



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

VERIFICACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA
CUANTIFICACIÓN DEL ANTITUSÍGENO DEXTROMETORFANO
BROMHIDRATO 15mg/5mL JARABE POR CROMATOGRFÍA
LÍQUIDA DE ALTA PRECISIÓN

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE GRADO DE
QUÍMICO FARMACEÚTICO

AUTORES:

BACH. CENTENO QUISPE, ELIZABETH SHARON
BACH. RASSA FUENTES, ELMER FRANCISCO JUNIOR

ASESOR:

Mg. HERNÁNDEZ GUERRA, REYNA EMPERATRIZ

LIMA – PERÚ

2021

DEDICATORIA

A mi madre, mis tías y mis abuelos por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluyen este. Me formaron con reglas y con algunas libertades, pero al final de cuentas, me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos. A mis hermanos menores, quienes son el motivo principal para superarme profesionalmente.

Rassa Fuentes, Elmer Francisco Junior

A Dios, por acompañarme en todo momento. A mi madre, por ser el pilar más importante, por formar a una persona con valores, por darme su apoyo incondicional e impulsarme a seguir adelante. A mis padres, que están conmigo siempre. A mis hermanos porque son mi motivo para esforzarme día a día, los amo demasiado familia.

Centeno Quispe, Elizabeth Sharon

AGRADECIMIENTO

A nuestros maestros, por compartirnos sus conocimientos, por brindarnos educación de calidad, y permitirnos crecer profesionalmente. A nuestros compañeros y a las personas que aportaron algún conocimiento o consejo durante todo este proceso.

A la Q.F Jhelinda Yupanqui, por el apoyo brindado para la realización de esta investigación.

Un agradecimiento muy especial a nuestra asesora Mg. Reyna Hernández Guerra, por guiarnos paso a paso, por los conocimientos brindados, por la paciencia y constancia de seguir adelante, por los consejos que fueron muy importantes y de gran ayuda para nosotros y finalmente poder decir ¡Lo logramos!

RESUMEN

Objetivo: Verificar el método analítico para la cuantificación del antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml jarabe por cromatografía líquida de alta precisión.

Metodología: La muestra seleccionada correspondió a un muestro censal, representado por el dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml jarabe. El diseño de la investigación fue experimental, con un enfoque cuantitativo. Para la recolección de la información, se utilizaron fichas de observación, en las cual se registraron los datos requeridos para el análisis. El procesamiento de la información estuvo a cargo de los distintos ensayos efectuados a los parámetros de adecuabilidad, linealidad, especificidad, precisión y robustez.

Resultados: Se evidencia que en los resultados asociados al parámetro adecuabilidad, el coeficiente de variación del área alcanzó un valor menor al 2%, verificándose la adecuación del método analítico. En cuanto a la especificidad, precisión y robustez del método todos los parámetros obtuvieron valores menores a los especificados. Por su parte, el método resulto ser lineal al obtenerse una ecuación de la recta $y = 4137,89x - 14,50$ que cumple con el modelo $y = bx + a$, y el resto de las pruebas estadísticas.

Conclusión: La verificación del método analítico para la cuantificación del antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml jarabe por cromatografía líquida de alta precisión, cumple con las exigencias en los parámetros referidos a la linealidad, precisión, robustez, adecuabilidad y especificidad al seguir el protocolo de verificación establecido.

Palabras Clave: Verificación del método analítico, linealidad, adecuabilidad, especificidad, precisión, robustez.

ABSTRACT

Objective: To verify the analytical method for the quantification of the antitussive dextromethorphan hydrobromide 15mg / 5ml syrup by high precision liquid chromatography

Methodology: The selected sample corresponded to a census sample, represented by dextromethorphan hydrobromide 15mg / 5ml syrup. The research design was experimental, with a quantitative approach. To collect the information, observation files were used, in which the data required for the analysis were recorded. The information processing was in charge of the different tests carried out on the parameters of suitability, linearity, specificity, precision and robustness.

Results: It is evident that in the results associated with the suitability parameter, the coefficient of variation of the area reached a value lower than 2%, verifying the adequacy of the analytical method. Regarding the specificity, precision and robustness of the method, all the parameters obtained values lower than those specified. For its part, the method turned out to be linear by obtaining an equation of the line $y = 4137.89x - 14.50$ that complies with the model $y = bx + a$, and the rest of the statistical tests.

Conclusion: The verification of the analytical method for the quantification of the antitussive dextromethorphan hydrobromide 15mg / 5ml syrup by high precision liquid chromatography, meets the requirements in the parameters related to linearity, precision, robustness, adequacy and specificity when following the verification protocol settled down.

Keywords: Verification of the analytical method, linearity, suitability, specificity, precision, robustness.

Índice general

DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTO	
RESUMEN	
ABSTRACT	
INDICE GENERAL	
INDICE DE TABLAS	
INDICE DE ANEXOS	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
2.1. Enfoque y diseño de la investigación.	8
2.2. Población, muestra y muestreo.	8
2.3. Variables de investigación.....	8
2.4. Técnica e instrumentos de recolección de datos.....	9
2.5. Plan de recolección de datos.	9
2.5.4.1. Adecuabilidad	12
2.5.4.2. Especificidad.....	12
2.5.4.3. Linealidad	15
2.5.4.3. Precisión	16
2.5.4.3. Robustez.....	17
2.6. Métodos de análisis estadístico.....	17
2.7. Aspectos éticos.	18
III. RESULTADOS	19
IV. DISCUSIÓN.....	30
V. CONCLUSIONES	34
VI. RECOMENDACIONES	35
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ANEXOS	38

Índice de tablas

Tabla 1. Resultados por muestra de la adecuabilidad.....	19
Tabla 2. Resultados obtenidos para el análisis de adecuabilidad	19
Tabla 3. Análisis de la precisión intermedia	20
Tabla 4. Análisis de la precisión para técnica analítica por HPLC.....	20
Tabla 5. Resultados de repetibilidad	21
Tabla 6. Resultados de los parámetros de precisión.....	21
Tabla 7. Resultados finales de las muestras de linealidad del sistema	22
Tabla 8. Resultados de Linealidad del Sistema.....	23
Tabla 9. Resultados del análisis de la varianza.....	24
Tabla 10. Resultados de los ensayos de especificidad	25
Tabla 11. Resultados obtenidos para el análisis de especificidad.....	25
Tabla 12. Análisis de especificidad para la degradación del placebo.....	26
Tabla 13. Resultados de especificidad para la degradación del placebo	26
Tabla 14. Resultados de especificidad para la degradación de la muestra.....	27
Tabla 15. Análisis de los ensayos de robustez.....	28
Tabla 16. Resultados de la robustez	28

Índice de anexos

Anexo A. Operacionalización de la variable o variables	39
Anexo B. Instrumento de recolección de datos	39
Anexo C. Acta o dictamen de aprobación de comité de ética	45
Anexo C. Evidencias fotográficasdel trabajo de campo	46

I. INTRODUCCIÓN

La verificación tiene gran importancia a nivel mundial, debido a que es un componente esencial para que un laboratorio pueda asegurar el rendimiento aceptable de los métodos analíticos, proporcionando la demostración científica de que un método es adecuado para su aplicación específica. En este sentido, la verificación hace referencia al conjunto de acciones que demuestran, de manera formal, que un sistema realiza lo que debe ejecutar, de manera continuada y ajustada al objetivo de análisis; en otras palabras, al validar un método se demuestra, formalmente, que posee un determinado grado de parámetros analíticos básicos requeridos. ⁽¹⁾

Dicho proceso, además, favorece de gran manera a la industria farmacéutica que, constantemente, debe producir fármacos de calidad y que, a su vez cuenten con una garantía absoluta de seguridad, tomando en cuenta que cualquier producto que tenga la finalidad de curar alguna patología o mejorar la calidad de vida del ser humano, no debe presentar ni un mínimo margen de error. Lo planteado ha motivado en los últimos años a que tenga gran auge la inclusión de la Garantía de Calidad, que son medidas que deben adoptarse para asegurar que los productos farmacéuticos tengan la calidad que se requiere para su utilización, siendo de gran relevancia en este sentido, las normas denominadas Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), que establecen caracteres mínimos que deben cumplir los laboratorios para el cumplimiento de los requerimientos de calidad y para salvaguardar la salud de las personas, que ameritan el empleo de dichos fármacos. ⁽²⁾⁽³⁾

Es por ello que, los laboratorios farmacéuticos, a través de datos confiables obtenidos de análisis realizados a sus diferentes productos, pueden tomar decisiones y asegurar la calidad de los mismos, mediante los criterios establecidos en la BPM, que comprende la adecuabilidad, especificidad, linealidad, precisión y robustez, entre otros. Es así, como el área de control de calidad tiene la misión de validar o verificar según sea el caso, la técnica analítica para comprobar si el método es preciso para el activo que se desea analizar. ⁽⁴⁾

Cabe destacar, que a nivel mundial uno de los métodos más empleados es la cuantificación de activos, por Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC), que permite la separación de los componentes de una mezcla compleja para su posterior identificación y determinación, es así como los compuestos de una mezcla son separados al pasar mediante una fase estacionaria líquida o sólida, transportados por una fase móvil (líquida) siendo ambas fases inmiscibles.⁽⁵⁾

La HPLC es una técnica de separación utilizada ampliamente, tanto en el mundo como en Perú, debido a sus grandes ventajas como tiempos cortos de análisis, la posibilidad de separación de sustancias de mezclas complejas con alta precisión, análisis con gran exactitud y facilidad con márgenes de error menores al 1%, entre otras. Por esta razón, algunas farmacopeas usan la HPLC para cuantificar sustancias activas; no obstante, en el mercado de la industria farmacéutica actualmente hay varios fármacos con una demanda considerablemente alta, cuyos métodos de análisis no se encuentran en farmacopeas oficiales. Esto ha causado que se realicen nuevas técnicas de análisis en el laboratorio, ameritando su respectiva validación secundaria o verificación, que se efectúa cuando un laboratorio procede a implementar un método desarrollado en otra parte, centrándose en la reunión de evidencias acerca de que el laboratorio está capacitado para cumplir las especificaciones establecidas en la validación primaria.^{(6) (7)}

Es el caso del antitusígeno, denominado dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml jarabe, cuyo mecanismo de acción se basa en la depresión del centro medular de la tos al disminuir la producción de taquicinas, además presenta un efecto ligero sedante, y cabe destacar que no posee acción analgésica ni narcótica ⁽⁸⁾. Es importante resaltar, que es de amplia adquisición por la población en general, de allí la importancia de la verificación del método analítico para la cuantificación de dicho fármaco, a lo cual se aboca la presente investigación, que considera como pregunta general ¿De qué manera se puede verificar el método analítico para la cuantificación del antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml jarabe por cromatografía líquida de alta precisión? Siendo los problemas específicos los siguientes: 1-) ¿El método analítico para la cuantificación del antitusígeno dextrometorfano bromhidrato

15mg/5ml jarabe por cromatografía líquida de alta precisión posee adecuabilidad? 2-) ¿El método analítico para la cuantificación del antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml jarabe por cromatografía líquida de alta precisión es preciso? 3-) ¿El método analítico para la cuantificación del antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml jarabe por cromatografía líquida de alta precisión posee linealidad? 4-) ¿El método analítico para la cuantificación del antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml jarabe por cromatografía líquida de alta precisión posee especificidad? 5-) ¿El método analítico para la cuantificación del antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml jarabe por cromatografía líquida de alta precisión posee robustez?

Tomando en cuenta lo presentado, cabe destacar que en la industria farmacéutica, se emplean diversidad de métodos para cuantificar activos en etapa de producto terminado, siendo como se mencionó el método HPLC uno de los más utilizados, destacando que mediante ella es posible aplicar varios métodos analíticos, los cuales se precisan como la adaptación de una técnica analítica para un propósito específico de cuantificación. Dichos métodos se deben validar y verificar. La validación se considera como la certeza documentada que un procedimiento, proceso, equipo, método, o sistema producirá consistentemente resultados dentro de las especificaciones establecidas previamente. ^{(6) (7)}

Por su parte la verificación, es el conjunto de acciones como ensayos, pruebas y demostraciones que demuestran de manera formal que un sistema realiza lo que debe ejecutar, de forma continuada y ajustada al propósito de análisis, en otras palabras, al validar un método se demuestra formalmente que posee un determinado grado de parámetros analíticos básicos requeridos. La verificación del método analítico se aplica cuando el laboratorio amerita la comprobación de que domina el ensayo y lo emplea de manera correcta, aplicándolo a métodos normalizados, lo que implica la realización de un trabajo experimental que garantice que el método funciona de forma correcta en el laboratorio. ⁽¹⁾

Es importante destacar que, para la verificación se usan diferentes criterios establecidos en la BPM, como la adecuabilidad, especificidad, linealidad, precisión y robustez. En el caso de la adecuabilidad, es la capacidad de

adaptación o adecuación que posee el sistema, por lo que se evalúa el grado que resulta adecuado para el análisis. Por su parte la especificidad, es la capacidad de poder evaluar de manera inequívoca al analito en presencia de componentes cuya presencia cabría esperar, como productos de degradación, impurezas, y componentes de la matriz. Sobre la linealidad, es su capacidad para conseguir resultados de prueba proporcionales a la concentración del analito en muestras en un intervalo dado. La precisión, es el grado de coincidencia entre los resultados de las muestras particulares de una muestra homogénea. Por último, la robustez es una medida de la capacidad del método analítico, que comprueba que no resulta afectado por pequeñas variaciones en los parámetros del método.⁽⁹⁾

De acuerdo con la situación problemática y marco teórico referencial se dispone de los siguientes antecedentes internacionales del estudio a desarrollarse, Noronha et al. (2015) realizaron un estudio con el propósito de validar un método HPLC para la cuantificación de OXPt. Los resultados indicaron que el método fue lineal durante el estudio con un intervalo de concentración OXPt (0,5-15,0µg/ml) con precisión y exactitud aceptables. El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) fueron 0.099µg/ml y 0,331µg/ml, respectivamente.⁽¹⁰⁾

Yugatama, Rohmani y Dewangga (2017) desarrollaron un trabajo de investigación basado en validar el método analítico simple de la tableta de atorvastatina por HPLC. Los resultados arrojaron que el método desarrollado tenía una buena validación que incluía selectividad, linealidad, exactitud, precisión, LOD y LOQ para el análisis del contenido de la tableta de atorvastatina. El LOD y el LOQ fueron de 0,2 y 0,7ng/mL, y el rango de linealidad fue de 20 a 120ng/mL.⁽¹¹⁾

Thangabalan, Kahsay y Eticha (2018) realizaron un estudio sobre la validación de un método por HPLC en la determinación del cinitapride en el plasma humano, obtuvieron como resultados que el rango de linealidad del método fue de 1 a 35ng/mL mientras que la recuperación de la extracción de cinitapride en plasma humano fue de más del 86%. El coeficiente porcentual de variación de la precisión tanto intradía como interdiaria fue de $\leq 7,1\%$.⁽¹²⁾

Desde el ámbito nacional, se encuentran los siguientes antecedentes: Lovaton y Carvajal (2019) realizaron una investigación con el fin de validar un método analítico para la cuantificación de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL, polvo para suspensión oral por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los resultados demostraron la especificidad del método analítico, no se observó interferencia de los excipientes; es lineal correlación $r=0,995$, es preciso ya que se obtiene una RSD de 0,314%. ⁽¹³⁾

Choque (2018) desarrolló un estudio con el fin de validar una Técnica Analítica por HPLC, para la Cuantificación de Clorhidrato de Clorhexidina + Benzocaína + Enoxolona en Comprimidos Orales. Los resultados evidenciaron que la linealidad se obtuvo un coeficiente de correlación r Benzocaína = 0.99937, r Clorhexidina HCl = 0.99935 y r Enoxolona = 0.99904. La precisión Benzocaína = 0.40%, C.V. Clorhexidina HCl = 1.25% y un C.V. Enoxolona = 0.85%. La exactitud Benzocaína = 99.41%, Clorhexidina HCl = 100.42% y Enoxolona = 99.30%. ⁽¹⁴⁾

Guarniz (2016) llevó a cabo un estudio para validar el método analítico por HPLC para la cuantificación de Ambroxol clorhidrato en polvo para suspensión oral. Los resultados indicaron que para repetibilidad, se obtuvo un DSR de 1,155%, en la precisión dio un p- valor de 0,201, la linealidad del sistema presentó coeficiente de correlación de 1,0000. En el parámetro de robustez se obtuvo un p- valor de 0,193. ⁽¹⁵⁾

En cuanto a la justificación teórica, hay que destacar que el desarrollo del presente estudio requiere una indagación profunda sobre el material bibliográfico afín, en especial de estudios similares realizados en el área farmacéutica, con lo cual se pondrá de manifiesto una búsqueda exhaustiva de información, que ya inició, con el objeto de mostrar información actualizada y verificada, que permita dar un mayor alcance y comprender en forma suficiente el objeto de estudio, en este caso la verificación del método analítico por HPLC, específicamente para el antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml jarabe. Pues es fundamental en toda investigación, abordar los aspectos que contienen las variables de investigación, al tiempo que esta investigación, las

fuentes consultadas, los resultados, la teoría contrastada, servirá de apoyo a otros investigadores.

En cuanto a la justificación práctica, esta investigación es importante porque permitirá verificar el método analítico para la cuantificación del antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml jarabe por cromatografía líquida de alta precisión contribuyendo a demostrar de manera formal, que el método analítico ejecutado por el laboratorio posee un determinado grado de parámetros analíticos básicos requeridos, por lo que el fármaco puede ser distribuido y utilizado por el consumidor sin ningún tipo de riesgo. Por lo tanto, el aporte que se generará con el presente estudio permite afirmar que el estudio es necesario y justifica su elaboración.

Metodológicamente se puede afirmar que tanto el instrumento diseñado por los investigadores, como la forma de abordar la problemática de estudio, serán un aporte para el desarrollo de futuras investigaciones sobre el tema o temas similares, donde los resultados y la forma de realizar el presente estudio, serán un punto de referencia a ser considerado. Al mismo tiempo, la aplicación de normas de investigación, representarán un modelo que podrá ser usado como guía en otras investigaciones, realizadas no sólo en la institución educativa, sino también en otras que empleen la misma metodología.

Es así, como la investigación se plantea como objetivo general: Verificar el método analítico para la cuantificación del antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml jarabe por cromatografía líquida de alta precisión. De allí que, los objetivos específicos son: 1-) Comprobar la adecuabilidad del método analítico para la cuantificación del antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml jarabe por cromatografía líquida de alta precisión. 2-) Comprobar la precisión del método analítico para la cuantificación del antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml jarabe por cromatografía líquida de alta precisión. 3-) Comprobar la linealidad del método analítico para la cuantificación del antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml jarabe por cromatografía líquida de alta precisión. 4-) Comprobar la especificidad del método analítico para la cuantificación del antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml jarabe por cromatografía líquida de alta precisión. 5-)

Comprobar la robustez del método analítico para la cuantificación del antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml jarabe por cromatografía líquida de alta precisión.

Por otra parte, cabe destacar que la hipótesis general del estudio es: El método analítico para la cuantificación del antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml jarabe por cromatografía líquida de alta precisión cumple con los parámetros a evaluar en la verificación, donde las hipótesis específicas son las siguientes: 1-) El método analítico para la cuantificación del antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml jarabe por cromatografía líquida de alta precisión, cumple con los parámetros de adecuabilidad. 2-) El método analítico para la cuantificación del antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml jarabe por cromatografía líquida de alta precisión, cumple con los parámetros de precisión. 3-) El método analítico para la cuantificación del antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml jarabe por cromatografía líquida de alta precisión, cumple con los parámetros de linealidad. 4-) El método analítico para la cuantificación del antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml jarabe por cromatografía líquida de alta precisión, cumple con los parámetros de especificidad. 5-) El método analítico para la cuantificación del antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml jarabe por cromatografía líquida de alta precisión, cumple con los parámetros de robustez.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Enfoque y diseño de la investigación.

El enfoque de la investigación es cuantitativo visto que se recopilaban datos para la comprobación de las hipótesis planteadas; empleando para ello, el análisis estadístico con el propósito de probar teorías. ⁽¹⁶⁾

En referencia al diseño de investigación, es experimental, definido como una técnica estadística que permite la identificación y cuantificación de las causas de un efecto dentro de un estudio experimental. Considera además la manipulación deliberada de una o más variables, para medir el efecto que tienen en otra variable de interés. ⁽¹⁷⁾

2.2. Población, muestra y muestreo.

Siendo la población el conjunto de casos que disponen de especificaciones o características similares en cuanto a contenido, lugar y tiempo ⁽¹⁷⁾, la población de estudio estuvo conformada por el antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5mL jarabe.

En el caso de la muestra, definida como un subconjunto de la población que dispone de una representatividad de las características de la población, lo cual permitió realizar inferencia a partir de ella⁽¹⁶⁾, la muestra seleccionada para la investigación por muestro censal es de dextrometorfano bromhidrato 15mg/5mL jarabe.

2.3. Variables de investigación.

Verificación del método analítico para la cuantificación del antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5mL jarabe por cromatografía líquida de alta precisión:

La verificación de un método analítico se centra en la reunión de evidencias acerca de que el laboratorio está capacitado para cumplir las especificaciones establecidas en la validación primaria, en este caso del método analítico para la

cuantificación del antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5mL jarabe por cromatografía líquida de alta precisión. Para lo cual toma en cuenta los siguientes parámetros: adecuabilidad, especificidad, linealidad, precisión y robustez.

2.4. Técnica e instrumentos de recolección de datos

En cuanto al instrumento seleccionado, se utilizó la ficha de recolección de datos (descrita en el Anexo 2) o fichas de observación, en la cual se registraron los datos que aportan los procedimientos a realizar. ⁽¹⁸⁾ La misma se sometió a validación por medio del juicio de expertos.

2.5. Plan de recolección de datos.

A continuación, se presenta el plan de recolección de los datos:

2.5.1. Equipos, materiales y reactivos.

Equipos.

- Balanza Analítica.
- Cromatógrafo líquido de alta precisión (HPLC)
- Ultrasonido
- Baño María
- Potenciómetro
- Agitador magnético

Materiales.

- Matraz volumétrico de 25mL.
- Matraz volumétrico de 50mL.
- Matraz volumétrico de 100mL.
- Pipeta volumétrica de 5,0mL.
- Pipeta volumétrica de 1,0mL.
- Picnómetro.
- Membrana filtrante de 0,45µm PVDF.

Reactivos.

- Docusato de Sodio
- Nitrato de Amonio
- Acetonitrilo
- Ácido clorhídrico
- Peróxido de hidrogeno
- Hidróxido de sodio
- Ácido Acético Glacial

Otros.

- Estándar de Referencia: Dextrometorfano bromhidrato.
- Placebo de Dextrometorfano bromhidrato 15mg/5mL Jarabe (Fórmula 1 y Fórmula 2)
- Dextrometorfano bromhidrato 15mg/5mL Jarabe

2.5.2. Descripción del método

Condiciones de trabajo:

Condiciones normales de trabajo establecidas para Control de Calidad (Temperatura $\leq 25^{\circ}\text{C}$ y Humedad Relativa $\leq 80\%$).

Procedimiento analítico:

Proceder según las técnicas analíticas para la fórmula de Dextrometorfano bromhidrato 15mg/5mL Jarabe.

Contenido:

Dextrometorfano Bromhidrato.

2.5.3. Método: Cromatografía líquida de alta precisión (HPLC)

a. Sistema Cromatográfico:

Longitud de onda	:	280nm.
Columna	:	4,6mm x 25cm; relleno L1 de 5 μm o equivalente
Velocidad de flujo	:	1,0mL/min
Volumen de inyección	:	20 μL
Temperatura	:	30 $^{\circ}\text{C}$

b. Preparación de las Soluciones de Trabajo

Fase Móvil:

Docusato de Sodio 0,007M y Nitrato de Amonio 0,007M en Acetonitrilo HPLC y Agua Purificada (70:30), filtrado y desgasificado.

En un recipiente adecuado para 1L, disolver 3,1g de Sodio Docusato en 800mL de una mezcla de Acetonitrilo HPLC y Agua Purificada (70:30) y agitar hasta disolución total. Luego agregar 561mg de Amonio Nitrato, agitar hasta disolución total y llevar a volumen de 1L con la Mezcla de Acetonitrilo HPLC y Agua Purificada (70:30).

Ajustar la solución anterior a un pH=3,4 \pm 0,05 con Ácido Acético Glacial y mezclar.

Medir en probetas separadas los volúmenes indicados y mezclar en un recipiente adecuado. Filtrar por filtro de membrana PVDF de 0,45 μm de tamaño de poro o equivalente y llevar al Baño de Ultrasonido durante 5 minutos.

Solución Estándar:

En un matraz volumétrico de 25mL, pesar exactamente alrededor de 25mg de Dextrometorfano Bromhidrato Estándar de Referencia, agregar 15mL de Agua Purificada y llevar a Baño de Ultrasonido, con agitación constante, hasta disolución total. Llevar a volumen con Agua Purificada y homogeneizar. Transferir volumétricamente 5,0mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 50mL, llevar a volumen con Fase Móvil y homogeneizar. (Concentración aproximada de Dextrometorfano bromhidrato 0,1mg/mL).

Solución Muestra:

En un matraz volumétrico de 100mL, pesar exactamente 3,5mL de Jarabe (equivalente a 10mg de Dextrometorfano bromhidrato), agregar 70mL de Agua Purificada y agitar magnéticamente durante 10 minutos. Luego llevar a volumen con Agua Purificada y homogeneizar. (Concentración aproximada de Dextrometorfano bromhidrato 0,1mg/mL).

Filtrar las soluciones de trabajo a través de una membrana de filtro de 0,45µm de tamaño de poro o equivalente, descartando los primeros 5mL del filtrado.

c. Aptitud del Sistema

Muestra: Solución Estándar.

Requisitos de aptitud

Factor de Cola o Asimetría: No más de 2,5 para el pico de Dextrometorfano Bromhidrato, en la Solución Estándar de Referencia.

Desviación Estándar Relativa: No más de 2,0%, para las áreas del pico de Dextrometorfano Bromhidrato, en inyecciones sucesivas de la Solución Estándar de Referencia.

d. Cálculos:

$$\text{Dextrometorfano mg/5mL} = \frac{\text{Amp} \times \text{Wst} \times 5 \times \text{Pot} \times 370,32 \times 100 \times \text{Pe} \times 5}{\text{Ast} \times 25 \times 50 \times 100 \times 352,32 \times \text{Wmp}}$$

Bromhidrato

Dónde:

- Amp : Área del pico de Dextrometorfano Bromhidrato en el Cromatograma de la Solución Muestra.
- Ast : Área del pico de Dextrometorfano Bromhidrato en el Cromatograma de la Solución Estándar de Referencia.
- Wst : Peso en miligramos del Estándar de Referencia.
- Wmp : Peso en gramos de la Muestra
- Pot : Potencia tal cual del Estándar de Referencia en porcentaje.
- 370,32 : Peso molecular de Dextrometorfano Bromhidrato Monohidrato
- 352,32 : Peso molecular de Dextrometorfano Bromhidrato

2.5.4. Parámetros de verificación a desarrollar y especificaciones:

Adecuabilidad, Especificidad, Linealidad de Sistema, Precisión y Robustez.

2.5.4.1. Adecuabilidad

a) Preparación de la Solución Estándar de Referencia

Preparar la solución estándar de referencia según el procedimiento analítico. Inyectar 5 veces la solución estándar y calcular el coeficiente de variación.

b) Especificación:

En la solución estándar:

CV \leq 2% Áreas.

CV \leq 2% Tiempo de retención.

Asimetría: No más de 2,5

Platos Teóricos: Informativo

2.5.4.2. Especificidad

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

a) Componentes de la matriz:

Se prepara y se inyectan la Fase móvil, diluyente (agua purificada) y los placebos de Dextrometorfano bromhidrato 15mg/5mL Jarabe (Fórmula 1 y 2).

Preparar las siguientes muestras:

Muestra 1: Fase Móvil.

Preparar según el procedimiento analítico. Realizar dos inyecciones.

Muestra 2: Agua (Diluyente)

Realizar dos inyecciones

Muestra 3: Placebo de Dextrometorfano bromhidrato 15mg/5mL Jarabe Fórmula 1.

Preparar por duplicado. En un matraz volumétrico de 100mL, pesar exactamente 3,5mL de Placebo, agregar 70mL de Agua Purificada y agitar magnéticamente durante 10 minutos. Luego llevar a volumen con Agua Purificada y homogeneizar.

Muestra 4: Placebo de Dextrometorfano bromhidrato 15mg/5mL Jarabe Fórmula 2.

Preparar por duplicado. En un matraz volumétrico de 100mL, pesar exactamente 3,5mL de Placebo, agregar 70mL de Agua Purificada y agitar magnéticamente durante 10 minutos. Luego llevar a volumen con Agua Purificada y homogeneizar.

Muestra 5: (Estándar de Referencia: Dextrometorfano bromhidrato).

Preparar por duplicado la solución estándar de referencia de acuerdo al procedimiento analítico.

Muestra 6: (Muestra Problema: Dextrometorfano bromhidrato 15mg/5mL Jarabe).

Preparar por duplicado de acuerdo con el procedimiento analítico.

Filtrar las soluciones de trabajo a través de una membrana de filtro de 0,45µm de tamaño de poro o equivalente, descartando los primeros 5mL del filtrado.

b) Especificación:

- En las muestras 1, 2, 3 y 4, el porcentaje de interferencia no debe ser mayor del 2,0%.
- En la muestra 6, la resolución del pico del principio activo con cualquier otro pico debe ser mayor a 1.

c) Degradaciones:

Se prepara e inyectan soluciones degradadas de la muestra y del placebo. Preparar las siguientes muestras:

Degradación de muestra de dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml jarabe:

Muestra 7 (Degradación Térmica de muestra de Dextrometorfano bromhidrato 15mg/5mL Jarabe).

Preparar por duplicado. En un matraz volumétrico de 100mL, pesar exactamente 3,5mL de Jarabe (equivalente a 10mg de Dextrometorfano bromhidrato), llevar a baño maría a 70°C por 60 minutos. Luego llevar a temperatura ambiente y agregar 70mL de Agua Purificada y agitar magnéticamente durante 10 minutos. Luego llevar a volumen con Agua Purificada y homogeneizar.

Muestra 8 (Degradación Ácida de muestra de Dextrometorfano bromhidrato 15mg/5mL Jarabe).

Preparar por duplicado. En un matraz volumétrico de 100mL, pesar exactamente 3,5mL de Jarabe (equivalente a 10mg de Dextrometorfano bromhidrato), adicionar 1mL de ácido clorhídrico 2N, dejar en reposo por 5 minutos, neutralizar con 1mL de Hidróxido de sodio 2N. Agregar 70mL de Agua Purificada y agitar magnéticamente durante 10 minutos. Luego llevar a volumen con Agua Purificada y homogeneizar.

Muestra 9 (Degradación Alcalina de muestra de Dextrometorfano bromhidrato 15mg/5mL Jarabe).

Preparar por duplicado. En un matraz volumétrico de 100mL, pesar exactamente 3,5mL de Jarabe (equivalente a 10mg de Dextrometorfano bromhidrato), adicionar 1mL de Hidróxido de sodio 2N, dejar en reposo por 5 minutos, neutralizar con 1mL de ácido clorhídrico 2N. Agregar 70mL de Agua Purificada y agitar magnéticamente durante 10 minutos. Luego llevar a volumen con Agua Purificada y homogeneizar.

Muestra 10 (Degradación Oxidativa de muestra de Dextrometorfano bromhidrato 15mg/5mL Jarabe).

Preparar por duplicado. En un matraz volumétrico de 100mL, pesar exactamente 3,5mL de Jarabe (equivalente a 10mg de Dextrometorfano bromhidrato), adicionar 1mL de peróxido de hidrógeno 10Vol. Agregar 70mL de Agua Purificada y agitar magnéticamente durante 10 minutos. Luego llevar a volumen con Agua Purificada y homogeneizar.

Muestra 11 (Degradación por Luz de muestra de Dextrometorfano bromhidrato 15mg/5mL Jarabe).

Preparar por duplicado. En un matraz volumétrico de 100mL, pesar exactamente 3,5mL de Jarabe (equivalente a 10mg de Dextrometorfano bromhidrato), exponer a la luz natural por 3 horas. Luego llevar a temperatura ambiente y agregar 70mL de Agua Purificada y agitar magnéticamente durante 10 minutos. Luego llevar a volumen con Agua Purificada y homogeneizar.

Filtrar las soluciones de trabajo a través de una membrana de filtro de 0,45µm de tamaño de poro o equivalente, descartando los primeros 5mL del filtrado.

Degradación de placebo de dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml jarabe (Fórmula 1):

Muestra 12 (Degradación Térmica del Placebo).

Preparar por duplicado. En un matraz volumétrico de 100mL, pesar exactamente 3,5mL de Placebo, llevar a baño maría a 70°C por 60 minutos. Luego llevar a temperatura ambiente y agregar 70mL de Agua Purificada y agitar magnéticamente durante 10 minutos. Luego llevar a volumen con Agua Purificada y homogeneizar.

Muestra 13 (Degradación Ácida del Placebo).

Preparar por duplicado. En un matraz volumétrico de 100mL, pesar exactamente 3,5mL de Placebo, adicionar 1mL de ácido clorhídrico 2N, dejar en reposo por 5 minutos, neutralizar con 1mL de Hidróxido de sodio 2N. Agregar 70mL de Agua Purificada y agitar magnéticamente durante 10 minutos. Luego llevar a volumen con Agua Purificada y homogeneizar.

Muestra 14 (Degradación Alcalina del Placebo).

Preparar por duplicado. En un matraz volumétrico de 100mL, pesar exactamente 3,5mL de Placebo, adicionar 1mL de Hidróxido de sodio 2N, dejar en reposo por 5 minutos, neutralizar con 1mL de ácido clorhídrico 2N. Agregar 70mL de Agua Purificada y agitar magnéticamente durante 10 minutos. Luego llevar a volumen con Agua Purificada y homogeneizar.

Muestra 15 (Degradación Oxidativa del Placebo).

Preparar por duplicado. En un matraz volumétrico de 100mL, pesar exactamente 3,5mL de Placebo, adicionar 1mL de peróxido de hidrógeno 10Vol. Agregar 70mL de Agua Purificada y agitar magnéticamente durante 10 minutos. Luego llevar a volumen con Agua Purificada y homogeneizar.

Muestra 16 (Degradación por Luz del Placebo).

Preparar por duplicado. En un matraz volumétrico de 100mL, pesar exactamente 3,5mL de Placebo, exponer a la luz natural por 3 horas. Luego llevar a temperatura ambiente y agregar 70mL de Agua Purificada y agitar magnéticamente durante 10 minutos. Luego llevar a volumen con Agua Purificada y homogeneizar.

Filtrar las soluciones de trabajo a través de una membrana de filtro de 0,45µm de tamaño de poro o equivalente, descartando los primeros 5mL del filtrado.

Especificación:

- En las muestras del 7 al 11 el resultado obtenido no debe ser mayor en más del 2,0% del obtenido en la muestra 6. Además, la resolución del pico del principio activo con cualquier otro pico debe ser mayor a 1.
- En las muestras del 12 al 16 el porcentaje de interferencia no debe ser mayor del 2,0%.

2.5.4.3. Linealidad

a) Linealidad del sistema

Preparar por triplicado las muestras correspondientes a 5 concentraciones de estándar de Dextrometorfano bromhidrato respectivamente (80%, 90%, 100%, 110% y 120%)

b) Preparación de la Solución Estándar de Referencia

Pesar por triplicado. En un matraz volumétrico de 25mL pesar con exactitud el estándar de Dextrometorfano bromhidrato según lo indicado en la tabla siguiente y agregar 15mL de Agua Purificada y llevar a Baño de Ultrasonido, con agitación constante, hasta disolución total. Llevar a volumen con Agua Purificada y homogeneizar.

Transferir volumétricamente 5,0mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 50mL, llevar a volumen con Fase Móvil y homogeneizar. Filtrar a través de una membrana PVDF de 0,45µm o equivalente, descartando los primeros 5mL.

Concentración*	Equivalente a mg/15mL	Estándar de Dextrometorfano bromhidrato (mg)
80%	12,0mg/5mL	20,0
90%	13,5mg/5mL	22,5

100%	15,0mg/5mL	25,0
110%	16,5mg/5mL	27,5
120%	18,0mg/5mL	30,0

*** Las concentraciones se establecen para abarcar el rango de trabajo de este producto: de 90,0% a 110,0% (13,5mg/5mL a 16,5mg/5mL de Jarabe).**

c) Procedimiento:

Seguir procedimiento detallado en las pautas analíticas.

d) Especificación:

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

2.5.4.3. Precisión

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

a) Precisión del Sistema.

Preparar una solución estándar, de acuerdo con el procedimiento analítico. Realizar 5 inyecciones sucesivas de la solución estándar y calcular el coeficiente de variación de las áreas y tiempos de retención.

Especificación:

C.V. \leq del 2,0% entre las Áreas y Tiempos de retención de las 5 inyecciones.

b) Repetibilidad.

Preparar 2 estándares y 6 muestras de acuerdo con el procedimiento analítico, empleando Dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml Jarabe. Filtrar a través de una membrana PVDF de 0,45 μ m de tamaño de poro o equivalente, descartando los primeros 5mL.

Calcular el coeficiente de variación de las respuestas obtenidas.

Especificación: C.V. \leq del 2,0%.

c) Precisión Intermedia.

Programar a un segundo analista, en un día diferente.

Preparar 2 estándares y 6 muestras de acuerdo con el procedimiento analítico, empleando el mismo lote de la Repetibilidad. Filtrar a través de una membrana PVDF de 0,45µm de tamaño de poro o equivalente, descartando los primeros 5mL.

Calcular el coeficiente de variación entre los resultados promedios de los dos analistas.

Especificación: CV ≤ del 2,0%.

2.5.4.3. Robustez

Los resultados de los métodos analíticos pueden variar por una serie de factores relacionados con diferentes condiciones externas o no inherentes al método.

a) Estabilidad de la muestra

Muestra a tiempo cero.

Preparar 2 estándares y 2 muestras de acuerdo con el procedimiento analítico, empleando Dextrometorfano bromhidrato 15mg/5mL Jarabe. Filtrar a través de una membrana PVDF de 0,45µm de tamaño de poro o equivalente, descartando los primeros 5mL.

Muestra de viales a 24 horas de preparadas, almacenadas a temperatura ambiente.

Analizar a las 24 horas los viales de muestras y estándares preparados en el tiempo cero, las cuales estuvieron a temperatura de ambiente en el área de instrumentación.

b) Especificación:

El Coeficiente de Variación C.V. ≤ del 3,0% entre la muestra a tiempo cero y cualquier otra muestra analizada.

2.6. Métodos de análisis estadístico.

Una vez disponible los datos señalados en la sección de métodos, se procederá a realizar el análisis mediante la implementación de diferentes pruebas para cada uno de los parámetros objeto de verificación⁽¹⁷⁾; y van a estar conformadas de la siguiente forma: .

- Tabla para los resultados obtenidos por analista para la prueba de repetibilidad.
- Tabla de resultados de adiciones a diferentes niveles de 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.
- Análisis de los coeficientes de variabilidad para la precisión, especificidad y robustez.

2.7. Aspectos éticos.

Con respecto a los aspectos éticos se considerará la transparencia de la información y datos manejados, así como los resultados obtenidos serán publicados sin ningún tipo de modificación. ⁽¹⁶⁾ Cabe destacar, que se contará con el acta o dictamen de aprobación de comité de ética de la universidad.

III. RESULTADOS

Tabla 1. Resultados por muestra de la adecuabilidad

ST	Factor st	Áreas	Factor/Área	Tiempo de retención	Platos teóricos	Asimetría
ST ₁₋₁	0,10081	398,56115	2,529E-04	8,46	20507	1,037
ST ₁₋₂	0,10081	398,53182	2,530E-04	8,47	20448	1,024
ST ₁₋₃	0,10081	399,17208	2,525E-04	8,46	20472	1,023
ST ₁₋₄	0,10081	399,44378	2,524E-04	8,47	20531	1,029
ST ₁₋₅	0,10081	398,72222	2,528E-04	8,47	20470	1,039
Promedio		398,88621	2,527E-04	8,47	20486	1,030
Desvest		0,403	2,554E-07	0,01	33,02	0,01
CV (%)		0,10 %	0,10 %	0,06 %	---	---
Máximo		399,44378	---	8,47	20531,00	1,039
Mínimo		398,53182	---	8,46	20448,00	1,023

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 2. Resultados obtenidos para el análisis de adecuabilidad

PARÁMETRO DE VALIDACION	ESPECIFICACION	RESULTADOS
ADECUABILIDAD	Tiempo de retención: CV ≤ 2,0 %	0,06%
	Áreas: CV ≤ 2,0 %	0,10%
	Asimetría: No más de 2,5	1,039

Fuente: Elaboración Propia

En la tabla 1 se tienen los resultados correspondientes a los parámetros de adecuabilidad, donde se puede observar que el coeficiente de variación del área alcanzó un valor de 0,10%, en tanto que el tiempo de retención se ubicó en 0,06%, los cuales resultaron ser menor al 2,0% que se observa en las especificaciones de

la tabla 2. En términos generales, se corrobora que los componentes y reactivos que intervinieron para lograr la obtención de datos funcionaron adecuadamente.

Tabla 3. *Análisis de la precisión intermedia*

Muestra (g)	Factor MP	Áreas		Promedio	%
4,24696	140,8066	417,1837	416,2736	416,72865	98,10%
4,14174	144,38376	410,0006	409,568	409,7843	98,90%
4,16537	143,56468	405,5747	406,1697	405,8722	97,40%
4,20282	142,28542	409,1514	409,4393	409,29535	97,30%
4,24782	140,77809	409,4116	409,6926	409,5521	96,40%
4,18435	142,91348	413,2702	412,6659	412,96805	98,60%
				1er Analista	98,50%
				2do Analista	97,80%
				Promedio	98,10%
				CV	0,52%

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 4. *Análisis de la precisión para técnica analítica por HPLC*

ST	Factor st	Área	Factor /Área	Tiempo de retención	Facto de cola	Platos Teóricos
ST1-1	0,10081	398,56115	2,53E-04	8,46	1,037	20507
ST1-2	0,10081	398,53182	2,53E-04	8,47	1,024	20448
ST1-3	0,10081	399,17208	2,53E-04	8,46	1,023	20472
ST1-4	0,10081	399,44378	2,52E-04	8,47	1,029	20531
ST1-5	0,10081	398,72222	2,53E-04	8,47	1,039	20470
	Promedio	398,8862	2,53E-04	8,47	1,0304	20486
	Desvest	0,4033	2,55E-07	0,01	0,01	33
	CV (%)	0,10%	0,10%	0,06%	0,71%	0,16%
	Máximo	399,44378	2,53E-04	8,47	1,039	20531
	Mínimo	398,53182	2,52E-04	8,46	1,023	20448

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 5. Resultados de repetibilidad

Muestra (g)	Factor MP	Áreas		Promedio	%
4,11499	145,32235	403,2891	403,0754	403,1823	98,30%
4,10994	145,50091	405,1075	405,1869	405,1472	98,90%
4,15201	144,02663	406,9902	406,622	406,8061	98,30%
4,15942	143,77004	407,9984	407,3989	407,6987	98,40%
4,14995	144,09812	406,683	406,6736	406,6783	98,30%
4,13370	144,66459	406,4082	406,0596	406,2339	98,60%
Promedio					98,50%
S					0,20%
CV					0,25%

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 6. Resultados de los parámetros de precisión

PARÁMETRO DE VALIDACION	ESPECIFICACION	RESULTADOS
PRECISIÓN	Precisión de Sistema: Áreas: CV ≤ 2,0 %	0,10%
	Tiempo de retención: CV ≤ 2,0 %	0,06%
	Repetibilidad: CV ≤ 2,0 %	0,25%
	Precisión intermedia: CV ≤ 2,0 %	0,50%

Fuente: Elaboración Propia

La tabla 3 muestra el parámetro de precisión intermedia, evidenciándose un Coeficiente de Variabilidad (CV) de 0,50%. Del análisis de la precisión para técnica analítica por HPLC se desprende un Coeficiente Variación de 0,10% (Ver tabla 4). En tanto que, para la repetibilidad de método, según lo observado en la tabla 5, se tiene un Coeficiente de Variación de 0,25%.

En la tabla 6 se resumen todos los resultados de los coeficientes de variación, para los distintos aspectos de la precisión del método. Para la precisión intermedia se obtuvo un coeficiente de variación de 0,50%, resultando menor al valor máximo establecido de 2,0 %. En lo que se refiere a la precisión para técnica analítica por HPLC, se registró un Coeficiente de Variabilidad de 0,10%, lo cual representa un valor inferior al 2,0%, para el tiempo de retención se obtuvo un coeficiente de variación de 0,06%, los cuales resultaron menores al 2,0% y que permite afirmar que el método cumple con el criterio de aceptación. Finalmente, la repetibilidad del método refleja un Coeficiente de Variación de 0,25%, lo cual constituye un valor inferior al estipulado de 2,0%, y que indica que los resultados de análisis independientes se han realizado bajo las mismas condiciones de método, equipos, operadores, etc.

Tabla 7. Resultados finales de las muestras de linealidad del sistema

Muestras (LM)	mg/mL	Áreas	xi 2	yi 2	xiyi	Factor Respuesta (f) yi/xi
	Xi	Promedio				
		Yi				
LM1	0,502	1,98E+03	5,10E-02	8,10E+05	2,00E+02	1,97E+04
LM2	0,502	2,01E+03	5,10E-02	8,20E+05	2,10E+02	2,00E+04
LM3	0,502	2,02E+03	5,10E-02	8,30E+05	2,10E+02	2,01E+04
Σ	1,51	6,01E+03	1,50E-01	2,50E+06	6,20E+02	5,99E+04
		Promedio			4,10E+01	3,99E+03
		Varianza			1,40E+02	2,15E+03
		D.S.			1,20E+01	4,64E+01
					δ	δ^2
					80%	8,20E+01 6,79E+03
					90%	5,00E+01 2,52E+03
					100%	3,30E+01 1,10E+03
					110%	1,50E+01 2,22E+02
					120%	3,30E+01 1,06E+03

Fuente: Elaboración Propia

En la tabla 7 se recogen los valores finales de las tres muestras analizadas en los ensayos de linealidad del sistema. De igual manera, se presentan la varianza (δ^2) y la desviación estándar (δ), para las concentraciones de estándar de Dextrometorfano bromhidrato utilizadas (80%, 90%, 100%, 110% y 120%). Cabe

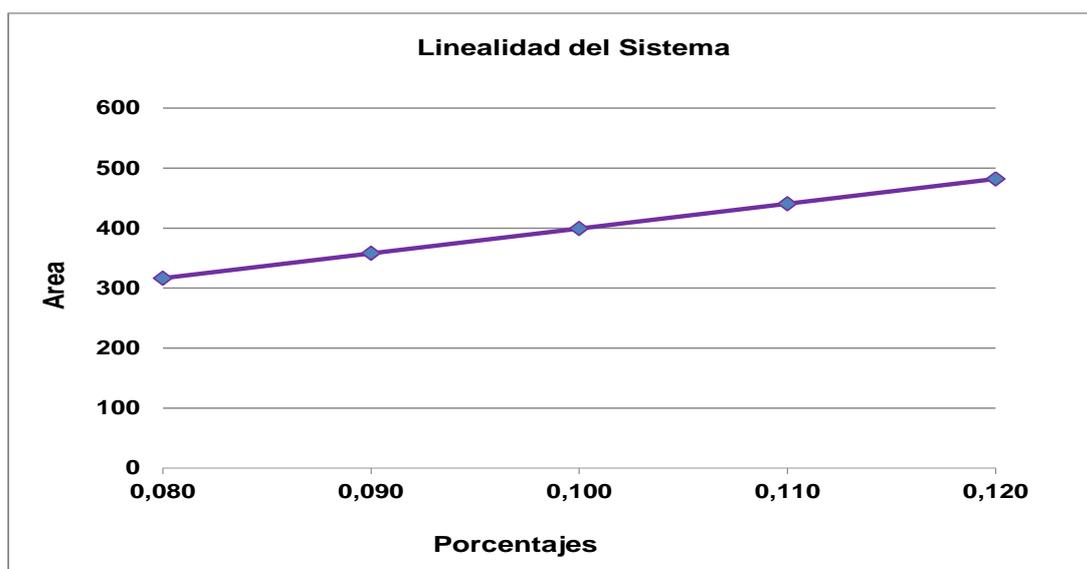
destacar, que esta información va a sustentar todos los cálculos de linealidad del sistema, los cuales van a ser desarrollados a continuación.

Tabla 8. Resultados de Linealidad del Sistema

PARAMETROS DE VALIDACION	ESPECIFICACION	RESULTADOS
LINEALIDAD DE SISTEMA.	Curva de Calibración	Conforme
	<ul style="list-style-type: none"> • $y = bx + a$ • "r": Mínimo 0,995 • "r²": Mínimo 0,990 	$y = 4137,89x - 14,50$ 0,998081 0,996165

Fuente: Elaboración Propia

Gráfico 1. Representación de la curva de calibración



Fuente: Elaboración Propia

En la tabla 8 se muestran los resultados del parámetro linealidad del sistema, donde se busca verificar la proporcionalidad del analito. En la linealidad del sistema se analizó solo principio activo a 5 concentraciones, 80%, 90%, 100%, 110% y 120% de la concentración nominal de trabajo donde para verificar la relación concentración/respuesta del analito se realizó una regresión lineal por el método de los mínimos cuadrados, obteniéndose una curva de calibración con una ecuación

de la recta $y = 4137,89x - 14,50$ que cumple con el modelo $y = bx + a$ (ver gráfico 1).

Al mismo tiempo, los resultados de la regresión arrojaron un coeficiente de correlación de 0,998081, el cual resulta ser mayor al nivel de aceptación ($> 0,995$), indicando de esta forma una relación dependiente y proporcional entre la concentración y respuesta.

Tabla 9. Resultados del análisis de la varianza

PARAMETROS DE VALIDACION	ESPECIFICACION	RESULTADOS
LINEALIDAD DEL SISTEMA	• Análisis de la Varianza	
	• Test de G de Cochran exp < G tablas	G exp (0,5806) < G tabla (0,6838)
	• Test de linealidad	
	C.V. F. Respuesta < 5%	1,2 %
	T exp > T tablas	t exp (58,113) > t tabla (2,160)
Límite de Confianza del Intercepto no debe incluir al cero.	3.984,0927 < b < 4.291,6967	

Fuente: Elaboración Propia

En lo que respecta al análisis de la varianza y al test de linealidad, en la tabla 9 se comprueba la homogeneidad de varianza al aplicarse el test de Cochran, en el cual el $G \text{ exp } (0,5806) < G \text{ tabla } (0,6838)$ a un nivel de significancia de 0.05. En definitiva, un $G \text{ exp } < G \text{ tabla}$ lo que significa es que las varianzas de las concentraciones son homogéneas, vale decir, el factor de concentración no incide en la variabilidad de los resultados, en tanto que al tratarse de un test estadístico, el nivel de significancia indica la proporción o frecuencia de decisiones erróneas a largo plazo.

De igual forma, para sustentar estadísticamente la relación dependiente y proporcional entre la concentración y respuesta, se realizó una prueba t-Student donde se obtuvo un t-experimental de 58,113 superior al t-tabla (2,160). Por otra

parte, se evidencia los índices e intervalos de confianza de la pendiente (b) y del intercepto, demostrándose que b es significativamente diferente de cero (4.137,89) y que presenta una pendiente positiva, corroborando que se cumple con el parámetro de linealidad.

Tabla 10. *Resultados de los ensayos de especificidad*

Muestra	Muestra	Factor MP	Areas		%	Promedio
Fase Móvil	1,00mg	598	0,0000	0,0000	0,00%	0,00%
Diluyente	1,00mg	598	0,0000	0,0000	0,00%	0,00%
Muestra 1	4,11498g	145,3227	402,5875	402,4543	98,30%	98,60%
Muestra 2	4,10994g	145,50091	404,3503	404,4725	98,90%	
Pbo Formula 1-1	4,06536g	147,09644	0,0000	0,0000	0,00%	0,00%
Pbo Formula 1-2	4,07023g	146,92044	0,0000	0,0000	0,00%	
Pbo Formula 2-1	4,12290g	145,04354	0,0000	0,0000	0,00%	0,00%
Pbo Formula 2-2	4,12106g	145,1083	0,0000	0,0000	0,00%	

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 11. *Resultados obtenidos para el análisis de especificidad*

PARÁMETRO DE VALIDACION	ESPECIFICACION	RESULTADOS
Fase Móvil	El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 2,0 %.	0,0%
Diluyente	El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 2,0 %.	0,0%
Placebo (Fórmula 1)	El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 2,0 %.	0,0%
Placebo (Fórmula 2)	El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 2,0 %.	0,0%
Muestra problema	La resolución del pico principal con cualquier otro pico no debe ser menor a 1.	23,8%

Fuente: Elaboración Propia

Los resultados de los ensayos de especificidad están reflejados en la tabla 10, donde se observa que la fase móvil y los diluyentes tienen un porcentaje de interferencia de 0,0% al igual que los placebos Fórmula 1 y Fórmula 2.

En la tabla 11, se muestra que los parámetros de fase móvil, diluyentes y placebos Fórmula 1 y Fórmula 2, obtuvieron un porcentaje de interferencia de 0,0%, que al contrastarlo con las especificaciones establecidas, se tiene que es menor al 2,0%, lo que significa que no se encontraron respuestas en el tiempo de retención del principio activo en el análisis, y por consiguiente no se generaron interferencias en el proceso. Por otra parte, de los resultados se desprende que la muestra problema alcanzó un valor de 23,8%, traduciéndose que está dentro de las especificaciones establecidas de que la resolución del pico principal con cualquier otro pico no debe ser menor a 1.

Tabla 12. *Análisis de especificidad para la degradación del placebo*

Muestra	Muestra (g)	Factor MP	Áreas		%	Promedio
Pbo. deg T°1	4,19376	142,59280	0,00000	0,00000	0,0 %	0,0 %
Pbo. Deg T°2	4,24242	140,95728	0,00000	0,00000	0,0 %	
Pbo. deg Ac.1	4,18728	142,81347	0,00000	0,00000	0,0 %	0,0 %
Pbo. degAc.2	4,23354	141,25295	0,00000	0,00000	0,0 %	
Pbo. deg Al.1	4,29039	139,38127	0,00000	0,00000	0,0 %	0,0 %
Pbo. degAl.2	4,23960	141,05104	0,00000	0,00000	0,0 %	
Pbo. deg Ox1	4,17181	143,34306	0,00000	0,00000	0,0 %	0,0 %
Pbo. deg Ox2	4,24296	140,93934	0,00000	0,00000	0,0 %	
Pbo. deg Luz1	4,26447	140,22845	0,00000	0,00000	0,0 %	0,0 %
Pbo. deg Luz2	4,26448	140,22812	0,00000	0,00000	0,0 %	

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 13. *Resultados de especificidad para la degradación del placebo*

PARÁMETRO DE VALIDACION	ESPECIFICACION	RESULTADOS
Degradación ácida	El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 2,0 %.	0,0%
Degradación alcalina	El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 2,0 %.	0,0%
Degradación oxidativa	El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 2,0 %.	0,0%

Degradación de luz	El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 2,0 %.	0,0%
Degradación térmica	El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 2,0 %.	0,0%

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 14. Resultados de especificidad para la degradación de la muestra

PARÁMETRO DE VALIDACION	ESPECIFICACION	RESULTADOS
ESPECIFICIDAD		
Degradación ácida	El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 2,0 %.	0,3%
	La resolución del pico principal con cualquier otro pico no debe ser menor a 1.	23,7%
Degradación alcalina	El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 2,0 %.	0,3%
	La resolución del pico principal con cualquier otro pico no debe ser menor a 1.	23,7%
Degradación oxidativa	El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 2,0 %.	0,0%
	La resolución del pico principal con cualquier otro pico no debe ser menor a 1.	23,7%
Degradación de luz	El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 2,0 %.	0,0%
	La resolución del pico principal con cualquier otro pico no debe ser menor a 1.	23,6%
Degradación térmica	El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 2,0 %.	0,0%
	La resolución del pico principal con cualquier otro pico no debe ser menor a 1.	23,6%

Fuente: Elaboración Propia

De acuerdo a lo observado en la tabla 12, todas las degradaciones del placebo de especificidad registraron un valor promedio de 0,0%. La tabla 13 contrasta los resultados obtenidos y las especificaciones establecidas, obteniéndose que los resultados de los porcentajes de degradación de luz, degradación alcalina,

degradación ácida, degradación oxidativa y degradación térmica son menores al especificado, que en esta oportunidad estaba indicado para el 2,0%, evidenciándose resoluciones de pico por un valor superior a 1.

Para la degradación de la muestra, se tiene que los resultados de los porcentajes de degradación alcalina y degradación ácida registraron un valor porcentual de 0,3%, en tanto que la degradación oxidativa, térmica y de luz alcanzaron valores de 0,0%, lo cual quiere decir que son menores a las especificaciones establecidas del 2,0%, observándose resoluciones de pico por un valor superior a 1.(Ver tabla 14).

Tabla 15. Análisis de los ensayos de robustez

Muestra (g)	Factor MP	Áreas		Promedio	mg/5mL	%
4,11499	145,3223	404,65570	403,24690	403,95130	14,44	96,3 %
4,10994	145,5009	407,88100	407,59750	407,73925	14,59	97,3 %
				Promedio	14,52	96,8 %
				S	0,11	0,72 %
				RSD	0,75%	0,75%

Tiempo 0h	14,79	98,6 %
Tiempo 24h	14,52	96,8 %
Promedio	14,65	97,7 %
S	0,19	1,29 %
RSD	1,32%	1,32%

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 16. Resultados de la robustez

PARAMETROS DE VALIDACION	ESPECIFICACION	CONFORME
ROBUSTEZ	<ul style="list-style-type: none"> • Estabilidad de la muestra: $CV \leq 3,0 \%$ • 24 horas filtrada al ambiente 	1,3 %

Fuente: Elaboración Propia

En la tabla 15 se tienen los resultados de los ensayos de la robustez, obteniéndose una desviación estándar de 0,65%. Al mismo tiempo, luego de tomar en cuenta los dos estándares y las dos muestras realizadas sustentadas en el procedimiento y analizadas a las 24 horas los viales de muestras y estándares preparados en el tiempo cero, las cuales estuvieron a temperatura de ambiente en el área de instrumentación se tiene que el método es robusto al evidenciarse un coeficiente de variación menor al especificado (1,3%), que en este caso estaba establecido en $CV \leq 3,0 \%$ (Ver tabla 16).

IV. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos permitieron lograr la verificación del método analítico para la cuantificación del antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5mL jarabe por cromatografía líquida de alta precisión, visto que se logró satisfacer los parámetros de adecuabilidad, precisión, linealidad, especificidad y robustez requeridos, constatándose la hipótesis general del estudio. Estos resultados demuestran que el método funciona de forma correcta en el laboratorio ⁽¹⁾, siendo un hallazgo también obtenido por Yugutama et al., (2017) en la validación del método analítico simple de la tableta de atorvastatina por HPLC ⁽¹¹⁾; Lovaton y Carvajal (2019) en la validación de un método analítico para la cuantificación de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL, polvo para suspensión oral por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ⁽¹³⁾ y Guarniz (2016) en la validación del el método analítico por HPLC para la cuantificación de Ambroxol clorhidrato en polvo para suspensión oral ⁽¹⁵⁾.

En la tabla 2 se tienen los resultados asociados al parámetro adecuabilidad, observándose que el coeficiente de variación del área alcanzó un valor menor al 2,0%, al igual que el tiempo de retención, verificándose la adecuación del método analítico y coincidiendo con las características que establece la World Health Organization para este parámetro ⁽⁹⁾, permitiendo comprobar la primera hipótesis específica del estudio. Al respecto, se verificaron tanto los instrumentos utilizados como las partes que integran los mismos, aunado al hecho de constatar la adecuada manipulación y almacenamiento de sustratos y reactivos, los términos de caducidad, así como la existencia o la ausencia de agentes contaminantes en los mismos.

La tabla 3 revela el parámetro de precisión, para la precisión del sistema se obtuvo un coeficiente de variación menor al valor máximo establecido de 2,0%, comprobándose la segunda hipótesis específica del estudio. En cuanto a la repetibilidad, se tiene que dicho método cumple con el criterio de aceptación correspondiente, porque para las 6 muestras realizadas, el coeficiente de variación resultó ser inferior al $(CV) \leq 2,0\%$. En lo que se refiere al parámetro de repetibilidad; el coeficiente de variación determinado fue 0,5%, es decir se obtienen valores

menores del límite máximo especificado (2,0%). Ante las consideraciones teóricas que entraña el concepto de repetibilidad, los resultados de la investigación se ajustan a lo contemplado en la misma, al estudiarse la variabilidad del método analítico realizando un análisis sobre la misma muestra, en un laboratorio particular y en un periodo de tiempo corto, obteniéndose de esta forma coeficientes de variabilidad contemplados dentro del rango preestablecido.

De igual manera, se muestra los resultados de la precisión intermedia; que refleja las variaciones intralaboratorio (diferentes analistas, diferentes días, diferentes equipos, etc.), matemáticamente se expresa como la desviación estándar por el coeficiente de variación. Tal como se evidencia, el coeficiente de variación total es 0,5%, que se encuentra dentro de la especificación establecida (menor a 2,0%). Con esto se comprobó 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 establecidas en la técnica analítica aplicada. En lo que concierne a la precisión del método analítico, Choque determinó la precisión de este método mediante la obtención de 0,40% en el coeficiente de variación para el elemento Benzocaina, 1,25% resultó ser el coeficiente de variación para la Clorhexidina HCl, mientras que la Enoxolona presentó un 0.85%. en cuanto a este mismo parámetro ⁽¹⁴⁾. Por otra parte, Lovaton y Carvajal demostraron que el método analítico para la cuantificación de amoxicilina trihidrato 250mg/5mL, polvo para suspensión oral por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es preciso ya que se obtuvo una RSD de 0,314% ⁽¹³⁾. Entre tanto, en los análisis de Guarniz los resultados indicaron que para repetibilidad, se obtuvo un DSR de 1,155%, y el parámetro de precisión alcanzó un p- valor de 0,201, con lo cual también se verificó la precisión del método analítico ⁽¹⁵⁾.

En la tabla 8 se muestran los resultados del parámetro linealidad del sistema, donde se busca verificar la proporcionalidad del analito, comprobándose la tercera hipótesis específica del estudio. En la linealidad del sistema se analizó solo principio activo a 5 concentraciones, 80%, 90%, 100%, 110% y 120%, realizándose una regresión lineal por el método de los mínimos cuadrados, en el cual se obtuvo una curva de calibración con una ecuación de la recta $y = 4137,89x - 14,50$ que cumple con el modelo $y = bx + a$. Se observó un coeficiente de correlación de 0,998081 (> 0,995), el cual indica una relación dependiente y proporcional entre concentración

y respuesta, vale decir que como el valor obtenido es mayor al valor de aceptación se presentó una buena correlación entre las concentraciones y las respuestas, indicando que tanto el sistema como el método conservan la linealidad esperada, constatándose la tercera hipótesis específica del estudio. Asimismo, para sustentar estadísticamente ese valor se estableció que la pendiente de la recta de regresión es significativamente distinta de cero, a través de la aplicación de una prueba t-Student donde se obtuvo un t-experimental de 58,113 superior al t-tabla (2,160). En definitiva, la linealidad para el método analítico verificado va a tener como condición particular, la capacidad para suministrar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango determinado.

Para comprobar la homogeneidad de varianza se aplicó el test de Cochran, en el cual el $G_{exp} (0,5806) < G_{tabla} (0,6838)$ y a un nivel de significancia de 0.05, demostrándose que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados. Estos hallazgos de linealidad se ajustan con los obtenidos en Noronha et al., donde se evidenció la linealidad del método con un intervalo de concentración OXPt (0,5-15,0 μ g/ml) ⁽¹⁰⁾. En otra investigación realizada por Yugatama, Rohmani y Dewangga se observa niveles aceptables de linealidad en el método al registrarse un rango de linealidad de 20 a 120ng/mL ⁽¹¹⁾. En el estudio de Lovaton y Carvajal el método de validación también cumplió con las especificaciones de linealidad registrando un coeficiente de correlación de $r = 0,995$.

Los resultados de la especificidad están reflejados en la tabla 12, donde se observa que para los placebos 1 y 2, el porcentaje de interferencia no es mayor al 2,0%, mientras que en la muestra 4, la resolución del pico del principio activo con cualquier otro pico efectivamente es mayor que 1, comprobándose la cuarta hipótesis específica del estudio. En el análisis del placebo, no se halló ninguna respuesta en el tiempo de retención del principio activo en el análisis, así que no hubo ninguna interferencia. En este caso, los porcentajes de degradación de luz, degradación alcalina, degradación acida, degradación oxidativa y degradación térmica registraron porcentajes menores al especificado, que en esta oportunidad estaba indicado para el 2,0%.

Para los métodos cromatográficos, el porcentaje de interferencia va a permitir establecer la especificidad del método en función al diluyente, la fase móvil y la matriz de la forma farmacéutica, no obstante, para las muestras que han sido sometidas a estrés, el porcentaje de interferencia se convierte en un indicativo del nivel de degradación puede haber sufrido la molécula, con lo cual se tiene que la especificidad del método se va a verificar a través del análisis de los cromatogramas obtenidos en las muestras. De igual modelo, en el trabajo de investigación de Lovaton y Carvajal, los resultados comprobaron la especificidad del método analítico, al no observarse interferencia de los excipientes ⁽¹³⁾. Un resultado similar fue evidenciado en el estudio de Yugatama, Rohmani y Dewangga, donde los niveles de selectividad (lo cual asemeja a la especificidad) lograron ser claramente validados ⁽¹¹⁾.

En la tabla 16 se mostraron los hallazgos de la robustez, donde se determinó que el método es robusto al evidenciarse un coeficiente de variación menor al especificado (1,3%), que en este caso estaba bajo un rango de CV < 3,0 %, comprobándose la quinta hipótesis específica del estudio. Dado que la robustez es una medida de la capacidad del método analítico, para el presente trabajo se demuestra que el mismo no resulta afectado por las variaciones que se producen en los parámetros del método. Dentro de los hallazgos encontrados en el estudio de Guarniz, se observó que el parámetro de robustez alcanzaba un p- valor de 0,193, con lo cual se demostraba la robustez del método analítico por HPLC para la cuantificación de Ambroxol clorhidrato en polvo para suspensión oral ⁽¹⁵⁾.

V. CONCLUSIONES

Los resultados alcanzados permiten concluir lo siguiente:

1. La verificación del método analítico para la cuantificación del antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml jarabe por cromatografía líquida de alta precisión, cumple con las exigencias en todos los parámetros referidos a la linealidad, precisión, robustez, adecuabilidad y especificidad al seguir el protocolo de verificación propuesta en el presente trabajo.
2. En relación a los parámetros como tal, se constató la verificación de adecuación del método analítico, encontrándose los resultados obtenidos dentro del rango esperado.
3. El método es preciso, ya que el grado de concordancia que existe entre las pruebas, nos permite obtener resultados repetitivos sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas. En este sentido, se demostró que no existen diferencias significativas desde una perspectiva estadística entre los resultados obtenidos efectuando los análisis en distintas condiciones de operatividad.
4. Del mismo modo, el método es lineal en el intervalo de concentración de 60% hasta 120% de sistema y muestra. En este caso, el método analítico verificado tiene la capacidad para ofrecer resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango determinado.
5. El método desarrollado tiene la capacidad para identificar simultáneamente o separadamente los analitos de que son objeto de intereses, por lo tanto, es específico, al no detectarse interferencia con la matriz, ni con los productos de degradación.
6. El método es robusto, ya que no hay diferencia significativa con los resultados obtenidos trabajando en las condiciones cromatografías establecidas.

VI. RECOMENDACIONES

Luego de la culminación del presente trabajo, resulta conveniente plantear las siguientes recomendaciones:

- El proceso de análisis y verificación de cada uno de los métodos debe ser documentado en forma minuciosa; para que no exista ambigüedades y los analistas puedan implementar el método con facilidad.
- Al realizar una verificación es fundamental programar una nueva verificación en función de garantizar altos niveles de calidad en los resultados encontrados en el laboratorio mediante el método.
- Garantizar la calibración y mantenimiento de los equipos utilizados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Peris J., Esteve J., & Carda S. Validation of Analytical Methods Based on Chromatographic Techniques: An. onlinelibrary. 2015;5(1).
2. Gouveia B., Rijo P., Gonçalo T., & Reis C. Good manufacturing practices for medicinal products for human use. J Pharm Bioallied Sci. 2015;7(2):87–96.
3. Sanjay J., & Rajesh K.. Evolution of GMP in Pharmaceutical Industry. Res J Pharm Tech. 2017;10(2):501–6.
4. Reham M., Maissa Y., Faten A., & Laila E. Quality in the pharmaceutical industry – A literature review. Saudi Pharm J Vol. 2015;23(5):463–9.
5. Rudy E., Laignier M. Araújo B., & Nunes H. Analytical Validation of Quantitative High-Performance Liquid Chromatographic Methods in Pharmaceutical Analysis: A Practical Approach. Crit Rev Anal Chem. 2012;42(1):87–100.
6. Bakhshi F., et al. Developing a high-performance liquid chromatography fast and accurate method for quantification of silibinin. BMC Res Notes. 2019;12(1–7).
7. Levin S. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in the Pharmaceutical Analysis. Pharm Sci Encycl. 2010;
8. Lexatussin®. Dextrometorfano Bromhidrato 15 mg / 5 mL-Jarabe [Internet]. Available from: <http://induquimica.com/media/insertos/129.pdf>
9. World Health Organization (OMS). Specifications for Pharmaceutical Preparations [Internet]. 2020. Available from: <https://www.who.int/medicines/publications/pharmprep/en/>
10. Noronha B. et al. Development and Validation of a Simple and Selective Analytical HPLC Method for the Quantification of Oxaliplatin. J Chem. 2015;5(1):1–5.
11. Yugatama A., Rohmani S., & Dewangga A. Development and Validation of High Performance Liquid Chromatography Method for Determination

- Atorvastatin in Tablet. IOP Conf Ser Mater Sci Eng. 2017;333(1):1–7.
12. Thangabalan B., Kabsay G., & Eticha T. Development and Validation of a High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Cinitapride in Human Plasma. J Anal Methods Chem. 2018;5(1):1–6.
 13. Lovatón J., y Carbajal E., Validación de un método analítico para cuantificación de amoxicilina trihidrato 250mg/5ml polvo para suspensión oral por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Tesis de grado) [Internet]. Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2019. Available from: <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/2038>
 14. Choque L. Validación de una Técnica Analítica por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC), para la Cuantificación de Clorhidrato de Clorhexidina + Benzocaína + Enoxolona en Comprimidos Orales (Tesis de grado) [Internet]. Universidad Católica de Santa María; 2018. Available from: http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/3239/008599_Tesis_CANAZA_LUQUE_ELIZABETH_MARISA.pdf?sequence=2&isAllowed=y
 15. Guarniz D. Validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación de ambroxol clorhidrato en polvo para suspensión oral (Tesis de grado) [Internet]. Universidad Nacional de Trujillo; 2016. Available from: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/3715>
 16. Hernández, R., Fernández, C., y Baptista P. Metodología de la investigación. México: Mc Graw Hill; 2014.
 17. Palomino, J., Peña, J., Zevallos, G., y Orizano L. Metodología de la investigación. Lima: Editorial San Marcos; 2015.
 18. Carrasco S. Metodología de la investigación científica. Pautas metodológicas para diseñar t elaborar el proyecto de investigación. Lima: Marcos, San; 2017.

ANEXOS

Anexo A. Operacionalización de la variable o variables

VARIABLE	Tipo de variable según su naturaleza y escala de medición	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	N° DE ITEMS
Verificación del método analítico para la cuantificación del antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml jarabe por cromatografía líquida de alta precisión	Tipo de variable según su naturaleza:	La verificación hace referencia al conjunto de acciones que demuestran de manera formal que un sistema realiza lo que debe ejecutar, de manera continuada y ajustada al objetivo de análisis, en otras palabras, al validar un método se demuestra formalmente que posee un determinado grado de parámetros analíticos básicos requeridos.	La verificación de un método analítico se centra en la reunión de evidencias acerca de que el laboratorio está capacitado para cumplir las especificaciones establecidas en la validación primaria, en este caso del método analítico para la cuantificación del antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5ml jarabe por cromatografía líquida de alta precisión. Para lo cual toma en cuenta los siguientes parámetros: <ul style="list-style-type: none"> • Adecuabilidad. • Especificidad • Linealidad • Precisión. • Robustez 	Adecuabilidad	<ul style="list-style-type: none"> • Grado que resulta adecuado para el análisis 	1
	Cuantitativa			Especificidad	<ul style="list-style-type: none"> • Evaluación inequívoca del analito ante componentes previsibles. 	2
	Escala de medición: Ordinal			Linealidad	<ul style="list-style-type: none"> • Resultados proporcionales a la concentración del analito. 	3
				Precisión	<ul style="list-style-type: none"> • Grado de dispersión • Tolerancia o fortaleza 	4
				Robustez	<ul style="list-style-type: none"> • Capacidad para no afectarse por pequeñas variaciones. 	5

Anexo B. Instrumento de recolección de datos

Nº	Parámetro	Especificaciones	Resultado final
1	Adecuabilidad	Tiempo de retención: CV ≤ 2,0 % Áreas: CV ≤ 2,0 % Asimetría: No más de 2,5	0,06% 0,10% 1,039
2	Especificidad		
	Fase Móvil	El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 2,0 %.	0,0%
	Diluyente	El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 2,0 %.	0,0%
	Placebo (Fórmula 1)	El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 2,0 %.	0,0%

Nº	Parámetro	Especificaciones	Resultado final
	Placebo (Fórmula 2)	El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 2,0 %.	0,0%
	Muestra problema	La resolución del pico principal con cualquier otro pico no debe ser menor a 1.	23,9%
	DEGRADACIÓN DEL PLACEBO		
	Degradación ácida.	El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 2,0 %.	0,0%
	Degradación alcalina.	El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 2,0 %.	0,0%
	Degradación oxidativa.	El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 2,0 %.	0,0%
	Degradación Luz	El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 2,0 %.	0,0%
	Degradación Térmica		

Nº	Parámetro	Especificaciones	Resultado final
	<p>DEGRADACIÓN DE LA MUESTRA</p> <p>Degradación ácida.</p> <p>Degradación alcalina.</p> <p>Degradación oxidativa.</p> <p>Degradación Luz</p>	<p>El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 2,0 %.</p> <p>El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 2.0 % La resolución del pico principal con cualquier otro pico no debe ser menor a 1</p> <p>El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 2.0 % La resolución del pico principal con cualquier otro pico no debe ser menor a 1</p> <p>El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 2.0 % La resolución del pico principal con cualquier otro pico no debe ser menor a 1</p>	<p>0,0%</p> <p>0,4% 23,7%</p> <p>0,4% 23,7%</p> <p>0,1% 23,7%</p>

Nº	Parámetro	Especificaciones	Resultado final
	Degradación Térmica	<p>El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 2.0 % La resolución del pico principal con cualquier otro pico no debe ser menor a 1</p> <p>El porcentaje de interferencia no debe ser mayor al 2.0 % La resolución del pico principal con cualquier otro pico no debe ser menor a 1</p>	<p>0,4% 23,7%</p> <p>0,4% 23,6%</p>
3	Linealidad	<p>Curva de Calibración</p> <ul style="list-style-type: none"> • $y = bx + a$ • "r": Mínimo 0,995 • "r²": Mínimo 0,990 <p>Análisis de la Varianza</p> <ul style="list-style-type: none"> • Test de G de Cochran exp < G tablas • Test de linealidad <p>C.V. F. Respuesta < 5% T exp > T tablas</p>	<p>Conforme</p> <p>$y = 4137,89x - 14,50$</p> <p>0,998081 0,996165</p> <p>G exp (0,5806) < G tabla (0,6838)</p> <p>1,2 % t exp (58,113) > t tabla (2,160)</p>

Nº	Parámetro	Especificaciones	Resultado final
		Límite de Confianza del Intercepto no debe incluir al cero.	3984,0927 < b < 4291,6967
4	Robustez	<ul style="list-style-type: none"> • Estabilidad de la muestra: CV < 3,0 % 24 horas filtrada al ambiente 	1,3 %
5	Precisión	<p>Precisión de Sistema: CV < 2,0 % Áreas de Dextrometorfano Bromhirato Monohidrato</p> <p>Repetibilidad: CV < 2,0 %</p> <p>Precisión intermedia: CV < 2,0 %</p>	<p>0,1 %</p> <p>0,3 %</p> <p>0,5%</p>

Anexo C. Acta o dictamen de aprobación de comité de ética

Anexo D. Evidencias fotográficas del trabajo de campo



Figura 1. *Análisis de adecuabilidad en el Área de Fisicoquímico*



Figura 2. *Materiales del análisis de Linealidad en el Área de Fisicoquímico*



Figura 3. *Reprocesos del análisis de Precisión Intermedia en el Área de Instrumentación*