

**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA**



**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA**

**“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA VALORACIÓN DE CLORHIDRATO DE TERBINAFINA EN GEL 1% POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (H.P.L.C.).”**

Tesis para optar el Título Profesional de  
Químico Farmacéutico y Bioquímico

**TESISTA:**

JUANA ELIZABETH PALOMINO CRUZ

**ASESOR:**

Mg. Q.F. HENRY MONTELLANOS CABRERA

**LIMA- PERÚ**

**2017**



**ACTA DE EXAMEN DE TITULACIÓN**

Siendo las 16:00 horas del día 16 de Octubre del 2017, en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica, el jurado designado por Resolución N° 810-2017-D/FCsFB de fecha 11 de Octubre 2017, procedió a evaluar a la Bachiller PALOMINO CRUZ, JUANA ELIZABETH; postulante al Título Profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico por la Modalidad de Trabajo de Investigación - Tesis.

Siendo las 19:00 horas, finalizada la Exposición y la absolución de las preguntas y observaciones, se procedió a la calificación de la aspirante al Título Profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico, obteniendo el siguiente resultado:

**S O B R E S A L I E N T E**

Por lo que lo declaramos apto para que se le confiera el Título de **QUÍMICO FARMACÉUTICO Y BIOQUÍMICO**.

Se extiende la presente Acta de conformidad con el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica.

Lima, 16 de Octubre de 2017.

Mg. Q.F. Nesquen Tasayco Yataco  
Presidente del Jurado

Mg. Q.F. Carlos Cano Pérez  
Vocal del Jurado

Mg. Q.F. Pedro Jacinto Hervías  
Secretario del Jurado

DR. JAIME ALIAGA TOVAR  
JEFE DE LA OFICINA DE GRADOS Y TITULOS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA

DEDICATORIA:

Para mis padres Juan, Elsa y a mis hermanas Diva y Milagros, por su apoyo incondicional confianza y paciencia.

**Juana**

## **AGRADECIMIENTO:**

A la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega por todos los años de excelente educación que me brindó.

A los docentes de la facultad por transmitirme sus conocimientos y experiencias.

Al Laboratorio ROKER PERÚ por brindarme las facilidades para la realización del presente trabajo.

Al profesor Q.F. Daniel Echevarría Rodríguez-Sawao por brindarme su amistad, su invaluable orientación, consejos, sugerencias, tiempo para la realización de esta tesis.

**La autora**

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA:.....	iii
AGRADECIMIENTO:.....	iv
ÍNDICE GENERAL .....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
RESUMEN .....	xi
ABSTRACT .....	xii
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.1.    DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA.....	3
1.2.    IDENTIFICACIÓN Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA .....	5
1.2.1. PROBLEMA GENERAL.....	5
1.2.2. PROBLEMAS ESPECÍFICOS .....	5
1.3.    OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN .....	5
1.3.1. OBJETIVO GENERAL .....	5
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	5
1.4.    JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN .....	6
1.5.    LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN .....	7
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO .....	9
2.1.    ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN .....	9
2.1.1. NACIONALES.....	9
2.1.2. INTERNACIONALES .....	12
2.2.    BASES LEGALES .....	15
2.2.1. NORMAS NACIONALES.....	15
2.3.    BASES TEÓRICAS .....	16
2.3.1. CALIDAD EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA.....	16
2.3.1.1. CALIDAD .....	16
2.3.1.2. GARANTÍA DE LA CALIDAD .....	17
2.3.1.3. BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA (BPM) .....	17
2.3.1.4. BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO (BPL) .....	18
2.3.1.5. CONTROL DE CALIDAD.....	18
2.3.2. VALIDACIÓN .....	19
2.3.2.1. CONCEPTO.....	19

2.3.2.2.	TIPOS DE VALIDACIÓN.....	19
2.3.2.3.	¿POR QUÉ VALIDAR?.....	20
2.3.2.4.	¿QUÉ VALIDAR? .....	21
2.3.2.5.	VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	21
2.3.2.6.	PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	21
2.3.2.7.	IDONEIDAD DEL SISTEMA.....	25
2.3.2.8.	DATOS REQUERIDOS PARA LA VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO .....	26
2.3.3.	ANÁLISIS INSTRUMENTAL .....	27
2.3.3.1.	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE.....	27
2.3.3.1.1.	CONCEPTOS GENERALES.....	27
2.3.3.1.2.	CALIFICACIÓN DEL EQUIPO HPLC .....	28
2.3.3.1.3.	CARACTERÍSTICAS DEL EQUIPO HPLC .....	29
2.3.4.	PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y FARMACOLÓGICAS DEL ANALITO.....	32
2.3.4.1.	CLORHIDRATO DE TERBINAFINA.....	32
2.3.4.1.1.	PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS: .....	32
2.3.4.1.2.	PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS:.....	33
2.4.	FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS .....	33
2.4.1.	HIPOTESIS GENERAL.....	33
2.4.2.	HIPÓTESIS ESPECÍFICAS.....	34
2.5.	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	34
2.6.	DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS.....	40
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA.....		42
3.1.	TIPO Y NIVEL DE LA INVESTIGACIÓN.....	42
3.1.1.	TIPO DE INVESTIGACIÓN:.....	42
3.1.2.	NIVEL DE INVESTIGACIÓN:.....	42
3.2.	DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	42
3.2.1.	DESARROLLO DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PROPUESTO .....	43
3.2.1.1.	MATERIALES DE PRUEBA.....	43
3.2.1.2.	ESTÁNDARES DE REFERENCIA:.....	43
3.2.1.3.	INSTRUMENTOS ANALÍTICOS.....	43
3.2.1.4.	MÉTODO DE ANÁLISIS.....	44
3.2.1.5.	PRINCIPIO DEL MÉTODO .....	44

3.2.1.6.	FLUJOGRAMA DEL MÉTODO.....	45
3.2.1.7.	DESARROLLO DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN.....	46
3.2.1.7.1.	PRECISIÓN.....	46
3.2.1.7.1.1.	REPETIBILIDAD.....	46
3.2.1.7.1.2.	PRECISIÓN INTERMEDIA.....	46
3.2.1.7.2.	EXACTITUD.....	48
3.2.1.7.3.	LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD) Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ).....	48
3.2.1.7.4.	ESPECIFICIDAD.....	49
3.2.1.7.5.	LINEALIDAD.....	49
3.2.1.7.6.	RANGO DE TRABAJO.....	49
3.3.	POBLACIÓN Y MUESTRA.....	50
3.3.1.	POBLACIÓN :.....	50
3.3.2.	MUESTRA:.....	50
3.4.	TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	50
3.4.1	TÉCNICA:.....	50
3.4.2	INSTRUMENTO:.....	50
3.4.3	DESCRIPCIÓN DE INSTRUMENTOS.....	51
3.4.4	VALIDACIÓN DE INSTRUMENTOS.....	59
3.5.	TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS.....	59
CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS .....		60
4.1.	PROCESAMIENTO DE DATOS: RESULTADOS .....	60
4.1.1.	PRECISIÓN .....	60
4.1.1.1.	REPETIBILIDAD.....	60
4.1.1.2.	PRECISIÓN INTERMEDIA.....	62
4.1.2.	EXACTITUD.....	66
4.1.3.	LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD) Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ). ....	69
4.1.4.	ESPECIFICIDAD.....	71
4.1.5.	LINEALIDAD.....	76
4.1.6.	RANGO DE TRABAJO.....	82
4.2.	RESUMEN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN.....	82
4.3.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	84
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....		86
5.1.	CONCLUSIONES .....	86
5.2.	RECOMENDACIONES .....	87

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	88
ANEXOS .....	92



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Requisitos para la validación de métodos analíticos según su categoría.	27
Tabla 2 Variable Independiente.....	35
Tabla 3 Variable Dependiente .....	36
Tabla 4. Cálculo De Límite Máximo de Rsd .....	47
Tabla 5 Resultados Obtenidos por Analista I Para La Prueba de Repetibilidad..	60
Tabla 6. Prueba de Grubbs y Horwitz para Analista I y II.....	62
Tabla 7. Determinación del RSD y Evaluación de Horwitz Para Analista I y Analista II.....	63
Tabla 8 Resultados de adiciones a diferentes niveles de concentración.....	66
Tabla 9. Recuperación en % de la concentración añadida.....	68
Tabla 10. Resultados de concentración y las áreas a concentraciones cercanas al límite esperado.....	69
Tabla 11. Resultados de concentración y los factores de respuesta en linealidad. ....	77
Tabla 12. Resultados de los promedios de los factores de respuesta y de la variancia para linealidad (TEST DE COCHRAN) .....	79
Tabla 13. Análisis de Varianza .....	80
Tabla 14. Resumen de parámetros de validación .....	82
Tabla 15 . PRUEBA DE HIPÓTESIS.....	83

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Formula estructural de clorhidrato de Terbinafina.....	32
FIGURA 2. Prueba de IC para dos Varianzas .....	65
FIGURA 3. Probabilidad de concentración normal .....	65
FIGURA 4. Ecuación de la recta para la prueba de exactitud de clorhidrato de Terbinafina .....	67
FIGURA 5 Curva de regresión de muestras a concentraciones cercanas al límite. .....	69
FIGURA 6. Recta de ecuación .....	70
FIGURA 7. Representación cromatográfica del disolvente metanol.....	71
FIGURA 8. Representación cromatográfica de la fase móvil .....	72
FIGURA 9. Representación cromatográfica fase móvil + disolvente metanol .....	72
FIGURA 10. Representación cromatográfica del estándar de clorhidrato de Terbinafina 0.03 mg/ml.....	73
FIGURA 11. Representación cromatográfica de muestra de clorhidrato de Terbinafina 0.03 mg/ml.....	73
FIGURA 12. Estándar clorhidrato de Terbinafina en 3D.....	74
FIGURA 13. Estándar de clorhidrato de Terbinafina en Isoplot (barrido) .....	74
FIGURA 14. Muestra (CLORHIDRATO DE TERBINAFINA AL 1%) EN 3D. ....	75
FIGURA 15. Muestra (CLORHIDRATO DE TERBINAFINA AL 1%) EN ISOPLOT (BARRIDO).....	75
FIGURA 16. Comparación en librería del pico de clorhidrato de Terbinafina en la muestra .....	76
FIGURA 17. Curva de regresión de estándares para demostrar la linealidad .....	78
FIGURA 18. Gráfico de los residuales.....	80

## RESUMEN

El objeto del presente trabajo de investigación fue demostrar la validez del método analítico propuesto. El método se basa en la separación y cuantificación del principio activo por cromatografía líquida de alta performance en fase reversa, a través de una columna cromatográfica C18 (125 mm x 4,0 mm x 5  $\mu$ m), a una longitud de onda de 260 nm, empleando una fase móvil compuesta por metanol, buffer pH 3,0 y acetonitrilo con una velocidad de flujo de 1,5 mL/min, y un volumen de inyección de 50  $\mu$ L. Los valores de desviación estándar relativa obtenidos, 0,926% para repetibilidad y 0,940% para precisión intermedia, demuestran la precisión del método analítico donde el valor máximo permitido es de 2,68% y 4% respectivamente. Para la exactitud se obtuvo una media de recuperación de 100,411%. Al aplicar el test de student se obtuvo un t experimental (-0,602) que es menor al t de las tablas (4,303); por lo tanto no existe diferencia significativa entre la recuperación media y la cantidad añadida del analito. El límite de detección y cuantificación, fue de 0,20 ppm y 0,50 ppm respectivamente. Se demostró la especificidad del método analítico al evaluar de manera inequívoca al analito, Clorhidrato de Terbinafina, donde no se observó interferencia de los excipientes o productos de degradación del principio activo. Para la linealidad se obtuvo como coeficiente de correlación  $r = 0,99989$  siendo el valor mínimo permisible 0,99 y el coeficiente de los factores de respuesta fue de 0,796%, siendo el mínimo permisible 2,0%. Los resultados de los parámetros evaluados se sometieron a pruebas estadísticas y de observación comparándolos con estándares establecidos internacionalmente. Se concluye que el método analítico para la valoración de Clorhidrato de Terbinafina en gel 1% por Cromatografía Líquida de Alta Performance (H.P.L.C.) cumple con la prueba de validación realizada.

**PALABRAS CLAVE:** Validación, Método analítico, Cromatografía Líquida de Alta Performance (H.P.L.C.), Clorhidrato de Terbinafina.

## ABSTRACT

The purpose of this research was to demonstrate shows the validity of the same, developing established settings and showing the reliability of the method. The method is based in the detachment and quantification of the active principle for liquid chromatography of high performance in a reverse phase through the chromatographic column C18 (125 mm x 4, 0 mm x 5 um), to a wave length of 206 mm employing a mobile phase made up of methanol, buffer pH 3,0 y Acetonitrilo with a flow velocity of 1,5 mL/min and a injection bulk of 50 L. The values of relative standard deviation obtained 0,926 % for repetibility and 0,940 % for intermediate accuracy, they show the analytical method accuracy where the maximum value allowed is 2.68 % and 4,0 % respectively. For the accuracy was obtained a recovery average of 100,411 %.To applied the student test was obtained an experimental t (-0.602) that is smaller than t of the tables (4.303) so there isn't a main difference between average recovery and the quantity added of analyte. The limit of detection and quantification was 0.20 ppm and 0.50 ppm respectively. Also was showed the specificity of analytical method to evaluated of wrong way the analyte, Terbinafine Hydrochloride, where there weren't interferences of excipients or degradation products of active principle. For the linearity was obtained a correlation coefficient  $r=0.99989$  being the same permissible value of 0.99 and the correlation factors answer was 0,796 % being the minimum value 2.0 %. The results of this settings were prove with statistical tests showing that analytical technique proposed for the quantification of the active principle is valid

**KEY WORDS:** Validation, analytical method, liquid chromatography High Performance, terbinafine hydrochloride.

## INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica en la actualidad busca la adaptación a las exigencias internacionales del mercado, se encuentra regida por normas a nivel nacional e internacional que permiten un adecuado trabajo en los laboratorios tanto para el análisis como para la fabricación de medicamentos.

Basado en la ley N° 29459 Ley de productos farmacéuticos, dispositivos médicos y productos sanitarios, es importante cumplir con las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), para poder asegurar la calidad de los medicamentos y la seguridad del paciente.

El área de Control de Calidad, con el fin de prestar un mejor servicio y calidad en sus productos, busca siempre la mejora continua, para esto necesita de técnicas confiables y seguras. Uno de los requisitos que se tienen que cumplir al momento de realizar análisis a un medicamento es que los métodos de ensayo se encuentren validados.

La validación de un método analítico es un proceso que establece que este cumple con los requisitos para su uso propuesto mediante un proceso a través de programas documentados y estudios. Es parte fundamental de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), Sin la confiabilidad de los resultados analíticos obtenidos no se puede asegurar que los medicamentos cumplen con sus especificaciones, y es un requisito de las Buenas Prácticas para Laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos descritas por la OMS en el punto 16 donde dice: "Todos los procedimientos analíticos empleados para análisis deben ser adecuados para el uso al que están destinados. Esto se demuestra por la validación".

Hoy en día, la validación es un tema que muestra un interés creciente en la Industria Farmacéutica debido al mayor énfasis que ha puesto la industria en años recientes en los temas de Aseguramiento de Calidad y mejora de la productividad. Por lo tanto la validación es fundamental para una operación eficiente de producción y parte muy importante en los programas de Aseguramiento de la Calidad.

Las calidades de todos los resultados obtenidos deben proporcionar reproducibilidad y fiabilidad del método analítico utilizado para su obtención, la que debe estar documentada detallando el proceso y los datos obtenidos.

En el presente trabajo de investigación, se realizó la validación de un método analítico para la valoración por Cromatografía Líquida de Alta Performance (H.P.L.C.) DE Clorhidrato de Terbinafina en gel 1%, debido a que no se encuentra un método para este producto en textos oficiales. El desarrollo del trabajo se realizó en Laboratorios Roker Perú S.A.

## CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### 1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA

Uno de los objetivos más importantes de toda empresa es 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 decisiones futuras con respecto al producto.

La validación de un método analítico permite conseguir objetivos técnicos y al mismo tiempo exigencias legales en la industria farmacéutica, siendo esta una de las industrias más reguladas en los últimos años. El reglamento para registro, control y vigilancia sanitaria de productos farmacéuticos, dispositivos médicos y productos sanitarios en su artículo número 31 sobre especificaciones técnicas, técnicas analíticas y procesos de fabricación establece lo siguiente: “Si la técnica analítica del producto terminado difiere o no se encuentra en ninguna de las farmacopeas de referencia, el interesado debe presentar los documentos que acrediten la validación de las técnicas analíticas propias emitidas por el fabricante de la forma farmacéutica ...”. Para poder asegurar la calidad de los datos provenientes del análisis es necesario validar los métodos de análisis ya que se podrán obtener resultados con la confiabilidad requerida, el concepto de validación engloba un concepto avanzado que trata de conseguir un total dominio de la calidad lo cual brindará la fiabilidad y reproducibilidad de la misma, es por eso que es necesario validar las técnicas de análisis de un producto. (1)

Se ha demostrado que la separación del principio activo Clorhidrato de Terbinafina en gel se separa de sus demás componentes en una columna Agilent HC-C18, disuelto en metanol y se ha diseñado una técnica analítica en la cual para la fase móvil se utiliza una mezcla de Acetonitrilo, Metanol y Solución Buffer. La separación se realiza por HPLC utilizando un detector UV 260 nm a una velocidad de flujo de 1,5 mL por minuto siendo el volumen de inyección 50 uL.

Pero es necesario comprobar si el método es capaz de separar y cuantificar el Clorhidrato de Terbinafina de la fórmula para que sea utilizado como parte del control de calidad del producto, esto significa que la técnica desarrollada debe ser validada.

Por ser una técnica que fue desarrollada internamente en el laboratorio, esta debe ser validada de acuerdo a lo establecido en la USP 40 y a la International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) la cual orienta acerca de los parámetros de validación. Con este procedimiento se comprueba la confiabilidad de la técnica analítica para asegurar la calidad del producto. (2) (3)

El producto objeto del presente estudio es un gel que contiene 1% de Clorhidrato de Terbinafina. Como todo producto farmacéutico su proceso de fabricación debe cumplir en todo momento con las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) asegurando la calidad del mismo, fabricándolo de una manera segura y controlada. La calidad debe ser inspeccionada en cada paso del proceso de manufactura, lo que será reflejado en el análisis hecho por el área de control de calidad quien aprobará o no el producto dependiendo del cumplimiento de sus especificaciones. (1) (4)

Los análisis realizados por el área de Control de Calidad deben ser totalmente confiables para esto se debe cumplir con las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y actualmente como muchos laboratorios lo hacen, cumplir con la ISO/IEC 17025. Esta última norma en el punto referente a métodos desarrollados por el laboratorio describe que para emplear métodos no cubiertos por métodos normalizados, el método desarrollado debe haber sido validado apropiadamente antes de su utilización. (4) (5) (6)



## **1.2. IDENTIFICACIÓN Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

### **1.2.1. PROBLEMA GENERAL**

- ¿El método analítico desarrollado para la cuantificación de Clorhidrato de Terbinafina en gel por Cromatografía Líquida de Alta Performance (H.P.L.C.) cumplirá con los parámetros de desempeño establecidos para una validación?

### **1.2.2. PROBLEMAS ESPECÍFICOS**

- ¿Se podrá desarrollar el proceso de validación del método analítico con exigencias de precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, especificidad, linealidad y rango?
- ¿Será confiable la validación del método analítico del principio activo a analizar?

## **1.3. OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN**

### **1.3.1. OBJETIVO GENERAL**

- Demostrar la validez de un método analítico para la valoración de Clorhidrato de Terbinafina en gel por Cromatografía Líquida de Alta Performance (H.P.L.C.).

### **1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Desarrollar los parámetros establecidos para la validación.
- Demostrar la confiabilidad de la validación del método analítico.

## 1.4. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Actualmente se encuentran diferentes normas que justifican la validación, como lo son la ISO/IEC 17025, las BPL que refieren que todos los métodos analíticos empleados para análisis deben ser adecuados para el uso al que están destinados lo que se demuestra por la validación. Así mismo, es una exigencia para la obtención de las BPM en la cual actualmente se contempla, que los métodos analíticos propios deben ser validados.

La técnica de análisis para la cuantificación de Clorhidrato de Terbinafina en gel no se encuentra descrita en obras oficiales como la USP, BP o alguna farmacopea reconocida por DIGEMID por lo cual es necesario buscar una que cumpla con los requisitos de calidad exigidos. La validación es una exigencia de calidad en la Industria Farmacéutica, su objetivo básico es incrementar la seguridad en la calidad del producto final y es de gran importancia, reflejada finalmente en una mayor productividad para la empresa, una validación se considera como una inversión, con la confiabilidad de resultados obtenidos se logra evitar la repetición de análisis ahorrando reactivos, materiales, tiempo, etc. Tanto desde un punto de vista económico (por el elevado coste que representan las repeticiones de análisis) como desde el punto de vista científico, la aplicación de un método analítico que arroje a la primera resultados confiables representa un gran reto.

Uno de los análisis más importantes y de mayor cuidado son los análisis de cuantificación de principios activos ya que usualmente son técnicas complejas y que requieren mayor dedicación de tiempo, es así que para constatar que el producto cumple con la concentración especificada se necesita una técnica analítica que sea capaz de proporcionar resultados confiables, la técnica a utilizarse debe ser capaz de separar el principio activo de los excipientes para así poder obtener los resultados de cuantificación. La separación de un analito es de vital importancia en los procedimientos analíticos, actualmente se realiza en la mayoría de los casos por cromatografía siendo lo más adecuado una técnica por Cromatografía Líquida de Alta Performance (H.P.L.C) debido a su sensibilidad y su fácil adaptación a determinaciones cuantitativas exactas. El

análisis para la cuantificación del principio activo del producto necesita por lo tanto un método de análisis para su cuantificación, el cual actualmente no se encuentra descrito en monografías oficiales, por lo que es necesario realizar la validación del método analítico.

El presente trabajo se constituirá como una herramienta para asegurar la calidad del producto garantizando al consumidor que el producto que recibe cumple con su fin, ya que el resultado de los análisis de la cuantificación del principio activo Clorhidrato de Terbinafina será confiable siempre que se desarrolle. Las razones de preferencia de esta técnica son su sensibilidad, fácil adaptación a determinaciones cuantitativas, de acuerdo a las características del principio activo puede ser cuantificado por H.P.L.C.

El estudio es viable siendo realizado en las instalaciones del laboratorio que cuenta con los equipos necesarios y contando con el completo apoyo de las autoridades y personal especializado.

## **1.5. LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN**

- La obtención de resultados idóneos con la aplicación del método propuesto dependerá del cumplimiento de las condiciones óptimas de trabajo para lo cual es necesario contar con:
  - Infraestructura adecuada que cumpla con las normativas vigentes.
  - Equipos que cuenten con las características mínimas para la obtención de datos.
  - Instrumentos y material de trabajo adecuados.
  
- El método es aplicable en el Laboratorio Roker Perú S.A. en el caso de aplicarse en otro laboratorio, este debe contar con las condiciones óptimas para su desarrollo.

- El método es aplicable al gel de Clorhidrato de Terbinafina producido en el laboratorio Roker Perú S.A., podría tener variaciones para el caso de un gel fabricado con una fórmula diferente.

## CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

### 2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

#### 2.1.1. NACIONALES

- Cornelio J., Azaña Y.; 2007. “Desarrollo y validación de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para cuantificar Clonixinato de Lisina 125 mg y Pargeverina Clorhidrato 10 mg en tabletas recubiertas.” El objetivo de la investigación fue desarrollar y validar la técnica analítica utilizando un cromatógrafo líquido de alta resolución, una columna RP Select B de 5  $\mu$ m de 125 x 4 mm, a una longitud de onda de 245 nm, flujo 1,5 mL/min con un volumen de inyección de 5  $\mu$ L para Clonixinato de Lisina y 100  $\mu$ L para Pargeverina Clorhidrato, fase móvil compuesta por ácido clorhídrico, lauril sulfato de sodio y metanol. Se evaluó la exactitud, linealidad y rango, selectividad, precisión intermedia. Los resultados fueron conformes para todas las especificaciones, recomendado por la USP 40 para un método cromatográfico, concluyendo que la técnica cumple con los parámetros de desempeño demostrando así la confiabilidad del método analítico. (7)
- Medina J., Berrocal. “Validación de método analítico de valoración de Naproxeno sódico 550 mg tableta por cromatografía líquida de alta performance.” El objetivo de la investigación fue demostrar que la técnica cumple con las exigencias de la USP para todos los parámetros de validación. Se trabajó con un cromatógrafo líquido de alta resolución, utilizando una columna L1 octadecilsilano a una longitud de onda de 254 nm, a un flujo de 1,2 mL/min, inyectando 20  $\mu$ L, fase móvil compuesta por acetonitrilo y agua. Se evaluó la repetibilidad, linealidad, exactitud, precisión intermedia, selectividad y especificidad. Se verificaron todos los parámetros para validar la técnica analítica, concluyendo que el método analítico es válido. (8)

- Leyva E., Pérez F.; “Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación por HPLC DE Clembuterol Clorhidrato en solución oral-gotas, y análisis comparativo de productos comercializados en Perú.” El objetivo fue demostrar la validez del método, para lo cual se trabajó con un equipo de cromatografía líquida de alta resolución, se utilizó una columna C8 de 150 x 4,6 mm de 5 µm, longitud de onda de 254 nm, un volumen de inyección de 50 µL a un flujo de 1,0 mL/min y temperatura de 40°C, fase móvil compuesta por solución buffer fosfato de amonio y acetonitrilo. Se evaluó la robustez, exactitud, precisión, linealidad y selectividad, se elaboró el protocolo de validación del método de análisis, se contó con el diseño experimental y los procedimientos estadísticos, se concluyó que el método de análisis es selectivo, lineal, preciso, reproducible y exacto, comprobándose así su validez. (9)
  
- Mayorga B. y Del Castillo H.; 2010. “Validación de una técnica de análisis por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para cuantificar Norfloxacin y Fenazopiridina clorhidrato en cápsulas orales.” El objetivo fue validar prospectivamente la técnica analítica para los activos para lo cual se hizo uso de un cromatógrafo líquido de alta resolución, columna de 125 x 4 mm x 5 µm a una longitud de onda de 254 nm, inyectando 10 µL a una temperatura de 40 °C a un flujo de 0,8 mL/min, se utilizó una fase móvil compuesta por trietilamina, acetonitrilo y ácido fosfórico diluido. Se evaluó la robustez, selectividad, precisión, exactitud y linealidad, los resultados corroboraron que la técnica es selectiva, lineal, exacta, precisa y robusta, lo que garantiza que el producto cumple con todas las exigencias de calidad requeridas. (10)
  
- Zavala C.; 2012. “Validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (H.P.L.C.) para la cuantificación de Amoxicilina y Ácido Clavulánico en tabletas recubiertas.” El objetivo fue demostrar bajo evidencia documentada que el método desarrollado cumple con las exigencias de desempeño de la validación. Se trabajó con un equipo de cromatografía líquida de alta resolución, se utilizó una columna L1 de

150 x 4,6 mm x 5 um a una longitud de onda de 220 nm, con un volumen de inyección de 20 uL, flujo 1 mL/min , temperatura 25°C , la fase móvil compuesta por buffer fosfato de sodio y metanol. Se evaluó la linealidad, intervalo, exactitud, precisión y robustez, los cuales cumplieron con los parámetros de validación, concluyendo que el método analítico es adecuado para su uso en el análisis del producto. (11)

- Vega E.; 2013. “Validación del método analítico por cromatografía líquida de alta performance (H.P.L.C.) para la valoración de Rufina Trihidrato en un medicamento hepatoprotector”. El objetivo de la investigación fue confirmar y documentar que los resultados producidos son confiables, consistentes y repetitivos en las condiciones establecidas. El método analítico hace uso de un cromatógrafo líquido de alta resolución, utilizando una columna L1 de 250 x 4,6 mm x 5 um , longitud de onda 350 nm, con volumen de inyección 5 uL a un flujo de 1 mL/min a una temperatura de 50°C , la fase móvil compuesta por agua y acetonitrilo. Se evaluó la especificidad, linealidad, precisión, exactitud e intervalo, cumpliéndose los parámetros establecidos, concluyendo que el método validado es confiable y consistente. (12)

- Canchero D.; 2013. “Desarrollo y validación de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta resolución para cuantificar bencigluconolato en tabletas de 800 mg de *Lepidium peruvianum* Chacón sp.” El objetivo de la investigación fue desarrollar y validar la técnica analítica para el producto. Para el estudio se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución, una columna de 125 x 4 mm x 5 um a una longitud de onda de 229 nm , inyectando 50 uL a un flujo de 0,5 mL/min a una temperatura de 35°C y fase móvil compuesta por acetonitrilo, metanol y agua., Toma en cuenta los parámetros de selectividad, linealidad, exactitud y precisión, resultados que fueron sometidos a evaluación estadística corroborando que la técnica analítica propuesta, es selectiva, lineal, exacta y precisa, cumpliendo con los parámetros de validación establecidos en las obras oficiales,

concluyendo que la técnica validada es confiable y puede ser empleada en los análisis de rutina. (13)

### **2.1.2. INTERNACIONALES**

- Heer E.; 2009. "Validación de metodología analítica para la cuantificación de Sibutamina clorhidrato monohidrato en tabletas de 15 mg." Considera como objetivo fundamental la propuesta de un método analítico y el desarrollo de una técnica capaz de cuantificar el principio activo. Se utilizó un equipo para cromatografía líquida de alta resolución, una columna de 125 nm x 4mm x 5um, longitud de onda de 229 nm, a 35 °C , se inyectó 50 uL a un flujo de 0,5 mL/min , fase móvil compuesta por acetonitrilo, metanol y agua. El método fue validado concluyéndose que es exacto, preciso, específico y lineal, afirma que con esta labor se desarrolló uno de los aspectos del sistema de gestión de calidad en la Industria Farmacéutica.(14)

- Vallejo F.;2009 "Validación de la metodología analítica de cuantificación de Clorferinamina Maleato, Dextrometorfano Bromhidrato, Fenilefrina Clorhidrato y Guaifenesina en dos jarabes comerciales por cromatografía líquida de alta resolución." El objetivo fue desarrollar un método analítico que cumpla con requerimientos de la ICH y USP y validarlo. Se trabajó con un cromatógrafo líquido de alta resolución, una columna Whatman Partisil , longitud de onda de 220 nm , volumen de inyección 20 uL, flujo de 1 mL/min, una fase móvil compuesta por metanol y fosfato diácido de potasio pH 4. Se verificó que se cumplan ciertos parámetros de validación incluyendo exactitud, precisión intermedia, especificidad, repetibilidad, linealidad del sistema y del método, concluyendo que el método analítico que se desarrolló es reproducible, efectivo, cumple con todas las especificaciones si se realiza a las mismas condiciones de laboratorio. (15)

- Berrio M. Trujillo M. 2013. "Desarrollo y validación de una metodología analítica por HPLC-DAD para la cuantificación de Warfarina Sódica en



una preparación extemporánea.” El objetivo de la investigación fue desarrollar y validar la metodología analítica. Se trabajó en un equipo para cromatografía líquida de alta resolución, columna de 250 x 4,6 mm x 5 um, longitud de onda de 280 nm, 20 uL de volumen de inyección, flujo 1,4 mL/min, fase móvil compuesta por ácido acético glacial, agua y metanol. Se evaluó la selectividad, linealidad, precisión y exactitud, concluyendo que el método es confiable para la cuantificación del principio activo. (16)

- Velástegui J.; 2011. “Validación del método analítico de valoración de Amoxicilina en polvo para suspensión oral producido por Betapharma S.A. mediante H.P.L.C.” El objetivo de la investigación fue demostrar que el método analítico es efectivo para obtener un producto 100% dentro de los parámetros establecidos. Se trabajó con un equipo cromatógrafo líquido de alta resolución, columna L1 de 125 x 4,6 mm x 5 um , volumen de inyección de 20 uL, longitud de onda de 230 nm, flujo de 1,5 mL/min, la fase móvil compuesta por acetonitrilo y una solución de fosfato monobásico de potasio. Se evaluó la especificidad , precisión, repetibilidad, reproducibilidad, linealidad , recuperación y robustez, los resultados obtenidos cumplieron con los parámetros establecidos concluyendo que el método es válido. (17)

- Montaña M.; 2011. “Determinación, cuantificación y comparación de la concentración de vitamina C en naranja (*citrus aurantium*), limón (*citrus aurantifolia*) y mandarina (*citrus reticulata*) por HPLC.” El objetivo de la investigación fue someter un método analítico para la cuantificación, identificación y extracción de vitamina C. Los parámetros estudiados fueron muestra, tiempo de análisis y eluyente. Se trabajó con un equipo para cromatografía líquida de alta resolución , columna C18, 150 x 3,9 mm x 5 um , flujo de 1,2 mL/min, volumen de inyección 20 uL , longitud de onda de 245 nm, temperatura ambiente , la fase móvil compuesta por metanol y agua evitando siempre la presencia de luz solar . Se evaluó la sensibilidad, precisión, exactitud y reproducibilidad,

cumpléndose con los parámetros establecidos, concluyendo que el método es adecuado para un rango de 10 a 160 mg/100g. (18)

- Álvarez A. Trujillo M., 2014. “Desarrollo y validación de un método analítico de estabilidad por HPLC para la cuantificación de Rosuvastatina cálcica.” El objetivo de la investigación fue desarrollar y validar el método analítico para lo que se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución, una columna de 50 x 4,6 mm x 3,5  $\mu$ m , flujo 1,5 mL/min. Se evaluó la linealidad, selectividad, precisión, exactitud, límite de detección y cuantificación, todos los resultados se encontraron dentro de los parámetros establecidos, concluyendo que la metodología analítica es confiable para utilizarla en estudios de degradación cinéticas en función de pH y temperatura y en estudios de estabilidad del fármaco.(19)

- Arias L.; 2014.”Validación de un método analítico para la cuantificación de vitamina A en alimentos, por cromatografía líquida de alta resolución y su determinación en Guayaba Fresa (*Psidium catteianum sabine*). El objetivo fue validar el método de análisis. Se trabajó con un cromatógrafo líquido de alta resolución , longitud de onda de 325 nm, volumen de inyección 15  $\mu$ L, fase móvil cuyos componentes fueron metanol, agua y propanol. Se evaluó exactitud, robustez, selectividad, linealidad, límite de detección y cuantificación , precisión e incertidumbre, concluyendo que el método tiene validez , debe ser trabajado por analistas con habilidades que les permita desarrollar correctamente el método. (20)

- Vizquete S.; 2015. “Validación de la técnica de cuantificación de vitamina B1 por el método de HPLC en harina de trigo fortificada.” El objetivo de la investigación fue validar la técnica para lo cual se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución, columna de 125 x 4,6 mm x 5  $\mu$ m, se inyectó 20  $\mu$ L con un flujo de 0,8 mL/min a una longitud de onda de 365 a 436 nm y una fase móvil compuesta por hidrógeno fosfato de di-potasio y dimetilformamida. Se evaluó la exactitud, linealidad,

precisión, límite de detección, límite de cuantificación e incertidumbre del método, los resultados obtenidos fueron conformes concluyendo que la metodología es confiable. (21)

## **2.2. BASES LEGALES**

### **2.2.1. NORMAS NACIONALES**

a) En el D.S. 016-2011-SA- REGLAMENTO PARA EL REGISTRO, CONTROL Y VIGILANCIA SANITARIA DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS, DISPOSITIVOS MÉDICOS Y PRODUCTOS SANITARIOS, se encuentran los siguientes artículos.

**Art. 31:** Especificaciones técnicas, técnicas analíticas y procesos de fabricación. “Si la técnica analítica del producto terminado difiere o no se encuentra en ninguna de las farmacopeas de referencia, el interesado debe presentar los documentos que acrediten la validación de las técnicas analíticas propias emitidos por el fabricante de la forma farmacéutica, laboratorio que encarga la fabricación u otro laboratorio de control de calidad certificado...” (22)

**Art. 40:** Requisitos para la inscripción y reinscripción de especialidades farmacéuticas.

“Para la categoría 1 el interesado debe presentar:

4. Validación de la técnica analítica propia del producto terminado.”  
(22)

b) En el MANUAL DE BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS – Ministerio de salud Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas (DIGEMID) ,1999 se encuentran los siguientes artículos.

**Art. 11:** “Los estudios de validación constituyen una parte esencial de las BPM deben efectuarse conforme a protocolos definidos de

antemano. Debe prepararse y archivarse un reporte escrito que resuma los resultados y las conclusiones registrados. 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 de proceso, limpieza y de los métodos analíticos.” (4)

**Art. 176** : “Los procedimientos de ensayos descritos en los documentos deben ser validados en el contexto de las instalaciones disponibles, antes de que sean adoptados para las pruebas correspondientes”. (4)

## **2.3. BASES TEÓRICAS**

### **2.3.1. CALIDAD EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA**

#### **2.3.1.1. CALIDAD**

Según la International Organization for Standardization (ISO) la calidad es el conjunto de propiedades y características de un producto, proceso o servicio que le confiere la aptitud de satisfacer las necesidades y las expectativas del cliente. (23)

En la Industria Farmacéutica, la administración de la calidad se define como el aspecto de la función administrativa que determina y pone en práctica la “Política de la Calidad”, es decir la orientación y las intenciones generales de un organismo en lo que respecta a la calidad, en la forma como lo expresan y lo autorizan las autoridades de dicho organismo. (6)

### **2.3.1.2. GARANTÍA DE LA CALIDAD**

“Garantía de la Calidad” es el conjunto de medidas que deben adoptarse con el fin de asegurar que los productos farmacéuticos sean de la calidad requerida para el uso al que están destinados. Por tanto, Garantía de Calidad incorpora las BPM y otros conceptos, incluyendo aquellos que van más allá del alcance de estos lineamientos, tales como el diseño y el desarrollo del producto. (4)

Con el fin de asegurar la calidad, la seguridad y la eficacia de los medicamentos que se fabrican es necesaria la existencia de un sistema de Garantía de la Calidad diseñado globalmente y aplicado de forma adecuada, según las normas de Buenas Prácticas de Manufactura y de Control de Calidad. Este sistema debe estar documentado y es necesario verificar su efectividad periódicamente. El sistema de Garantía de la Calidad debe estar dotado de personal competente, áreas, equipos e instalaciones adecuadas y suficientes, ya que son los recursos básicos para elaborar los medicamentos. (24)

### **2.3.1.3. BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA (BPM)**

Las Buenas Prácticas de Manufactura han sido desarrolladas para asegurar que los productos farmacéuticos se fabriquen consecuentemente y controlados por los patrones de calidad apropiados para su utilización. Es así que las BPM constituyen el factor que asegura que los productos se fabriquen en forma uniforme y controlada, de acuerdo con las normas de calidad adecuadas al uso que se pretende dar a los productos, y conforme a las condiciones exigidas para su comercialización. En esta norma nacional se menciona que los métodos analíticos deben ser validados.(4)

#### **2.3.1.4. BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO (BPL)**

“Son las normas y procedimientos de operación oficiales considerados como requerimientos mínimos para promover la calidad e integridad de un producto”. Las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) nacen de la necesidad de contar con datos analíticos de confianza y de un seguimiento de todo el proceso, para poder juzgar de la seguridad de un producto. Las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), pretenden promocionar la calidad y validez de los datos de los análisis. Además facilita el comportamiento adecuado del estudio, promueve su exacto y completo reporte de los medios por los cuales se puede verificar la integridad de los mismos. (4)

#### **2.3.1.5. CONTROL DE CALIDAD**

El control de calidad de medicamentos se encuentra incluido dentro de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y se encuentran involucradas las actividades relacionadas a especificaciones, pruebas, muestreo, procedimientos de organización, todo lo relacionado a documentación para asegurar la realización de pruebas pertinentes, para autorizar finalmente el uso y venta de los productos una vez establecida su calidad. (4)

Se encuentran incluidas todas las medidas relacionadas para cumplir con las especificaciones de materias primas, productos intermedios, materiales de envase y productos terminados, los cuales deben cumplir con las especificaciones establecidas para identidad, contenido, pureza y otras características. (5)

## **2.3.2. VALIDACIÓN**

### **2.3.2.1. CONCEPTO**

La validación es la confirmación mediante examen y la provisión de evidencia objetiva de que los requisitos particulares para un uso propuesto específico se cumplen. (3)

Es establecer una evidencia documentada de que un proceso se realiza correctamente y produce un producto que está dentro de las especificaciones predeterminadas, se debe tener presente que la validación se refiere a procesos, sistemas y métodos y antes de utilizar un proceso debe estar validado. (24)

### **2.3.2.2. TIPOS DE VALIDACIÓN**

#### **a) VALIDACIÓN PROSPECTIVA**

Se realiza cuando la verificación del cumplimiento de las condiciones establecidas para un proceso o método analítico se lleva a cabo antes de la comercialización del producto. Este tipo de validación se aplica cuando se elabora un nuevo método analítico. Es típico en los laboratorios de investigación y desarrollo, y se realiza de acuerdo con un protocolo perfectamente planificado. Comprende el estudio de todos los criterios necesarios para demostrar el buen funcionamiento del método. (25)

#### **b) VALIDACIÓN RETROSPECTIVA**

Se realiza cuando la idoneidad del método o proceso analítico se basa en la garantía constatada a través de los datos analíticos del producto ya comercializado, se aplica a

métodos no validados previamente t de los que se tiene una amplia historia de resultados. (25)

#### **a) VALIDACIÓN CONCURRENTE**

Se realiza cuando un producto se fabrica industrialmente para su salida comercial. A partir de la validación prospectiva se utiliza la información generada en aquella, al implementar el proceso a nivel industrial. (24)

#### **b) REVALIDACIÓN**

Efectuada cuando se introduce un cambio considerado importante como puede ser, cambio en las especificaciones, en la matriz del producto, en el método analítico. Estos cambios pueden afectar la idoneidad del método analítico. (25)

### **2.3.2.3. ¿POR QUÉ VALIDAR?**

Nos interesa mantener un método que sea estable, capaz y robusto. 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.

Validando aseguramos que se cumpla con los requerimientos preestablecidos, confirmando su precisión y exactitud.

También aseguramos que las modificaciones de las condiciones normales de ensayo y medio ambiente operacional no afecten negativamente el resultado final.

Porque validando tenemos un control de los puntos críticos del ensayo y así prevenir y evitar resultados erróneos que afecten la calidad de análisis. (6)



#### **2.3.2.4. ¿QUÉ VALIDAR?**

En un análisis de laboratorio debe considerarse validar todo equipo o procedimiento que influya en la calidad final del resultado, así tenemos:

- Cambios en los sistemas analíticos en todo su conjunto.
- Cambios relacionados a los equipos o al método analítico del producto si se realizaron modificaciones importantes.
- Los métodos de análisis que no se encuentran en obras consideradas oficiales como la USP, BP, etc. (6)

#### **2.3.2.5. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS**

La validación de un método analítico es el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. (2)

Es el procedimiento para demostrar que el método analítico es aceptable para el fin que se pretende. (22)

#### **2.3.2.6. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS**

Las características de desempeño de un método analítico se expresan en función de los parámetros analíticos. Según la Guía ICH Q2 Validación de procedimientos analíticos, los parámetros analíticos considerados en validación son:

-Precisión

- ✓ Repetibilidad
- ✓ Precisión Intermedia
- ✓ Reproducibilidad

-Exactitud

- Límite de Detección
- Límite de Cuantificación
- Especificidad
- Linealidad y rango (3)

A continuación se describen cada uno de los parámetros mencionados:

### **a) PRECISIÓN**

La 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 procedencia de las muestras destinadas al estudio de la precisión pueden ser de muestras reales o preparadas en el laboratorio. (3)

El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad o el más – menos del método de ensayo. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Como consecuencia de la existencia de estos errores, los análisis efectuados sobre muestras idénticas, en las mismas circunstancias, no conducen generalmente a resultados idénticos. (26)

#### **1) REPETIBILIDAD**

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos, etc.) en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.

La repetibilidad se expresa matemáticamente por el coeficiente de variación (desviación estándar relativa) de una serie de medidas.

Uno de los factores que más puede influir en la repetibilidad del método de análisis es la concentración del analito, ya que la desviación estándar de las respuestas obtenidas aumenta al disminuir la concentración del analito. (26)

## **2) PRECISIÓN INTERMEDIA**

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra pero en diferentes condiciones operativas (diferentes analistas, aparatos, días, etc.) y en un mismo laboratorio.

En el estudio de la precisión intermedia se deben considerar aquellas circunstancias en las que se pretende desarrollar el método de ensayo. El analista debe evaluar los efectos causados al variar una serie de factores. Típicos factores a estudiar incluyen el día, el analista, el instrumento, etc. (26)

## **3) REPRODUCIBILIDAD**

Estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios. La precisión de un método analítico se expresa generalmente como el Coeficiente de Variación (CV) de una serie de medidas. Estudia la variabilidad de los resultados inter-laboratorio. La reproducibilidad de dicho método de análisis se determina analizando una serie de alícuotas procedentes de lotes homogéneos en diferentes laboratorios, diferentes analistas y utilizando condiciones operativas y ambientales distintas pero siguiendo el procedimiento descrito en el método. (26)

## **b) EXACTITUD**

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado. No deben confundirse exactitud y precisión. La precisión está relacionada con la dispersión de una serie de mediciones, pero no da ninguna indicación de lo cerca que está del valor verdadero.

Se puede tener mediciones muy precisas pero poco exactas; sin embargo, para que un método sea exacto se requiere un cierto grado de precisión. (26)

## **c) LÍMITE DE DETECCIÓN (LD)**

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. (26)

## **d) LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LC)**

Se entiende por límite de cuantificación a la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo las condiciones experimentales descritas, con una adecuada precisión y exactitud. El límite de cuantificación es por lo tanto un término cuantitativo.

Entre el límite de detección y límite de cuantificación se encuentra un rango de concentraciones en el que si bien no puede cuantificarse el analito en cuestión con razonable certeza, sí puede detectarse su presencia sin incurrir en falsos positivos. (26)

## **e) ESPECIFICIDAD**

Es la capacidad de evaluar de manera inequívoca al analito en presencia de los componentes cuya presencia resulta previsible, tales

como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz. La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual puede compensarse usando otros procedimientos analíticos complementarios. (3)

#### **f) LINEALIDAD Y RANGO**

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido. Siempre que sea posible se buscará una respuesta de tipo lineal que facilitará su trazado, interpolación e interpretación.

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.

Aunque el proceso lógico consistiría en evaluar cuales son los límites de concentración en los que el método analítico pierde su linealidad, normalmente se toma como punto de partida un intervalo de concentraciones ya establecido de acuerdo con la experiencia, el conocimiento analítico de la técnica empleada y principalmente en función de las especificaciones. (26)

#### **2.3.2.7. IDONEIDAD DEL SISTEMA**

El test de idoneidad del sistema (system suitability test) consiste en un conjunto de ensayos que permitan comprobar en el momento de la utilización del método, que el sistema (analista, reactivos e instrumental) es adecuado para llevar a cabo la determinación para la que se ha establecido y validado dicho método. Por lo tanto, el test de idoneidad del sistema se ha de entender como parte integrante del procedimiento de

análisis y requisito previo a su realización. El test de idoneidad del sistema es susceptible de emplearse en cualquier procedimiento de medida en el que las condiciones analíticas puedan estar sometidas a variación de las condiciones operacionales. (26)

#### **2.3.2.8. DATOS REQUERIDOS PARA LA VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO**

Los métodos analíticos descritos varían desde determinaciones analíticas complejas hasta la evaluación subjetiva de ciertas características, para los cuales se requieren diferentes esquemas de validación. Las categorías de métodos analíticos más comunes son las siguientes:

**Categoría I.** Incluye los métodos analíticos para la cuantificación de los componentes mayoritarios de las materias primas o de los principios activos (incluyendo conservadores) en productos farmacéuticos.

**Categoría II.** Incluye los métodos analíticos empleados para la determinación de impurezas en materias primas o productos de degradación en los productos farmacéuticos. Estos métodos incluyen valoraciones cuantitativas y ensayos de límites.

**Categoría III.** Incluye métodos analíticos para la determinación de las características de desempeño (Ej., disolución, liberación de principios activos) de un producto farmacéutico.

**Categoría IV.** Ensayo de identificación de producto farmacéutico.

Para cada categoría de análisis, se necesita diferente información analítica.

En la tabla N° 1 se indica los elementos que normalmente se requieren para cada una de estas categorías.

Tabla 1

Requisitos para la validación de métodos analíticos según su categoría.

Características de desempeño analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis Cuantitativos	Pruebas de Limite		
Exactitud	Si	Si	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Si	*	Si
Límite de detección	No	No	Si	*	No
Límite de cuantificación	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No
Rango	Si	Si	*	*	No

\*Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica. (3)

### 2.3.3. ANÁLISIS INSTRUMENTAL

#### 2.3.3.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE

##### 2.3.3.1.1. CONCEPTOS GENERALES

Las técnicas de separación cromatográfica son métodos de separación de múltiples etapas en los que los componentes de una muestra se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra móvil. La separación puede basarse en adsorción, distribución de masa (partición) o intercambio iónico; o puede basarse en diferencias entre las propiedades fisicoquímicas de las moléculas, tales como tamaño, masa o volumen. (2)

La separación de un analito es de vital importancia en los procedimientos analíticos, actualmente se realiza en la mayoría de los casos por cromatografía siendo lo más adecuado una técnica por Cromatografía Líquida de Alta Performance (H.L.P.C.) debido a su sensibilidad y su fácil adaptación a determinaciones cuantitativas exactas. (27)

La Cromatografía Líquida de Alta Performance (H.P.L.C.) deriva de una evolución de la cromatografía preparativa en columna cuyos resultados, en términos de selectividad y de resolución, han mejorado mucho por la miniaturización y la utilización de fases estacionarias muy elaboradas. Estas fases, constituidas generalmente por micropartículas esféricas cuyo diámetro está comprendido entre 2 y 5  $\mu\text{m}$ , producen una pérdida de presión importante en la columna. Por lo tanto, es necesario aplicar una fuerte presión a la fase móvil para obtener un caudal conveniente. (28)

#### **2.3.3.1.2. CALIFICACIÓN DEL EQUIPO HPLC**

El término calificación se aplica a la etapa del proceso de calibración dedicada a comprobar y documentar el funcionamiento del instrumento tanto a nivel modular como el sistema completo. Dicha calificación comprende:

##### **a) CALIFICACIÓN DE DISEÑO (DQ)**

Es necesario un estudio preliminar para ver factibilidad, requerimientos, así como las características del equipo y del proveedor que nos va a suministrar el equipo. (29)

##### **b) CALIFICACIÓN DE LA INSTALACIÓN (IQ)**

Comprende la verificación documentada de que todos los aspectos importantes de la instalación están en conformidad



con las especificaciones del diseño y con las normas reglamentarias. (29)

#### **c) CALIFICACIÓN DE LA OPERACIÓN (OQ)**

La calificación operativa comprende la verificación documentada de que los sistemas y subsistemas funcionan de la manera esperada y son capaces de operar en los rangos operativos anticipados. Para lograr esto, es necesario que toda la evaluación deba tener procedimientos escritos, todas las secuencias automáticas deban funcionar repetidamente como lo especificado. Toda la instrumentación deberá calibrarse y deberá haber POES para la operación de cada sistema. (29)

#### **d) CALIFICACIÓN DEL DESEMPEÑO (PQ)**

La calificación de desempeño o funcionamiento tiene por finalidad demostrar que cada sistema y piezas del equipo realizan la función para la que están destinadas, resultando componentes, materiales, productos y resultados conformes a las especificaciones de calidad.(29)

#### **2.3.3.1.3. CARACTERÍSTICAS DEL EQUIPO HPLC**

Un equipo de HPLC se compone de varios módulos con funciones definidas, que están integrados en la misma carcasa o bien se presentan en bloques diferentes unidos entre ellos como elementos de un equipo. La circulación de la fase móvil entre estos módulos se hace a través de conductos tubulares cortos de pequeño diámetro interno (0,1mm). (28)

Se encuentra compuesto por las siguientes partes:

**a) Recipientes para la fase móvil y sistema para el tratamiento de los disolventes:**

Un equipo de HPLC moderno se encuentra equipado con un o más recipientes de vidrio o de acero inoxidable. Los recipientes a menudo se equipan con un sistema para eliminar los gases disueltos que interfieren formando burbujas en la columna y en los sistemas de detección. Estas burbujas provocan ensanchamientos de banda y a menudo interfieren en el funcionamiento del detector. Un desgasificador puede consistir en un sistema de bombeo por vacío, un sistema de destilación, dispositivos para calentar y agitar los disolventes o sistemas de purga que permiten arrastrar los gases disueltos fuera de la solución mediante finas burbujas de un gas inerte de baja solubilidad. Con frecuencia estos sistemas contienen un dispositivo para la filtración del polvo y de las partículas sólidas en suspensión en los disolventes para evitar que estas partículas dañen la bomba o los sistemas de inyección u obturen la columna. No es necesario que los desgasificadores sean partes integrantes de los sistemas de HPLC, puede tratarse los disolventes antes de introducirlos en el recipiente, filtrándolos al vacío.

Una separación que utiliza un solo disolventes de composición constante se denomina una elución isocrática. Con frecuencia la eficacia de la separación se aumenta notablemente por una elución con gradiente, en este caso se utilizan dos o tres sistemas de disolventes con una polaridad significativamente distinta. (27)

**b) Sistema de bombeo:**

Los equipos incluyen al menos una bomba para forzar el paso de fase móvil a través de la columna cuyo relleno, muy

compacto, es responsable de una sobre presión muy importante a nivel del inyector, la cual puede variar dependiendo del caudal de la fase móvil, su viscosidad y el tamaño de partículas de la fase móvil. Se utilizan bombas de alta presión diseñadas para mantener un caudal sin pulsos y estable, incluso cuando la composición de la fase móvil varía. (28)

### **c) Inyectores:**

La inyección de un volumen preciso de muestra debe hacerse a la entrada de la columna en un corto periodo de tiempo para perturbar lo menos posible el régimen de circulación establecido en la columna y en el detector. Para ello se utiliza una válvula de alta presión de varias vías, manual o automatizada en los casos de los inyectores automáticos situada justo antes de la columna. (28)

### **d) Columna:**

Es un tubo recto, calibrado, de acero, la fase estacionaria se mantiene entre dos discos porosos situados entre sus extremidades. A menudo la columna se encuentra precedida de una precolumna denominada guardacolumna, rellena de la misma fase estacionaria que retiene los compuestos, así se logra aumentar la duración de la vida de esta.

La fase estacionaria en contacto con la fase móvil pero insoluble en esta es el segundo medio con el que los compuestos inicialmente disueltos en fase móvil van a interaccionar. En la columna se generan tantas asociaciones particulares de los tres constituyentes (fase móvil, fase estacionaria y compuestos) como analitos en la muestra.

Entre los diferentes materiales orgánicos o inorgánicos que sirven para el relleno de las columnas de HPLC, el gel de

sílice, un sólido amorfo y rígido, se utiliza convenientemente transformado en el 80% de las aplicaciones.

La interacción más o menos fuerte entre fase estacionaria (normal o de polaridad inversa) influye sobre los tiempos de retención de los solutos. La polaridad de la fase estacionaria permite distinguir dos situaciones iniciales:

-Si la fase estacionaria es polar, la cromatografía es en fase normal. En este caso se utilizará una fase móvil poco polar.

-Si la fase estacionaria es muy poco polar, la cromatografía se denominará en fase inversa, o cromatografía hidrófoba, y se utilizará una fase móvil polar (lo más común son las mezclas de Acetonitrilo o metanol con agua). (28)

#### e) Detector:

Cualquier detector debe reunir cierto número de cualidades: Dar a cada compuesto detectado una respuesta proporcional a su concentración instantánea, ser sensible y tener poco ruido de fondo, ser estable en el tiempo. Los modos de detección más corrientes se basan en propiedades ópticas de los compuestos: absorción, fluorescencia e índice de refracción. (28)

### 2.3.4. PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y FARMACOLÓGICAS DEL ANALITO

#### 2.3.4.1. CLORHIDRATO DE TERBINAFINA

##### 2.3.4.1.1. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS:

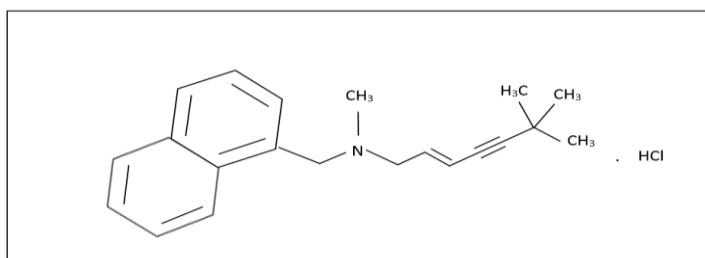


FIGURA 1. Formula estructural de clorhidrato de Terbinafina

**Nombre químico:** Clorhidrato de (f)-N-(6,6-dimetil-2-hepten-4-inil)-N-metil-1-naftalenmetilamina

**Formula Molecular:** C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>N•HCl

**Peso molecular:** 327,9

**Solubilidad:** Fácilmente soluble en alcohol deshidratado y en metanol, poco soluble en acetona, muy poco o poco soluble en agua

**Descripción:** Polvo blanco o blanquecino. (2)

#### **2.3.4.1.2. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS:**

El Clorhidrato de Terbinafina es una alilamina altamente activa contra dermatofitos. La actividad antimicótica se deriva de la inhibición selectiva de la epoxidasa de escualeno, una enzima clave para la síntesis del ergosterol. La sensibilidad de la escualeno-epoxidasa de hongos a la terbinafina es muy superior a la del mamífero. Es, pues, una acción anterior a la de los imidazoles dentro de la misma cadena de síntesis del ergosterol. A diferencia de éstos, tiene escasa afinidad por el citocromo P-450, por lo que no interfiere en la síntesis de hormonas esteroideas. (4)(30)

Aunque in vitro muestra un amplio espectro de actividad antifúngica, en la práctica clínica encuentra su máxima eficacia en el tratamiento de las infecciones dermatofíticas: tinea corporis, cruris y tinea pedis, tanto en las infecciones crónicas como recurrentes, en la candidiasis cutánea y en la pitiriasis versicolor. (31)

### **2.4. FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS**

#### **2.4.1. HIPOTESIS GENERAL**

- El nuevo método analítico para la valoración de Clorhidrato de Terbinafina en gel por Cromatografía líquida de alta performance, cumple con los parámetros de desempeño de la validación.

## **2.4.2. HIPÓTESIS ESPECÍFICAS**

- Se puede desarrollar el proceso de validación del método analítico con exigencias de precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, especificidad, linealidad y rango.
- La validación del método analítico es confiable.

## **2.5. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES**

**VARIABLE INDEPENDIENTE** : Valoración de Clorhidrato de Terbinafina.

**VARIABLE DEPENDIENTE** : Validación del método analítico

Tabla 2

Variable Independiente

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIÓN	INDICADOR
VALORACIÓN DE CLORHIDRATO DE TERBINAFINA	<p>La valoración de Clorhidrato de Terbinafina es la obtención de la concentración de analito en la muestra y se realiza por Cromatografía Líquida de Alta Performance (H.P.L.C.) La Cromatografía Líquida de Alta Performance es una técnica de separación cromatográfica sensible y de fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas. (27)</p>	<p>Medición y obtención de los resultados de concentración del analito mediante la aplicación del método analítico.</p>	Método analítico	<p>Intervalo de tipo cuantitativo:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Conforme</li> <li>- No conforme</li> </ul>

Tabla 3

Variable Dependiente

VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIÓN	INDICADOR
VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	<p>La validación de un método analítico es el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. (4)</p> <p>PRECISIÓN: Grado de concordancia entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas.(26)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Repetibilidad: Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.(26)</li> <li>- Precisión intermedia: Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, en diferentes condiciones operativas en un mismo laboratorio.(26)</li> </ul>	<p>Obtención de todos los resultados de los parámetros de validación y su comparación con los valores establecidos, el resultado indica la confiabilidad del método analítico.</p>	<p>PARAMETROS DE VALIDACIÓN (características de desempeño)</p>	<p>%RSD &lt; 2,68</p> <p>%RSD &lt; 4,00</p>



VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIÓN	INDICADOR
VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Exactitud: Proximidad entre el valor que es aceptado como verdadero o de referencia y el valor experimental encontrado.(26)</li> <li>- Límite de detección: Mínima cantidad de analito en muestra que se puede detectar. (26)</li> </ul>		PARAMETROS DE VALIDACIÓN	<p><math>t_{exp} &lt; t_{tablas}</math></p> <p>Resultado de valor mínimo de detección.</p>

VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIÓN	INDICADOR
VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Límite de cuantificación: Mínima cantidad de analito que se puede cuantificar. (26)</li>   <li>- Especificidad: Capacidad de evaluar de manera inequívoca al analito en presencia de los componentes cuya presencia resulta previsible. (3)</li> </ul>		PARAMETROS DE VALIDACIÓN	<p>Resultado de valor mínimo de cuantificación.</p> <p>No debe haber interferencias en la evaluación del analito.</p>

VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIÓN	INDICADOR
VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Linealidad: Capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido. (26)</li>   <li>- Rango: Intervalo de la concentración superior e inferior del analito para el cual se ha demostrado correcta precisión, exactitud y linealidad del método. (26)</li> </ul>		PARAMETROS DE VALIDACIÓN	<p>r mínimo = 0,99</p> <p>r<sup>2</sup> mínimo = 0,995</p> <p>Resultado obtenido según las pruebas realizadas.</p>

## 2.6. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS

- a) Analito:** Sustancia contenida en la muestra sometida a análisis.
- b) Blanco:** Muestra preparada para la lectura final pero que no contiene analito. Puede ser un blanco de los reactivos o bien un blanco de la muestra problema que contenga todos los ingredientes de la muestra problema excepto los analitos.
- c) Desviación estándar:** Estadístico básico indicativo de la dispersión o variabilidad de los resultados.
- d) Desviación estándar relativa (RSD):** Desviación estándar expresada como función de la media. Normalmente se expresa en porcentaje.
- e) Error, error sistemático, error aleatorio:** Los errores analíticos que se cometen al efectuar los análisis, pueden ser determinados o indeterminados. Los errores determinados o sistemáticos van en una sola dirección y se deben a fallos de instrumentos, personas o métodos. Deben eliminarse (o corregirse sus efectos) puesto que afectarían la exactitud del método. Los errores indeterminados o aleatorios son de origen desconocido, actúan en ambas direcciones y determinan la variabilidad de los resultados o precisión del método. Los errores indeterminados son objeto de los tratamientos estadísticos.
- f) Estándar de referencia:** Producto homogéneo con propiedades específicas que ha sido analizado y certificado por un organismo cualificado y homologado.
- g) Fiabilidad:** Capacidad de un método analítico para mantener durante periodos de tiempo apropiados los criterios fundamentales de validación. La fiabilidad indica las prestaciones del método para su uso rutinario.

- h) Método analítico:** Procedimiento que explica detalladamente todas las operaciones necesarias para efectuar un análisis concreto.
- i) Muestra:** Producto resultante de una operación de muestreo. El muestreo debe ser representativo y con un determinado carácter aleatorio.
- j) Recta de regresión (curva de calibración) :** Relación entre las respuestas instrumentales que produce un analito y las concentraciones del mismo
- k) Recuperación:** Se define como eficacia en el rescate del analito de la matriz de la muestra. La recuperación ideal es el 100 %.
- l) Residual:** Es la diferencia entre el valor observado experimentalmente y el valor estimado en la recta de regresión o curva de calibración.
- m) Resolución:** Medida de la separación entre dos picos cromatográficos. El valor de resolución ideal es aquel que permite la resolución hasta la línea de base entre los picos de interés.
- n) Sensibilidad:** Capacidad de un método analítico para detectar pequeñas concentraciones de analito.
- o) Sesgo:** Error sistemático o determinado. (26)

## **CAPÍTULO III: METODOLOGÍA**

### **3.1. TIPO Y NIVEL DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **3.1.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN:**

Por el tipo de la investigación el presente estudio reúne las condiciones metodológicas de una investigación de tipo experimental, prospectivo, longitudinal.

#### **3.1.2. NIVEL DE INVESTIGACIÓN:**

La presente investigación, reúne por su nivel las características de un estudio aplicativo.

### **3.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

Selección de la muestra, consistió en la elección de Clorhidrato de Terbinafina en gel 1%, producto cuya metodología analítica no se encontró en obras oficiales, siendo necesaria la metodología para la valoración de su principio activo.

Selección de la metodología analítica, la que fue proporcionada por el fabricante del principio activo optimizada por el personal de desarrollo analítico del laboratorio.

Evaluación de la factibilidad, realizada en conjunto con la Jefatura de Control de Calidad, comprobando que se cuente con las condiciones óptimas para el desarrollo de la validación.

Calificación de equipos, realizada previamente al desarrollo de la validación.

- CALIFICACIÓN DE DISEÑO (DQ)
- CALIFICACIÓN DE LA INSTALACIÓN (IQ)
- CALIFICACIÓN DE LA OPERACIÓN (OQ)
- CALIFICACIÓN DEL DESEMPEÑO (PQ)

### 3.2.1. DESARROLLO DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PROPUESTO

#### 3.2.1.1. MATERIALES DE PRUEBA.

Los materiales de prueba para este estudio fueron los siguientes:

Material	Principio activo	Concentración	Lote Piloto	
Gel	Clorhidrato de Terbinafina	1%	101P016	

#### 3.2.1.2. ESTÁNDARES DE REFERENCIA:

Los estándares de referencia para este estudio fueron los siguientes:

Estándar	Lote	Fecha Expiración	Pureza	Fuente	Condiciones de Almacenamiento
Clorhidrato de Terbinafina	G0K287	Activo	99.9%	USP	Ambiente

#### 3.2.1.3. INSTRUMENTOS ANALÍTICOS

Instrumento	Marca/ Modelo	Serie	Calificación
Cromatógrafo líquido de alta performance con detector DAD-FLD	AGILENT TECHNOLOGIES -1200	DE63056724	09/01/16

### 3.2.1.4. MÉTODO DE ANÁLISIS

Nombre del método	Referencia del método
Determinación de Terbinafina al 1% gel por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC)	Propio

### 3.2.1.5. PRINCIPIO DEL MÉTODO

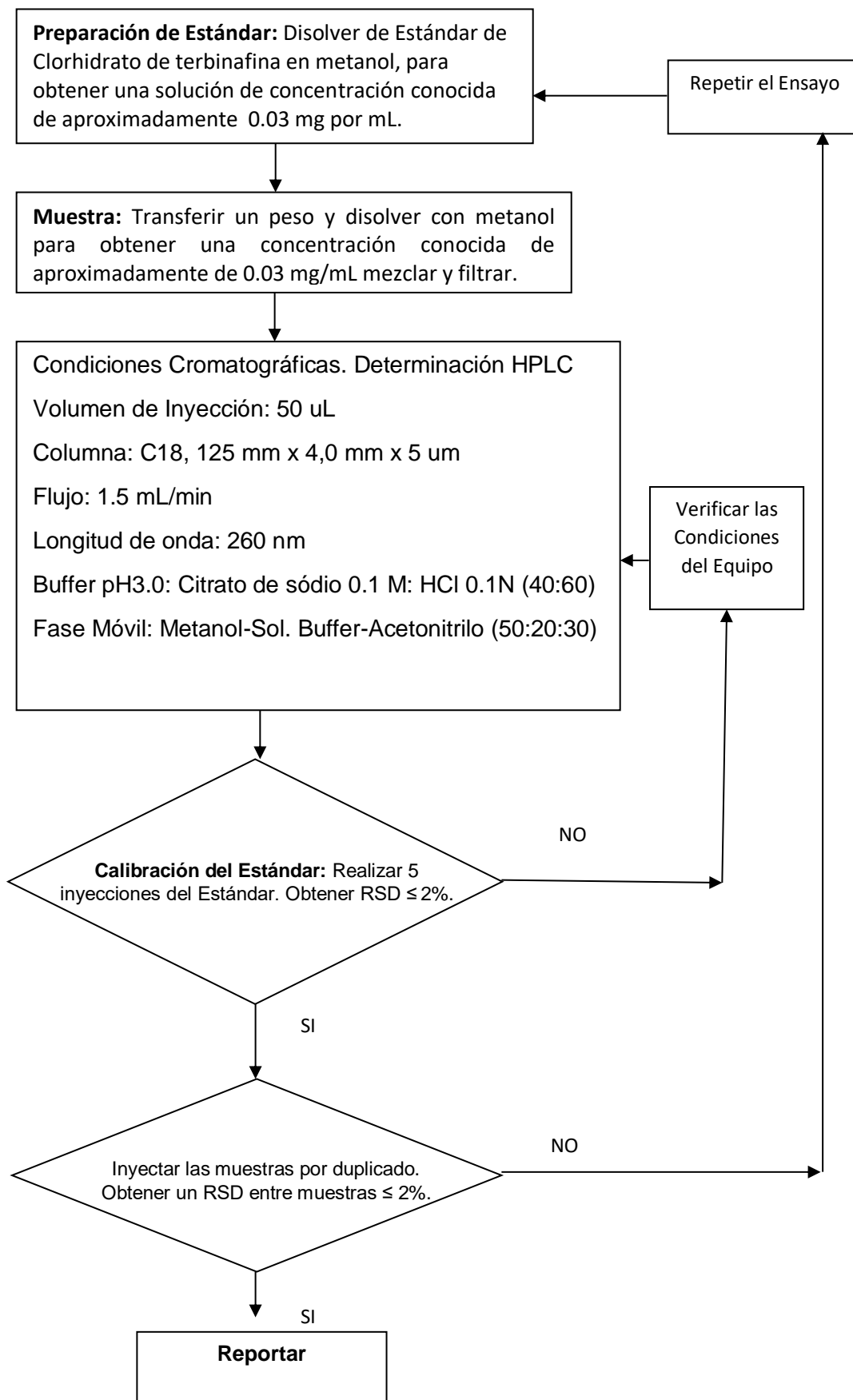
Clorhidrato de Terbinafina es determinado por Cromatografía Líquida de Alta Performance (H.L.C.P.) en fase reversa usando un detector UV con detección a 260 nm, las muestras y el estándar se diluye en metanol.

El contenido del ingrediente activo es determinado por las áreas de los picos usando un estándar externo.

Las inyecciones repetidas de una preparación estándar empleada en la valoración se comparan para determinar si se cumplen con los requisitos de precisión. Se emplean los datos de 5 inyecciones repetidas del analito para calcular de Desviación Estándar Relativa (RSD) y éste debe ser  $\leq 2.0\%$



### 3.2.1.6. FLUJOGRAMA DEL MÉTODO



### 3.2.1.7. DESARROLLO DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

#### 3.2.1.7.1. PRECISIÓN

##### 3.2.1.7.1.1. REPETIBILIDAD

Para la repetibilidad se eligió 1 muestra conteniendo el principio activo de Clorhidrato de Terbinafina a la concentración nominal de 1%, se analizó 10 veces una única muestra en días diferentes.

Se calculó la desviación estándar relativa (RSD) para cada nivel de fortificación (concentración). El RSD se calculó multiplicando por 100 al cociente de la desviación estándar ( $s$ ) entre el promedio ( $\bar{x}$ ), según la siguiente formula:

$$RSD = 100 \frac{s}{\bar{x}}$$

Se evaluó la repetibilidad (RSD) utilizando los límites aceptables de RSD calculados a partir de la ecuación corregida de Horwitz:

$$RSD_r < 2^{1-0.5 \log C} x 0.67$$

Donde C es la concentración expresada en fracción

##### 3.2.1.7.1.2. PRECISIÓN INTERMEDIA

Se realizó 10 análisis independientes en días diferentes y con analistas diferentes a partir de la muestra de Clorhidrato de Terbinafina 1% en gel (concentración teórica de 1g/100 g). Los resultados se reportan en la tabla N° 6 y 7.

Se calculó la desviación estándar relativa (RSD) para cada analista y para cada día por cada nivel de fortificación.

Se evaluó la precisión (RSD) por analista y por día, utilizando los límites de aceptación de RSD calculados a partir de la ecuación corregida de Horwitz.

**Ecuación para determinación de %RSD**

$$RSD = 100 \frac{s}{x}$$

**Ecuación de Horwitz para Precisión Intermedia:**

$$RSD_r < 2^{1-0.5\log C}$$

Donde:

C: concentración expresada en fracción.

Tabla 4.

Cálculo De Límite Máximo de Rsd

Concentración Teórica (g/100g)	Valor C (g/g)	Log C	1-0.5logC	PRECISION INTERMEDIA	REPETIBILIDAD
				$2^{1-0.5\log C}$	$2^{1-0.5\log C} \times 0.67$
1	0.01	-2	2	<b>4.00</b>	<b>2.68</b>

(26)

### **3.2.1.7.2. EXACTITUD**

La exactitud se evaluó empleando la prueba t- student de los datos obtenidos del ensayo de recuperación (%R) del analito en muestras fortificadas, las que fueron preparadas por adición de cantidades conocidas de analito (estándar) a una muestra conocida y de concentración igual. Se determinó la exactitud a partir de la muestra del producto, se fortificó 3 muestras del producto comercial adicionando con 0.5 mL, 1.0 mL y 1.5 mL del estándar Clorhidrato de Terbinafina USP al 99.9% preparado al 0.999 mg/mL y se diluyó con metanol para obtener concentraciones finales de analito adicionado de 0.00999 mg/mL, 0.01998 mg/mL y 0.02997 mg/ml respectivamente. Paralelamente se preparó 3 muestras más de producto comercial sin la adición de estándar, teniendo en cuenta la concentración inicial de la muestra comercial y la dilución realizada obteniéndose una concentración final aproximada de 0.018 mg/mL de Clorhidrato de Terbinafina . Se realizó 03 análisis independientes de cada concentración final de analito adicionado, además se analizó las 3 muestras sin analito adicionado. Los datos obtenidos se resumen en la tabla N°9.

### **3.2.1.7.3. LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD) Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ).**

Se preparó tres muestras a concentraciones cercanas al límite esperado. Estas concentraciones fueron de 0.001 mg/mL (1.0 ppm), 0.0020 mg/mL (2.0 ppm), 0.0050 mg/mL (5.0 ppm). Se calculó la Pendiente de la recta, extrapolándose la señal blanco.

#### **3.2.1.7.4. ESPECIFICIDAD**

Se revisaron visualmente los espectros en 3D e isoplot, tanto del estándar como de la muestra.

#### **3.2.1.7.5. LINEALIDAD**

Se prepararon 5 niveles de estándares de calibración en el rango de (0.010 a 0.05 mg/ml), disolviendo el estándar en metanol. Se preparó la curva de calibración, cada nivel de concentración se midió por triplicado; en la tabla N°11 se muestra las relaciones del área del estándar.

Se realizó el ajuste de la curva de calibración por el método de los mínimos cuadrados y se determinaron los siguientes parámetros: coeficiente de correlación, intercepto con el eje "y" y pendiente de la curva de calibración. Se calculó y graficó los valores residuales (diferencia entre el valor verdadero de "y" y el valor predicho por la línea recta, para cada valor de "x"). Se realizó el análisis de varianza de la regresión.

#### **3.2.1.7.6. RANGO DE TRABAJO**

Se tomaron los datos obtenidos de los análisis que se realizaron para la determinación del Límite de detección.

**\* TOTAL DE ANÁLISIS REALIZADOS: 63**

**Repetibilidad:** Se tomó una muestra de gel (un tubo) y se realizaron 10 análisis.

**Precisión intermedia:** Se combinaron 10 tubos de muestra con los cuales se hizo un pool, se realizaron 20 análisis. (Incluidos Analista 1 y 2)

**Exactitud:** Se combinaron 10 tubos de muestra con los cuales se hizo un pool, el que fue fortificado para obtener tres concentraciones y realizar un total de 9 análisis (3 análisis por concentración).

**Límite de detección y límite de cuantificación:** Se combinaron 10 tubos de muestra con los cuales se hizo un pool, se preparó muestras a 3 concentraciones las que fueron analizadas por triplicado realizando un total de 9 análisis.

**Linealidad:** Se preparó 5 niveles de estándares que fueron analizados por triplicado realizando un total de 15 análisis.

### **3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA**

#### **3.3.1. POBLACIÓN :**

Clorhidrato de Terbinafina en gel 1%, tubo por 15 gramos.

#### **3.3.2. MUESTRA:**

31 tubos de Clorhidrato de Terbinafina 1% gel , los que fueron muestreados aleatoriamente.

### **3.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

#### **3.4.1 TÉCNICA:**

Observación y análisis documental

#### **3.4.2 INSTRUMENTO:**

##### **TABLAS EXCEL:**

- Tabla para los resultados obtenidos por analista para la prueba de repetibilidad.

- Tabla de prueba de Grubbs y Hortwitz para analista I y II.
- Tabla para la determinación del RSD y evaluación de Hortwitz para analista I y II.
- Tabla de resultados de adiciones a diferentes niveles de concentración añadida.
- Tabla de recuperación en porcentaje de la concentración añadida.
- Tabla de resultados de concentración y las áreas a concentraciones cercanas al límite esperado.
- Tabla de resultados de concentración y los factores de respuesta en linealidad.
- Tabla de resultados de los promedios de los factores de respuesta y de la varianza para linealidad (Test de Cochran)
- Tabla de análisis de varianza.

### **3.4.3 DESCRIPCIÓN DE INSTRUMENTOS**

Por la naturaleza de la investigación el instrumento de recolección de datos utilizado fueron las tablas realizadas en el programa Excel, programa que cuenta con todas las herramientas necesarias para obtener resultados confiables lo que hace posible la realización de cálculos exactos, permite trabajar con grandes cantidades de datos utilizando todas las muestras e incluyendo variables. Permite el ahorro de tiempo y la adecuada interpretación de los resultados de los análisis. Los datos que se ingresan a las tablas Excel son obtenidos del equipo cromatógrafo líquido de alta performance.

- Tabla para los resultados obtenidos por analista para la prueba de repetibilidad. (Tabla utilizada para el parámetro Repetibilidad)

Nº de muestras	Fecha de análisis	W Mtra. (g)	Iny. 1 (g/100 g)	Iny. 2 (g/100 g)	Promedio
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
Promedio					
D.estandar					
RSD %					
Max					
Min					
Qmax					
Qmin					
Valores de tabla					
5%					
1%					
Ecuación Horwitz (criterio de aceptación)					2.68

En las columnas de Iny. 1 e Iny. 2 se ingresan los valores de los análisis obtenidos del procesamiento en el equipo de cromatografía. Los resultados se obtienen aplicando las fórmulas requeridas en el programa Excel.

W Mtra = Peso de la muestra, el cual será ingresado en gramos.

Iny. 1 = Resultados obtenidos de la primera inyección.

Iny. 2 = Resultados obtenidos de la segunda inyección.



- Tabla de prueba de Grubbs y Hortwitz para analista I y II. (Tabla utilizada para el parámetro Precisión Intermedia)

Nº de muestras	Analista I		Analista II	
	Fecha de análisis	Terbinafina Clorhidrato (g/100 g)	Fecha de análisis	Terbinafina Clorhidrato (g/100 g)
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
Promedio				
D.estandar				
RSD %				
Max				
Min				
Qmax				
Qmin				
Valores de tabla				
5%				
1%				
Ec. Horwitz		4.00		4.00

En las columnas para los Analista I y II se ingresan los valores de cada uno de ellos obtenidos del procesamiento en el equipo de cromatografía. Los resultados se obtienen aplicando las fórmulas requeridas en el programa Excel.

- Tabla para la determinación del RSD y evaluación de Hortwitz para analista I y II. (Tabla utilizada para el parámetro Precisión Intermedia)

	<b>Fecha de análisis</b>	<b>Nº de muestras</b>	<b>Promedio (g/100g)</b>
<b>ANALISTA I</b>		1	
		2	
		3	
		4	
		5	
		6	
		7	
		8	
		9	
		10	
<b>ANALISTA II</b>		11	
		12	
		13	
		14	
		15	
		16	
		17	
		18	
		19	
		20	
<b>Promedio</b>			
<b>Desviación estándar</b>			
<b>RSD %</b>			
<b>Límite Máximo %</b>			<b>4.00</b>

En las columna Promedio se ingresan los valores promedio de las 2 inyecciones de cada muestra, obtenidos del procesamiento en el equipo de cromatografía. Los resultados se obtienen aplicando las fórmulas requeridas en el programa Excel.

- Tabla de resultados de adiciones a diferentes niveles de concentración añadida. (Tabla utilizada para el parámetro Exactitud)

	Muestras	Concentración Teórica añadida de Clorhidrato de Terbinafina			
		x mg/mL del blanco	x del blanco + 0.5 ml Std Clorhidrato de Terbinafina	x del blanco + 1.0 ml Std Clorhidrato de Terbinafina	x del blanco + 1.5 ml Std Clorhidrato de Terbinafina
Respuesta (Área bajo la Curva)	1				
	2				
	3				
	Promedio				
	Desv. Std				
	RSD %				

Se ingresan las respuestas de las áreas a cada nivel de concentración, obtenidas del equipo de cromatografía. Los resultados se obtienen aplicando las fórmulas requeridas en el programa Excel.

- Tabla de recuperación en porcentaje de la concentración añadida. (Tabla utilizada para el parámetro Exactitud)

Concentración Teórica añadida de Clorhidrato de Terbinafina (mg/mL) (Cc)	Concentración total en mg/mL del Blanco + estándar añadido	Concentración blanco en mg/mL de Clorhidrato de Terbinafina	Concentración Práctica obtenida de la recuperación de Clorhidrato de Terbinafina en mg/mL (Cr)	% Recuperación
<b>PROMEDIO</b>				
<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>				
<b>RSD %</b>				

En las columnas respectivas se ingresan los valores de cada muestra a cada nivel, obtenidos del procesamiento en el equipo de cromatografía. Los resultados se obtienen aplicando las fórmulas requeridas en el programa Excel.

- Tabla de resultados de concentración y las áreas a concentraciones cercanas al límite esperado. (Tabla utilizada para el parámetro Exactitud)

Concentración (mg/mL)	Área			Área Media	Desv. Estándar
0.001					
0.002					
0.005					

En las columnas respectivas se ingresan las respuestas de las áreas de cada muestra a cada nivel, obtenidas del equipo de cromatografía. Los resultados se obtienen aplicando las fórmulas requeridas en el programa Excel.

- Tabla de resultados de concentración y los factores de respuesta en linealidad (Tabla utilizada para el parámetro Linealidad)

Concentración teórica (mg/mL)	Concentración Clorhidrato de Terbinafina (mg/mL)(x)	Factor Respuesta (y)	xy	x <sup>2</sup>	y <sup>2</sup>	f= (y/x)
0.01						
0.01						
0.01						
0.02						
0.02						
0.02						
0.03						
0.03						
0.03						
0.04						
0.04						
0.04						
0.05						
0.05						
0.05						

Promedio f

Sf

CV o RSD



En la columna Concentración se ingresan los valores en mg/mL y en factor de respuesta la respuesta de las áreas obtenidas de cada muestra en el equipo de cromatografía. Los resultados se obtienen aplicando las fórmulas requeridas en el programa Excel.

- Tabla de resultados de los promedios de los factores de respuesta y de la varianza para linealidad (Test de Cochran) (Tabla utilizada para el parámetro Linealidad)

Promedio	Desv. Estándar	Varianza (S <sup>2</sup> )

Suma  
Gexp

% Gtablas( $\alpha=0.05$ , K=5, n=3) 0.5981

Se ingresan los promedios de los resultados obtenidos en en función de “x” y “y” según la tabla N°11 . Los resultados se obtienen aplicando las fórmulas requeridas en el programa Excel.

- Tabla de análisis de varianza. (Tabla utilizada para el parámetro Linealidad)

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión					
Residuos					
Total					

Se ingresan los datos respectivos obtenidos de los análisis en el equipo de cromatografía. Los resultados finales de F se obtienen aplicando las fórmulas requeridas en el programa Excel.

#### **3.4.4 VALIDACIÓN DE INSTRUMENTOS**

La validez del instrumento que se aplicó a la investigación se efectuó mediante el “juicio de experto”, para ello se realizó la evaluación por tres profesionales Químicos Farmacéuticos con amplia experiencia en la Industria Farmacéutica, con la finalidad de evaluar, los cuales dieron que el instrumento cumple con los requisitos necesarios para la obtención de resultados confiables en este tipo de investigación. (Anexo 1)

#### **3.5. TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS**

Se realizó un análisis estadístico para cada parámetro independiente el uno del otro con los datos obtenidos de los análisis realizados, los cuales son detallados en la presentación de resultados de cada parámetro del método analítico.

## CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

### 4.1. PROCESAMIENTO DE DATOS: RESULTADOS

#### 4.1.1. PRECISIÓN

##### 4.1.1.1. REPETIBILIDAD

Tabla 5

Resultados Obtenidos por Analista I Para La Prueba de Repetibilidad

Nº de muestras	Fecha de análisis	WMta. (g)	Iny. 1 (g/100 g)	Iny. 2 (g/100 g)	Promedio
1	13/11/2016	0.0905	0.99204	0.99180	0.9919
2	13/11/2016	0.0904	1.01193	1.01077	1.0114
3	13/11/2016	0.0914	1.02089	1.01355	1.0172
4	14/11/2016	0.0911	0.99096	0.99881	0.9949
5	14/11/2016	0.0906	1.01924	1.01762	1.0184
6	14/11/2016	0.0902	1.00139	1.00114	1.0013
7	14/11/2016	0.0903	1.00558	1.00486	1.0052
8	15/11/2016	0.0917	0.99751	0.99380	0.9957
9	15/11/2016	0.0915	1.01210	1.00799	1.0100
10	15/11/2016	0.0920	1.00323	1.01363	1.0084
Promedio		0.0910	1.00549	1.00540	1.00544
D. estandar			0.01048	0.00882	0.00931
RSD			1.04254	0.87742	0.92591
Max			1.02089	1.01762	1.01843
Min			0.99096	0.99180	0.99192
Qmax			1.469	1.386	1.395
Qmin			1.386	1.541	1.452
Valores de tabla					
5%					2.29
1%					2.41
Ecuación Horwitz (criterio de aceptación)					2.68



En la tabla N° 5 se muestran los resultados obtenidos por el analista. Se aplicó el test de Grubbs para ver la presencia de valores atípicos, una vez que se ha comprobado que los datos de las mediciones son consistentes se puede evaluar el mejor estimado de las mediciones (típicamente el promedio) sin temor a que el valor tenga algún sesgo por algún dato atípico o fuera de rango. Luego de la Prueba de Grubbs (Q max y Q min) realizada, no se aprecian valores atípicos; ya que los valores son inferiores a los valores de la tabla al 5% y al 1%

Los Datos obtenidos por el RSD del Analista I son menores al criterio de aceptación de la Ecuación de Horwitz. Por lo tanto se concluye que el método cumple con el parámetro de repetibilidad.

#### 4.1.1.2. PRECISIÓN INTERMEDIA

Tabla 6.

Prueba de Grubbs y Horwitz para Analista I y II

Nº de muestras	Analista I		Analista II	
	Fecha de análisis	Terbinafina Clorhidrato (g/100 g)	Fecha de análisis	Terbinafina Clorhidrato (g/100 g)
1	13/11/2016	0.9919	13/11/2016	1.0071
2	13/11/2016	1.0114	13/11/2016	0.9842
3	13/11/2016	1.0172	13/11/2016	0.9972
4	14/11/2016	0.9949	14/11/2016	1.0119
5	14/11/2016	1.0184	14/11/2016	1.0046
6	14/11/2016	1.0013	14/11/2016	1.0028
7	14/11/2016	1.0052	14/11/2016	1.0016
8	15/11/2016	0.9957	15/11/2016	0.9844
9	15/11/2016	1.0100	15/11/2016	1.0069
10	15/11/2016	1.0084	15/11/2016	1.0022
Promedio		1.00544		1.00029
D. estandar		0.00931		0.00929
RSD		0.92591		0.92841
Max		1.01843		1.01188
Min		0.99192		0.98422
Qmax		1.395		1.247
Qmin		1.452		1.731
Valores de tabla				
5%		2.29		2.29
1%		2.41		2.41
Ec. Horwitz		4.00		4.00

En la tabla N°6 se observan los resultados en la cual los Analistas I y II cumplen con la prueba de Grubbs, no hay presencia de valores atípicos. Cada Analista cumple que el  $RSD < RSD$  de Horwitz

#### **Modelo Hipotético:**

Ho: Las medias de los analistas son iguales.

Ha: Al menos una de las medias de los analistas es diferente.

Nivel de Significación: 95%

**Prueba Estadística: MODELO DCA**

ANOVA: Análisis de las Varianzas.

Prueba de Tukey para ver diferencias significativas.

Tabla 7.

Determinación del RSD y Evaluación de Horwitz Para Analista I y Analista II

	Fecha de análisis	Nº de muestras	Promedio
ANALISTA I	17/11/2016	1	0.9919
	17/11/2016	2	1.0114
	17/11/2016	3	1.0172
	20/11/2016	4	0.9949
	20/11/2016	5	1.0184
	20/11/2016	6	1.0013
	23/11/2016	7	1.0052
	23/11/2016	8	0.9957
	23/11/2016	9	1.0100
	24/11/2016	10	1.0084
ANALISTA II	29/11/2016	11	1.0071
	29/11/2016	12	0.9842
	29/11/2016	13	0.9972
	17/11/2016	14	1.0119
	17/11/2016	15	1.0046
	17/11/2016	16	1.0028
	20/11/2016	17	1.0016
	20/11/2016	18	0.9844
	20/11/2016	19	1.0069
	23/11/2016	20	1.0022
<b>Promedio</b>			1.0029
<b>Desv Std.</b>			0.009
<b>RSD</b>			0.940
<b>Límite Máximo</b>			4.00

En la tabla N°7 se observan los resultados obtenidos por los Analistas I y II , estos cumplen con que el RSD de todos los analistas < RSD de Horwitz (ver tabla N°4)

Para comprobar se efectúa el ANOVA y el análisis de Tukey para ver diferencias significativas en las medias de los analistas.

### **Modelo lineal general: Concentración vs. Analistas**

Método

Codificación de factores (-1, 0, +1)

Información del factor

Factor Tipo Niveles Valores

Analistas Fijo 2 1, 2

### **Análisis de Varianza**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Analistas	1	0.000132	0.000132	1.53	0.232
Error	18	0.001556	0.000086		
Total	19	0.001689			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.0092982	7.84%	2.72%	0.00%

### **Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = Concentración, Término = Analistas**

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Analistas	N	Media	Agrupación
1	10	1.00544	A
2	10	1.00029	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

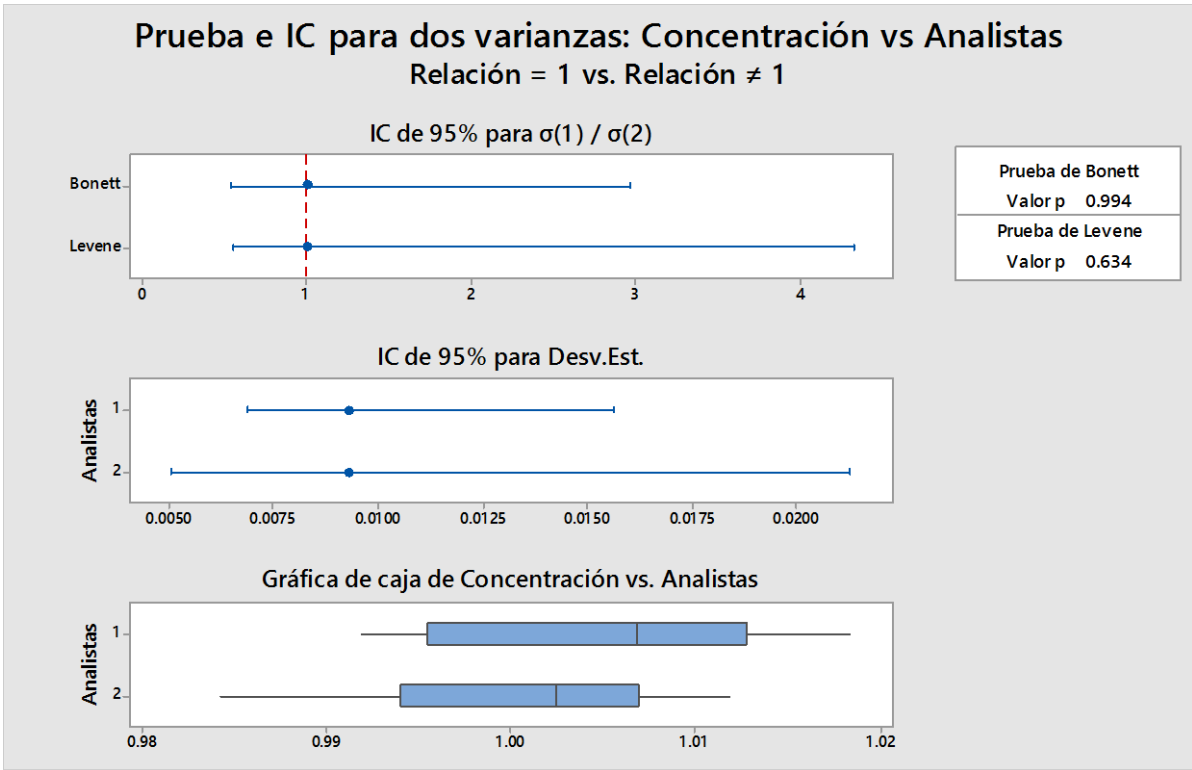


FIGURA 2. Prueba de IC para dos Varianzas

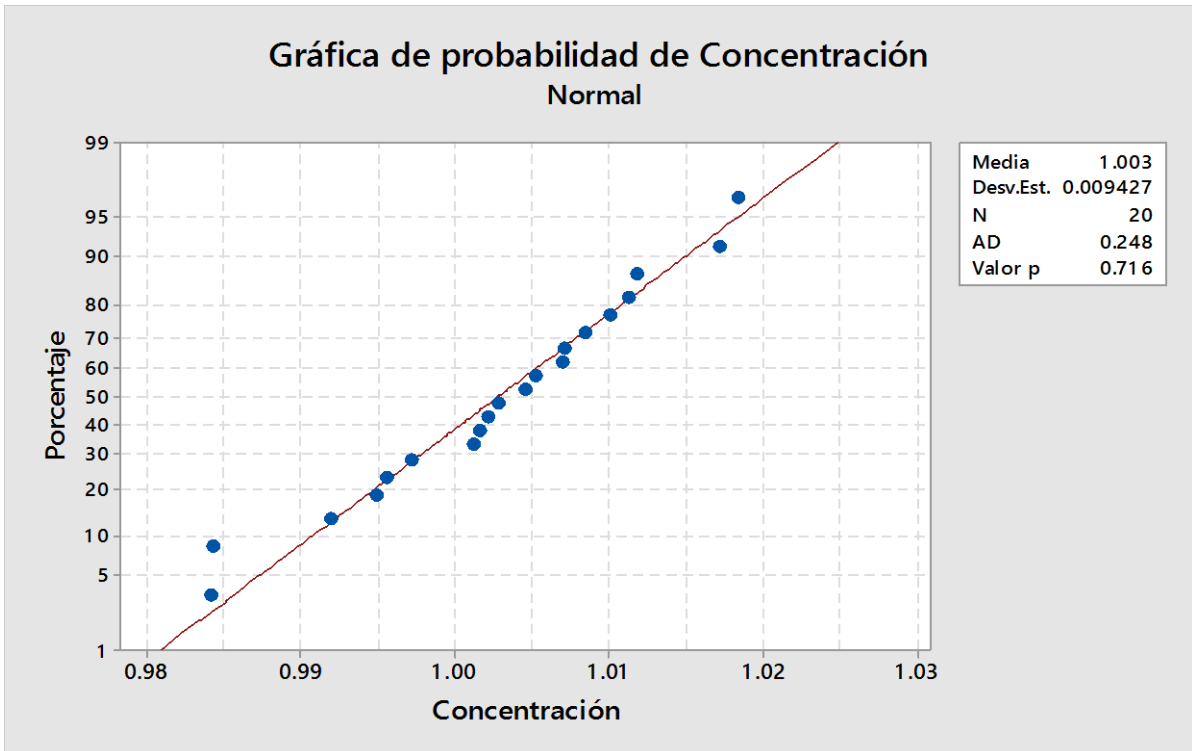


FIGURA 3. Probabilidad de concentración normal

El valor de p es mayor a  $\alpha=0.05$ , Por lo tanto no hay significancia estadística, y se aprueba la hipótesis nula concluyéndose que las medias de los dos analistas son iguales; el método cumple con el parámetro de Precisión Intermedia.

La Prueba de tukey demuestra que no hay significancia estadística en comparación con cada una de las medias de los analistas, los dos analistas tienen la misma homogeneidad por lo tanto, el método cumple con el parámetro de Precisión Intermedia.

#### 4.1.2. EXACTITUD

Tabla 8

Resultados de adiciones a diferentes niveles de concentración

	Muestras	Concentración Teórica añadida de Clorhidrato de Terbinafina			
		x mg/mL del blanco	x del blanco + 0.5 mL Std Clorhidrato de Terbinafina	x del blanco + 1.0 mL Std Clorhidrato de Terbinafina	x del blanco + 1.5 mL Std Clorhidrato de Terbinafina
Respuesta (Área bajo la Curva)	1	3261.27368	4934.50732	6497.19141	8323.26270
		3268.84644	4935.17578	6494.22217	8339.18164
	2	3259.86084	4911.62451	6599.55371	8343.15527
		3272.02661	4914.74463	6624.75000	8353.70801
	3	3242.20679	4885.09717	6549.11230	8254.66992
		3240.11558	4883.92676	6557.96924	8251.67792
	<b>Promedio</b>	3257.38832	4910.84603	6553.79981	8310.94258
	<b>Desv. Std</b>	13.38360	22.60641	52.76497	45.81415
	<b>RSD o CV%</b>	0.41087	0.46034	0.80511	0.55125

En la tala N°8 se observa que la recta de calibración efectuada con soluciones patrón del analito (0.01 mg/mL a 0.03 mg/mL) es:

$$y = 165,691.65105x + 135.59646$$

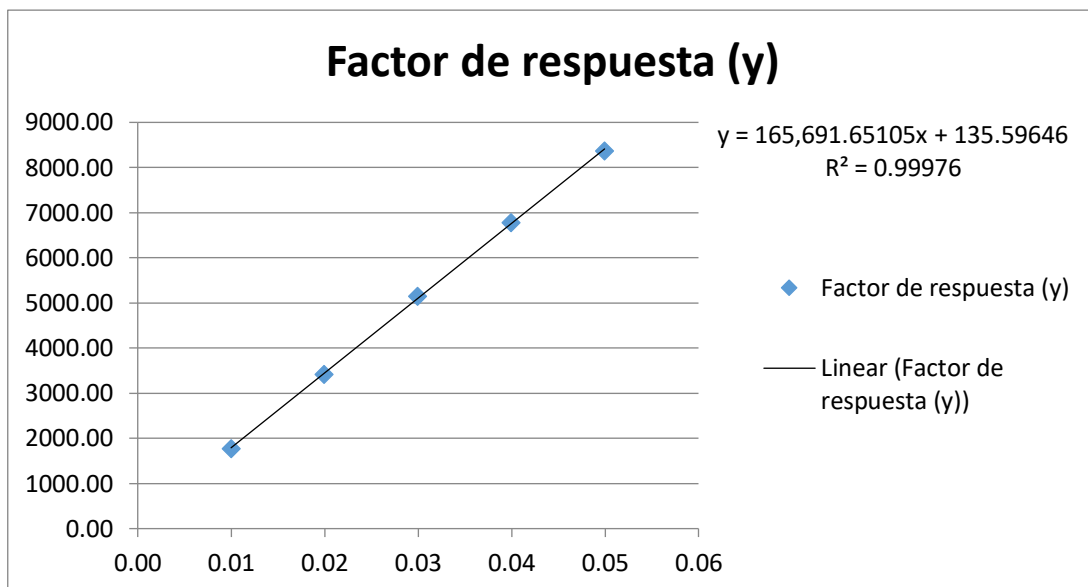


FIGURA 4. Ecuación de la recta para la prueba de exactitud de clorhidrato de Terbinafina

Las concentraciones experimentales netas preparadas de Clorhidrato de Terbinafina son las siguientes

1ra muestra: "X" concentración del blanco + 0.00999 mg/mL de Clorhidrato de Terbinafina .

2da muestra: "X" concentración del blanco + 0.01998 mg/mL de Clorhidrato de Terbinafina .

3era muestra: "X" concentración del blanco + 0.02997 mg/mL de Clorhidrato de Terbinafina .

Se comparan los resultados obtenidos con la concentración recuperada por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recuperación} = 100 \frac{C_r}{C_c}$$

Donde  $C_r$  es la concentración recuperada y  $C_c$  es concentración conocida añadida.

Tabla 9.

Recuperación en % de la concentración añadida

Concentración Teórica añadida de Clorhidrato de Terbinafina (mg/mL) (Cc)	Concentración total en mg/mL del Blanco + estándar añadido	Concentración blanco en mg/mL de Clorhidrato de Terbinafina	Concentración Práctica obtenida de la recuperación de Clorhidrato de Terbinafina en mg/mL (Cr)	% Recuperación
0.00999	0.02882	0.01884	0.00998	99.891
0.01998	0.03874	0.01884	0.01989	99.574
0.02997	0.04934	0.01884	0.03050	101.767
<b>PROMEDIO</b>				100.411
<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>				1.186
<b>RSD o CV %</b>				1.181

% Recuperación (AOAC)  $\geq$  1.00%

97-103 %

% Recuperación Promedio

100.411 %

**Para confirmar se aplica una Prueba T**

Planteamiento de la Hipótesis

Ho Media de las mediciones igual a 100

Ha Media < 100

Con alpha a un valor de 0.05

Fórmula para Prueba T

$$t_{\text{experimental}} = \frac{|\text{valor teórico} - \text{recuperación experimental}| \times \sqrt{\text{numero de datos}}}{\%RSD}$$

**t exp**  
**t tablas ( $\alpha = 0.05$ ;  $gl=3-1$ )**

-0.602  
4.303



No existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100, por lo que la exactitud es correcta.

Conclusión:  $t_{exp} < t_{tablas}$ , se acepta  $H_0$  método verás.

#### 4.1.3. LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD) Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ).

Tabla 10.

Resultados de concentración y las áreas a concentraciones cercanas al límite esperado

Concentración (mg/mL)	Área			Área Media	Desv. Estándar
0.001	59.11563	56.52248	56.11491	57.25	1.628
0.002	103.33426	92.94073	98.9048	98.39	5.216
0.005	249.97479	252.9361	249.97479	250.96	1.710

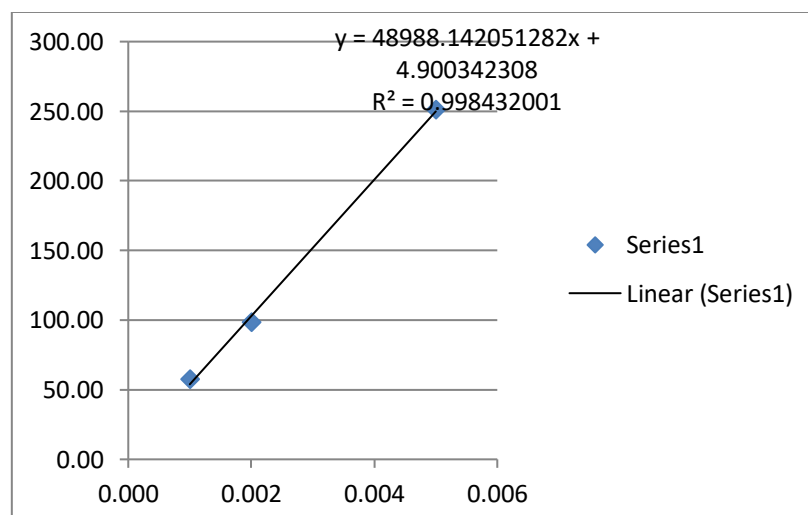


FIGURA 5 Curva de regresión de muestras a concentraciones cercanas al límite.

- Ruido de fondo o background del sistema (Y bl): 4.9003
- Pendiente de la recta cercano al límite de cuantificación (b): 48988.14

Para el cálculo de la desviación estándar de la señal proporcionada por el ruido se debe construir la recta calculada tomando como eje de ordenadas las desviaciones estándar de las respuestas y como el eje de abcisas las concentraciones estudiadas. De esta forma se obtiene una recta de ecuación.

$$Y = -253.9X + 3.528$$

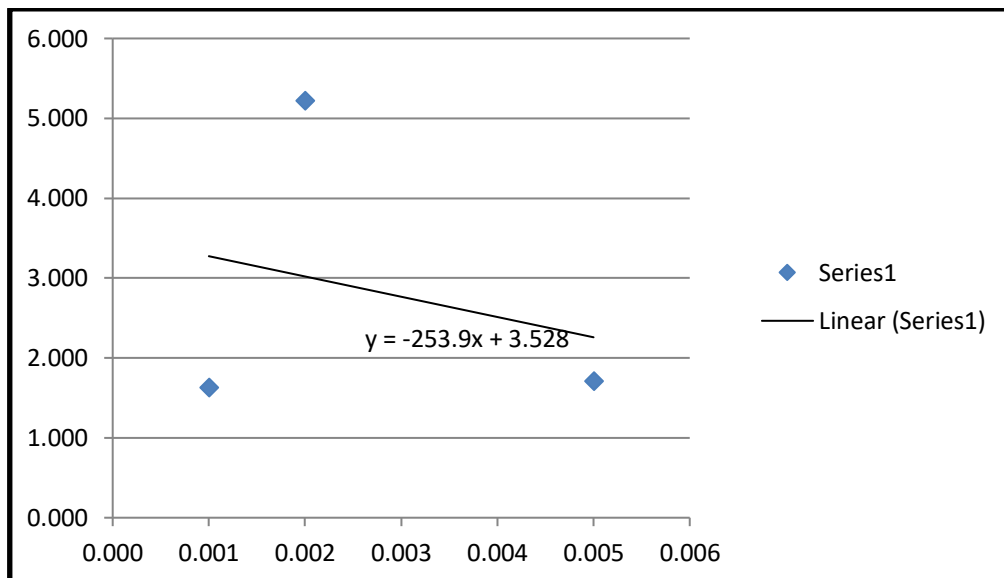


FIGURA 6. Recta de ecuación

Se considera que la desviación estándar de las respuestas corresponderá al valor de la ordenada en el origen de esta recta:

$$S_{bl}: 3.528$$

Cálculo de los Límites Teóricos de Detección y Cuantificación:

**Límite de Detección:**

$$LD (K=3) \quad \frac{CL}{b * \sqrt{n}} = \frac{Y_{bl} + (K * S_{bl})}{b * \sqrt{n}}$$

$$LD (K=3) CL = 0.00018 \text{ mg/mL o } 0.18 \text{ ppm}$$

### Límite de Cuantificación:

$$LC (K=10) \quad \frac{CL}{b * \sqrt{n}} = Y_{bl} + (K * S_{bl})$$

$$LC (K=10) \quad CL = 0.00047 \text{ mg/mL o } 0.47 \text{ ppm}$$

#### 4.1.4. ESPECIFICIDAD

Observando las gráficas que se presentan a continuación se comprueba que no hay interferencias en las matrices analizadas, según los cromatogramas mostrados, se determinó la pureza de pico de la muestra de Clorhidrato de Terbinafina en gel 1%.

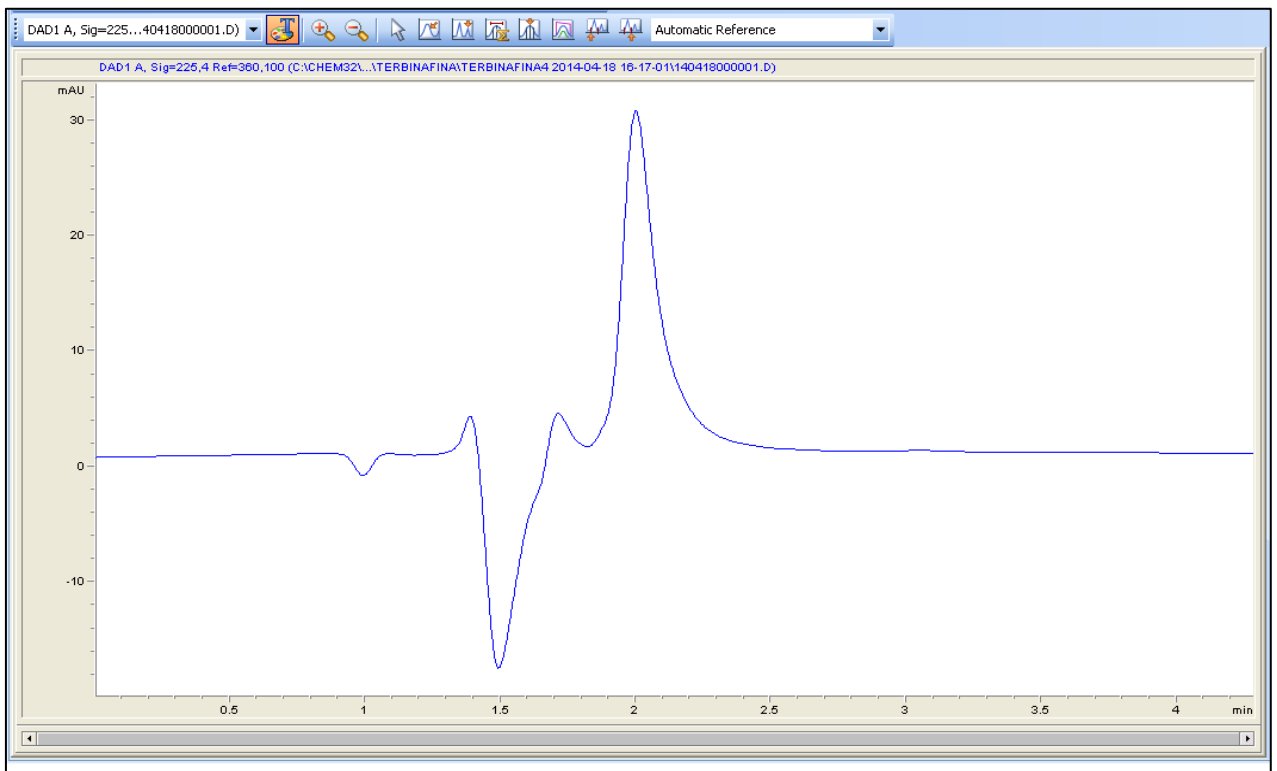


FIGURA 7. Representación cromatográfica del disolvente metanol

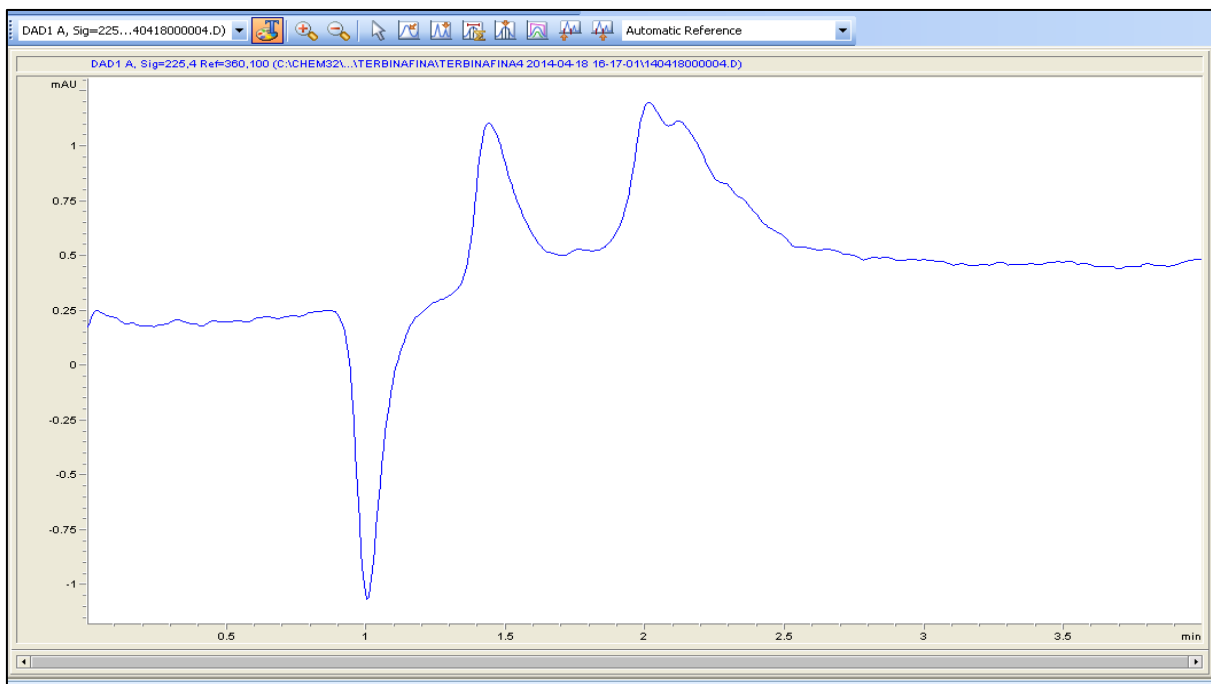


FIGURA 8. Representación cromatográfica de la fase móvil

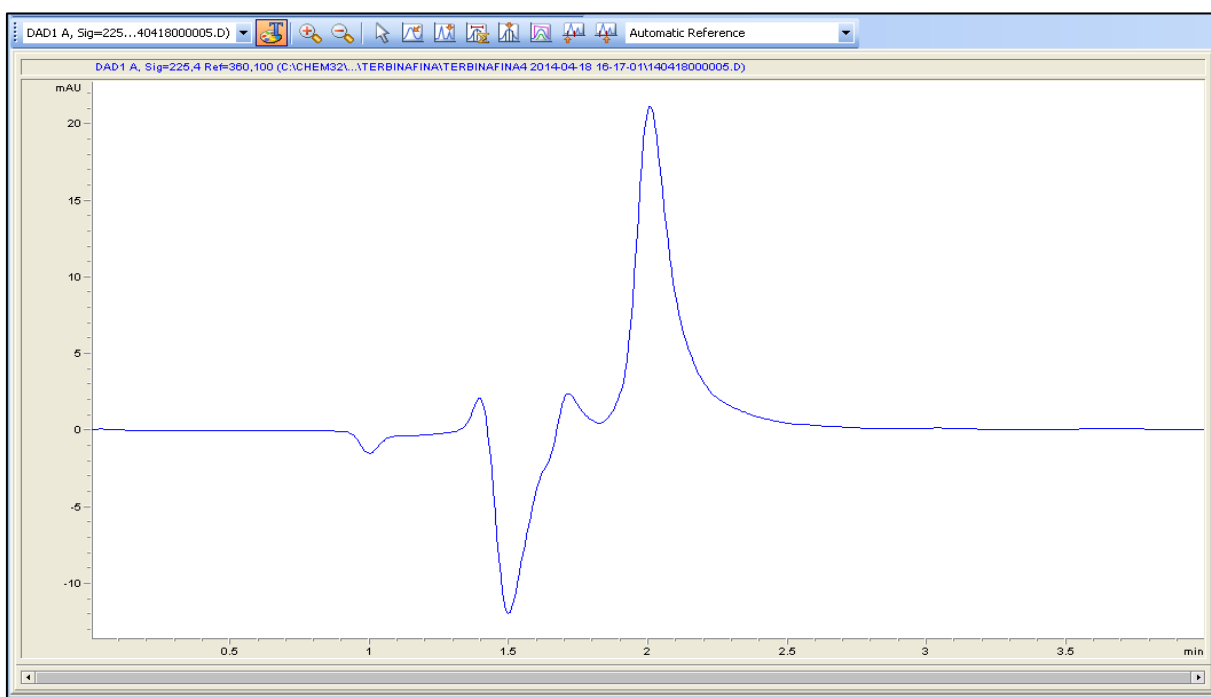


FIGURA 9. Representación cromatográfica fase móvil + disolvente metanol

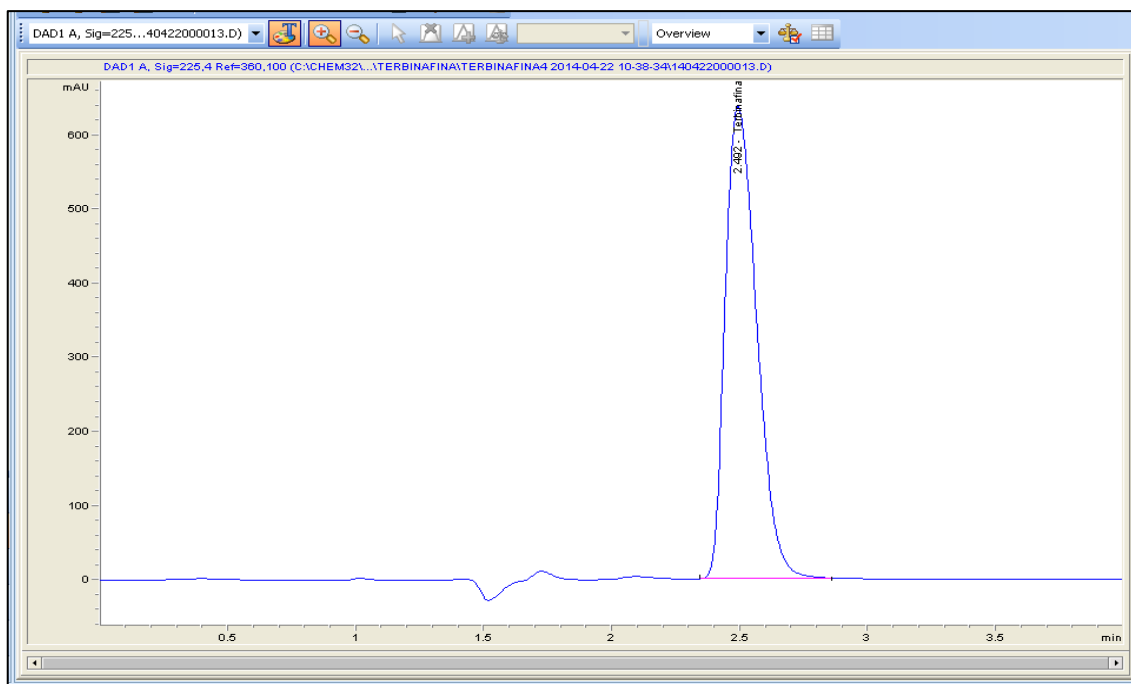


FIGURA 10. Representación cromatográfica del estándar de clorhidrato de Terbinafina 0.03 mg/ml

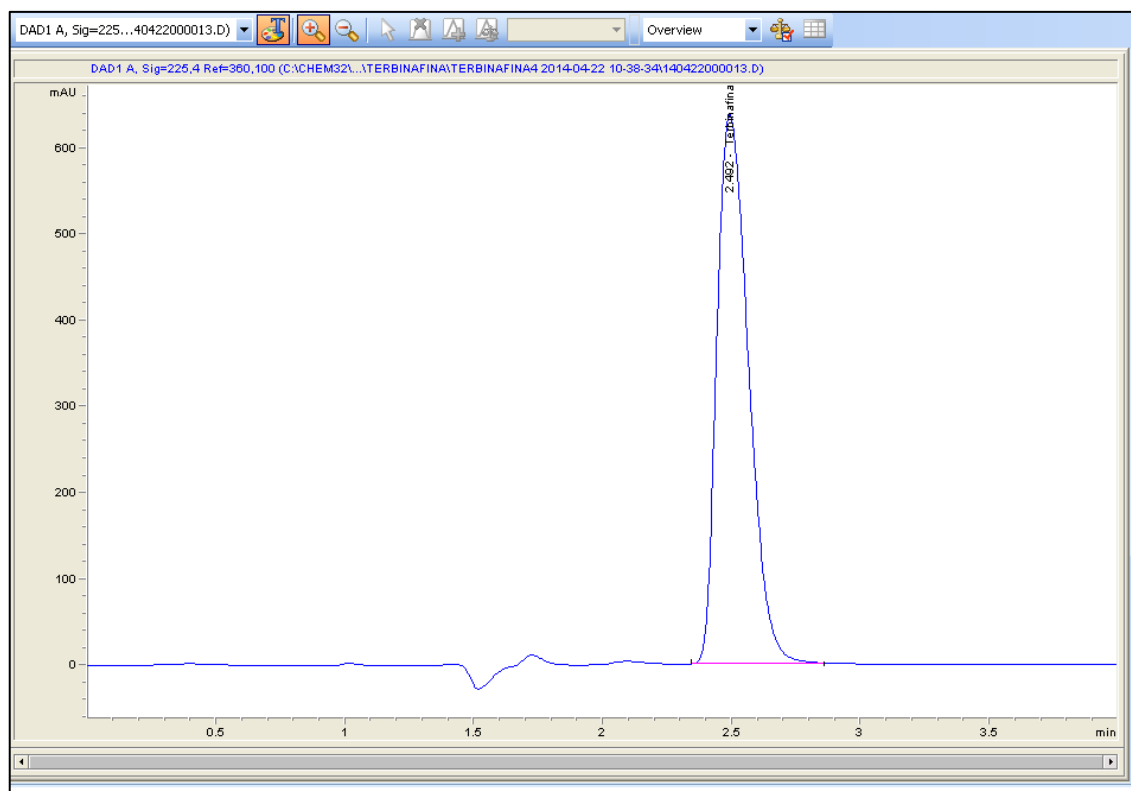


FIGURA 11. Representación cromatográfica de muestra de clorhidrato de Terbinafina 0.03 mg/ml

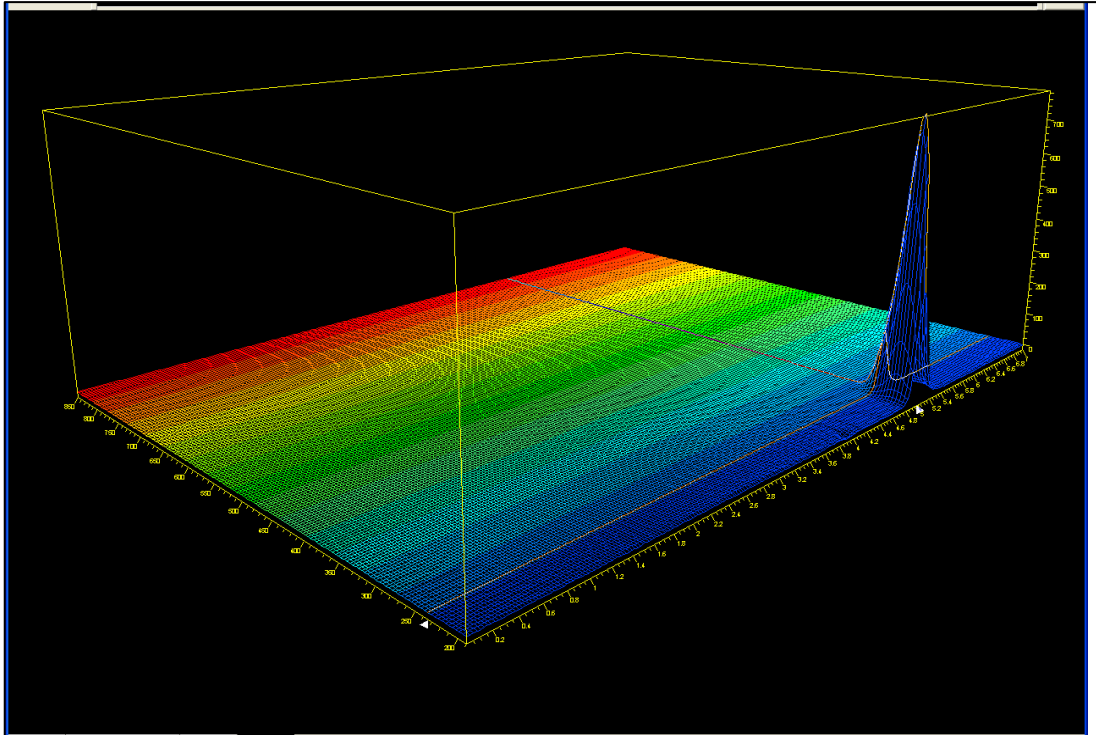


FIGURA 12. Estándar clorhidrato de Terbinafina en 3D

Se aprecia que no hay interferentes.

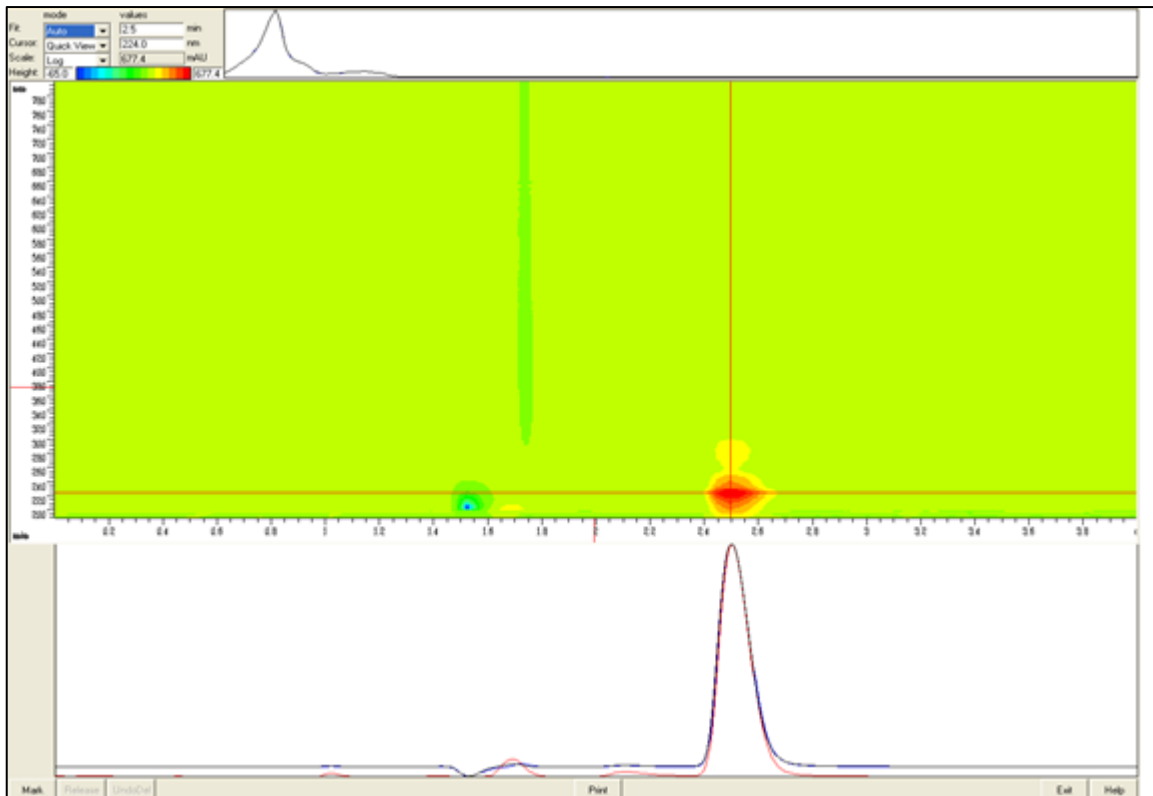


FIGURA 13. Estándar de clorhidrato de Terbinafina en Isoplot (barrido)

Se aprecia que no hay interferentes.

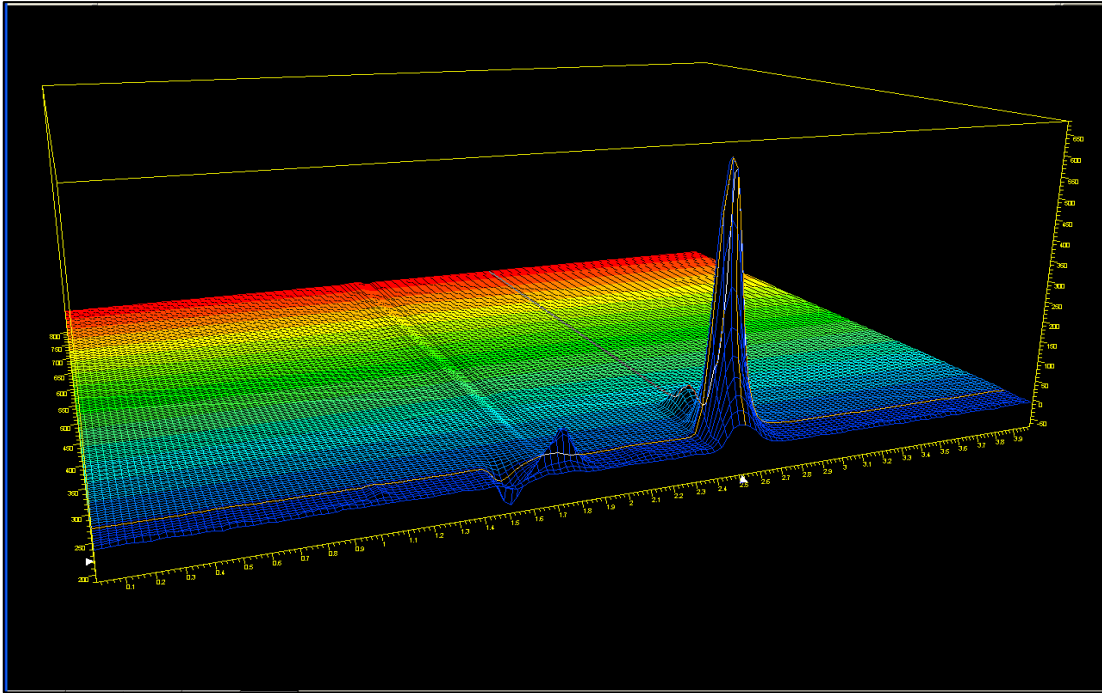


FIGURA 14. Muestra (CLORHIDRATO DE TERBINAFINA AL 1%) EN 3D.  
Se aprecia que no hay interferentes.

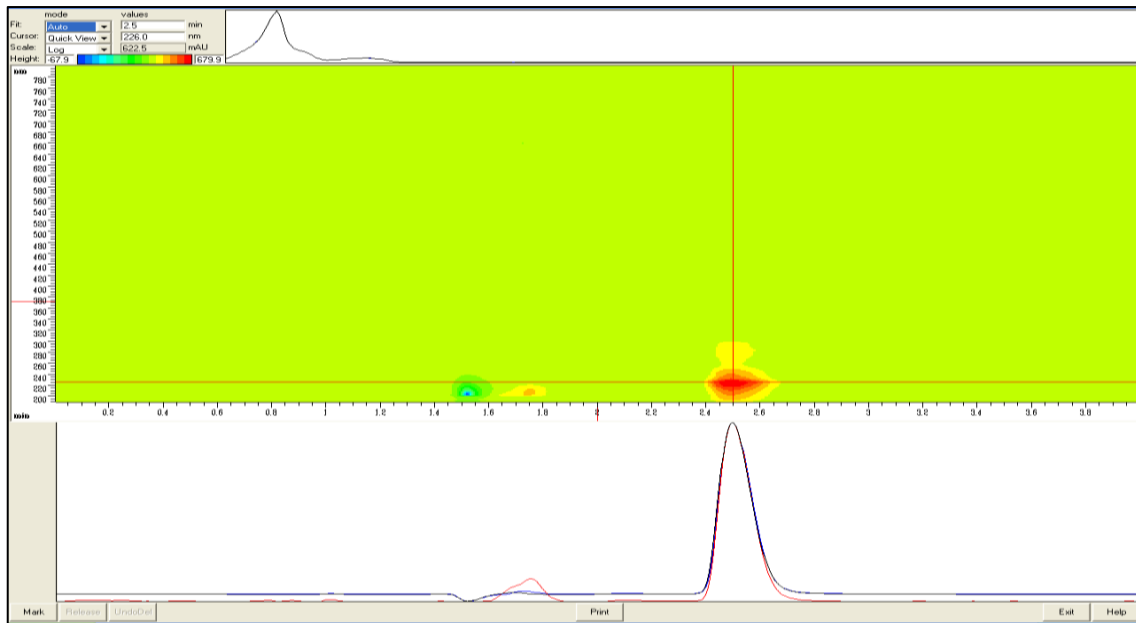


FIGURA 15. Muestra (CLORHIDRATO DE TERBINAFINA AL 1%) EN ISOPLOT (BARRIDO)

Se aprecia que no hay interferentes.

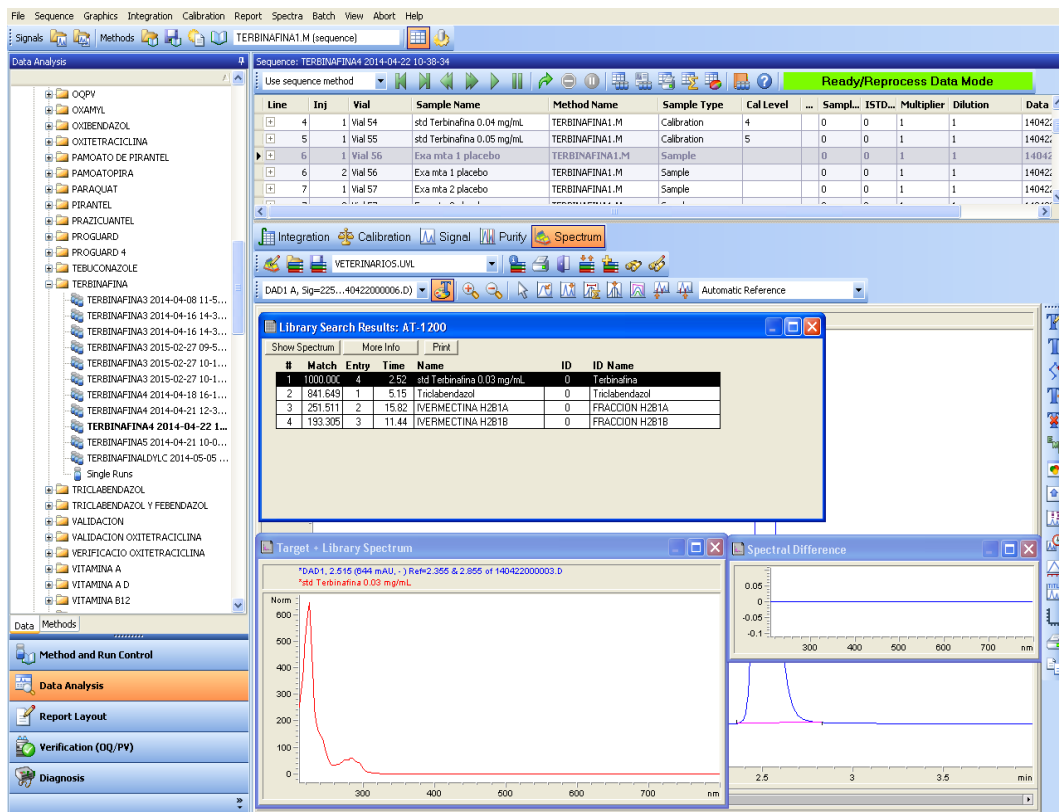


FIGURA 16. Comparación en librería del pico de clorhidrato de Terbinafina en la muestra

Encontrándose una aproximación de 100.00 % de certeza de pico.

- El método es específico para Clorhidrato de Terbinafina en gel.

#### 4.1.5. LINEALIDAD

Para evaluar la linealidad de la curva de calibración se aplicó el criterio de aceptación recomendable para el coeficiente de correlación para los métodos de análisis de medicamentos  $r > 0.99$  y para el coeficiente de determinación  $r^2 > 0.995$ .

La distribución aleatoria de los valores residuales alrededor de la línea recta confirma la linealidad. Tendencias sistemáticas de los residuales indican no-linealidad. Se probó la existencia de regresión lineal de la señal sobre la concentración mediante el análisis de varianza de la regresión.



Tabla 11.

Resultados de concentración y los factores de respuesta en linealidad.

Concentración teórica (mg/mL)	Concentración Clorhidrato de Terbinafina (mg/ml)	Factor Respuesta (y)	xy	x <sup>2</sup>	y <sup>2</sup>	f= (y/x)
0.01	0.009790	470.8230	4.60945	0.000096	221674.3	48091.253
0.01	0.009790	471.4783	4.61587	0.000096	222291.8	48158.188
0.01	0.009790	469.6132	4.59761	0.000096	220536.6	47967.683
0.02	0.019580	949.1848	18.58542	0.000383	900951.7	48476.271
0.02	0.019580	949.1219	18.58419	0.000383	900832.3	48473.058
0.02	0.019580	946.5158	18.53316	0.000383	895892.2	48339.965
0.03	0.029371	1400.1525	41.12332	0.000863	1960427.2	47671.908
0.03	0.029371	1395.9805	41.00078	0.000863	1948761.5	47529.859
0.03	0.029371	1393.6093	40.93114	0.000863	1942146.8	47449.124
0.04	0.039161	1865.4321	73.05181	0.001534	3479836.7	47635.187
0.04	0.039161	1855.7520	72.67273	0.001534	3443815.6	47388.001
0.04	0.039161	1853.7314	72.59361	0.001534	3436320.3	47336.404
0.05	0.048951	2352.4664	115.15558	0.002396	5534098.1	48057.576
0.05	0.048951	2345.3958	114.80947	0.002396	5500881.6	47913.134
0.05	0.048951	2340.0934	114.54991	0.002396	5476037.2	47804.814
Promedio						
f						47886.16
Sf						381.28
CV o RSD						0.796

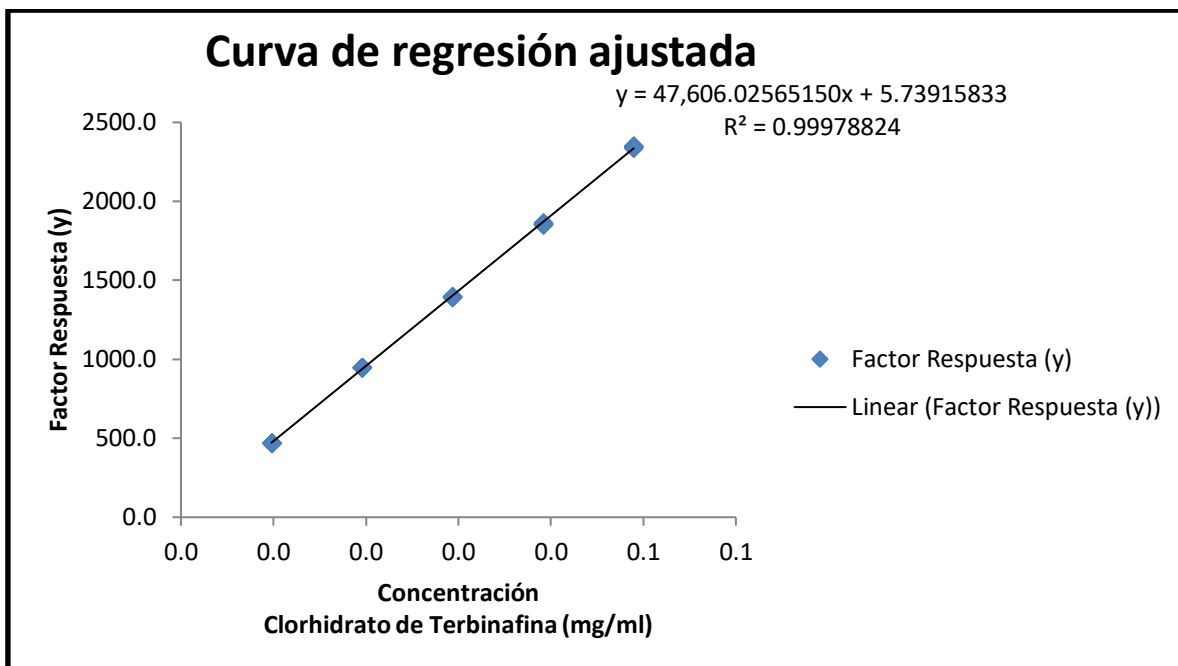


FIGURA 17. Curva de regresión de estándares para demostrar la linealidad

**Ecuación Lineal:**

$$Y = bX + a$$

$Y =$	$47606.02565$	$X$	$-$	$5.739158333$
-------	---------------	-----	-----	---------------

**Coefficiente de Regresión**

$(r) = 0.999894113417259$

**Coefficiente de determinación**

$(r^2) = 0.999788238046486$

**Verificación de la Linealidad**

1. El CV o RSD de los factores de respuesta ( $f=y/X$ ) debe ser menor al 2 % (test de verificación de la pendiente o de linealidad)
2. Análisis de varianza:

**a) Test de Cochran:**

$G_{exp} < G_{tablas}$  significa que las variancias de las concentraciones son homogéneas, es decir que el factor de concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

Tabla 12.

Resultados de los promedios de los factores de respuesta y de la variancia para linealidad (TEST DE COCHRAN)

Promedio	Desv. Estándar	Varianza (S <sup>2</sup> )
48072.375	96.6455	9340.34679
48429.765	77.7855	6050.58039
47550.297	112.7894	12721.44801
47453.198	159.7055	25505.83700
47925.175	126.8106	16080.91983
	Suma	69699.13202
	$G_{exp}$	0.37
%	$G_{tablas}(\alpha=0.05, K=5, n=3)$	0.5981

**b) Normalidad de los Residuales**

Si  $F_{exp} > F_{tablas}$  entonces demuestra la existencia de una pendiente distinta de 0.

Tabla 13.

Análisis de Varianza

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	6516707.60	6516707.60	61376.6867	2.84889E-25
	3	1380.28302	106.175617	9	
Residuos	13	6518087.88		2	
Total	14	6			

Valor F tablas                      19.247

Valor F exp                         61376.68679

**c) Homocedasticidad:**

La distribución de los puntos en el gráfico de los Residuales (Variancia residual constante) o de Homocedasticidad es aleatoria y no refleja ninguna tendencia

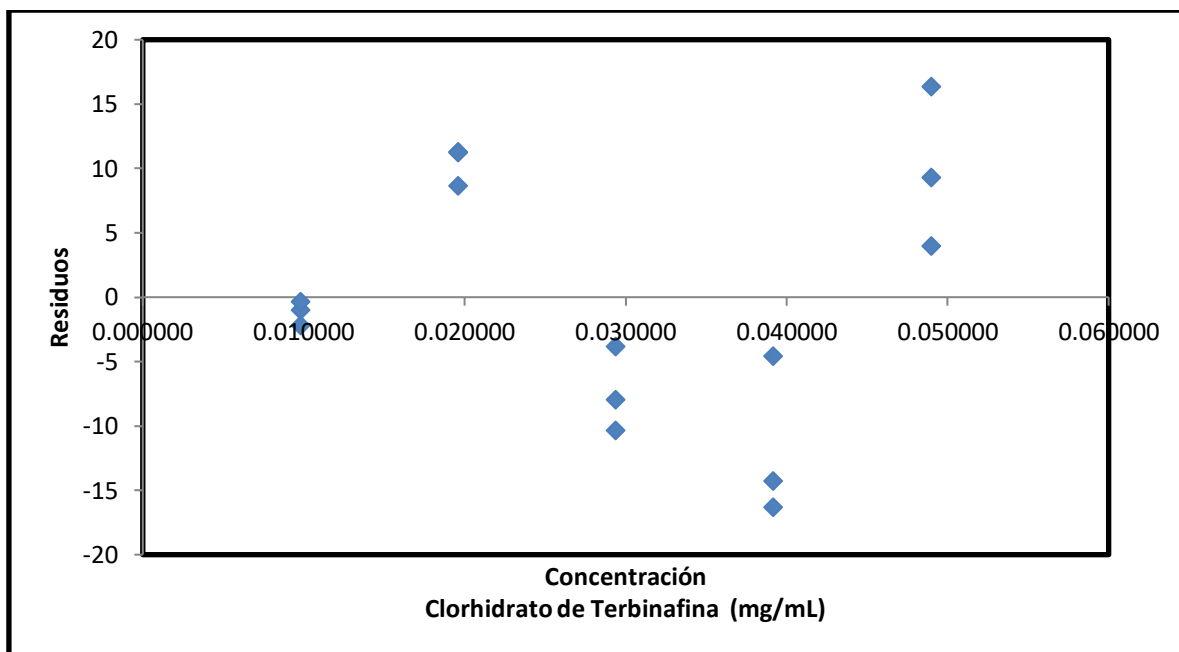


FIGURA 18. Gráfico de los residuales

**d) Significación estadística de la desviación estándar de la pendiente**

Cumple con el test de Student de la pendiente o linealidad ya que  $t_{exp} > t_{tablas}$ .

S2b	36924.99216
s2 y.x	106.1756172
Sb	192.1587681
Sb rel (%)	0.403643794 < 2 %

<b>Test de t</b>	$t_{exp} > t_{tablas}$
t exp	247.7431872
t tablas( $\alpha=0.05$ , GL15-2)	2.16

**Intervalos de Confianza**

Intervalos de confianza	$\frac{48021.15943}{47606.026} \pm \frac{415.1337797}{47606.026}$
	Sup 95%
	Inf 95%

Este intervalo no incluye el cero

**e) Test de Verificación de la Variable Independiente o de Proporcionalidad**

Sa	6.239475911
S2a	38.93105965
s2 y.x	106.1756172
Sa rel (%)	108.7176124

<b>Test de t</b>	$t_{exp} < t_{tablas}$
t exp	0.9198
t tablas( $\alpha=0.05$ , GL15-2)	2.16

Cumple con el test de Student de la variable independiente por ser  $t_{exp} < t_{tablas}$

**Intervalos de Confianza**

Intervalos de confianza	19.21872652 Sup 95%
-------------------------	---------------------

$$5.7391583 \pm 13.47956819 \quad -7.740409858 \text{ Inf } 95\%$$

Intervalos de confianza para termino independiente este intervalo incluye el cero.

#### 4.1.6. RANGO DE TRABAJO

El rango de trabajo determinado para el método en estudio es desde el límite de detección del método (LD = 0.00018 mg/mL o 0.18 ppm) hasta 0.05 mg/mL que es el máximo nivel de concentración para el cuál se ha demostrado linealidad

#### 4.2. RESUMEN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

Los valores obtenidos para los parámetros de validación se resumen en la tabla N° 14, los cromatogramas y resultados se adjuntan al presente informe.

Tabla 14.

Resumen de parámetros de validación

Parámetro de validación	Criterio de aceptación	Resultado
Precisión	% RSD <2.68 Repetibilidad (Horwitz) % RSD <4.00 Precisión Intermedia (Horwitz)	% RSD = 0.926 (repetibilidad) %RSD = 0.940 (Precisión Intermedia) Cumple
Exactitud	97-103%	100.41 % Cumple
Límite de Detección	-	0.0018 mg/ml o 0.18 ppm
Límite de Cuantificación	-	0.00047 mg/ml ó 0.47 ppm
Especificidad	No se muestran interferencias con el principio activo.	No hay interferencias.
Linealidad	$r > 0.990$ $r^2 > 0.995$	0.99989 0.99978 Cumple
Rango de trabajo	-	0.0018 mg/ml – 0.05 mg/ml

Tabla 15.

PRUEBA DE HIPÓTESIS

Parámetro de validación	Criterio de aceptación	Evaluación	Prueba de hipótesis	Prueba estadística	Resultado	Conclusión
<b>Precisión</b>	97-103%	Analista 1 : 100,5%  Analista 2 : 100,0%	Ho: Las medias de los analistas son iguales. Ha: Al menos una de las medias de los analistas es diferente.  Nivel de Significación: 95%	% RSD <2.68 Repetibilidad (Horwitz) % RSD <4.00 Precisión Intermedia (Horwitz)	% RSD = 0.926 (repetibilidad) %RSD = 0.940 (Precisión Intermedia)	%RSD exp Analistas < % RSD Horwitz Cumple
<b>Exactitud</b>	97-103%	100.41 %	Ho Media de las mediciones igual a 100 Ha Media < 100 Con alpha a un valor de 0.05	t tablas= ( $\alpha=0,05$ ; gl=3-1)=4,303	t exp=-0,602	t exp < t tablas, se acepta Ho Cumple
<b>Límite de Detección</b>	-	-	-	-	0.0018 mg/ml o 0.18 ppm	Cumple
<b>Límite de Cuantificación</b>	-	-	-	-	0.00047 mg/ml ó 0.47 ppm	Cumple
<b>Especificidad</b>	No hay interferencias	Observación	-			No se encontraron interferencias. Cumple
<b>Linealidad</b>	-	-	-	R mínimo :0,99 R <sup>2</sup> mínimo :0.995	R mínimo =0,999894 R <sup>2</sup> mínimo :0.999788	Cumple
<b>Rango de trabajo</b>	-	-	-	-	0.0018 mg/ml – 0.05 mg/ml	Cumple

### 4.3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la evaluación de la repetibilidad los resultados fueron satisfactorios dado que el valor de RSD calculados a partir de la ecuación de Horwitz fue 0.96% que es menor a 2.68% el cual es el valor máximo aceptado (26) , se demuestra así que con el método analítico logramos resultados reproducibles efectuando los análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas.

Para la precisión intermedia se obtuvieron también resultados satisfactorios dado que el valor de RSD calculado a partir de la ecuación de Horwitz fue 0.94% que es menor a 4% el cual es valor máximo aceptado (26). Se comprobó que no hay diferencias significativas desde el punto de vista estadístico entre los resultados obtenidos realizando los análisis en diferentes condiciones operativas

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado, el valor del porcentaje promedio de la muestra recuperada fue 100.411% que se encuentra dentro de la especificación establecida (97% - 103%) (26). Empleando la prueba del test de student con muestras fortificadas se obtuvo que el test experimental es menor que el test de tablas (Ver anexo 2), se considera con esto que los errores sistemáticos no fueron significativos, con lo que se demuestra la exactitud del método analítico.

Para el cálculo de límite de detección del método analítico, se obtuvo el valor de 0.18 ppm que es la cantidad mínima del analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar, al ser detectable no se daría como resultado un falso positivo. . En el caso del límite de cuantificación se obtuvo el valor de 0.47 ppm que es la cantidad mínima del analito presente en la muestra que se puede cuantificar con un adecuada precisión y exactitud. El método por lo tanto es capaz de detectar la concentración límite y sus superiores.(26)



En el método analítico se obtuvo picos cromatográficos de Clorhidrato de Terbinafina con tiempos de retención similares para la muestra y el estándar, por lo tanto el método es específico. Se revisaron visualmente los espectros en 3D e isoplot, tanto del estándar como de la muestra, y como resultado, no se aprecia ninguna interferencia en ambos espectros; la pureza de pico demostró que sólo se le puede atribuir al analito en cuestión como Clorhidrato de Terbinafina, demostrándose su especificidad.(26)

En la evaluación de la curva de calibración se obtuvo como coeficiente de correlación  $r = 0.99989$ , siendo el valor mínimo aceptado 0.99 y el coeficiente de determinación dio como resultado 0.99978 siendo el valor mínimo aceptado 0.995 (26), lo que indica que existe una proporcionalidad entre las concentraciones y las respuestas obtenidas, es decir el sistema conserva la linealidad esperada. Aplicando el test de Cochran se comprobó que el factor de concentración no influye en la variabilidad de resultados obteniéndose un  $G$  experimental = 0.37 menor al  $G$  tablas = 0.68 (Ver anexo 4). El análisis estadístico de regresión dio como resultado  $F$  experimental = 61376.68679 mayor a  $F$  tablas = 19.247 demostrando que el modelo lineal proporciona un buen ajuste de datos. Aplicando el test de Student para la pendiente se obtuvo un  $t$  experimental = 247.743 mayor al  $t$  tablas = 2.16 y para la variable independiente un  $t$  experimental = 0.9198 que es menor al  $t$  tablas = 2.16 (ver anexo 2), el valor estadísticamente es igual a cero es decir este intervalo de confianza de intercepto incluye a cero. La linealidad queda demostrada para el rango de 0,010 a 0,05 mg/mL y el rango de trabajo es desde el límite de detección del método (0.00018 mg/mL) hasta 0.05 mg/mL que el nivel máximo de concentración para el cual se ha demostrado linealidad.(26)

## **CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **5.1. CONCLUSIONES**

1. El método analítico para la valoración de Clorhidrato de Terbinafina en gel 1% por Cromatografía Líquida de Alta Performance (H.P.L.C.) cumple con la prueba de validación realizada.
2. Todos los parámetros del estudio de validación del método analítico para la determinación de Clorhidrato de Terbinafina, repetibilidad, precisión intermedia, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, especificidad, linealidad y rango, cumplen con los criterios establecidos de validación de la determinación de Clorhidrato de Terbinafina en gel 1% por Cromatografía Líquida de Alta Performance (H.P.L.C.).
3. Con los resultados obtenidos se demostró la confiabilidad de la validación del método analítico.

## 5.2. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda seguir los pasos establecidos, según la validación de este método, el cual presenta de forma detallada el desarrollo, para que los resultados sean reproducibles.
2. La validación de métodos analíticos, debe ser considerada y aplicada en todas las labores de análisis en los laboratorios farmacéuticos, para la obtención de resultados confiables.
3. Cada vez que se realice una validación, es recomendable revisar el método analítico utilizado en el laboratorio si ya existe o revisar toda la información bibliográfica para el principio activo que se validará.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adalid J, Alavedra M, Amela J, Aparici M, Beaus R, Beaus R. Cualificación y validación. 1ª ed. Barcelona: Romagraf; 2007.
2. The United States Pharmacopeial Convention. Farmacopea de los Estados Unidos de América 40 th ed, Formulario Nacional 33 th ed. Estados Unidos de América ;2016.
3. International Conference on Harmonisation Tripartite. Guideline validation of analytical procedures: Q2(R1) Validation of analytical procedures: Text methodology. [Consultado: 04 de Agosto del 2016]. Disponible en: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf)
4. Ministerio de Salud, Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas DIGEMID. Manual de Buenas Prácticas de Manufactura. Perú. 1999.
5. Organización Mundial de la Salud. Buenas Prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos. Ginebra: Organización Mundial de la Salud. 2010. Anexo 1. Serie de informes técnicos de la OMS, No. 957,2010.
6. Norma Técnica Peruana NTP-ISO/IEC 17025 2001. Requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración. Perú: Indecopi; 2001.
7. Cornelio J., Azaña Y. Desarrollo y validación de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para cuantificar Clonixinato de Lisina 125 mg y Pargeverina Clorhidrato 10 mg en tabletas recubiertas. [Tesis] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007.
8. Medina J., Berrocal J. Validación de método analítico de valoración de naproxeno sódico 550 mg. Tableta por cromatografía líquida de alta

- performance. [Tesis] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2008.
9. Leyva E., Cáceres F. Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación por HPLC de Clombuterol Clorhidrato en solución oral-gotas, y análisis comparativo de productos comercializados en Perú. [Tesis] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2009.
  10. Mayorga G, Del Castillo C. Validación de una técnica de análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para cuantificar norfloxacin y fenazopiridina clorhidrato en cápsulas orales. [Tesis] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2010.
  11. Zavala C., Validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para cuantificación de amoxicilina y ácido Clavulánico en tabletas recubiertas. [Tesis] Trujillo : Universidad Nacional de Trujillo; 2012.
  12. Vega E. Validación del método analítico por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para la valoración de Rutina Trihidrato en un medicamento hepatoprotector. [Tesis] Trujillo; 2013.
  13. Canchero D. Desarrollo y validación de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta resolución para cuantificar bencigluconato en tabletas de 800 mg de *Lepidium peruvianum* Chacón sp.” [Tesis] Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonia Peruana ; 2013.
  14. Heer E. Validación de metodología analítica para la cuantificación de Sibutamina Clorhidrato monohidrato en tabletas de 15 mg. [Tesis] Guatemala: Universidad San Carlos de Guatemala; 2009.
  15. Vallejo F. Validación de la metodología analítica de cuantificación de Clorfenamina Maleato, Dextrometorfano Bromohidrato, Fenilefrina Clorhidrato y Guaifenesina en dos jarabes comerciales por cromatografía

- líquida de alta resolución. [Tesis] Guatemala: Universidad San Carlos de Guatemala; 2009.
16. Berrío M. Trujillo M. Desarrollo y validación de una metodología analítica por HPLC-DAD para la cuantificación de Warfarina Sódica en una preparación extemporánea. [Revista en línea] 2013 Mayo [Consultado: 27 de Octubre del 2016]; 42(1). Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v42n1/v42n1a08.pdf>
  17. Velastegui J. Validación del método analítico de valoración de Amoxicilina en polvo para suspensión oral producido por Betapharma S.A. Mediante HPLC. [Tesis] Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2011.
  18. Montaña M. Determinación, cuantificación y comparación de la concentración de vitamina C en naranja (*citrus aurantium*), limón (*citrus aurantifolia*) y mandarina (*citrus reticulata*) por HPLC. [Tesis] Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador; 2011.
  19. Álvarez A., Trujillo M. Desarrollo y validación de un método analítico indicativo de estabilidad por HPLC para la cuantificación de Rosuvastatina cálcica. [Revista en línea] 2014 Mayo [Consultado: 27 de Octubre del 2016]; 43(1). Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v43n1/v43n1a05.pdf>
  20. Arias L. Validación de un método analítico para la cuantificación de vitamina A en alimentos, por cromatografía líquida de alta resolución y su determinación en Guayaba Fresa (*Psidium cattleianum sabine*). [Tesis] Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; 2014.
  21. Vizúete S. Validación de la técnica de cuantificación de vitamina B1 por el método de HPLC en harina de trigo fortificada. [Tesis] Quito: Universidad Central del Ecuador; 2015.

22. Decreto Supremo 016-2011-SA Reglamento para el registro, control y vigilancia sanitaria de productos farmacéuticos, dispositivos médicos y productos sanitarios (27-072011)
23. Norma Internacional ISO 9001:2008 Sistemas de gestión de la calidad: Requisitos = Quality management systems: Requirements 4ta ed. Suiza, Secretaría Central de ISO, 2008.
24. Salazar R, editor. Cualificación y validación. 1a ed, Barcelona: Romargraft; 2007.
25. Morales de la C. Desarrollo y Validación de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para enalapril 10 mg tabletas recubiertas. [Tesis] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2004.
26. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), Validación de Métodos Analíticos, Madrid: Gráficas Gispert , 2001.
27. Holler F, Nieman, Skoog D. Principios de análisis instrumental. 5ª ed. Madrid: Mc Graw Hill; 2001.
28. Rouessac F , Rouessac A . Análisis químico, métodos y técnicas instrumentales modernas. 5ta ed. Madrid: Mc Graw Hill; 2003.
29. Skoog D. Análisis Instrumental. Ediciones MC Graw-Hill/ Interamericana 4ta ed. Madrid; 1994.
30. Flores J. Farmacología Humana. 3ª ed. Barcelona: Masson; 1997
31. Katzung B, Masters S, Trevor A. Farmacología básica y clínica. 12ª ed. Mexico D.F. : Mc Graw Hill; 2010.

# **ANEXOS**



## ANEXO N°1: CONSTANCIA DE VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO.

### CONSTANCIA DE VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO

Yo, Daniel Eduardo Echevarría Rodríguez-Sawao, Químico farmacéutico ejerciendo actualmente como especialista químico en SENASA Unidad del Centro de Control de Insumos y Residuos Tóxicos, especialista en investigación de metodologías analíticas, docente en la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, hago constar que he revisado, con fines de validación el instrumento "Tablas Excel para la validación de métodos analíticos". Luego de hacer las evaluaciones pertinentes puedo dar validez del mismo.

Lima, 25 de noviembre del 2016.

  
DANIEL EDUARDO ECHEVARRÍA RODRÍGUEZ-SAWAO  
QUÍMICO FARMACÉUTICO Y BIOQUÍMICO  
C.O.F.P. 08943

Daniel Eduardo Echevarría Rodríguez-Sawao

### CONSTANCIA DE VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO

Yo, María Arellán Meza, Químico Farmacéutico, ejerciendo actualmente el cargo de Jefe del área de Estabilidades del Laboratorio AC Farma S.A. hago constar que he revisado , con fines de validación , el instrumento " Tablas excel para la validación de métodos analíticos". Luego de hacer las evaluaciones pertinentes puedo dar validez del mismo.

Lima, 10 de Marzo del 2017

 Laboratorios  
**AC FARMA S.A.**

  
-----  
**QF. MARÍA ARELLAN MEZA**  
**JEFE DE ESTABILIDAD**  
**C.Q.F.D.L.: 09378**

Firma del validador

**ANEXO N°2: DISTRIBUCIÓN DE T DE STUDENT. ÁREA DE COLA BILATERAL EN FUNCIÓN DE LOS GRADOS DE LIBERTAD DE LA DISTRIBUCIÓN.**

v	$\alpha$							
	0.50	0.20	0.10	0.05	0.02	0.01	0.002	0.001
1	1.000	3.078	6.314	12.706	31.821	63.656	318.289	636.578
2	0.816	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	22.328	31.600
3	0.765	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.214	12.924
4	0.741	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173	8.610
5	0.727	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	5.894	6.869
6	0.718	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208	5.959
7	0.711	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.785	5.408
8	0.706	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	4.501	5.041
9	0.703	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.297	4.781
10	0.700	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.144	4.587
11	0.697	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.025	4.437
12	0.695	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.930	4.318
13	0.694	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.852	4.221
14	0.692	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.787	4.140
15	0.691	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.733	4.073
16	0.690	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.686	4.015
17	0.689	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.646	3.965
18	0.688	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.610	3.922
19	0.688	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.579	3.883
20	0.687	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.552	3.850
21	0.686	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.527	3.819
22	0.686	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.505	3.792
23	0.685	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.485	3.768
24	0.685	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.467	3.745
25	0.684	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.450	3.725
26	0.684	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.435	3.707
27	0.684	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.421	3.689
28	0.683	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.408	3.674
29	0.683	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.396	3.660
30	0.683	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.385	3.646
40	0.681	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.307	3.551
50	0.679	1.299	1.676	2.009	2.403	2.678	3.261	3.496
60	0.679	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.232	3.460
70	0.678	1.294	1.667	1.994	2.381	2.648	3.211	3.435
80	0.678	1.292	1.664	1.990	2.374	2.639	3.195	3.416
90	0.677	1.291	1.662	1.987	2.368	2.632	3.183	3.402
100	0.677	1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	3.174	3.390
$\infty$	0.675	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.090	3.290

**ANEXO N°3: DISTRIBUCIÓN DE F DE SNEDECOR. VALORES QUE DEJAN UN ÁREA DE COLA DE 0,05 EN FUNCIÓN A LOS GRADOS DE LIBERTAD DE LA DISTRIBUCIÓN.**

$v_2$	$v_1$														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	20	30	40	50	100
1	161.446	199.499	215.707	224.583	230.160	233.988	236.767	238.884	240.543	241.862	248.016	250.096	251.144	251.774	253.043
2	18.513	19.000	19.164	19.247	19.296	19.329	19.353	19.371	19.385	19.396	19.446	19.463	19.471	19.476	19.486
3	10.128	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.785	8.660	8.617	8.594	8.581	8.554
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.803	5.746	5.717	5.699	5.664
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.558	4.496	4.464	4.444	4.405
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	3.874	3.808	3.774	3.754	3.712
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.445	3.376	3.340	3.319	3.275
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.688	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.150	3.079	3.043	3.020	2.975
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	2.936	2.864	2.826	2.803	2.756
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.774	2.700	2.661	2.637	2.588
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.124	2.039	1.994	1.966	1.907
30	4.171	3.316	2.922	2.690	2.534	2.421	2.334	2.266	2.211	2.165	1.932	1.841	1.792	1.761	1.695
40	4.085	3.232	2.839	2.606	2.449	2.336	2.249	2.180	2.124	2.077	1.839	1.744	1.693	1.660	1.589
50	4.034	3.183	2.790	2.557	2.400	2.286	2.199	2.130	2.073	2.026	1.784	1.687	1.634	1.599	1.525
100	3.936	3.087	2.696	2.463	2.305	2.191	2.103	2.032	1.975	1.927	1.676	1.573	1.515	1.477	1.392

**ANEXO N°4: NIVEL DE SIGNIFICACIÓN DE LA PRUEBA DE COCHRAN  
( $\alpha=0,05$ )**

v	k (n° de grupos)												
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	30
1	0.9985	0.9669	0.9065	0.8412	0.7808	0.7271	0.6798	0.6385	0.6020	0.5410	0.4709	0.3894	0.2929
2	0.9750	0.8709	0.7679	0.6838	0.6161	0.5612	0.5157	0.4775	0.4450	0.3924	0.3346	0.2705	0.1980
3	0.9392	0.7977	0.6841	0.5981	0.5321	0.4800	0.4377	0.4027	0.3733	0.3264	0.2758	0.2205	0.1593
4	0.9057	0.7457	0.6287	0.5441	0.4803	0.4307	0.3910	0.3584	0.3311	0.2880	0.2419	0.1921	0.1377
5	0.8772	0.7071	0.5895	0.5065	0.4447	0.3974	0.3595	0.3286	0.3029	0.2624	0.2195	0.1735	0.1237
6	0.8534	0.6771	0.5598	0.4783	0.4184	0.3726	0.3362	0.3067	0.2823	0.2439	0.2034	0.1602	0.1137
7	0.8332	0.6530	0.5365	0.4564	0.3980	0.3535	0.3185	0.2901	0.2666	0.2299	0.1911	0.1501	0.1061
8	0.8159	0.6333	0.5175	0.4387	0.3817	0.3384	0.3043	0.2768	0.2541	0.2187	0.1815	0.1422	0.1002
9	0.8010	0.6167	0.5017	0.4241	0.3682	0.3259	0.2926	0.2659	0.2439	0.2098	0.1736	0.1357	0.0658
10	0.7880	0.6025	0.4884	0.4118	0.3568	0.3154	0.2829	0.2568	0.2353	0.2020	0.1671	0.1303	0.0921
16	0.7341	0.5466	0.4366	0.3645	0.3135	0.2756	0.2462	0.2226	0.2032	0.1737	0.1429	0.1108	0.0771
36	0.6602	0.4748	0.3720	0.3066	0.2612	0.2278	0.2022	0.1820	0.1655	0.1403	0.1144	0.0879	0.0604
144	0.5813	0.4031	0.3093	0.2513	0.2119	0.1833	0.1616	0.1446	0.1308	0.1100	0.0889	0.0675	0.0457
$\infty$	0.5000	0.3333	0.2500	0.2000	0.1667	0.1429	0.1250	0.1111	0.1000	0.0833	0.0667	0.0500	0.0333

## ANEXO N°5: ABREVIATURAS

<b>a</b>	Término independiente de la recta de regresión
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>AOAC</b>	Asociación de Comunidades Analíticas
<b>b</b>	Pendiente de la recta de regresión o curva de calibración
<b>BP</b>	Farmacopea Británica
<b>BPL</b>	Buenas Prácticas de Laboratorio
<b>BPM</b>	Buenas Prácticas de Manufactura
<b>C<sub>c</sub></b>	Concentración conocida añadida
<b>CL</b>	Cálculo de los límites
<b>C<sub>r</sub></b>	Concentración recuperada
<b>CV(CV%)</b>	Coefficiente de variación
<b>DAD</b>	Detector de arreglo de diodos
<b>DCA</b>	Diseño complementario aleatorio
<b>DIGEMID</b>	Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas
<b>DQ</b>	Calificación de diseño
<b>exp</b>	Experimental
<b>f</b>	Factor de respuesta
<b>FN</b>	Formulario Nacional
<b>G</b>	Test estadístico de la prueba de homogeneidad de varianza de Cochran
<b>g</b>	Gramo
<b>gl</b>	Grados de libertad
<b>Ha</b>	Hipótesis alternativa
<b>Ho</b>	Hipótesis nula
<b>H.P.L.C.</b>	Cromatografía Líquida de Alta Performance <sup>2</sup>
<b>IC</b>	Intervalo de confianza
<b>ICH</b>	International Conference on Harmonisation
<b>IEC</b>	Comisión Electrotécnica Internacional
<b>IQ</b>	Calificación de Instalación
<b>ISO</b>	International Organization for Standardization
<b>K</b>	Número de grupos
<b>LC</b>	Límite de cuantificación

<b>LD</b>	Límite de detección
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milimetro
<b>n</b>	Tamaño de la muestra
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>OQ</b>	Calificación de la operación
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>POE</b>	Procedimiento Operativo Estándar
<b>ppm</b>	Parte por millón
<b>PQ</b>	Calificación de desempeño
<b>r</b>	Coefficiente de correlación
<b>r<sup>2</sup></b>	Coefficiente de determinación
<b>RSD</b>	Desviación estándar relativa
<b>Sbl</b>	Desviación estándar del blanco
<b>t</b>	Test estadístico de Student
<b>uL</b>	Microlitros
<b>USP</b>	Farmacopea de los Estados Unidos
<b>UV</b>	Ultra Violeta
<b>x</b>	Variable independiente (valor nominal)
<b>y</b>	Variable dependiente (valor experimental)
<b>µm</b>	Micrómetro
<b>%R</b>	Porcentaje de recuperación