filtrar las soluciones de trabajo a través de membrana de filtro PVDF de 0,45µm de tamaño de poro o equivalente, descartando los primeros mililitros.

PROCEDIMIENTO

Proceder a inyectar la Solución Estándar de Referencia y registrar su Cromatograma: El Factor de Cola o Asimetría del pico de Levocetirizina Diclorhidrato es no mayor a 2; *La desviación estándar relativa para inyecciones sucesivas es no mayor a 2%.*

Proceder a inyectar la Solución Muestra y registrar su Cromatograma.

Cálculos:

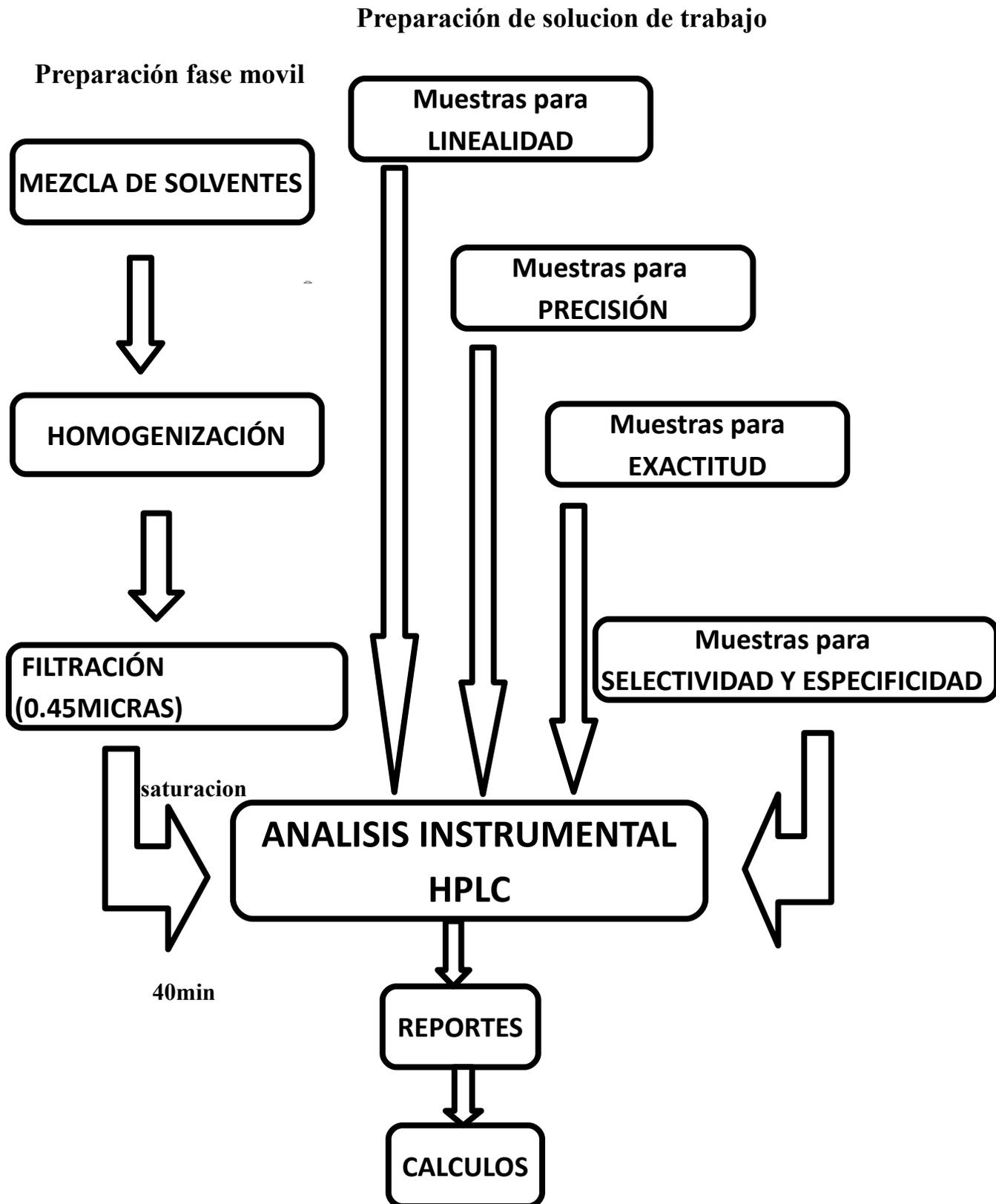
Levocetirizina mg/mL: $\frac{\text{Amp}}{\text{Ast}} \times \frac{\text{Pst}}{50} \times \frac{5}{25} \times \frac{\text{Pot}}{100} \times \frac{50}{\text{Pmp}} \times \frac{25}{\text{Pe}}$
clorhidrato

Donde:

- Amp : Área del pico de Levocetirizina Diclorhidrato en la Solución Muestra.
- Ast : Área del pico de Levocetirizina Diclorhidrato en la Solución Estándar de Referencia.
- Pst : Peso, en miligramos, de Levocetirizina Diclorhidrato Estándar de Referencia.
- Pot : Potencia tal cual, en porcentaje, de Levocetirizina Diclorhidrato Estándar de Referencia.
- Pmp : Peso, en gramos, de la Muestra.
- Pe : Peso específico de la Solución.

Esquema N°1

DIAGRAMA DEL FLUJO DEL PROCESO ANALITICO DE LEVOCETIRIZINA
DICLORHIDRATO 5mg/mL SOLUCIÓN ORAL GOTAS



3.3 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN A DESARROLLAR Y ESPECIFICACIONES:

Adecuabilidad, Especificidad, Exactitud, Precisión, Linealidad, Robustez y Rango.

3.3.1 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

Preparación de la Solución Estándar de Referencia

Preparar una solución estándar de referencia según el ítem 3.2.2

Inyectar 6 veces la solución de adecuabilidad y calcular el coeficiente de variación.

Especificación: $CV \leq$ del 2%

3.3.2 ESPECIFICIDAD

Es la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, como componentes de la matriz.

Preparar las siguientes muestras:

Muestra 1 (Fase Móvil)

Preparar la fase móvil según el ítem 3.2.2 Filtrar la solución a través de membrana de filtro PVDF de 0,45 μ m de tamaño de poro o equivalente, descartando los primeros mililitros. Realizar dos inyecciones.

Muestra 2 (Diluyente)

Preparar el Diluyente según el ítem 3.2.2 Filtrar la solución a través de membrana de filtro PVDF de 0,45 μ m de tamaño de poro o equivalente, descartando los primeros mililitros. Realizar dos inyecciones.

Muestra 3 (Placebo)

Preparar por duplicado, agregar con exactitud 5 mL de placebo en un matraz volumétrico de 50 mL, adicionar 35 mL de Diluyente y agitar por rotación durante 30 segundos. Llevar a volumen con Diluyente y homogenizar.

Transferir volumétricamente 5 mL de la solución anterior, a un matraz volumétrico de 25 mL y llevara volumen con Diluyente. Homogenizar.

Muestra 4 (Estándar de Referencia: LEVOCETIRIZINA DICLORHIDRATO)

Preparar por duplicado, solución estándar de referencia según el ítem 3.2.2

Muestra 5 (Muestra Problema)

Preparar por duplicado, solución muestra según el ítem 3.2.2

Procedimiento:

Seguir procedimiento detallado en 3.2.2

Especificación: En las muestras 1, 2 y 3 el porcentaje de interferencia no debe ser mayor del 2%. En la muestra 5 el porcentaje de recuperación no debe variar en más del 2% de lo teórico, además la resolución del pico principal con cualquier otro pico no debe ser menor a 1.

PRUEBAS DE DEGRADACIÓN DE PLACEBO:

Muestra 6 (Degradación Térmica del placebo)

Preparar por duplicado, en un matraz volumétrico de 50 mL, pesar exactamente 5 mL de Placebo, agregar 35 mL de Diluyente y agitar por rotación durante 30 segundos. Llevar a un Baño María a 70°C durante 60 minutos, enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con Diluyente. Homogenizar.

Transferir volumétricamente 5mL de la solución anterior, a un matraz volumétrico de 25 mL y llevara volumen con Diluyente. Homogenizar.

Muestra 7 (Degradación Ácida del placebo)

Preparar por duplicado, en un matraz volumétrico de 50 mL, pesar exactamente 5 mL de Placebo agregar 1 mL de Ácido Clorhídrico 2N, agitar por rotación y dejar reposar por 5 minutos. Luego, neutralizar la solución agregando 1 mL de Hidróxido de Sodio 2N, agregar 35 mL de Diluyente y agitar por rotación durante 30 segundos. Llevar a volumen con Diluyente y homogenizar.

Transferir volumétricamente 5 mL de la solución anterior, a un matraz volumétrico de 25 mL y llevara volumen con Diluyente. Homogenizar.

Muestra 8 (Degradación Alcalina del placebo)

Preparar por duplicado, en un matraz volumétrico de 50 mL, pesar exactamente 5 mL de Placebo, agregar 1 mL de Hidróxido de Sodio 2N, agitar por rotación y dejar reposar por 5 minutos. Luego, neutralizar la solución agregando 1 mL de Ácido Clorhídrico 2N, agregar 35 mL de Diluyente y agitar por rotación durante 30 segundos. Llevar a volumen con Diluyente y homogenizar.

Transferir volumétricamente 5 mL de la solución anterior, a un matraz volumétrico de 25 mL y llevara volumen con Diluyente. Homogenizar.

Muestra 9 (Degradación Oxidativa del placebo)

Preparar por duplicado, en un matraz volumétrico de 50mL, pesar exactamente 5 mL de Placebo, agregar 1 mL de Peróxido de Hidrógeno, agitar por rotación y dejar reposar por 5 minutos. Luego, agregar 35 mL de Diluyente y agitar por rotación durante 30 segundos. Llevar a volumen con Diluyente y homogenizar.

Transferir volumétricamente 5 mL de la solución anterior, a un matraz volumétrico de 25 mL y llevara volumen con Diluyente. Homogenizar.

Muestra 10 (Degradación por Luz UV 254 nm del placebo)

Preparar por duplicado, en un matraz volumétrico de 50 mL, pesar exactamente 5 mL de Placebo, agregar 35 mL de Diluyente y agitar por rotación durante 30 segundos. Exponer a la luz UV a 254 nm durante 3 horas. Luego, llevar a volumen con Diluyente y homogenizar.

Transferir volumétricamente 5 mL de la solución anterior, a un matraz volumétrico de 25 mL y llevar a volumen con Diluyente. Homogenizar.

Filtrar las soluciones de trabajo a través de membrana de filtro PVDF de 0,45µm de tamaño de poro o equivalente, descartando los primeros mililitros.

Procedimiento:

Seguir procedimiento detallado en 3.2.2

Especificación: En las muestras 6, 7, 8, 9 y 10 el porcentaje de interferencia no debe ser mayor del 2%.

DEGRADACIÓN DE MUESTRA PROBLEMA de LEVOCETIRIZINA 5mg/mL

Solución:

Muestra 11 (Degradación Térmica de LEVOCETIRIZINA 5mg/mL Solución)

Preparar por duplicado, en un matraz volumétrico de 50 mL, pesar exactamente 5 mL de Muestra (equivalente a 25 mg de Levocetirizina Diclorhidrato), agregar 35 mL de Diluyente y agitar por rotación durante 30 segundos. Llevar a un Baño María a 70°C durante 60 minutos, enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con Diluyente. Homogenizar.

Transferir volumétricamente 5 mL de la solución anterior, a un matraz volumétrico de 25 mL y llevara volumen con Diluyente. Homogenizar.

Muestra 12 (Degradación Ácida de LEVOCETIRIZINA 5mg/mL Solución)

Preparar por duplicado, en un matraz volumétrico de 50 mL, pesar exactamente 5 mL de Muestra (equivalente a 25 mg de Levocetirizina Diclorhidrato), agregar 1 mL de Ácido Clorhídrico 2N, agitar por rotación y dejar reposar por 5 minutos. Luego, neutralizar la solución agregando 1mL de Hidróxido de Sodio 2N, agregar 35 mL de Diluyente y agitar por rotación durante 30 segundos. Llevar a volumen con Diluyente y homogenizar.

Transferir volumétricamente 5 mL de la solución anterior, a un matraz volumétrico de 25 mL y llevara volumen con Diluyente. Homogenizar.

Muestra 13 (Degradación Alcalina de LEVOCETIRIZINA 5mg/mL Solución)

Preparar por duplicado, en un matraz volumétrico de 50 mL, pesar exactamente 5 mL de Muestra (equivalente a 25 mg de Levocetirizina Diclorhidrato), agregar 1 mL de Hidróxido de Sodio 2N, agitar por rotación y dejar reposar por 5 minutos. Luego, neutralizar la solución agregando 1mL de Ácido Clorhídrico 2N, agregar 35 mL de

Diluyente y agitar por rotación durante 30 segundos. Llevar a volumen con Diluyente y homogenizar.

Transferir volumétricamente 5 mL de la solución anterior, a un matraz volumétrico de 25 mL y llevara volumen con Diluyente. Homogenizar.

Muestra 14 (Degradación Oxidativa de LEVOCETIRIZINA 5mg/mL Solución)

Preparar por duplicado, en un matraz volumétrico de 50 mL, pesar exactamente 5 mL de Muestra (equivalente a 25 mg de Levocetirizina Diclorhidrato), agregar 1 mL de Peróxido de Hidrógeno, agitar por rotación y dejar reposar por 5 minutos. Luego, agregar 35 mL de Diluyente y agitar por rotación durante 30 segundos. Llevar a volumen con Diluyente y homogenizar.

Transferir volumétricamente 5 mL de la solución anterior, a un matraz volumétrico de 25 mL y llevara volumen con Diluyente. Homogenizar.

Muestra 15 (Degradación por Luz UV 254 nm de LEVOCETIRIZINA 5mg/mL Solución)

Preparar por duplicado, en un matraz volumétrico de 50 mL, pesar exactamente 5 mL de Muestra (equivalente a 25 mg de Levocetirizina Diclorhidrato), agregar 35 mL de Diluyente y agitar por rotación durante 30 segundos. Exponer a la luz UV a 254 nm durante 3 horas. Luego, llevar a volumen con Diluyente y homogenizar.

Transferir volumétricamente 5 mL de la solución anterior, a un matraz volumétrico de 25 mL y llevara volumen con Diluyente. Homogenizar.

Filtrar las soluciones de trabajo a través de membrana de filtro PVDF de 0,45µm de tamaño de poro o equivalente, descartando los primeros mililitros.

Procedimiento:

Seguir procedimiento detallado en 3.2.2

Especificación: En las muestras 11, 12, 13, 14 y 15 el porcentaje de recuperación obtenido no debe exceder el 2% de lo teórico. Además la resolución del pico principal con cualquier otro pico no debe ser menor a 1.

3.3.3 EXACTITUD

La exactitud de un método analítico, es la proximidad entre los resultados obtenidos y el valor verdadero.

Preparar por triplicado las muestras correspondientes a 3 concentraciones (80%, 100% y 120%) de Placebo enriquecido con principio activo.

Preparación de las Muestras:

Preparar por triplicado cada concentración, en un matraz volumétrico de 50 mL, pesar exactamente lo indicado en la Tabla N° 02 de Levocetirizina Diclorhidrato Estándar de Referencia, agregar 35 mL de Diluyente y 5 mL de Placebo. Agitar por rotación durante 30 segundos y llevar a volumen con Diluyente. Homogenizar.

Transferir volumétricamente 5 mL de la solución anterior, a un matraz volumétrico de 25 mL y llevar a volumen con Diluyente. Homogenizar.

Tabla N° 02

Concentración*	Equivalente a mg/mL	Estándar de Levocetirizina Diclorhidrato (mg)
80 %	4,0 mg/mL	20,00
100 %	5,0 mg/mL	25,00
120 %	6,0 mg/mL	30,00

** Las concentraciones se establecen para abarcar el rango de trabajo de este producto: de 90,0% a 110,0% (4,5mg/mL a 5,5mg/mL).*

Procedimiento:

Seguir procedimiento detallado en 3.2.2

Especificación:

- El Porcentaje de Recuperación debe estar entre 98,0 - 102,0%.
- Calcular el Porcentaje de Recuperación por Nivel de Concentración.
- Graficar la cantidad agregada vs cantidad recuperada.
- Calcular el Coeficiente de Variación: (Especificación: $CV < 2\%$).
- Realizar el Test de igualdad de Varianza (Test de Cochran): $G_{exp} < G_{tabla}$ (indica que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados).
- Realizar el Test de Student: $T_{exp} < T_{tabla}$ (indica que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100%).

3.3.4 PRECISIÓN

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea.

3.3.4.1 PRECISIÓN DEL SISTEMA

Preparación de la Solución Estándar de Referencia

Preparar una solución estándar de referencia según el ítem 3.2.2

Inyectar 6 veces y calcular el coeficiente de variación.

Especificación: $CV < \text{del } 2\%$

3.3.4.2 REPETIBILIDAD

Un **primer analista** debe realizar el análisis de contenido de Levocetirizina Diclorhidrato del lote de Levocetirizina 5 mg/mL solución.

Preparar 6 muestras, según el procedimiento analítico (ítem 3.2.2).

Especificación: $CV \leq \text{del } 2\%$

3.3.4.3 PRECISIÓN INTERMEDIA

Otro día, un **segundo analista** debe realizar el análisis de contenido de Levocetirizina Diclorhidrato del mismo lote de la repetibilidad.

Preparar 6 muestras, según el procedimiento analítico (ítem 3.2.2).

Comparar los análisis entre ambos analistas y calcular el coeficiente de variación.

Especificación: CV \leq del 2%

3.3.5 LINEALIDAD

3.3.5.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Preparar por triplicado las muestras correspondientes a 5 concentraciones (80%, 90%, 100%, 110% y 120%) de Levocetirizina Diclorhidrato Estándar de Referencia.

Preparación de la Solución Estándar de Referencia

Preparar por triplicado cada concentración, en un matraz volumétrico de 50 mL, pesar exactamente lo indicado en la Tabla N° 03 de Levocetirizina Diclorhidrato Estándar de Referencia, agregar 35 mL de Diluyente y llevar a un Baño de Ultrasonido, con agitación constante, hasta disolución total. Llevar a volumen con Diluyente y homogenizar.

Transferir volumétricamente 5 mL de la solución anterior, a un matraz volumétrico de 25 mL y llevar a volumen con Diluyente. Homogenizar

Tabla N° 03

Concentración*	Equivalente a mg/mL	Estándar de Levocetirizina Diclorhidrato (mg)
80 %	4,0 mg/mL	20,00
90 %	4,5 mg/mL	22,50
100 %	5,0 mg/mL	25,00
110 %	5,5 mg/mL	27,50
120 %	6,0 mg/mL	30,00

** Las concentraciones se establecen para abarcar el rango de trabajo de este producto: de 90,0% a 110,0% (4,50 mg/mL a 5,50 mg/mL).*

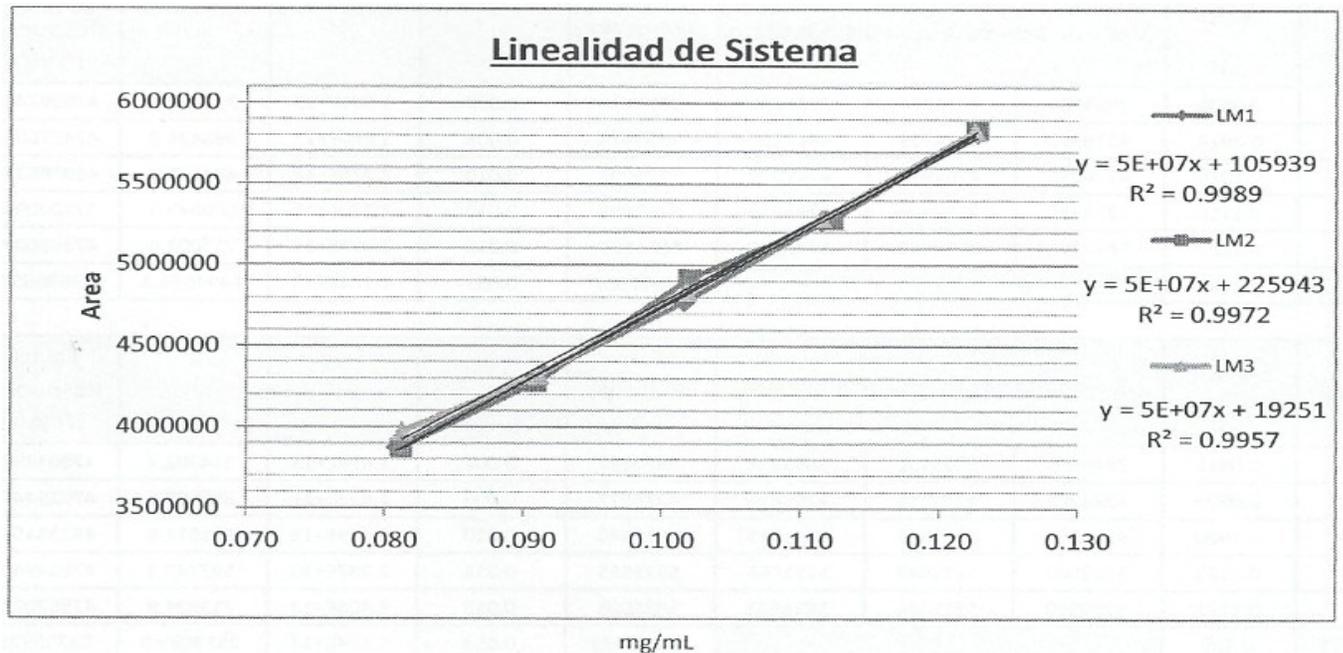
Procedimiento:

Seguir procedimiento detallado en 3.2.2

Especificación:

- Curva de calibración: Si existen diferencias apreciables entre los valores experimentales y los puntos de la recta, significa que la linealidad no es conforme.
- Recta de regresión: $y = bx + a$
- Coeficiente de correlación: $r > 0,995$
- Coeficiente de determinación : $r^2 > 0,990$
- Análisis de la varianza (test de Cochran): $G_{exp} < G_{tabla}$
- Test de Linealidad: El coeficiente de variación de los factores de respuesta (f) < 5%.

Esquema N°2: Representa la curva de calibración de la linealidad del sistema



3.3.5.2 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Preparar por triplicado las muestras correspondientes a 5 concentraciones (80%, 90%, 100%, 110% y 120%) de Placebo enriquecido con principio activo.

Preparación de las Muestras:

Preparar por triplicado cada concentración, en un matraz volumétrico de 50 mL, pesar exactamente lo indicado en la Tabla N° 04 de Levocetirizina Diclorhidrato Estándar de Referencia, agregar 35 mL de Diluyente y 5mL de Placebo. Agitar por rotación durante 30 segundos y llevar a volumen con Diluyente. Homogenizar.

Transferir volumétricamente 5 mL de la solución anterior, a un matraz volumétrico de 25 mL y llevar a volumen con Diluyente. Homogenizar.

Tabla N° 04

Concentración*	Equivalente a mg/mL	Estándar de Levocetirizina Diclorhidrato (mg)
80 %	4,0 mg/mL	20,00
90 %	4,5 mg/mL	22,50
100 %	5,0 mg/mL	25,00
110 %	5,5 mg/mL	27,50
120 %	6,0 mg/mL	30,0

- *Las concentraciones se establecen para abarcar el rango de trabajo de este producto: de 90,0% a 110,0% (4,5mg/mL a 5,5mg/mL).*

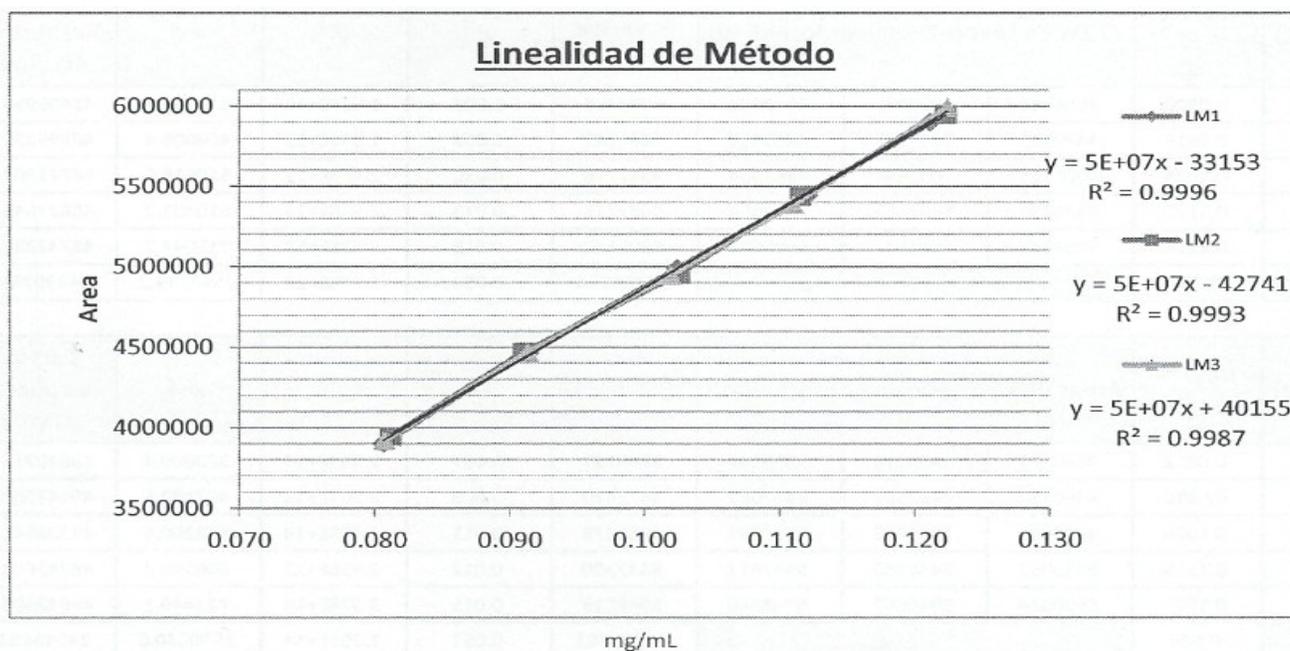
Procedimiento:

Seguir procedimiento detallado en 3.2.2

Especificación:

- Curva de calibración: Si existen diferencias apreciables entre los valores experimentales y los puntos de la recta, significa que la linealidad no es conforme.
- Recta de regresión: $y = bx + a$
- Coeficiente de correlación: $r > 0,995$
- Coeficiente de determinación : $r^2 > 0,990$
- Análisis de la varianza (test de Cochran): $G_{exp} < G_{tabla}$
- Test de Linealidad: El coeficiente de variación de los factores de respuesta (f) < 5%.

Esquema N°3: Representa la curva de calibración de la linealidad del metodo



3.3.6 ROBUSTEZ

La robustez de un método analítico, es la medida de la resistencia al cambio cuando se introducen pequeñas pero deliberadas variaciones en el procedimiento.

3.3.6.1. MUESTRA PROBLEMA CON 24 HORAS DE PREPARADA.

Realizar las lecturas de las 6 muestras de la repetibilidad por duplicado. Seguir procedimiento detallado en 3.2.2

Especificación: $CV \leq 3 \%$.

3.3.7 RANGO

El rango se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito.

Se toma como punto de partida las concentraciones establecidas en el presente protocolo donde queda demostrado su correcta precisión, exactitud y linealidad

IV RESULTADOS

PRODUCTO: LEVOCETIRIZINA DICLORHIDRATO 5mg/mL SOLUCIÓN GOTAS

LOTE: 10390425P

LÍNEA: CIFARMA

METODO DE ANALISIS: CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION

Tabla N° 05 : CATEGORIA: I

PARÁMETRO DE VALIDACION	ESPECIFICACION	RESULTADOS
ADECUABILIDAD	<ul style="list-style-type: none">• Área CV \leq a 2 %• Tiempo de retención \leq a 2 %• Platos teóricos. Informativo• Asimetría: Informativo	0,53 % 0,07 % Máx. (3231) Mín. (3169) Máx. (1,77) Mín. (1,71)
ESPECIFICIDAD	<ul style="list-style-type: none">• Interferencia no mayor a 2%	0,00 %
Fase móvil	<ul style="list-style-type: none">• Interferencia no mayor a 2%	0,00 %
Diluyente	<ul style="list-style-type: none">• Interferencia no mayor a 2%	0,00%
Placebo	<ul style="list-style-type: none">• Resolución de Levocetirizina diclorhidrato y cualquier otro pico no debe ser menor a 1	5,4
Muestra Problema		
DEGRADACION DEL PLACEBO		
Degradación térmica.	<ul style="list-style-type: none">• Interferencia no mayor a 2%	0,00 %
Degradación ácida.	<ul style="list-style-type: none">• Interferencia no mayor a 2%	0,00 %
Degradación alcalina.	<ul style="list-style-type: none">• Interferencia no mayor a 2%	0,00 %
Degradación oxidativa.	<ul style="list-style-type: none">• Interferencia no mayor a 2%	0,00 %
Degradación Luz UV 254nm.	<ul style="list-style-type: none">• Interferencia no mayor a 2%	0,00 %

<p>DEGRADACION DE LA MUESTRA PROBLEMA</p> <p>Degradación térmica.</p> <p>Degradación ácida.</p> <p>Degradación alcalina.</p> <p>Degradación oxidativa.</p> <p>Degradación Luz UV 254nm.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Resolución no menor a 1, porcentaje no debe exceder del 2%. • Resolución no menor a 1, porcentaje no debe exceder del 2%. • Resolución no menor a 1, porcentaje no debe exceder del 2%. • Resolución no menor a 1, porcentaje no debe exceder del 2%. • Resolución no menor a 1, porcentaje no debe exceder del 2%. 	<p>5,4 y No excede</p>
<p>EXACTITUD</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Porcentaje recuperado: De 98 a 102% de lo Declarado • CV no > a 2% • Test de G de Cochran exp < G tablas • Test de T de student exp < T tablas 	<p>100,4 %</p> <p>0,83 %</p> <p>G exp (0,655) < G tabla (0,870)</p> <p>T exp (1,144) < T tabla (2,3060)</p>
<p>PRECISIÓN</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Sistema: CV ≤ 2% • Método: <ul style="list-style-type: none"> - Repetibilidad: RSD no > a 2% - Intervalo de Confianza - Precisión intermedia: CV entre 2 analistas no > a 2% 	<p>0,53 %</p> <p>0,19 %</p> <p>5,12 – 5,14 mg/mL</p> <p>0,47 %</p>

LINEALIDAD		L. Sistema	L. Método
	Curva de Calibración	Conforme	Conforme
	• $y = bx + a$	$y = 46375747x + 116410,7$	$y = 48812727x - 11837,1$
	• “r”: Mínimo 0,995	0,998	1,000
	• “r ² ”: Mínimo 0,990	0,996	0,999
	• Análisis de la Varianza		
	• Test de G de Cochran exp < G tablas	G exp (0,4559) < G tabla (0,6830)	G exp (0,3764) < G tabla (0,683)
	• Test de linealidad		
	C.V. F. Respuesta < 5%	0,5 %	1,0 %
	T exp > T tablas Limite de Confianza del Intercepto no debe incluir al cero.	t exp (123,025) > t tabla (2,160) $47955704 < b < 49669751$	T exp (60,590) > T tabla (2,160) $44722474 < b < 48029021$
• Test de proporcionalidad			
Limite de Confianza del Intercepto debe incluir al cero. T exp < T tablas	$-99765,9 < a < 76091,8$ T exp (0,2908) < T tabla (2,1600)	$-53431,6 < a < 286253,0$ T exp (1,4805) < T tabla (2,1600)	

ROBUSTEZ		
Estabilidad a las 24 Horas	• Robustez $CV \leq 3\%$	1.88 %
RANGO	• Cumplimiento de Linealidad, exactitud y Precisión	80,0 % - 120,0 %

4.1 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

TABLA N° 6: RESULTADOS PARA LEVOCETIRIZINA DICLORHIDRATO

ST	Factor st	Area	Factor /Area	Tiempo de Retención	Platos Teóricos	Asimetría
ST ₁ -1	0.102818	4841372	0.00000002	5.56	3231	1.730
ST ₁ -2	0.102818	4829532	0.00000002	5.55	3203	1.770
ST ₁ -3	0.102818	4838184	0.00000002	5.55	3205	1.710
ST ₁ -4	0.102818	4835389	0.00000002	5.55	3171	1.760
ST ₁ -5	0.102818	4825618	0.00000002	5.55	3176	1.740
ST ₁ -6	0.102818	4773824	0.00000002	5.55	3169	1.720
Promedio			0.00000002	5.55	3193	1.738
Desvest			0.00000000	0.00	24.64	0.02
CV (%)			0.53 %	0.07 %	---	---
Máximo			---	5.56	3231	1.770
Mínimo			---	5.55	3169	1.710

$$C.V. = \frac{\text{Desvest} * 100}{\text{Promedio}}$$

4.2 ESPECIFICIDAD

TABLA N° 7: RESULTADOS PARA LEVOCETIRIZINA DICLORHIDRATO

ST	Factor st	RT	Area	F St / Area
ST ₁ -1	0.101808	5.45min	4873720	0.00000002
ST ₁ -2	0.101808	5.45min	4897196	0.00000002
ST ₁ -3	0.101808	5.45min	4863104	0.00000002
ST ₁ -4	0.101808	5.45min	4892602	0.00000002
ST ₁ -5	0.101808	5.45min	4877212	0.00000002
ST ₂ -1	0.101970	5.45min	4923554	0.00000002
ST ₂ -2	0.101970	5.45min	4918673	0.00000002
Promedio				0.00000002
RSD %				0.40%

$$F_{mp} = \frac{\text{Factor dil mp}}{W_{mp}(\text{mg})}$$

$$F_{st} = \frac{\text{Peso st} * \text{Factor dil st} * \text{Pot} * \text{Factor S/B}}{100}$$

TABLA N° 8: RESULTADOS PARA PLACEBO, FASE MÓVIL, DILUYENTE

[Concentración] = Area prom * F MP * F st * Peso prom ó PE

Muestra	Peso (mg/g)	Factor MP	RT	Areas		Promedio	mg/mL	%	Resolucion
Fase Movil		50.000000		0	0	0	0.00	0.0 %	0.0 min
Diluyente		50.000000		0	0	0	0.00	0.0 %	0.0 min
Placebo m1	5.59861	44.653941		0	0	0	0.00	0.0 %	0.0 min
Placebo m2	5.62761	44.423832		0	0	0	0.00	0.0 %	0.0 min
MP m1									
MP m2									

Muestra	Resultados	Observaciones
Fase Movil	CONFORME	-
Diluyente	CONFORME	-
Placebo m1	CONFORME	No hay interferencia
Placebo m2	CONFORME	No hay interferencia
MP m1		
MP m2		

TABLA N° 9: RESULTADOS PARA MUESTRA PROBLEMA

[Concentración] = Area prom * F MP * F st * Peso prom ó PE

Muestra	Peso (mg/g)	Factor MP	RT	Areas		Promedio	mg/mL	%	Resolucion
Fase Movil									
Diluyente									
Placebo m1									
Placebo m2									
MP m1	5.64245	44.306994	5.46min	5023414	5025496	5024455	5.21	104.1911 %	5.41
MP m2	5.66743	44.111705	5.45min	5013875	5033628	5023752	5.19	103.7174 %	5.43

Muestra	Resultados	Observaciones
Fase Movil		-
Diluyente		-
Placebo m1		-
Placebo m2		-
MP m1	CONFORME	-
MP m2	CONFORME	-

TABLA N° 10: RESULTADOS PARA DEGRADACIÓN DEL PLACEBO

Muestra	Peso (mg/g)	Factor MP	RT	Areas		Promedio	mg/mL	%	Resolucion
Deg Térmica m1	5.53394	45.175770	-	0	0	0	0.00	0.0000 %	-
Deg Térmica m2	5.57024	44.881370	-	0	0	0	0.00	0.0000 %	-
Deg Ácida m1	5.57149	44.871300	-	0	0	0	0.00	0.0000 %	-
Deg Ácida m2	5.60353	44.614734	-	0	0	0	0.00	0.0000 %	-
Deg Alcalina m1	5.58664	44.749617	-	0	0	0	0.00	0.0000 %	-
Deg Alcalina m2	5.62563	44.439467	-	0	0	0	0.00	0.0000 %	-
Deg Oxidativa m1	5.49295	45.512885	-	0	0	0	0.00	0.0000 %	-
Deg Oxidativa m2	5.52497	45.249114	-	0	0	0	0.00	0.0000 %	-
Deg UV m1	5.55387	45.013657	-	0	0	0	0.00	0.0000 %	-
Deg UV m2	5.59195	44.707124	-	0	0	0	0.00	0.0000 %	-

Muestra	Resultados	Observaciones
Deg Térmica m1	CONFORME	-
Deg Térmica m2	CONFORME	-
Deg Ácida m1	CONFORME	-
Deg Ácida m2	CONFORME	-
Deg Alcalina m1	CONFORME	-
Deg Alcalina m2	CONFORME	-
Deg Oxidativa m1	CONFORME	-
Deg Oxidativa m2	CONFORME	-
Deg UV m1	CONFORME	-
Deg UV m2	CONFORME	-

**TABLA N° 11: RESULTADOS PARA DEGRADACIÓN DE LA
MUESTRA PROBLEMA**

Muestra	Peso (mg/g)	Factor MP	RT	Areas		Promedio	mg/mL	%	Resolucion
Deg Térmica m1	5.56550	44.919594	5.45min	4981025	4971360	4976193	5.23	104.62 %	5.43
Deg Térmica m2	5.59019	44.721199	5.45min	4963789	4951875	4957832	5.19	103.77 %	5.44
Deg Ácida m1	5.58755	44.742329	5.45min	5014484	5030320	5022402	5.26	105.17 %	5.41
Deg Ácida m2	5.61330	44.537082	5.45min	5024042	5030727	5027385	5.24	104.79 %	5.44
Deg Alcalina m1	5.55599	44.996481	5.45min	5002390	4900014	4951202	5.21	104.27 %	5.43
Deg Alcalina m2	5.57623	44.833158	5.45min	4997636	4997308	4997472	5.24	104.86 %	5.43
Deg Oxidativa m1	5.55499	45.004581	5.47min	4826941	4833149	4830045	5.09	101.74 %	5.46
Deg Oxidativa m2	5.58444	44.767246	5.45min	4939203	4952601	4945902	5.18	103.63 %	4.43
Deg UV m1	5.58129	44.792512	5.45min	4997790	4990098	4993944	5.23	104.69 %	5.43
Deg UV m2	5.60627	44.592929	5.45min	4854261	4990806	4922534	5.14	102.74 %	5.47

Muestra	Resultados	Observaciones
Deg Térmica m1	CONFORME	-
Deg Térmica m2	CONFORME	-
Deg Ácida m1	CONFORME	-
Deg Ácida m2	CONFORME	-
Deg Alcalina m1	CONFORME	-
Deg Alcalina m2	CONFORME	-
Deg Oxidativa m1	CONFORME	-
Deg Oxidativa m2	CONFORME	-
Deg UV m1	CONFORME	-
Deg UV m2	CONFORME	-

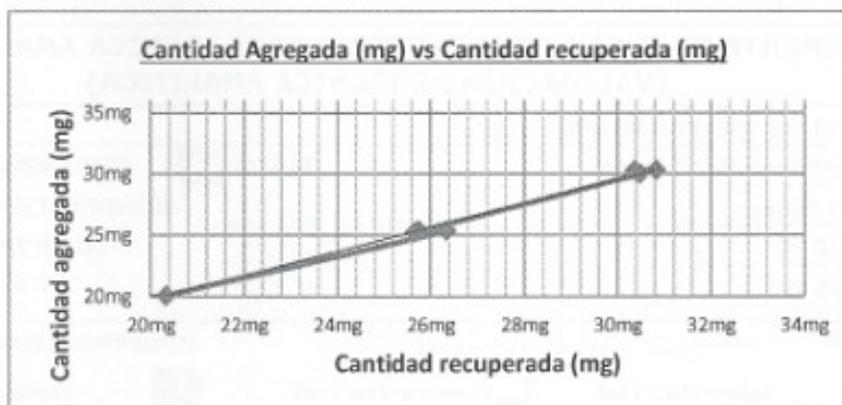
4.3 EXACTITUD

TABLA N° 12: RESULTADOS PARA LEVOCETIRIZINA DICLORHIDRATO

ST	Factor st	Area	F St / Area	Muestra	St (mg)	Areas			%	%	
ST ₁ -1	0.101525	4908653	0.00000002	80%	19.96mg	3906753	3901410	3810817	98.99 %	99.7 %	
ST ₁ -2	0.101525	4915456	0.00000002	80%	20.10mg	3949814	3934256	3948162	100.10 %		
ST ₁ -3	0.101525	4896147	0.00000002	80%	19.98mg	3902587	3924224	3929090	100.05 %		
ST ₁ -4	0.101525	4928975	0.00000002	100%	25.34mg	5120742	5101245	5116702	102.93 %	101.3 %	
ST ₁ -5	0.101525	4937386	0.00000002	100%	25.39mg	4993249	4996304	4998201	100.38 %		
ST ₂ -1	0.101606	4955247	0.00000002	100%	25.23mg	4963187	4982557	4994953	100.70 %	100.2 %	
ST ₂ -2	0.101606	4949379	0.00000002	120%	29.98mg	5914475	5920450	5913644	100.67 %		
	Promedio	0.00000002		120%	30.27mg	5839365	5866299	5973669	99.32 %		
	RSD %	0.41%		120%	30.30mg	5984939	5977817	5980356	100.70 %		
									Promedio	100.4 %	100.4 %
									S	1.12 %	0.83 %
									RSD	1.12 %	0.83 %

TABLA N° 13: RESULTADOS PARA TEST DE STUDENT

Agregada	Recupero
19.96 mg	19.96 mg
20.10 mg	20.32 mg
19.98 mg	20.19 mg
25.34 mg	26.34 mg
25.39 mg	25.74 mg
25.23 mg	25.66 mg
29.98 mg	30.48 mg
30.27 mg	30.36 mg
30.30 mg	30.82 mg



Conclusión : El recupero es lineal en cuanto a la concentración, es semejante al 100%

TEST DE STUDENT

Especificación: t tabla mayor al t experimental

$$t_{exp} = \frac{|100 - x| \cdot \sqrt{n}}{C. V.}$$

t tabla: 2.306
t experimental: 1.14442145

1.144 < 2.306 CONFORME

TABLA N° 14: RESULTADOS PARA TEST DE COCHRAN

Especificación: G tabla mayor al G experimental

Muestra	St (mg)	Area prom	F rpta	S ²
80%	19.96mg	3872993	194037.74	1525279.05
80%	20.10mg	3944077	196222.75	
80%	19.98mg	3918634	196127.81	
100%	25.34mg	5112896	201771.76	7434867.95
100%	25.39mg	4995918	196767.15	
100%	25.23mg	4980232	197393.28	
120%	29.98mg	5916190	197337.88	2396808.03
120%	30.27mg	5893111	194684.87	
120%	30.30mg	5981037	197393.97	
Promedio			196859.69	
s			2195.75	
C.V.			1.12%	

$$G_{exp} = \frac{S_{max}^2}{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2}$$

G tabla: 0.8709
G experimental: 0.6547

0.6547 < 0.8709 CONFORME

4.4 PRECISION

TABLA N° 15 : RESULTADOS PARA LEVOCETIRIZINA DICLORHIDRATO

ST	Factor st	Area	Factor /Area
ST ₁ -1	0.102818	4841372	0.00000002
ST ₁ -2	0.102818	4829532	0.00000002
ST ₁ -3	0.102818	4838184	0.00000002
ST ₁ -4	0.102818	4835389	0.00000002
ST ₁ -5	0.102818	4825618	0.00000002
ST ₁ -6	0.102818	4773824	0.00000002
Promedio			0.00000002
Desvest			0.00000000
CV (%)			0.53 %
Máximo			—
Mínimo			—

$$C.V. = \frac{\text{Desvest} * 100}{\text{Promedio}}$$

TABLA N° 16: RESULTADOS PARA RETETIBILIDAD

ST	Factor st	Area	F St / Area	Muestra	Factor MP	Areas		Promedio	mg/mL	%
ST ₁ -1	0.102818	4841372	0.00000002	5.56402g	50.5030535	4771343	4799235	4785289	5.14	102.87 %
ST ₁ -2	0.102818	4829532	0.00000002	5.59089g	50.2603342	4795423	4792415	4793919	5.13	102.56 %
ST ₁ -3	0.102818	4838184	0.00000002	5.53074g	50.8069445	4729722	4740086	4734904	5.12	102.39 %
ST ₁ -4	0.102818	4835389	0.00000002	5.54382g	50.6870714	4749687	4763951	4756819	5.13	102.63 %
ST ₁ -5	0.102818	4825618	0.00000002	5.57441g	50.4089222	4806392	4787706	4797049	5.15	102.93 %
ST ₂ -1	0.101525	4779854	0.00000002	5.50948g	51.0029985	4770967	4688965	4729966	5.13	102.68 %
ST ₂ -2	0.101525	4747285	0.00000002	[Concentración] = Area prom * Fst * Fmp				Promedio	5.13	102.7 %
	Promedio	0.00000002	S					0.01	0.20 %	
	RSD %	0.25%	RSD					0.19%	0.19%	

Intervalo de Confianza:

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

X= 5.1338 (promedio)
 t_{tabla}= 2.571 (para n-1 grado de libertad y α =0.05)
 s= 0.0099 (desviación estandar)
 n= 6 (numero de muestra)

Intervalo de Confianza: 5.1234 mg/mL - 5.1441 mg/mL

TABLA N° 17: RESULTADOS PARA PRECISIÓN INTERMEDIA

ST	Factor st	Area	F St / Area	Muestra	Factor MP	Areas		Promedio	mg/mL	%
ST ₁ -1	0.103020	5753948	0.00000002	5.56269g	50.5151285	5656278	5672584	5664431	5.12	102.38 %
ST ₁ -2	0.103020	5738144	0.00000002	5.55062g	50.6249752	5713226	5681486	5697356	5.16	103.19 %
ST ₁ -3	0.103020	5778806	0.00000002	5.55026g	50.6282589	5696735	5710521	5703628	5.17	103.31 %
ST ₁ -4	0.103020	5754443	0.00000002	5.55643g	50.5720400	5764024	5734326	5749175	5.20	104.02 %
ST ₁ -5	0.103020	5757653	0.00000002	5.55697g	50.5671256	5682351	5671513	5676932	5.14	102.71 %
ST ₂ -1	0.102050	5711328	0.00000002	5.55093g	50.6221480	5762908	5778126	5770517	5.23	104.51 %
ST ₂ -2	0.102050	5709204	0.00000002	[Concentración] = Area prom * Fst * F mp				Promedio	5.17	103.4 %
	Promedio	0.00000002	S					0.04 %	0.80 %	
	RSD %	0.22%	RSD					0.77%	0.77%	

Intervalo de Confianza:

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

X= 5.1677 (promedio)
 t_{tabla}= 2.571 (para n-1 grado de libertad y α =0.05)
 s= 0.0400 (desviación estandar)
 n= 6 (numero de muestra)

1er Analista	5.13	mg/mL
2do Analista	5.17	mg/mL
Promedio	5.15	mg/mL
RSD	0.47%	

Intervalo de Confianza: 5.1258 mg/mL - 5.2097 mg/mL

4.5 LINEALIDAD

TABLA N° 18: RESULTADOS PARA LINEALIDAD DEL SISTEMA

LM1	Peso (mg)	mg/mL xi	Areas de Levocetirizina diclorhidrato			Area promedio yi	xi ²	yi ²	xiyi	Factor Respuesta (f) yi/xi
80%	20.02	0.0809	3863366	3898844	3860202	3874137	0.007	1.501E+13	313343.3	47899344.9
90%	22.63	0.0914	4318922	4344925	4344389	4336079	0.008	1.880E+13	396426.9	47427609.3
100%	25.15	0.1016	4776295	4764919	4778076	4773097	0.010	2.278E+13	484975.3	46976523.7
110%	27.60	0.1115	5253355	5289404	5246239	5262999	0.012	2.770E+13	586845.5	47200094.5
120%	30.37	0.1227	5877771	5779492	5776321	5811195	0.015	3.377E+13	713003.4	47363007.0
Σ		0.508	Σ			24057507	0.053	1.181E+14	2494594.3	236866579

LM2	Peso (mg)	mg/mL xi	Areas de Levocetirizina diclorhidrato			Area promedio yi	xi ²	yi ²	xiyi	Factor Respuesta (f) yi/xi
80%	20.10	0.0812	3844855	3903102	3863638	3870532	0.007	1.498E+13	314302.7	47664298.1
90%	22.50	0.0909	4333201	4195313	4296416	4274977	0.008	1.828E+13	388595.4	47029446.3
100%	25.24	0.1020	4915863	4917660	4921515	4918346	0.010	2.419E+13	501521.8	48233453.9
110%	27.79	0.1123	5283082	5273949	5281665	5279565	0.013	2.787E+13	592745.2	47024940.7
120%	30.37	0.1227	5790090	5875046	5839881	5835006	0.015	3.405E+13	715924.9	47557073.9
Σ		0.509	Σ			24178425	0.053	1.194E+14	2513089.9	237509213

LM3	Peso (mg)	mg/mL xi	Areas de Levocetirizina diclorhidrato			Area promedio yi	xi ²	yi ²	xiyi	Factor Respuesta (f) yi/xi
80%	20.11	0.0812	3993912	3945137	3975644	3971898	0.007	1.578E+13	322694.4	48888263.9
90%	22.54	0.0911	4326542	4287417	4340419	4318126	0.008	1.865E+13	393215.5	47419834.5
100%	25.18	0.1017	4839987	4830253	4838511	4836250	0.010	2.339E+13	491978.2	47541368.8
110%	27.59	0.1115	5288632	5267394	5306007	5287344	0.012	2.796E+13	589346.4	47435614.3
120%	30.33	0.1225	5886297	5802977	5794755	5828010	0.015	3.397E+13	714124.7	47562698.7
Σ		0.508	Σ			24241628	0.053	1.197E+14	2511359.2	238847780

Σ	1.525	Σ	72477560	0	3.572E+14	7519043	7.13E+08
---	-------	---	----------	---	-----------	---------	----------

Promedio	501270	4.75E+07
Varianza	2.125E+10	2.48E+11
D.S.	145784	497949
	δ	δ ²
80%	649525.46	4.22E+11
90%	227668.33	5.18E+10
100%	629537.57	3.96E+11
110%	206074.89	4.25E+10
120%	113703.10	1.29E+10

$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$$

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

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

$$y = bx + a$$

Coefficiente de correlación (r) 0.998234
Coefficiente de determinación (r²) 0.996471
Pendiente (b) 46375747
Intercepto (a) 116410.7
Ecuación de la recta $y = 46375747 x + (116410.7)$

TABLA N° 19: RESULTADOS PARA LINEALIDAD DEL MÉTODO

LM1	Peso (mg)	mg/mL xi	Areas de Levocetirizina diclorhidrato			Area promedio yi	xi ²	yi ²	xiyi	Factor Respuesta (f) yi/xi
80%	19.96	0.0806	3904484	3892902	3912992	3903459	0.007	1.524E+13	314768.7	48406954.2
90%	22.61	0.0913	4470563	4467665	4461818	4466682	0.008	1.995E+13	408006.4	48899352.3
100%	25.34	0.1024	5008169	5000694	4954464	4987776	0.010	2.488E+13	510616.6	48721307.7
110%	27.73	0.1120	5436350	5447405	5459394	5447716	0.013	2.968E+13	610303.3	48627646.5
120%	29.98	0.1211	5903362	5901632	5905927	5903640	0.015	3.485E+13	715044.2	48742398.7
Σ		0.508	Σ			24709274	0.053	1.246E+14	2558739.2	243397659

LM2	Peso (mg)	mg/mL xi	Areas de Levocetirizina diclorhidrato			Area promedio yi	xi ²	yi ²	xiyi	Factor Respuesta (f) yi/xi
80%	20.10	0.0812	3940179	3954114	3950297	3948197	0.007	1.559E+13	320609.4	48620716.5
90%	22.53	0.0910	4460780	4482569	4477061	4473470	0.008	2.001E+13	407180.6	49147561.2
100%	25.39	0.1026	4949683	4952515	4963635	4955278	0.011	2.455E+13	508290.6	48308541.9
110%	27.61	0.1115	5435052	5438936	5437911	5437300	0.012	2.956E+13	606500.3	48745608.6
120%	30.27	0.1223	5950014	5946997	5948546	5948519	0.015	3.538E+13	727449.1	48642408.1
Σ		0.509	Σ			24762763	0.053	1.251E+14	2570030.0	243464836

LM3	Peso (mg)	mg/mL xi	Areas de Levocetirizina diclorhidrato			Area promedio yi	xi ²	yi ²	xiyi	Factor Respuesta (f) yi/xi
80%	19.98	0.0807	3927307	3917013	3922649	3922323	0.007	1.538E+13	316606.8	48592193.7
90%	22.61	0.0913	4457899	4471578	4475652	4468376	0.008	1.997E+13	408161.2	48917901.2
100%	25.23	0.1019	4944256	4944009	4954762	4947676	0.010	2.448E+13	504312.6	48540316.9
110%	27.47	0.1110	5387362	5388036	5382196	5385865	0.012	2.901E+13	597716.8	48530572.2
120%	30.30	0.1224	5989579	5990350	6000717	5993549	0.015	3.592E+13	733682.3	48962100.7
Σ		0.507	Σ			24717788	0.053	1.248E+14	2560479.6	243543085

Σ	1.524	Σ	74189825	0	3.745E+14	7689249	7.3041E+08
---	-------	---	----------	---	-----------	---------	------------

Promedio	512617	4.8694E+07
Varianza	2.208E+10	4.8553E+10
D.S.	148587	220348
	δ	δ ²
80%	116051.47	1.3470E+10
90%	138260.29	1.9116E+10
100%	206902.95	4.2809E+10
110%	107687.16	1.1597E+10
120%	163539.20	2.6745E+10

$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$$

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

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

$$y = bx + a$$

Coefficiente de correlación (r) 0.999571
Coefficiente de determinación (r²) 0.999142
Pendiente (b) 48812727
Intercepto (a) -11837.1
Ecuación de la recta y = 48812727 x + (-11837.1)

4.6 ROBUSTEZ

TABLA N° 20 RESULTADOS PARA LEVOCETIRIZINA DICLORHIDRATO

ST	Factor st	Area	F St / Area	Muestra	Factor MP	Areas	Promedio	mg/mL	%
ST ₁ -1	0.098778	4889456	0.00000002	5.56402g	50.5030535	4850652 4844739	4847696	4.97	99.5 %
ST ₁ -2	0.098778	4888158	0.00000002	5.59089g	50.2603342	4836804 4846486	4841645	4.94	98.9 %
ST ₁ -3	0.098778	4884770	0.00000002	5.53074g	50.8069445	4838488 4807803	4823146	4.98	99.6 %
ST ₁ -4	0.098778	4903150	0.00000002	5.54382g	50.6870714	4805223 4825708	4815466	4.96	99.2 %
ST ₁ -5	0.098778	4904358	0.00000002	5.57441g	50.4089222	4875843 4874242	4875043	4.99	99.9 %
ST ₂ -1	0.101525	4910296	0.00000002	5.50948g	51.0029985	4906309 4884953	4895631	5.07	101.5 %
ST ₂ -2	0.101525	4919641	0.00000002				Promedio	4.99	99.7 %
		Promedio	0.00000002	[Concentración] = Area prom * Fst * Fmp			S	0.05	0.9 %
		RSD %	1.15%				RSD	0.91%	0.91%

Intervalo de Confianza:

X= 4.9873 (promedio)

t_{tabla}= 2.571 (para n-1 grado de libertad y α =0.05)

s= 0.0454 (desviación estandar)

n= 6 (numero de muestra)

Intervalo de Confianza: 4.9397 mg/mL - 5.0350 mg/mL

$X \pm t s / \sqrt{n}$

1er Analista	5.13	mg/mL
2do Analista	5.17	mg/mL
Estabilidad a 24horas	4.99	mg/mL
Promedio	5.10	mg/mL
RSD	1.88%	

4.7 RANGO

TABLA N° 21: RESULTADOS PARA LEVOCETIRIZINA DICLORHIDRATO

PARÁMETRO	RANGO	RESULTADO
Exactitud	80,0% - 120,0%	Cumple
Linealidad del Sistema	80,0% - 120,0%	Cumple
Linealidad del Método	80,0% - 120,0%	Cumple

V DISCUSIÓN

Se calculó el coeficiente de variación de las lecturas realizadas, para las áreas del cromatograma del activo levocetirizina clorhidrato y con una especificación $CV \leq 2\%$, obteniéndose como resultado. Área de Levocetirizina diclorhidrato Resultado: 0,53 %
Tiempo de retención Resultado: 0,07 % Conforme (Tabla N° 6)

El Porcentaje de Interferencia para la especificidad es menor del 2%. Y en la muestra 5 la resolución entre el pico principal y el pico más cercano no es menor a 1. Para la Muestra N° 01 - % de Interferencia de la Fase Móvil: 0,00 %, Muestra N° 02 - % de Interferencia del Diluyente: 0,00 %, Muestra N° 03 - % de Interferencia del Placebo: 0,00 %, Muestra N°05, Muestra Problema (Producto Terminado): La resolución de Levocetirizina Diclorhidrato con el pico más próximo dio 5,4. Conforme (Tabla N°8 Y N°9)

También podemos observar que el porcentaje de interferencia de placebo es menor al 2%; para Degradación térmica: 0,00 %, Degradación ácida: 0,00 %, Degradación alcalina: 0,00 %, Degradación oxidativa: 0,00 %. Degradación luz UV 254 nm: 0,00%, Conforme (Tabla N°10). Comparando con su especificación el Porcentaje no debe exceder el 2%, encontrado en la muestra 5 de la especificidad. La resolución del Levocetirizina Diclorhidrato con cualquier otro pico no debe ser menor a 1.

En los resultados de las muestras degradadas podemos notar que la Degradación térmica No excede La resolución con el pico más cercano 5,40. Degradación ácida: No excede, la muestra se degrada hasta un 5% por hidrólisis ácida. La resolución con el pico más cercano 5,4. Degradación alcalina: No excede. La resolución con el pico más cercano 5,4. Degradación oxidativa: No excede. La resolución con el pico más cercano 5,4. Degradación luz UV 254 nm: No excede. La resolución con el pico más cercano 5,4. Conforme (Tabla N°11)

Mientras que para exactitud podemos observar que el porcentaje en la Especificación es de 98 a 102 % hecho que podemos constatar en el resultado 100,4 %, El porcentaje de recuperación para el Nivel 80 % nos resultó 99,7 %, para el Nivel 100 % fue de 101,3% y para el Nivel 120 %: 100,2 %, con una constante de variabilidad $CV = 0,83\%$ Conforme (Tabla N°12)

Del mismo modo para el Test de Student la Especificación nos dice que t_{exp} tiene que ser menor que t_{tabla} . En el estudio encontramos que t_{exp} (1,144) menor que t_{tabla} (2,306) y por lo tanto se dice que no existe diferencia significativa entre la Recuperación media y 100, por lo que la exactitud es correcta, Conforme (Tabla N°13)

También podemos observar que para el Test de Cochran la especificación G_{exp} debe ser menor que G_{tabla} , por lo tanto encontramos que G_{exp} (0,655) es menor que G_{tabla} (0,8709). Con ello confirmamos que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados Conforme (Tabla N°14).

Para precisión del sistema observamos que la Desviación Estándar Relativa, la Especificación: CV debe ser menor al 2 %, en el estudio este fue de 0,53 % Conforme (Tabla N°15)

Para precisión del método tanto repetibilidad como precisión intermedia debe ser menor al 2%, como resultado se obtuvo 0,19 % y 0,47 % respectivamente. Conforme (Tabla N° 16), para repetibilidad y (Tabla N° 17) para precisión Intermedia.

En la linealidad del sistema podemos observar una ecuación de la recta para Levocetirizina Diclorhidrato $y=46375747x + 116410,7$ donde el coeficiente de correlación es 0,996, comparado con la especificación, está dentro de los valores aceptables ya que esta nos dice que el mínimo aceptable es 0,990.(Tabla N° 18)

También podemos observar que aplicando las mismas tablas de distribución con los mismos estadísticos de prueba la linealidad de método nos arroja resultados similares a los obtenidos en la linealidad de sistema 0,991 (Tabla N°19).

Con esto podemos estar seguros que tanto nuestro método como nuestro sistema nos cumplen que las lecturas de áreas integradas en el hplc dependen a la concentración del activo Levocetirizina Diclorhidrato empleado en la muestra.

También podemos observar la robustez de nuestro método al Calcular el coeficiente de variación de las respuestas obtenidas a las 24 horas de haber concluido el ensayo del mismo analista observando nuestro resultado 1,88% menor a la especificación 3%.(Tabla N°20)

También podemos observar la conformidad del rango de nuestro método mediante las pruebas ya mencionadas, Exactitud, Linealidad y Precisión se establece el siguiente rango para la técnica 80,0 % a 120,0 % que equivale a 4,0mg/mL – 6,0mg/mL de Solución (Tabla N°21)

VI CONCLUSIONES

1. El nuevo método analítico desarrollado para la cuantificación de Levocetirizina Diclorhidrato solución oral gotas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) cumple con los parámetros de desempeño de la validación, establecido por la USP para el uso específico previsto demostrando confiabilidad de los resultados.

2. Los resultados de la validación para Adecuabilidad, Especificidad, Exactitud, Precisión, Linealidad y Robustez del método de cuantificación de levocetirizina 5mg/mL cumplen las especificaciones propuestas para validar el método analítico.

VII RECOMENDACIONES:

1. Con respecto a la validación del método analítico y su adecuada documentación, se recomienda el uso de este formato, el cual contempla de forma detallada su desarrollo, como lo establecen las normas de Buenas Prácticas de Laboratorio, desde el establecimiento de objetivos, hasta la elaboración del informe técnico, el mismo que presenta en forma concisa, los resultados.
2. Para evitar contaminación cruzada, el analista no debe estar expuesto antes ni durante el tiempo de análisis a esmalte de uñas, cremas humectantes, colonias o perfumes ni a otras sustancias derivadas del petróleo como disolventes o combustibles. Además se recomienda no fumar durante este tiempo ni exponerse a fuentes de contaminación de material orgánico.
3. Las disoluciones de analito concentrado deben almacenarse por debajo de los 4°C y protegidas de la acción de la luz solar recubriendo con papel de aluminio, esto para garantizar la estabilidad de dichas disoluciones.
4. Se debe considerar la validación de métodos analíticos a ser aplicados en las labores de análisis; así estos estén contemplados en las farmacopeas oficiales, ya que las condiciones analíticas no son las mismas que aquellas con las que fueron desarrolladas, además de ser una buena disposición de la autoridad sanitaria DIGEMID, (Capítulo V del Manual de BPM de productos farmacéuticos) quien controla el cumplimiento de este punto.

VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. USP 40 – NF 35. La publicación contiene dos compendios separados: la Farmacopea de los Estados Unidos de América, Trigésima Séptima Revisión, y el Formulario Nacional, Trigésima Segunda Edición. Oficial desde el 7 ° de mayo de 2015 hasta 1 de mayo 2016. Pag.1257- 1286.
2. Farmacopea de los Estados Unidos de América. USP 40 -NF 35. Capítulo <1225 > Validación de Procedimientos Farmacopeicos Directiva Sanitaria N° 001-MINSA/DIGEMID V.01 2014. <https://es.scribd.com/doc/314740026/Validaciones-Normativa-de-Peru>
2. Bertran G. farmacología básica y clínica editorial el manual moderno S.A; 8ª edición; pág. 682-684; México DF 2002.
3. Jorge G. validación del método analítico de valoración de amoxicilina en polvo para suspensión oral producido por Betapharma s.a. mediante HPLC Ecuador - Riobamba 2011 (04 de Abril 2016). Tesis.
4. Arestegui K. Validación de un método analítico para la cuantificación de ampicilina en capsulas por cromatografía liquida de alta resolución. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga - Ayacucho 2008. Tesis
5. Bellido N. Validación de método analítico por cromatografía liquida de alta resolución para la determinación cuantitativa de Ambroxol Clorhidrato en jarabe. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga - Ayacucho 2007. Tesis.
6. Capcha H y Llanos G. Validación de un método analítico para la cuantificación de dexametasona y clotrimazol en crema tópica, por HPLC Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima 2001. Tesis.
7. Medina J y Berrocal J. Validación de un método analítico de valoración de Naproxeno sódico de 550 mg en tabletas por cromatografía liquida de alta performance. Universidad Nacional de Mayor de San Marcos, Lima. 2008. Disponible en: http://unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/865/1/Medina_jj.pdf
8. Mendoza M. Validación del método analítico por cromatografía liquida de alta resolución HPLC para determinación cuantitativa de Levofloxacin 500 mg/100ml inyectable para infusión. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga - Ayacucho 2011. Tesis.
9. Morales C. Validación prospectiva de una técnica de una técnica analítica por cromatografía liquida de alta performance HPLC para la cuantificación de Enalapril 10 mg tabletas recubiertas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga - Ayacucho. 2004. Tesis.

10. Mayorda G y Del Castillo C. Validación de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para cuantificar Norfloxacin y Fenazopiridina Clorhidrato en capsulas orales. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima 2010. Tesis
11. Menesses L. Validación de un método para el análisis cuantitativo de Bronhexina en ampolla por HPLC. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga - Ayacucho 2002. Tesis.
12. Merck E. Productos para la cromatografía líquida y reactivos MERCK – Darmstadt, Alemania. 1981
13. Del Castillo M. Antivíricos y otros antimicrobianos. Enfermedades Infecciosas. Madrid. 09-2004.
14. Goodman & Gilman. Las Bases farmacológicas de la terapéutica (vol. II) 10 edición, editorial Mc Graw – Hil interamericana 2003.
15. katzun B. Farmacología básica y clínica 10 edición, editorial Mc Graw Hill, Nueva York USA 2005.
16. Jorge G. Validación del método analítico de valoración de Amoxicilina en polvo para suspensión oral producido por Betapharma s.a. mediante HPLC. Riobamba – Ecuador 2011. Tesis
17. Bertha A. Validación del método analítico por HPLC para la cuantificación de disolución levonorgesterol 1.5mg grageas. Universidad Veracruz–México. 2014. <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/35176/1/hernandezballesterosbertha.pdf>
18. NTP-ISO 2859-1 2009. Procedimientos de Muestreo Para Inspección por Atributos. Parte 1. 3ra Edición. Editado por La Comisión de Reglamentos Técnicos y Comerciales - INDECOPI. Lima – Perú, 2009.
19. Frida I. validación de la metodología analítica de cuantificación de clorfeniramina maleato, dextrometorfano bromohidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina en dos jarabes comerciales por cromatografía líquida de alta resolución. Universidad de san Carlos de Guatemala. 2009 tesis. biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2763.pdf.
20. Romero G. desarrollo de nuevas metodologías analíticas en el control de calidad de la industria farmacéutica. Disponible: www.tdx.cesca.es/tesis_uab/available/tdx-0712102-102928//marg1de9.pdf

ANEXOS