

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



“Validación de un método analítico por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para la cuantificación de Levotiroxina sódica en tabletas, Lima - 2022”

Tesis para optar el Título Profesional de:
Químico Farmacéutico

Presentado por:

Bach. Michel Sicha Gutierrez

Asesor:

Mg. Maricela López Sierralta

Ayacucho - Perú

2024

A mis padres Florabel y Plácido,
hermanos Gabriel y Mabel, mi
segunda madre Juanita. Por el
apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi gratitud a la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, centro de conocimiento, por haberme recibido en sus instalaciones. Quiero reconocer especialmente a la Facultad de Ciencias de la Salud, en particular, a la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. Agradezco a su distinguido cuerpo docente por su noble labor, ya que me han brindado conocimientos esenciales que han ayudado a mi crecimiento profesional.

Asimismo, quiero agradecer a la Mg. Maricela López Sierralta y al Q.F Jorge Trujillo Azahuanche por brindar su amplia experiencia, conocimientos y asesoría durante el proceso de realización de este trabajo de investigación.

No puedo dejar de mencionar al Dr. Luis Kanashiro Chinen, a la Dra. Elisa Zavala Fernández, al Mg. Deivy Quiroz Delgado y al Q.F Juan Obregón Pillaca, quienes han brindado su apoyo moral y técnico, siendo piezas clave en mi crecimiento personal y profesional.

Además, quiero expresar mi gratitud a mis compañeros del departamento de I+D por su constante apoyo y colaboración.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes del estudio	3
2.2. Marco conceptual	8
2.2.1. Validación	8
2.2.2. Parámetros de validación	8
2.2.3. Tipos de procedimientos analíticos a validar	10
2.2.4. Cromatografía líquida de alto rendimiento	12
2.2.5. Levotiroxina sódica	14
2.2.6. Medicamento	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Lugar de ejecución	17
3.2. Población y muestra	17
3.3. Metodología y recolección de datos	17
3.3.1. Tipo de investigación	17
3.3.2. Desarrollo del método analítico	17
3.3.3. Determinación de parámetros de validación	19
3.3.4. cálculos	25
3.3.5. Análisis de datos	29
IV. RESULTADOS	31
V. DISCUSIÓN	41
VI. CONCLUSIONES	45
VII. RECOMENDACIONES	47
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXOS	53

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Parámetros de validación según el Consejo Internacional para la Armonización de Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH).	11
Tabla 2 Información necesaria para la validación según la farmacopea de los Estados Unidos de América.	12
Tabla 3 Pureza de pico cromatográfico en muestras que contienen levotiroxina sódica al evaluar la especificidad. Lima-2022.	33
Tabla 4 Porcentaje de recuperación de analito, en la evaluación de la especificidad-interferencia con el pico de analito. Lima-2022.	34
Tabla 5 Pureza de pico cromatográfico en muestras que contienen levotiroxina sódica, sometidas a degradación forzada. Lima-2022.	35
Tabla 6 Porcentaje de recuperación del analito (levotiroxina sódica) en presencia de placebo. Para la evaluación de la exactitud. Lima – 2022.	38
Tabla 7 Desviación estándar relativa, del porcentaje obtenido de levotiroxina sódica, entre analista 1 y analista 2, para la evaluación de la repetibilidad y precisión intermedia en tabletas que contienen levotiroxina sódica.. Lima – 2022.	39

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Estructura química de levotiroxina sódica.	15
Figura 2 Curva de calibración de concentración versus área, para la evaluación de la linealidad del sistema, del método analítico. Lima-2022.	36
Figura 3 Curva de calibración de concentración versus área, para la evaluación de la linealidad del método analítico y exactitud. Lima-2022.	37

ÍNDICE DE ANEXOS

		Página
Anexo 1	Desviación estándar de tiempos de retención y áreas en la evaluación de la precisión instrumental de inyecciones repetidas de una muestra de levotiroxina sódica. Lima-2022.	55
Anexo 2	Especificidad - Interferencias. Resultado de pureza de pico de analito (levotiroxina sódica). Lima-2022.	56
Anexo 3	Especificidad - Interferencias. Resultado de pureza de pico de analito (levotiroxina sódica) en presencia de placebo. Lima-2022.	57
Anexo 4	Espectro tridimensional de estándar de Levotiroxina sódica. Lima-2022.	58
Anexo 5	Espectro tridimensional de muestra (Levotiroxina sódica tableta). Lima-2022.	59
Anexo 6	Identificación. Comparación de muestra que contiene el analito con base de datos (espectros) de diferentes estándares de referencia. Lima-2022.	60
Anexo 7	Estadísticas de curva de calibración de concentración versus área, para la evaluación de la linealidad del sistema, del método analítico. Lima-2022.	61
Anexo 8	Estadísticas de curva de calibración de concentración versus área, para la evaluación de la linealidad del método analítico y exactitud. Lima – 2022.	62
Anexo 9	Resumen de datos y resultados de linealidad de sistema. Lima-2022.	63
Anexo 10	Residuales, concentración versus residuos, para la evaluación de la aleatoriedad de los resultados en la prueba de linealidad de sistema. Lima- 2022.	64
Anexo 11	Resumen de datos y resultados de linealidad de método. Lima-2022.	65
Anexo 12	Residuales, concentración versus residuos, para la evaluación de la aleatoriedad de los resultados en la prueba de linealidad de método. Lima-2022.	66
Anexo 13	Resultados y evaluación estadística de la linealidad. Lima-2022.	67
Anexo 14	Matriz de consistencia	68

RESUMEN

A través de la validación se obtienen pruebas documentadas que demuestran que un método es confiable y reproducible. En el presente estudio, el objetivo fue validar un método analítico utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para cuantificar levotiroxina sódica en tabletas. La investigación se llevó a cabo en el laboratorio farmacéutico Medifarma SA, ubicado en la ciudad de Lima. Se realizó una evaluación descriptiva simple. Las condiciones cromatográficas del método evaluado fueron, la columna cromatográfica de relleno L1 (Hypersil DBS C18), 250 mm x 4,6 mm x 5 μ m; la velocidad de flujo isocrático de 1,0 mL/min; la temperatura del horno de columna a 25 °C y el volumen de inyección de 20 μ L. El análisis y evaluación de algunos parámetros de validación garantiza la especificidad adecuada del método, con purezas de pico superiores a 999,5. Además, se obtuvo una linealidad con un coeficiente de determinación (r^2) de 0,9997 y 0,9996 para la linealidad del sistema y del método, respectivamente. El método analítico demostró exactitud en el rango de trabajo del 70 % al 130 %, con una recuperación del analito (levotiroxina sódica) del 99,58 %. Con una repetibilidad de 0,22 % y precisión intermedia de 0,00 %. El conjunto de resultados alcanzados nos permite decir que el método analítico validado para la cuantificación de levotiroxina sódica en tabletas es confiable. En conclusión, se validó el método analítico utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para cuantificar levotiroxina sódica en tabletas, el cual cumple los parámetros de especificidad, linealidad, intervalo, exactitud y precisión.

Palabras clave: Levotiroxina sódica, validación, método analítico.

I. INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica, como parte del cumplimiento de las normativas Internacionales BPL y BPM, recurre a la validación de métodos analíticos, con el cual se busca demostrar que los métodos analíticos son adecuados para su propósito. Para ello se realizan una serie de pruebas denominadas parámetros de validación, a los cuales se someterán los métodos analíticos a validar.¹

Un método analítico validado, es usado como alternativa a las monografías farmacopeicas. Los organismos regulatorios como *The United States Pharmacopeia* (USP), *Food and Drug Administration* (FDA) y *International Conference on Harmonisation* (ICH), exigen la realización de estudios de validación, para el cumplimiento, como requisito imprescindible de la Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).²

En la industria farmacéutica se busca que los métodos analíticos sean lo más confiable posible, para lo cual se utilizan técnicas como la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), que se caracteriza por la eficiencia en la separación y cuantificación de analitos por medio de la detección e identificación de picos cromatográficos. La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) ofrece numerosas ventajas en comparación con los métodos analíticos tradicionales. Esta técnica permite realizar análisis con tiempos rápidos, logrando la separación y diferenciación de componentes de una muestra en combinaciones complejas con alta resolución. Además, el HPLC facilita la ejecución de análisis con exactitud y facilidad. Una de las ventajas más destacadas de esta tecnología es su sistema automatizado. Mediante el uso de un sistema HPLC automatizado, se puede inyectar la muestra, llevar a cabo la separación cromatográfica, identificar y cuantificar cada sustancia encontrada en la muestra, y finalmente repetir el ciclo con otra muestra.³

La glándula tiroidea produce dos hormonas relacionadas, la tiroxina (T4) y la triyodotironina (T3), estas hormonas desempeñan funciones muy importantes desde el desarrollo fetal, hasta la conservación del homeostasis termogénica y metabólica en el adulto.⁴ El uso de hormonas sintéticas como la Levotiroxina sódica vienen siendo utilizadas para el tratamiento de diversas enfermedades relacionadas con la deficiencia de las hormonas tiroideas.

La importancia de un método analítico confiable para la industria farmacéutica, permite que los medicamentos evaluados en las diferentes áreas de control, sean seguros y eficaces para el propósito por el cual fueron indicados.³

El método analítico validado permitirá el control cuantitativo rápido, seguro y eficaz de los productos farmacéuticos que contengan Levotiroxina sódica tabletas. Contribuyendo al crecimiento tecnológico y científico de los sectores donde se requieran.

Los objetivos planteados fueron los siguientes:

Objetivos generales

Validar un método analítico por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para la cuantificación de Levotiroxina sódica en tabletas y documentar los resultados obtenidos.

Objetivos específicos

- Determinar la especificidad del método analítico.
- Determinar la linealidad del sistema, linealidad del método y el intervalo del método analítico.
- Determinar la exactitud, repetibilidad y precisión intermedia del método analítico.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del estudio

Arévalo⁵, realizó un trabajo de investigación donde desarrolló y validó un método analítico para determinar ácidos grasos como el oleico, palmítico y esteárico por HPLC en diferentes aceites vegetales”, este trabajo fue presentado en Ecuador, en el año 2021. El objetivo fue determinar los parámetros de validación establecidos por la ICH. Se establecieron las condiciones experimentales para la cromatografía utilizando estándares de los ácidos grasos mencionados. El sistema cromatográfico fue desarrollado y adecuado para el buen rendimiento analítico. Posteriormente, se procedió al procesamiento de adecuación de la muestra, que consistió en la hidrólisis de la misma. Los ácidos grasos libres resultantes se reconstituyeron utilizando hexano, el cual fue posteriormente evaporado y nuevamente reconstituido con metanol para su análisis mediante HPLC. En la validación, se logró una recuperación de analito de 100,3 % en promedio. La linealidad del método presentó un coeficiente de determinación (r^2) superior a 0,98. Además, se determinó que la incertidumbre fue del 4,76 % para el ácido oleico, 8,08 % para el ácido palmítico y 1,62 % para el ácido esteárico. Cada ácido graso fue validado de forma independiente y los tres cumplieron con todos los parámetros establecidos en el protocolo de validación.

Mustafá *et al.*⁶, Publicaron un trabajo de investigación titulado “Determinación simultánea de amoxicilina, lansoprazol y levofloxacina en productos farmacéuticos mediante HPLC con detector UV-Vis”, en el país de China, en el año 2020. La investigación se enmarcó en la determinación de los parámetros de validación establecidos por la ICH. En la investigación realizada se utilizó como técnica la cromatografía líquida de alto rendimiento, así como un detector UV-Vis con arreglo de diodos, se realizaron algunos ensayos que forman parte de los parámetros de validación. Se obtuvieron excelentes correlaciones de calibración (r^2 : 0,9942,

0,9997 y 0,9974) para amoxicilina, lansoprazol y levofloxacina respectivamente. Los porcentajes de recuperación de amoxicilina, lansoprazol y levofloxacina en productos farmacéuticos comerciales se obtuvieron como 105,5%, 98,57% y 102,5%, respectivamente. El método de cuantificación fue validado exitosamente, cumpliendo con los parámetros establecidos en el protocolo de validación.

Logoyda *et al.*⁷, realizaron un trabajo de científico de investigación, donde se desarrolló y validó por método HPLC, la determinación simultánea de maleato de enalapril en presencia de sus impurezas con aplicación al análisis de tabletas, en el país de Ucrania, en el año 2018. El sistema cromatográfico con flujo isocrático fue desarrollado y adecuado para el buen rendimiento analítico. El método propuesto se validó de acuerdo con las directrices de la ICH con un tiempo de ejecución total inferior a 9 minutos. El coeficiente de correlación (r^2) fue de 0,99981 que indica que el método fue lineal a la concentración frente a las respuestas del área del pico cromatográfico. En conclusión, el método analítico fue validado exitosamente, cumpliendo con las directrices de la ICH, el método desarrollado y validado fue utilizado para la determinación del maleato de enalapril en presencia de sus impurezas en forma de tableta.

Choque⁸, publicó un trabajo en el que desarrolló y validó un método analítico que indica la estabilidad del ácido acetil salicílico en tabletas por método de cromatografía HPLC, Bolivia año 2017. El método analítico que indica la estabilidad del analito, las condiciones cromatográficas se establecieron para una fase reversa isocrática, con presencia de solvente orgánico y solución tampón para la fase móvil. El resultado mostró una resolución entre picos de 7,41 entre picos cercanos y un coeficiente de variación entre inyecciones de $\pm 0,96\%$. Se sometió a diferentes tipos de degradación forzada como la termólisis en estufa, oxidación, fotólisis en cámara acondicionada e hidrólisis ácida y alcalina. Se determinó que las soluciones fueron más estables frente a la fotólisis y la hidrólisis ácida. Además, se evaluó la robustez de la muestra para su análisis en diferentes intervalos de tiempo, y se encontró que la muestra se mantuvo estable hasta los 120 minutos. El método fue validado utilizando parámetros de validación establecidos en las directrices de la ICH y farmacopeas de referencia.

Jitendra *et al.*⁹, trabajaron en la investigación titulada “Desarrollo y validación de un nuevo método RP-HPLC de dapagliflozina en Forma de dosificación a granel y en tabletas”, India año 2017. Para lo cual se utilizaron los criterios de validación establecido por la ICH, la técnica elegida fue RP-HPLC. El sistema cromatográfico

fue de fase reversa isocrático, para la detección se utilizó un detector DAD. Se encontró que el tiempo de retención de dapagliflozina era de 3,461 minutos. La validación del método desarrollado se realizó según la USP y Directrices de la ICH. La validación del método reveló que el método es rápido, exacto, preciso, confiable y reproducible. Los gráficos de calibración lineal fueron obtenidos en el rango de concentración de 10-60 µg/mL para Dapagliflozin. El límite de detección fue de 0,02 µg/mL y el límite de cuantificación fue de 0,06 µg/mL para Dapagliflozin. La alta recuperación y los bajos coeficientes de variación confirman la eficacia del proceso en la forma farmacéutica. Los parámetros de validación fueron realizados exitosamente indicando que el método es válido y puede ser utilizado con éxito para el análisis cuantitativo de tabletas disponibles comercialmente.

Hurtado¹⁰, llevó a cabo un estudio de investigación titulado "Desarrollo y validación de una metodología analítica para la determinación de diez residuos de antibióticos veterinarios en *Oncorhynchus mykiss*" en el año 2021, en la Universidad Peruana Cayetano Heredia. En esta investigación, se vio por conveniente el uso de la cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a un detector de ICP-masas de triple cuadrupolo. El objetivo fue validar el método analítico de acuerdo a los criterios de aceptabilidad descritos en la guía de validación de métodos químicos del Programa de Alimentos y Medicina Veterinaria de la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA). Los parámetros evaluados incluyeron la selectividad, linealidad (con valores de $r \geq 0,997$ y $r^2 \geq 0,994$), sensibilidad, el límite de detección (con valores $\leq 1,994$ µg/Kg), límite de cuantificación (con valores $\leq 6,647$ µg/Kg), la recuperación (entre 90% y 118%), precisión (menor al 6%), precisión intermedia (menor al 9%) y el rango mínimo de trabajo (desde 5,6 µg/Kg hasta 14,4 µg/Kg). El resultado de la validación del método fue exitoso, lo que indica que se cumplió con los criterios establecidos en la guía de validación del Programa de Alimentos y Medicina Veterinaria de la FDA.

Bocanegra¹¹, publicó el trabajo de investigación científica sobre la validación de un método por cromatografía líquida de alta resolución con el objetivo de determinar cinco vitaminas hidrosolubles en solución endovenosa inyectable, en la Universidad Nacional de Trujillo año 2021. El objetivo de la investigación fue evaluar diferentes parámetros de validación para la cuantificación de cinco vitaminas hidrosolubles, las vitaminas analizadas fueron: riboflavina 5-fosfato

sódica, ácido ascórbico, pantenol, piridoxina clorhidrato y nicotinamida. Para lograrlo, se implementó un sistema de cromatografía líquida en gradiente que utilizó metanol como fase móvil y una solución buffer de hexanosulfonato sódico a pH 2,7, se empleó una columna L1. La detección se realizó mediante un arreglo de diodos. Además, se utilizaron solventes orgánicos y soluciones tampón como fase móvil y diluyente. Los resultados obtenidos fueron favorables en términos de precisión instrumental, ya que tanto el área como el tiempo de retención presentaron una R.S.D. (Desviación Estándar Relativa) menor o igual al 2,0%. La metodología analítica demostró ser específica, con purezas de pico de no menos de 0,99, la degradación oxidativa del ácido ascórbico mostró una pureza de pico de entre 0,75 a 0,79. Se demostró linealidad y exactitud, recuperando entre el 98,0 % y el 102,0 % de las concentraciones propuestas. Además, la precisión intramétodo e intralaboratorio también obtuvo valores de R.S.D. inferiores al 2,0%. En conclusión, los parámetros de validación establecidos, cumplieron con las especificaciones dadas para los analitos sometidos a prueba: riboflavina 5-fosfato sódica, ácido ascórbico, pantenol, piridoxina clorhidrato y nicotinamida. Por lo tanto, se determinó que la metodología analítica es adecuada para su uso bajo las condiciones propuestas.

Bardales *et al.*¹², llevaron a cabo una investigación titulada "Validación de una metodología por cromatografía líquida de alta resolución para la valoración de cloruro de benzalconio en Gentamicina 0,3% solución oftálmica" en la Universidad Nacional de Trujillo en el año 2021. El propósito principal de esta investigación fue evaluar diversos parámetros de validación para asegurar la fiabilidad del método analítico utilizado. Para lograr esto, se empleó un método de cromatografía líquida de alta resolución. Los parámetros evaluados incluyeron la especificidad, linealidad, exactitud, precisión, robustez y rango. Los resultados obtenidos mostraron que la metodología fue exitosa en cada uno de estos aspectos: El método fue específico, ya que no hubo interferencias significativas por parte de excipientes o productos de degradación que pudieran afectar el análisis del cloruro de benzalconio, el analito de interés. Se demostró que la relación entre la concentración del analito y la respuesta del detector fue lineal, $r = 0,9998$ como valor de coeficiente de correlación. Los valores de desviación estándar relativa (DRS) se mantuvieron por debajo del 2 %, cumpliendo con los criterios de precisión establecidos. Se obtuvo una recuperación promedio del 99,88 %, lo que indica que los resultados obtenidos se acercaron al valor verdadero o teórico. El

método fue considerado robusto, ya que cumplió con los criterios de aceptación establecidos para el coeficiente de variación, presentando una variación dentro del 2 % aceptable y dentro del intervalo establecido. En conclusión, la metodología analítica demostró cumplir con los parámetros de especificidad, linealidad, exactitud, precisión y robustez para la cuantificación de cloruro de benzalconio en el colirio de Gentamicina al 0,3 %. Esto asegura la confiabilidad y aplicabilidad del método analítico en la determinación de la cantidad de cloruro de benzalconio en dicha solución.

Fabian¹³, publicó el trabajo de investigación titulado “Validación del método analítico por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de triprolidina clorhidrato y dextrometorfano bromhidrato en jarabe”, en la Universidad Nacional de Trujillo año 2021. En la investigación se realizó la evaluación de la precisión, exactitud, especificidad y linealidad. El método utilizado para el estudio fue la cromatografía líquida de alta resolución. La investigación demostró que la metodología analítica es altamente selectiva, ya que no se observó interferencia de excipientes o productos degradados en el análisis del principio activo. Además, se evidenció que el método es lineal, ya que los coeficientes de correlación obtenidos fueron 0,99999 para triprolidina clorhidrato y 0,99998 para dextrometorfano bromhidrato, lo cual indica la buena vinculación entre la concentración del analito en muestra y la respuesta del detector. La precisión del sistema e intermedia, expresada como desviación estándar relativa (DSR), arrojó valores inferiores al 2 %. Esto indica una alta precisión en las mediciones, tanto dentro del mismo sistema como entre diferentes análisis. Por otro lado, la exactitud del método se determinó mediante la recuperación, la cual fue del 100,18 % para triprolidina clorhidrato y 100,38 % para dextrometorfano bromhidrato. En conclusión, el método analítico validado en esta investigación es confiable, consistente y adecuado para su uso en los análisis de rutina previstos. Se garantiza la precisión y fiabilidad de los resultados en la cuantificación de triprolidina clorhidrato y dextrometorfano bromhidrato.

Choque¹⁴, realizó un trabajo de investigación, donde validó una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para la cuantificación de clorhidrato de clorhexidina + benzocaína + enoxolona en comprimidos orales. Los trabajos fueron realizados en la Universidad Católica de Santa María en el año 2017. La investigación se enmarcó en la evaluación de la performance de los procedimientos analíticos para determinar la aptitud del sistema, la exactitud, la

especificidad, la exactitud y la precisión del método. También se llevó a cabo una prueba de estabilidad para demostrar la robustez de la muestra. El análisis cromatográfico se realizó mediante la adición del solvente de manera isocrática. El tiempo de retención aproximada para la benzocaína, clorhexidina HCl y enoxolona fue de 2,52 minutos, 3,88 minutos y 9,87 minutos, respectivamente, por esta razón se estableció un tiempo de corrida adecuada, no menor de 15 minutos. Se obtuvieron los siguientes resultados: No se observan interferencias en la especificidad, la interferencia de placebo es de 0,0 % para cada uno de los analitos. El coeficiente de correlación obtenido fue de 0,99937 para benzocaína, 0,99935 clorhexidina HCl y 0,99904 para enoxolona, en la evaluación de la linealidad. Para evaluación de la repetibilidad, se encontró un C.V. de 0,40 % para benzocaína, 1,25 % para clorhexidina HCl y 0,85 % para enoxolona. El porcentaje de recuperación obtenido fue de 99,41 % para benzocaína, 100,42 % para clorhexidina HCl y 99,30 % para enoxolona. Para demostrar la robustez, se realizó la prueba de estabilidad, obteniendo una diferencia de 0,33 para Clorhexidina HCl, 1,49 para benzocaína y 1,68 para enoxolona; los tiempos de análisis fueron de 0, 12 y 24 horas. En conclusión, se demostró que el método es fiable, proporcionando evidencia documentada de su validez y utilidad mediante la evolución de los parámetros de validación.

2.2. Marco conceptual

2.2.1. Validación

Es un proceso donde se realizan investigaciones en el laboratorio, que buscan garantizar y comprobar que un método analítico específico producirá resultados consistentes y fiables, apropiados para el propósito deseado. Para lo cual se evalúan diferentes parámetros de validación, la preferencia de los parámetros a evaluar dependerá de la categoría en la cual se ubique según la USP – ICH.^{15, 16}

2.2.2. Parámetros de validación

A. Especificidad

Se refiere a la condición de poder distinguir de manera clara y precisa el compuesto analizado en medio de otras sustancias de la muestra que se podrían anticipar como presentes. Habitualmente, estos otros componentes podrían comprender impurezas, productos de degradación, matriz, entre otros.¹⁵

Estos son los efectos de esta definición:

- a. Identificación: para garantizar la identidad de un analito.

- b. Ensayo (contenido o potencia): para proporcionar un resultado exacto que permita una declaración precisa sobre el contenido o la potencia del analito en una muestra.

B. Exactitud

La exactitud de un método analítico se refleja en qué tan cerca están los resultados de la prueba obtenidos a través del método analítico empleado respecto al valor real. Es esencial determinar la exactitud de un procedimiento analítico en todo el rango de alcance.¹⁶

En la evaluación del analito en un producto formulado, se puede determinar la exactitud aplicando el procedimiento analítico a mezclas sintéticas de los componentes presentes en el producto farmacéutico, a las cuales se les agregan cantidades conocidas del analito dentro del rango del procedimiento. Los cálculos de la exactitud se realizan mediante la obtención del porcentaje de recuperación de la cantidad estimada en comparación con la cantidad conocida del analito agregado a la muestra, o también como la diferencia entre la media de la estimación y el valor verdadero aceptado, teniendo en cuenta los intervalos de confianza.¹⁶

De acuerdo con las recomendaciones de ICH, se sugiere realizar la evaluación de la exactitud con nueve determinaciones realizadas en al menos tres niveles de concentración diferentes, abarcando el rango especificado. Esto significa que se deben realizar tres mediciones repetidas en cada uno de los tres niveles de concentración para un total de nueve determinaciones. Esta aproximación garantiza una evaluación rigurosa y confiable de la exactitud del procedimiento analítico.¹⁶

C. Precisión

Se manifiesta como la cercanía en términos de acuerdo (nivel de dispersión) entre una secuencia de mediciones derivadas de múltiples muestras de una misma muestra uniforme en las condiciones especificadas. Los niveles de evaluación a considerar se son: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.¹⁵

La evaluación de este parámetro requiere el uso de muestras genuinas y homogéneas. En situaciones donde obtener una muestra homogénea resulta inviable, es factible llevar a cabo investigaciones empleando muestras artificialmente preparadas o soluciones de muestra. Dicha evaluación se suele realizar mediante la medición de varianza, la desviación estándar o el C.V a partir de una sucesión de mediciones repetidas.¹⁵

- a. Repetibilidad: La repetibilidad expresa la precisión del método en las mismas condiciones de trabajo durante el tiempo de corrida. La repetibilidad también se denomina precisión intraensayo.
- b. Precisión intermedia: La precisión intermedia expresa la variación de resultados dentro del mismo laboratorio: en diferentes días, con diferentes analistas, y en diferentes equipos.

D. Linealidad

El objetivo de esta evaluación es determinar la capacidad del método analítico, dentro de un rango determinado, para obtener resultados de prueba que son directamente proporcionales a la concentración o cantidad del analito presente en la muestra. Esto nos podrá garantizar una medición precisa y confiable en diferentes niveles de concentración.¹⁵

E. Rango

Es el intervalo de las concentraciones de la muestra para el que se ha demostrado que el procedimiento analítico tiene un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad.¹⁵

Algunos libros oficiales lo denominan como intervalo.

F. Robustez

Se refiere a la evaluación de cómo un método analítico puede resistir cambios intencionados y pequeños en los parámetros del procedimiento de análisis, lo que a su vez señala cuán fiable es en condiciones de uso habitual en el laboratorio. Esta evaluación puede llevarse a cabo durante la fase de desarrollo del método analítico.¹⁵

2.2.3. Tipos de procedimientos analíticos a validar

La evaluación sobre la validación de procedimientos analíticos se centra en los cuatro tipos de pruebas:

- Pruebas para la identificación de analitos.¹⁵
- Pruebas para la cuantificación del contenido de impurezas.¹⁵
- Pruebas para la determinación del límite de impurezas.¹⁵
- Pruebas de desempeño como la disolución.¹⁵

Tabla 1. Parámetros de validación según el Consejo Internacional para la Armonización de Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH).

Procedimiento analítico.	Identificación de analitos	Pruebas de impurezas	-Valoración
Características	Cuantificación	Límite	-Disolución -Contenido
Exactitud	-	+	- +
Precisión			
Repetibilidad	-	+	- +
Precisión intermedia	-	+	(1) - + (1)
Especificidad (2)	+	+	+ +
Límite de detección	-	-	(3) + -
Límite de cuantificación	-	+	- -
Linealidad	-	+	- +
Intervalo	-	+	- +

- No es necesaria su evaluación.

+ Se requiere de su evaluación.

(1) Si se ha evaluado la reproducibilidad, no será necesario evaluar la precisión.

(2) La carencia de especificidad en un método analítico podría ser contrarrestada mediante el respaldo de otros enfoques analíticos.

(3) Evaluar la necesidad de su evaluación

La farmacopea de los Estados Unidos de América (USP), también establece los parámetros que se deben determinar para la validación de un método analítico, según la categoría en la que las agrupa. Estas son:

Categoría I: Métodos de análisis utilizados para cuantificar los componentes fundamentales de medicamentos en estado sin procesar o los ingredientes activos (junto con los agentes conservantes) en productos farmacéuticos terminados.

Categoría II: Métodos de análisis destinados a identificar impurezas en medicamentos en estado granel o productos de degradación en medicamentos terminados. Estos procesos incluyen tanto análisis cuantitativos como pruebas de límite.

Categoría III: Se lleva a cabo la valoración de las propiedades de desempeño (como la solubilidad y la liberación de fármacos, entre otras).

Categoría IV: Se utilizan para validar las técnicas espectroscópicas cualitativas de identificación. Sin embargo, cada una de las diferentes técnicas se puede

utilizar para una variedad de propósitos diferentes, y el uso específico de una técnica en particular.¹⁶

Tabla 2. Información necesaria para la validación según la farmacopea de los Estados Unidos de América.

Características de desempeño analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis cuantitativo	Pruebas de límite		
Exactitud	Si	Si	a	a	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Si	a	Si
Límite de detección	No	No	Si	a	No
Límite de cuantificación	No	Si	No	a	No
Linealidad	Si	Si	No	a	No
Intervalo	Si	Si	a	a	No

a Pueden ser necesarios dependiendo de la naturaleza particular de la prueba en cuestión.

2.2.4. Cromatografía líquida de alto rendimiento

Gracias a la capacidad para separar elementos de diferente naturaleza presentes en una mezcla, la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) se presenta como una técnica de cromatografía muy utilizada. Se utiliza en una variedad de aplicaciones industriales, incluidas las farmacéuticas, bioquímicas, alimenticias, productos químicos, medicina clínica y química forense.

Este método utiliza la fase móvil y la fase estacionaria. La muestra se transporta a través de la fase estacionaria por medio de la fase móvil la cual es líquida. La retención y el proceso de separación de cada uno de los elementos de la mezcla son influenciados por las diferentes fuerzas químicas y físicas que interactúan entre la mezcla analizada y las dos fases. Los elementos que presentan una mayor relación de afinidad hacia la fase estacionaria se moverán con una velocidad menor en comparación con los componentes que tienen una afinidad menor.¹⁷

Equipo

El equipo cromatográfico HPLC, por lo general trabaja con cinco instrumentos principales: los frascos que contienen la fase móvil, la bomba, el inyector, el horno de columna, el detector y el sistema de toma y procesamiento de datos.¹⁷

a. Reservorio de fase móvil

Es el recipiente que contiene la fase móvil. Por lo general, se coloca en una posición elevada con respecto al nivel de la bomba para permitir que la gravedad

dirija el solvente hacia ella, asegurando así que las conexiones se mantengan llenas.

Se puede emplear cualquier recipiente de laboratorio de alta calidad, fabricado en vidrio o polímeros resistentes, junto con una tapa adecuada para prevenir la entrada de partículas del entorno al sistema, como reservorio de la fase móvil. Incluso se puede utilizar los mismos envases donde se comercializan los solventes y de esa manera evitar la contaminación cruzada.

Al extremo del tubo de salida de solvente se conecta un filtro con 2 a 10 μm de porosidad que impide el ingreso de partículas a la bomba.¹⁸

b. Bomba

La fase móvil es impulsada por bombas hacia el inyector y luego hacia la columna desde el reservorio de solvente. Su caudal de trabajo puede variar según sea necesario. Las bombas de pistón, también conocidas como bombas reciprocantes, y las de desplazamiento continuo, también conocidas como bombas de jeringa, son dos tipos de bombas. Las mencionadas en primer lugar son las más comunes porque son adaptables y fáciles de usar en el laboratorio.¹⁸

c. Inyector

La pieza del equipo que permite inyectar la muestra en la solución sin interrumpir el flujo de solvente a través del sistema se conoce como inyector. El inyector tiene varias características, como:

- Debe ser mostrar facilidad para su manipulación
- Debe mostrar inercia frente al ataque y desgaste químico.
- Debe tener la capacidad de soportar presiones elevadas.
- Debe mostrar precisión en la cantidad de muestra que va introducir en el sistema.¹⁸

d. Horno de columna

El horno se encarga de regular y mantener la temperatura dentro de la columna, ya que esta influye directamente en la retención y selectividad de la misma.¹⁷

e. Detector

Este elemento del equipo posibilita la "observación" de cada componente de una muestra al salir de la columna cromatográfica.

Este elemento debe de cumplir con ciertos requisitos, como:

- Contar con una respuesta que abarque un amplio rango dinámico.
- Exhibir una respuesta en forma lineal.
- No causar el ensanchamiento de la banda fuera de la columna.

- Debe dar una respuesta a todos los solutos.
- Debe poseer una sensibilidad apropiada.
- Permanecer inalterado ante variaciones de temperatura.
- Mostrar una relación señal/ruido satisfactorio.

los detectores utilizados en cromatografía HPLC pueden ser generales o selectivos. Los detectores generales evalúan el cambio en alguna propiedad física de la fase móvil que contiene el analito en comparación con la fase móvil pura. Ejemplos de detectores generales son el detector de índice de refracción y el detector de conductividad. Por otro lado, los detectores selectivos son sensibles a las características del soluto, como el detector ultravioleta, que emite una señal proporcional a la absorbancia del soluto a una longitud de onda específica.¹⁸

Algunos ejemplos de detectores son:

- Detector de Índice de refracción
- Detector UV
- Detector de fluorescencia
- Detector electroquímico.

f. Sistema de toma y procesamiento de datos

Se producen dos resultados a partir del ensayo cromatográfico. Por una parte, se logran divisiones individuales de los constituyentes de la muestra, mientras que, por otra parte, se genera un gráfico cromatográfico que puede analizarse para derivar conclusiones tanto cualitativas como cuantitativas. Un sistema de toma de muestra y procesamiento de datos se utiliza para obtener este registro y posterior manipulación de la señal del detector.¹⁸

Forman parte de este sistema:

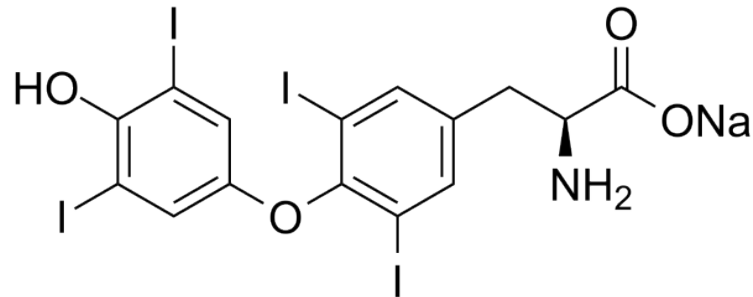
- Registrador gráfico
- Integrador
- Computadora

2.2.5. Levotiroxina sódica

Características Físicoquímicas

El principio activo farmacéutico se presenta como un polvo que tiende a absorber humedad, con un tono amarillo claro a beige, carece de olor y sabor. Es estable en ambientes secos, aunque puede adquirir un matiz ligeramente rosado al estar expuesto a la luz. Se disuelve en soluciones de hidróxidos alcalinos y en soluciones calientes de carbonatos alcalinos. Muestra una baja solubilidad en

alcohol, una solubilidad muy limitada en agua, y no es soluble en acetona, cloroformo ni éter.¹⁶



3,3',5,5'- tetrayodotironina

Figura 1: Estructura química de levotiroxina sódica.

Farmacología

La Levotiroxina es una sal sódica del isómero L de tiroxina (tetrayodotironina, T4). Esta molécula es usada para reemplazar una hormona producida normalmente por la glándula tiroides para regular la energía y el metabolismo del cuerpo.¹⁹

a. Farmacodinamia

La Levotiroxina entra a las células por transporte activo, dentro de la célula la T4 se convierte en T3, ésta última ingresa al núcleo donde se une a una proteína específica del receptor tiroideo T3, lo cual conduce a una mayor formación de RNA y la posterior síntesis de proteínas.²⁰

b. Farmacocinética

La absorción ocurre casi exclusivamente en el duodeno, pudiendo alcanzar hasta un 80 %. Si se toma con alimentos, la absorción puede disminuir. A las dos o tres horas después de la digestión alcanza su punto máximo en el plasma. La acción comienza a los 3-5 días después de haber sido ingerido por vía oral.

El volumen de distribución oscila entre diez y doce litros. La afinidad de la levotiroxina por proteínas transportadoras específicas es excepcionalmente elevada, cercana al 99,97%. Dado que la unión entre proteína y hormona no es de tipo covalente, la fracción de hormona unida en el plasma experimenta un constante y rápido intercambio con la fracción libre de la hormona.

El proceso metabólico de la levotiroxina es de aproximadamente 1,2 litros de plasma por día. Se descompone principalmente en el hígado, el riñón, el cerebro y el músculo. Los metabolitos se eliminan a través de la orina y las heces. La vida

útil promedio de la levotiroxina es de siete días, con una disminución en el hipertiroidismo (3 a 4 días) y un aumento en el hipotiroidismo (9 a 10 días).²¹

2.2.6. Medicamento

a. Ingrediente farmacéutico activo:

También llamado principio activo, es aquella sustancia química que presenta actividad terapéutica.²²

b. Excipientes:

Son aquellos componentes del medicamento que no presentan actividad terapéutica. Los excipientes desempeñan una función determinante en la elaboración, conservación, estabilidad y liberación de los principios activos.²²

En el análisis de medicamentos, el conjunto de excipientes es llamado placebo o matriz del producto farmacéutico.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

La investigación tuvo lugar en las instalaciones del laboratorio Farmacéutico Medifarma S.A., situado en el distrito de Ate en el departamento de Lima.

3.2. Población y muestra

Población: Grupo de lote piloto de 20 000 tabletas, producido en las instalaciones del laboratorio farmacéutico Medifarma S.A., área de Investigación y Desarrollo.

Muestra: 500 tabletas muestreadas de manera aleatoria simple.

Estándar de referencia:

Levotiroxina sódica

Tipo de estándar : secundario

Lote : MP00019201

Potencia : 89,6 % T/C

Fecha de expira : Septiembre 2023

3.3. Metodología y recolección de datos

3.3.1. Tipo de investigación

Descriptivo transversal de nivel básico

3.3.2. Desarrollo del método analítico

Fase móvil: Se preparó una mezcla filtrada y desgasificada de Metanol, agua purificada y ácido orto fosfórico en la siguiente proporción (670:330:0.5) respectivamente en mL.

Longitud de onda: espectro ultravioleta a 225 nm

Columna cromatográfica: L1 (Hypersil DBS C18), 25 cm x 4,6 mm x 5 µm

Velocidad de flujo: 1,0 mL/min

Temperatura de horno: 25 °C

Volumen de inyección: 20 µL

Tiempo de corrida: 15 minutos

Tiempo de retención: 11,2 minutos aproximadamente

Diluyente:

Solución de Hidróxido de sodio 0,01 N.- Se pesó aproximadamente 4,0 g de hidróxido de sodio a un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvió con 50 mL de agua purificada y se llevó a volumen con agua purificada. Luego se midió 10 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 1000 mL, se llevó a volumen con agua purificada.

Preparación del estándar

Se pesó con exactitud una cantidad equivalente a 25,0 mg de Levotiroxina sódica y se transfirió a una fiola de 500 mL, se agregó 200 mL de diluyente y se llevó al baño de ultrasonido por 5 minutos, se dejó atemperar y luego se diluyó hasta alcanzar el volumen de aforo. Se midió 5 mL de la solución anterior a una fiola de 25 mL, se homogeneizó y filtró por membrana PVDF de tamaño de poro de 0,45µm a un vial ámbar para cromatografía. (Concentración aproximada: 0,01 mg/mL de Levotiroxina sódica).

Preparación de la muestra

Se tomaron 20 tabletas y se molieron a polvo fino, luego se pesó con exactitud alrededor de 250 mg de polvo (equivalente a 0,25 mg de levotiroxina sódica) y se transfirió a una fiola de 50 mL, se agregaron volumétricamente 25,0 mL de diluyente y se llevó a baño de ultrasonido por 15 minutos con agitación intermitente. Se dejó atemperar las muestras, luego se llevó a centrifugar por 15 minutos a 3500 rpm. Se filtró el sobrenadante por papel filtro de tamaño de poro de 2 a 3 µ, luego se volvió a filtrar por membrana PVDF de tamaño de poro de 0,45 µm a un vial ámbar para cromatografía. (Concentración aproximada: 0,01 mg/mL de Levotiroxina sódica).

Cálculos

Levotiroxina sódica µg/tab.

Dónde:

- A M : Área de Levotiroxina sódica en la muestra.
A St : Área de Levotiroxina sódica en el estándar.
W St : Peso del estándar expresado en mg.
Pot St : Potencia del estándar expresado en fracción decimal como tal cual.
W M : Peso de la muestra expresado en mg.
PP : Peso promedio expresado en mg.
1000 : Factor de conversión de mg a µg.

$$\frac{A M}{A St} \times \frac{W St}{500} \times \frac{5}{25} \times Pot St \times \frac{25}{W M} \times PP \times 1000$$

3.3.3. Determinación de parámetros de validación

3.3.2.1 Precisión Instrumental

Para medir este valor, se inyectó la solución estándar seis veces seguidas. Se calculó la desviación estándar relativa (RSD) de las áreas y los tiempos de retención. La desviación estándar relativa debe ser del 2 % o menos.

3.3.2.2 Especificidad

A. Determinación de posibles interferentes

Se analizó diluyente, placebo, analito y analito más placebo, según la técnica analítica propuesta. Examinando las respuestas del análisis en comparación con las de un estándar. La especificidad del método se evaluó al contrastar los resultados del análisis del principio activo tanto con, como sin la presencia del placebo.

Los resultados de interferencia deben ser no significativos, presentando no más de 0,5 % de interferencia.²⁴. El valor de pureza de pico se debe de encontrar entre 995 y 1000.

Placebo, analito y analito más placebo fueron evaluados por duplicado. Las muestras se inyectaron por duplicado.

Placebo: Se realizó una medición precisa de aproximadamente 249,75 mg de placebo en una fiola de 50 mL, se agregaron volumétricamente 25,0 mL de diluyente y se llevó a baño de ultrasonido por 15 minutos con agitación intermitente. Se dejó atemperar las muestras, luego se llevó a centrifugar por 15

minutos a 3500 rpm. Se filtró el sobrenadante por papel filtro de tamaño de poro de 2 a 3 μ m, luego se volvió a filtrar por membrana PVDF de tamaño de poro de 0,45 μ m a un vial ámbar para cromatografía. (Concentración aproximada: 0,01 mg/mL de Levotiroxina sódica).

Analito: Se pesó con exactitud una cantidad equivalente a 25,0 mg de Levotiroxina sódica, se transfirió a una fiola de 500 mL, luego se agregó 200 mL de diluyente y se llevó al baño de ultrasonido por 5 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se diluyó hasta alcanzar el volumen de aforo. Se midió con exactitud 5,0 mL de la solución anterior y se llevó a una fiola de 50 mL, a ésta fiola se le añadió volumétricamente 20,0 mL de diluyente, se llevó a baño de ultrasonido por 15 minutos con agitación intermitente, luego se centrifugó por 15 minutos a 3500 rpm. Se filtró el sobrenadante por papel filtro de tamaño de poro de 2 a 3 μ m, luego se volvió a filtrar por membrana PVDF de tamaño de poro de 0,45 μ m a un vial ámbar para cromatografía. (Concentración aproximada: 0,01 mg/mL de Levotiroxina sódica).

Analito + Placebo: Se pesó con exactitud una cantidad equivalente a 25,0 mg de Levotiroxina sódica, se transfirió a una fiola de 500 mL, luego se agregó 200 mL de diluyente y se llevó al baño de ultrasonido por 5 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se diluyó hasta alcanzar el volumen de aforo. Se midió con exactitud 5,0 mL de la solución anterior y se llevó a una fiola de 50 mL, se pesó con exactitud alrededor de 249,75 mg de placebo y se agregó a la misma fiola, se añadió volumétricamente 20,0 mL de diluyente, se llevó a baño de ultrasonido por 15 minutos con agitación intermitente, luego se centrifugó por 15 minutos a 3500 rpm. Se filtró el sobrenadante por papel filtro de tamaño de poro de 2 a 3 μ m, luego se volvió a filtrar por membrana PVDF de tamaño de poro de 0,45 μ m a un vial ámbar para cromatografía. (Concentración aproximada: 0,01 mg/mL de Levotiroxina sódica).

B. Determinación de interferencia de productos de degradación

El diluyente, placebo, analito y analito más placebo se sometieron a diferentes medios de degradación (fotólisis, termólisis, degradación ácida, degradación alcalina y degradación oxidativa).

Los resultados obtenidos de interferencia deben ser no significativos, presentando no más de 0,5 % de interferencia.²⁴. El valor de pureza de pico se debe de encontrar entre 995 y 1000.

Placebo, analito y analito más placebo fueron evaluados por duplicado. Las muestras se inyectaron por duplicado.

Para todas las degradaciones, se siguió con el procedimiento general de preparación de muestras, los cuales son escritos a continuación:

Diluyente: Se midió con exactitud 5,0 mL de diluyente y se transfirió a una fiola de 50 mL. Se llevo a degradación.

Culminado la degradación, se agregaron volumétricamente 20,0 mL de diluyente y se filtró por membrana PVDF de tamaño de poro de 0,45 μm a un vial ámbar para cromatografía.

Placebo: Se realizó una medición precisa de aproximadamente 249,75 mg de placebo en una fiola de 50 mL, se agregó 5,0 mL de diluyente. Se llevó a degradación.

Culminado la degradación, se agregaron volumétricamente 20,0 mL de diluyente y se llevó a baño de ultrasonido por 15 minutos con agitación intermitente. Se dejó atemperar las muestras, luego se llevó a centrifugar por 15 minutos a 3500 rpm. Se filtró el sobrenadante por papel filtro de tamaño de poro de 2 a 3 μm , luego se volvió a filtrar por membrana PVDF de tamaño de poro de 0,45 μm a un vial ámbar para cromatografía.

Analito: Se procedió a medir con precisión una cantidad que correspondía a 25,0 mg de Levotiroxina sódica a una fiola de 500 mL, se agregó 200 mL de diluyente y se llevó al baño de ultrasonido por 5 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente se diluyó hasta alcanzar el volumen de aforo. Se midió con exactitud 5,0 mL de la solución anterior y se llevó a una fiola de 50 mL. Se llevó a degradación. Culminado la degradación, se añadió volumétricamente 20,0 mL de diluyente, se llevó a baño de ultrasonido por 15 minutos con agitación intermitente, luego se centrifugó por 15 minutos a 3500 rpm. Se filtró el sobrenadante por papel filtro de tamaño de poro de 2 a 3 μm , luego se volvió a filtrar por membrana PVDF de tamaño de poro de 0,45 μm a un vial ámbar para cromatografía. (Concentración aproximada: 0,01 mg/mL de Levotiroxina sódica).

Analito + Placebo: Se procedió a medir con precisión una cantidad que correspondía a 25,0 mg de Levotiroxina sódica a una fiola de 500 mL, se agregó 200 mL de diluyente y se llevó al baño de ultrasonido por 5 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se diluyó hasta alcanzar el volumen de aforo. Se midió con exactitud 5,0 mL de la solución anterior y se llevó a una fiola de 50 mL, se

pesó con exactitud alrededor de 249,75 mg de placebo y se agregó a la fiola anterior. Se llevo a degradación.

Culminado la preparación de diluyente, placebo, analito y analito más placebo, continuar según procedimiento de degradación específica.

B.1. Fotólisis: Las muestras fueron expuestas a radiación ultravioleta en una cámara, por cinco días.

Culminado la degradación, se añadió volumétricamente 20,0 mL de diluyente, se llevó a baño de ultrasonido por 15 minutos con agitación intermitente, luego se llevó a centrifugar por 15 minutos a 3500 rpm. Se filtró el sobrenadante por papel filtro de tamaño de poro de 2 a 3 μm , luego se volvió a filtrar por membrana PVDF de tamaño de poro de 0,45 μm a un vial ámbar para cromatografía. (Concentración aproximada: 0,01 mg/mL de Levotiroxina sódica).

B.2. Termólisis: Las muestras fueron expuestas a 40 °C por 48 horas en una estufa.

Culminado la degradación, se añadió volumétricamente 20,0 mL de diluyente, se llevó a baño de ultrasonido por 15 minutos con agitación intermitente, luego se llevó a centrifugar por 15 minutos a 3500 rpm. Se filtró el sobrenadante por papel filtro de tamaño de poro de 2 a 3 μm , luego se volvió a filtrar por membrana PVDF de tamaño de poro de 0,45 μm a un vial ámbar para cromatografía. (Concentración aproximada: 0,01 mg/mL de Levotiroxina sódica).

B.3. Hidrólisis ácida: Con 2,5 mL de HCl 0,5 N durante cuatro horas a 40 °C en una estufa y posterior neutralización con 2,5 mL NaOH 0,5 N.

Culminado la degradación, se añadió volumétricamente 15,0 mL de diluyente, se llevó a baño de ultrasonido por 15 minutos con agitación intermitente, luego se llevó a centrifugar por 15 minutos a 3500 rpm. Se filtró el sobrenadante por papel filtro de tamaño de poro de 2 a 3 μm , luego se volvió a filtrar por membrana PVDF de tamaño de poro de 0,45 μm a un vial ámbar para cromatografía. (Concentración aproximada: 0,01 mg/mL de Levotiroxina sódica).

B.4. Hidrólisis alcalina: Con NaOH 0,1 N durante cuatro horas a 40 °C y posterior neutralización con HCl 0,1 N.

Culminado la degradación, se añadió volumétricamente 15,0 mL de diluyente, se llevó a baño de ultrasonido por 15 minutos con agitación intermitente, luego se llevó a centrifugar por 15 minutos a 3500 rpm. Se filtró el sobrenadante por papel filtro de tamaño de poro de 2 a 3 μm , luego se volvió a filtrar por membrana PVDF

de tamaño de poro de 0,45 µm a un vial ámbar para cromatografía. (Concentración aproximada: 0,01 mg/mL de Levotiroxina sódica).

B.5. Degradación oxidativa: Con 5,0 mL de peróxido de hidrógeno al 0,3% v/v durante 15 minutos a 40 °C.

Culminado la degradación, se añadió volumétricamente 15,0 mL de diluyente, se llevó a baño de ultrasonido por 15 minutos con agitación intermitente, luego se llevó a centrifugar por 15 minutos a 3500 rpm. Se filtró el sobrenadante por papel filtro de tamaño de poro de 2 a 3 µm, luego se volvió a filtrar por membrana PVDF de tamaño de poro de 0,45 µm a un vial ámbar para cromatografía. (Concentración aproximada: 0,01 mg/mL de Levotiroxina sódica).

3.3.2.3 Linealidad e Intervalo

A. Intervalo de trabajo

Para la especificación de 90,0 % a 110,0 % de ingrediente farmacéutico activo en el producto, el intervalo de trabajo es de 70 % a 130 %. Para lo cual se demuestra exactitud y precisión en dicho rango.²⁴

Los resultados son tomados de la linealidad de método.

B. Linealidad de sistema

Se prepararon cinco concentraciones (50 %, 75 %, 100 %, 125 % y 150 % de la concentración nominal) a partir de una solución madre.

Preparación de la solución madre de Levotiroxina sódica; dicha solución se preparó por triplicado:

Se pesó con exactitud alrededor de 31,25 mg de Levotiroxina sódica y se transfirió a una fiola de 100 mL, se llevó al baño de ultrasonido por 5 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se diluyó hasta alcanzar el volumen de aforo.

De cada Solución madre, se midió 2, 3, 4, 5 y 6 mL y se transfirió a fiolas de 25 mL, se llevó a volumen con solución diluyente, se homogeneizó. Se midió 5,0 mL de cada fiola y se transfirió a fiolas de 50 mL, se agregó volumétricamente 20,0 mL de solución diluyente y se homogeneizó. Las soluciones se filtraron por membrana PVDF de tamaño de poro de 0,45 µm en viales ámbar para cromatografía.

Las muestras se inyectaron por duplicado.

C. Linealidad de método

Se crearon mezclas del principio activo junto con excipientes en tres niveles de concentración diferentes (70 %, 100 % y 130 %). Las mediciones de peso se llevaron a cabo en forma individual y en triplicado. Al mismo tiempo, se prepararon

dos estándares de concentración conocida a un nivel de 100 % de la concentración prevista en el estudio, con el fin de ser contrastados con las muestras y así evaluar la exactitud de los resultados. Las muestras se inyectaron por duplicado.

- Preparación de las muestras al 70 %: (por triplicado)

Se pesó con exactitud una cantidad equivalente a 17,5 mg de Levotiroxina sódica, se transfirió a una fiola de 500 mL, luego se diluyó hasta alcanzar el volumen de aforo y se homogeneizó. Se midió con exactitud 5,0 mL de esta solución y se transfirió a una fiola de 50 mL, se añadió alrededor de 249,75 mg de placebo, luego agregó volumétricamente 20,0 mL de diluyente, se sometió a un baño de ultrasonido por 15 minutos con agitación intermitente, luego se llevó a centrifugar por 15 minutos a 3500 rpm. Se filtró el sobrenadante por papel filtro de tamaño de poro de 2 a 3 μm , luego se volvió a filtrar por membrana PVDF de tamaño de poro de 0,45 μm a un vial ámbar para cromatografía. (Concentración aproximada: 0,01 mg/mL de Levotiroxina sódica).

- Preparación de las muestras al 100 %: (por triplicado).

Se pesó con exactitud una cantidad equivalente a 25,0 mg de Levotiroxina sódica, se transfirió a una fiola de 500 mL, luego se diluyó hasta alcanzar el volumen de aforo y se homogeneizó. Se midió con exactitud 5,0 mL de esta solución y se transfirió a una fiola de 50 mL, se añadió alrededor de 249,75 mg de placebo, luego agregó volumétricamente 20,0 mL de diluyente, se sometió a un baño de ultrasonido por 15 minutos con agitación intermitente, luego se llevó a centrifugar por 15 minutos a 3500 rpm. Se filtró el sobrenadante por papel filtro de tamaño de poro de 2 a 3 μm , luego se volvió a filtrar por membrana PVDF de tamaño de poro de 0,45 μm a un vial ámbar para cromatografía. (Concentración aproximada: 0,01 mg/mL de Levotiroxina sódica).

- Preparación de las muestras al 130 %: (por triplicado)

Se pesó con exactitud una cantidad equivalente a 32,5 mg de Levotiroxina sódica, se transfirió a una fiola de 500 mL, luego se diluyó hasta alcanzar el volumen de aforo y se homogeneizó. Se midió con exactitud 5,0 mL de esta solución y se transfirió a una fiola de 50 mL, se añadió alrededor de 249,75 mg de placebo, luego agregó volumétricamente 20,0 mL de diluyente, se sometió a un baño de ultrasonido por 15 minutos con agitación intermitente, luego se llevó a centrifugar por 15 minutos a 3500 rpm. Se filtró el sobrenadante por papel filtro de tamaño de poro de 2 a 3 μm , luego se volvió a filtrar por membrana PVDF de tamaño de poro

de 0,45 µm a un vial ámbar para cromatografía. (Concentración aproximada: 0,01 mg/mL de Levotiroxina sódica).

3.3.2.4 Exactitud

Para la evaluación de esta medida, se tomaron las muestras preparadas en la linealidad de método. La evaluación se realizó entre muestras y estándar de referencia.

3.3.2.4 Precisión

A. Repetibilidad

Se analizaron seis muestras de manera independiente, para lo cual se utilizó la metodología propuesta.

B. Precisión Intermedia

Un segundo analista realizó el análisis de seis muestras de manera independiente, utilizando la metodología propuesta. El análisis se realizó un día después al de la evaluación de la repetibilidad, en las mismas instalaciones, con materiales y equipos diferentes a los utilizados por el primer analista.

3.3.4. Cálculos

3.3.3.1 Precisión instrumental

La desviación estándar relativa (RSD) de áreas y tiempos de retención se determinó aplicando las siguientes formulas.²²:

Desviación estándar:

$$S = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

RSD:

$$rsd = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

3.3.3.2 Especificidad

A. Muestras sin degradar (interferentes)

Las muestras de diluyente y placebo, no deben de mostrar una respuesta analítica (área). Valor de interferencia menor al 0,5 %.²⁴

La pureza de pico principal en las muestras de analito y analito más placebo, se debe de encontrar entre 995 y 1000 (ausencia de coelución).

B. Muestras degradadas (productos de degradación)

Las muestras de diluyente y placebo, no deben de mostrar una respuesta analítica (área) en el tiempo de retención del pico principal. Valor de interferencia menor al 0,5 %.²⁴

La pureza de pico principal en las muestras de analito y analito más placebo, se debe de encontrar entre 995 y 1000 (ausencia de coelución).

3.3.3.2 Linealidad e Intervalo

A. Regresión Lineal.^{24, 25}

Ecuación de la recta:

$$y=bx+a$$

Donde:

x: concentración del analito.

y: respuesta del área del pico cromatográfico.

b: pendiente de la recta.

a: intercepto de la recta con el eje "y".

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

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

B. Coeficiente de correlación (r) y coeficiente de determinación (r²).^{24, 25}

Coeficiente de correlación (r):

El coeficiente de correlación nos indica el grado de relación que existe entre la variable "x" (concentración), y la variable "y" (respuesta). Si (r) es cercano a la unidad, entonces significa que existe correlación con una probabilidad elevada. El valor de r debe ser mayor o igual a 0,999.

$$r = \frac{\Sigma xy - \frac{\Sigma x \Sigma y}{n}}{\sqrt{\left(\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}\right)\left(\Sigma y^2 - \frac{(\Sigma y)^2}{n}\right)}}$$

Coeficiente de determinación (r^2)

Este coeficiente indica la proporción de la variación total de la variable “y” (respuesta) explicada por la regresión. El valor de r^2 debe ser mayor o igual a 0,998.

C. Varianza Residual Constante.²⁴

La representación de los residuales aporta información acerca de la validez del modelo. Consiste en representar los residuales (eje de ordenadas) frente a los valores estimados (eje de abscisas). La distribución de los puntos debería ser aleatoria y no reflejar ninguna tendencia.

D. Análisis de varianza: ANOVA.²⁴

Antes de realizar el análisis ANOVA, primero se debe asegurar la homogeneidad de las varianzas, la cual se puede comprobar aplicando el Test de Cochran.

Homogeneidad de varianzas (Test de Cochran)

Test de Hipótesis para G exp

Ho = Las varianzas son semejantes

H1 = Las varianzas son diferentes

$$G_{exp} = \frac{S_{m\acute{a}xima}^2}{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + \dots + S_i^2}$$

Dónde:

$$S_i^2 = \text{varianza de cada grupo}(k)$$

$$S_{m\acute{a}xima}^2 = \text{varianza m\acute{a}xima de los } k \text{ grupos}$$

Criterio de aceptación: Si $G_{exp} < G_{tabla}$, para una probabilidad del 95% ($p=0,05$) y $K = 5$, $n = 3$, se acepta la hipótesis nula (Ho), entonces las varianzas no son estadísticamente diferentes entre sí.

ANOVA

Test de Hipótesis

Ho: $\beta = 0$ El modelo lineal No proporciona un buen ajuste a los datos

H1: $\beta \neq 0$ El modelo lineal Si proporciona un buen ajuste a los datos

Criterio de aceptación:

Si $F_{\text{exp}} > F_{\text{tabla}}$, para una probabilidad del 95% ($p=0,05$), se rechaza la hipótesis nula (H_0), demostrando la existencia de una pendiente distinta de 0, esto nos indica que el modelo lineal si proporciona un buen ajuste a los datos.

E. Test de linealidad.²⁴

Coeficiente de variación de los factores de respuesta (f)

$$f = \frac{y}{x}$$

Criterio de aceptación: C.V. (%) ≤ 2 %

Donde:

y = Respuesta cromatográfica (áreas)

x = Concentración de analito en mg/mL

Significación estadística de la desviación estándar de la pendiente.

Test de Hipótesis para la pendiente "b":

H_0 : "b" es estadísticamente igual a cero.

H_1 : "b" es estadísticamente diferente a cero.

Criterio de aceptación:

Si $t_{\text{exp.}} > t_{\text{tabla}}$ para una probabilidad del 95% ($p = 0,05$) y (n-2) grados de libertad, se rechaza la Hipótesis nula (H_0), entonces "b" es estadísticamente diferente de cero.

El intervalo de confianza no incluye el cero.

F. Test de proporcionalidad.²⁴

Este parámetro estadístico nos permite evaluar si la recta pasa por el origen de las coordenadas, determinando si la variable independiente es significativamente distinta de cero.

Test de Hipótesis para el intercepto "a":

H_0 : "a" es estadísticamente igual a cero.

H_1 : "a" es estadísticamente diferente a cero.

Criterio de aceptación:

Si $t_{\text{exp.}} < t_{\text{tabla}}$ para una probabilidad del 95% ($p = 0,05$) y (n-2) grados de libertad, se rechaza la Hipótesis nula (H_0), entonces "a" es estadísticamente diferente de cero.

3.3.3.3 Exactitud.²⁴

$$\%R = \frac{X_H \times 100}{X_A}$$

Donde:

$\%R$: porcentaje de recuperación.

X_H : cantidad de analito hallado.

X_A : cantidad de analito añadido

Criterio de aceptación: El porcentaje de recuperación debe encontrarse entre 98 % y 102 %.

3.3.3.4 Precisión²⁴.

A. Repetibilidad

Para la evaluación de este parámetro se analizó 6 muestras. El C.V. (%) debe ser menor o igual a 2 %.

B. Precisión Intermedia

Para la evaluación de este parámetro un segundo analista analizó la muestra. Los resultados del primer y segundo analista fueron comparados, el C.V. (%) debe ser menor o igual a 2 % con respecto a primer analista (prueba de repetibilidad).

3.3.5. Análisis de datos

Los resultados obtenidos producto de cada prueba realizada para la evaluación de los diferentes parámetros de validación, fueron sometidos a análisis estadístico utilizando el programa Excel de Microsoft Office Profesional Plus 2019.

Las pruebas estadísticas utilizadas fueron ANOVA y t de Student. con un 95 % de confianza.

IV. RESULTADOS

Tabla 3. Pureza de pico cromatográfico en muestras que contienen levotiroxina sódica al evaluar la especificidad. Lima-2022.

Levotiroxina sódica		
	Número	Pureza de pico cromatográfico
Interferencias	Analito	999,997
		1
		999,997
		999,998
	Analito + Placebo	2
		999,998
		999,973
		1
Analito + Placebo	999,990	
	999,986	
	2	
	999,996	

Tabla 4. Porcentaje de recuperación de analito, en la evaluación de la especificidad-interferencias. Lima-2022.

Levotiroxina sódica							
	N°	Peso (mg)	Añadido (mg)	Hallado (mg)	Promedio hallado (mg)	% Recuperación	
Interferencias	Placebo	1	0,00	0,00	0,00 0,00	0,00	0,00
		2	0,00	0,00	0,00 0,00	0,00	0,00
		1	28,09	25,17	25,20485 25,24910	25,23	100,24
		2	27,86	24,96	25,03006 24,97413	25,00	100,16
	Analito + Placebo	1	29,07	26,05	26,18546 26,21392	26,20	100,58
		2	28,20	25,27	25,51875 25,51526	25,52	100,99

Tabla 5. Pureza de pico cromatográfico en muestras que contienen levotiroxina sódica, sometidas a degradación forzada. Lima-2022.

Levotiroxina sódica					
	N°	Pureza de pico cromatográfico			
Fotólisis	Analito	1	995,132 995,131		
		2	995,134 995,131		
	Analito + Placebo	1	995,348 995,341		
		2	995,346 995,345		
		Termólisis	Analito	1	999,954 999,952
				2	999,958 999,954
Analito + Placebo	1		998,239 998,237		
	2		998,231 998,233		
	Hidrólisis ácida		Analito	1	999,994 999,996
				2	999,992 999,991
Analito + Placebo		1	999,991 999,992		
		2	999,991 999,993		
		Hidrólisis alcalina	Analito	1	999,990 999,991
				2	999,992 999,991
Analito + Placebo	1		999,958 999,957		
	2		999,954 999,956		
	Degradación oxidativa		Analito	1	999,998 999,997
				2	999,998 999,998
Analito + Placebo		1	999,994 999,993		
		2	999,992 999,991		

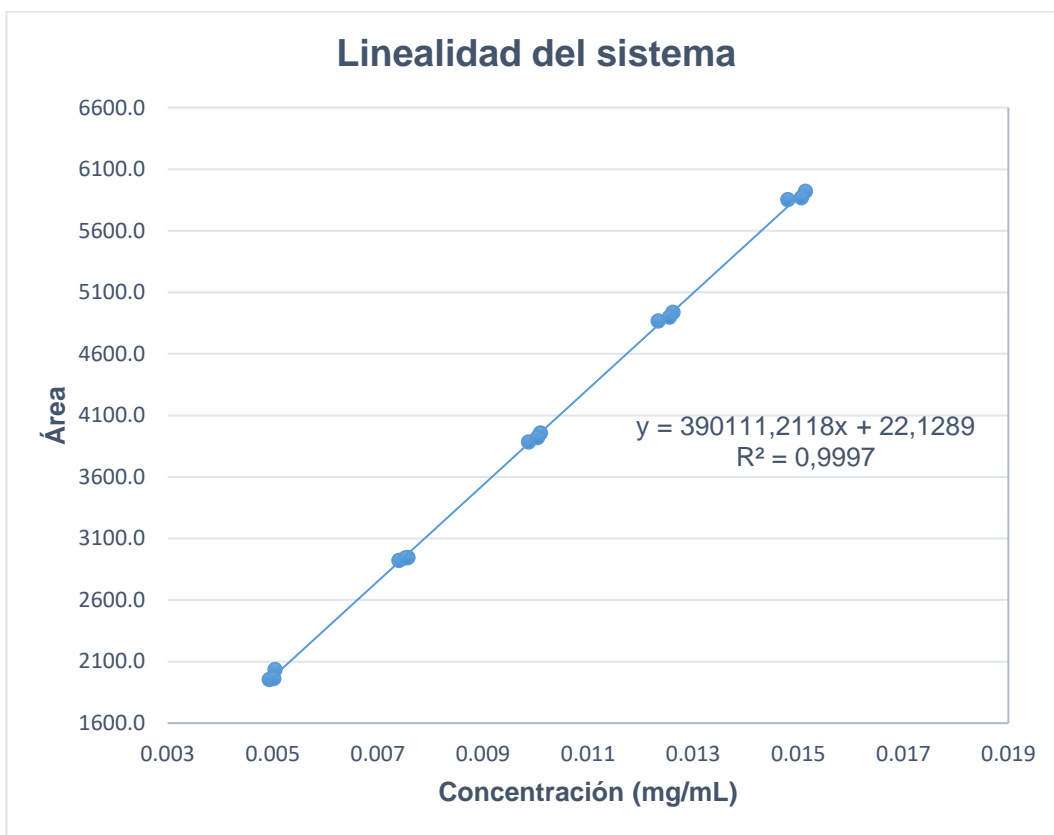


Figura 2. Curva de calibración de concentración versus área, para la evaluación de la linealidad del sistema, del método analítico. Lima-2022.

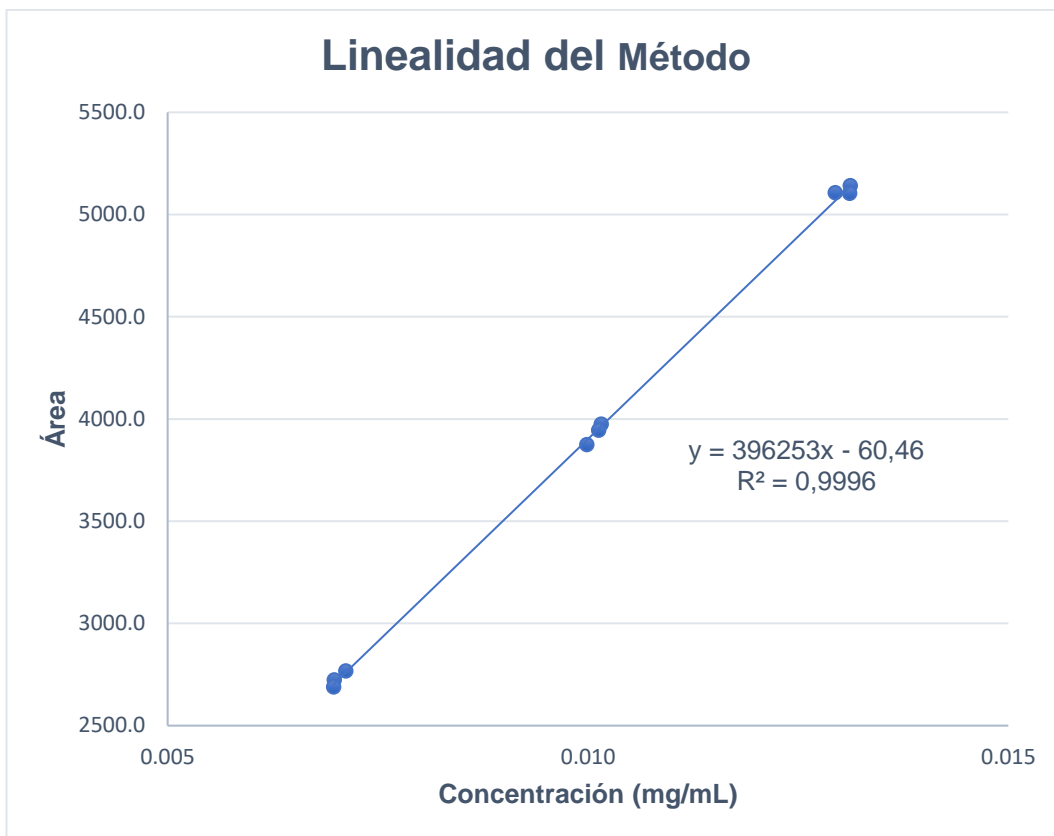


Figura 3. Curva de calibración de concentración versus área, para la evaluación de la linealidad del método analítico y exactitud. Lima-2022.

Tabla 6. Porcentaje de recuperación del analito (levotiroxina sódica) en presencia de placebo. Para la evaluación de la exactitud. Lima – 2022.

Concentración	Muestra	Peso (mg)	Analito añadido (mg)	Analito hallado (mg)	Promedio de analito hallado (mg)	Recuperación %
70%	M1	19,48	17,45	17,38432 17,38450	17,38	99,60
	M2	19,86	17,79	17,66060 17,67171	17,67	99,33
	M3	19,46	17,44	17,12998 17,20717	17,17	98,45
100%	M1	28,34	25,39	25,37680 25,37067	25,37	99,92
	M2	27,86	24,96	24,73490 24,73710	24,74	99,12
	M3	28,25	25,31	25,17944 25,19727	25,19	99,53
130%	M1	36,11	32,35	32,55369 32,65844	32,61	100,80
	M2	36,61	32,80	32,82972 32,82872	32,83	100,09
	M3	36,58	32,78	32,59836 32,57076	32,58	99,39
					Promedio	99,58
					RSD	0,66

Tabla 7. Desviación estándar relativa, del porcentaje obtenido de levotiroxina sódica, entre analista 1 y analista 2, para la evaluación de la repetibilidad y precisión intermedia en tabletas que contienen levotiroxina sódica. Lima – 2022.

Muestra	Analista 1			Analista 2			
	Levotiroxina sódica (µg/tab.)	Promedio levotiroxina sódica (µg/tab.)	%	Levotiroxina sódica (µg/tab.)	Promedio levotiroxina sódica (µg/tab.)	%	
M1	100,09	100,08	100,1	100,56	100,57	100,6	
	100,07			100,58			
M2	100,26	100,27	100,3	100,36	100,37	100,4	
	100,28			100,37			
M3	100,14	100,15	100,1	100,74	100,75	100,7	
	100,15			100,75			
M4	100,02	100,04	100,0	100,41	100,41	100,4	
	100,05			100,40			
M5	100,65	100,65	100,6	100,12	100,12	100,1	
	100,64			100,11			
M6	100,21	100,23	100,2	100,35	100,35	100,4	
	100,24			100,35			
		Promedio	100,2			Promedio	100,4
		RSD	0,22			RSD	0,21
			Promedio entre analista 1 y 2				100,3
			RSD entre analista 1 y 2				0,14

V. DISCUSIÓN

La cromatografía líquida de alto rendimiento es una técnica analítica que presenta ventajas sobre los métodos tradicionales de análisis como: el IR y espectrofotometría UV-VIS, esto debido a que se puede realizar una separación de los componentes de una muestra, con lo cual podemos identificar y cuantificar el analito de manera inequívoca. Se pudo obtener una técnica analítica con tiempos de análisis rápidos, separación de sustancias de mezclas complejas con alta resolución, ejecución de análisis con facilidad y exactitud.³ Se realizó la evaluación de los parámetros de validación según USP, ICH, AEFI.

En la tabla 3; se muestran los resultados de especificidad. En la cual evalúa la pureza de pico cromatográfico en muestras que contienen el analito (levotiroxina sódica). Las muestras analizadas fueron analito y analito más placebo y los resultados fueron en promedio 999,998 y 999,986 para analito y analito más placebo respectivamente. La AEFI²⁴ en su libro sobre “validación de métodos analíticos” indica que para las pruebas de especificidad no debe de existir una interferencia mayor al 0,5 %, es decir que, para la evaluación de la pureza de pico cromatográfico, donde la escala de medición va de 0 a 1000, los resultados de pureza de pico deben ser mayores a 995. Los resultados obtenidos demuestran que el analito y analito en presencia de placebo, al ser analizados por el método propuesto son específicos y que la matriz del producto no interfiere con el pico cromatográfico de interés. Bocanegra¹¹, en su estudio de validación de método analítico por cromatografía líquida de alta resolución para determinar vitaminas hidrosolubles en solución endovenosa inyectable, pudo obtener purezas de pico de no menos de 0,99, en una escala de 0 a 1.

En la tabla 4; se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos para la prueba de especificidad. Resultado de posibles interferencias en porcentaje de

recuperación. Las muestras analizadas fueron analito y analito más placebo y los resultados fueron en promedio 100,2 % y 100,8 % para analito y analito más placebo respectivamente. La farmacopea norteamericana (USP¹⁶) indica que, la especificidad en el caso de las pruebas de valoración del principio activo, proporcionan un resultado exacto, la cual nos permite una declaración exacta del contenido en una muestra. Los criterios de aceptación para la exactitud se encuentran en un rango de entre 98 – 102 %.²⁴ Los resultados demuestran que el analito y analito en presencia de placebo, al ser analizados por el método propuesto llegan a tener una recuperación del activo muy buena y que la matriz del producto no interfiere con los resultados.

En la tabla 5; se muestran los resultados de especificidad. Resultado de pureza de pico de levotiroxina sódica en muestras sometidas a degradación forzada: fotólisis, termólisis, hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina y degradación oxidativa. En el caso de la fotólisis, las muestras de analito y analito más placebo dieron como resultado valores promedio de 995,132 y 995,345 respectivamente. Para la termólisis, las muestras de analito y analito más placebo dieron como resultado valores promedio de 999,955 y 998,235 respectivamente. Los resultados de hidrólisis ácida, en muestras de analito y analito más placebo, fueron en promedio 999,993 y 999,992 respectivamente. Para la hidrólisis alcalina, los resultados de analito y analito más placebo en promedio fueron 999,991 y 999,956 respectivamente. Para la degradación oxidativa, las muestras de analito y analito más placebo dieron como resultado valores promedio de 999,998 y 999,993 respectivamente. La AEFI²⁴ en su libro sobre “validación de métodos analíticos” indica que, en los estudios de muestras sometidas a estrés, se debe comprobar la identidad del analito y que la señal proviene solo de él. Para las pruebas de especificidad no debe de existir una interferencia mayor al 0,5 %, es decir que, para la evaluación de pureza de pico, donde la escala de medición es de 0 a 1000, los resultados de pureza de pico deben ser mayores a 995. Los resultados de muestras sometidas a estrés (fotólisis, termólisis, hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina, degradación oxidativa), demuestran que las muestras que contienen analito y las muestras que contienen analito en presencia de placebo, al ser analizados por el método propuesto son específicos y la degradación a la que fue sometida, no interfiere con la respuesta cromatográfica del analito de interés. Un estudio realizado por Bocanegra¹¹, para la validación de método analítico por cromatografía líquida de alta resolución para determinar vitaminas hidrosolubles

en solución endovenosa inyectable, mostró resultados de pureza de pico cromatográfico para la degradación oxidativa entre 0,75 a 0,79.

En la figura 2 y anexo 7; se presentan los resultados de la curva de calibración de la evaluación de la linealidad de del sistema. El resultado obtenido como ecuación de la recta fue, $y = 390111,2118x + 22,1289$. Además, el resultado obtenido de la evaluación de la ecuación de la recta nos permitió obtener un coeficiente de determinación $r^2 = 0,9997$ y un coeficiente de correlación $r = 0,9998$. En la figura 3 y anexo 8; Se muestran los resultados de la evaluación de la linealidad del método. El análisis de la ecuación de la recta no proporciono el valor del coeficiente de determinación $r^2 = 0,9996$, así como también el del coeficiente de correlación $r = 0,9998$. La AEFI²⁴, nos indica que el valor para que el coeficiente de correlación pueda ser aceptado, debe ser mayor a 0,999. Para Gary²⁶, el coeficiente de determinación, obtenido como resultado de la evaluación de la linealidad debe ser mayor que 0,998. Los resultados obtenidos nos indican que existe un alto grado de relación entre las variables de concentración y respuesta, por lo tanto, podemos decir que el resultado obtenido es lineal. En el anexo 13 se presenta el resumen de la evaluación estadística de la linealidad de método y sistema, los estadísticos utilizados fueron: el test de ANOVA y el estadístico de Fisher. Antes de realizar el estadístico de ANOVA, se verificó la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Cochran, donde $G_{exp} < G_{tablas}$.²⁴, los resultados obtenidos fueron $0,60 < 0,68$ y $0,47 < 0,87$ para linealidad de sistema y método respectivamente. Se realizó el ANOVA para una probabilidad del 95% ($p=0,05$), donde $F_{exp} > F_{tabla}$.²⁴, los resultados obtenidos fueron $38836,52 > 4,67$ y $16469,51 > 5,59$ para linealidad de sistema y método respectivamente. Estos resultados nos indican que el modelo lineal si proporciona un buen ajuste a los datos. En el anexo 13 también encontramos los resultados de Coeficiente de variación de los factores de respuesta (f), donde C.V. (%) es menor al 2 %.²⁴ Los resultados obtenidos fueron 0,91 % y 0,66 % para linealidad de sistema y linealidad de método respectivamente. Los resultados nos indican que existe una buena relación entre la respuesta (área) y la concentración. Se analizó la pendiente de la recta de calibración, mediante la prueba de t de Student para n-2 grados de libertad y un grado de significación de $p = 0,05$, donde $t_{exp} > t_{tabla}$.²⁴ Se tuvieron resultados de $197,07 > 2,16$ y $128,33 > 2,36$ para linealidad de sistema y método respectivamente. Los resultados nos indican que existe una pendiente significativamente distinta de cero. También se realizó el análisis

estadístico de del intercepto (test de proporcionalidad), para lo cual se utilizó el estadístico t de Student para n-2 grados de libertad y un grado de significación de $p = 0,05$, donde $t_{exp} < t_{tabla}$.²⁴ El resultado fue de $1,05 < 2,16$ y $1,89 < 2,36$ para linealidad de sistema y método respectivamente. Con estos resultados podemos decir que la recta pasa por el origen de las coordenadas, además que la variable independiente es significativamente distinta de cero. Bardales *et al.*¹² realizo un estudio sobre validación por HPLC para la valoración de cloruro de benzalconio en Gentamicina 0,3 % solución oftálmica, donde obtuvo un valor de $r = 0,9998$ como coeficiente de variación.

En la tabla 6; se muestra los resultados de la evaluación de la exactitud. Según la AEFI²⁴, el criterio de aceptación para la recuperación, debe de estar entre 98,0 - 102,0 %. El resultado obtenido fue 99,58 %. Además, los resultados deben de cumplir con criterios de precisión, para lo cual se determinó el coeficiente de variación recomendado por USP¹⁶, la cual nos indica que el valor de C.V debe ser menos del 2 %, El resultado obtenido de C.V fue de 0,66 %. Esto nos indica que el método analítico nos permite hacer una buena recuperación del analito en el intervalo de trabajo de 70 % a 130 %. Bardales *et al.*¹² en su estudio de validación por HPLC para la valoración de cloruro de benzalconio en Gentamicina 0,3% solución oftálmica, logró obtener un porcentaje de exactitud de 99,88 %. Los resultados obtenidos en ambos se encuentran cerca del valor verdadero teórico.

En la tabla 7; se muestra la evaluación de la repetibilidad y precisión intermedia para la cuantificación de levotiroxina sódica en tabletas. Según AEFI²⁴, para cumplir con el criterio de aceptación el resultado de C.V. (%) debe ser menor o igual a 2 %. Los resultados obtenidos fueron 0,22 % y 0,14 % para repetibilidad y precisión intermedia respectivamente. Choque¹⁴, en su trabajo de investigación sobre validación por HPLC para la cuantificación de clorhidrato de clorhexidina + benzocaína + enoxolona en comprimidos orales, pudo encontrar un C.V. de 0,40 % para benzocaína, 1,25 % para clorhexidina HCl y 0,85 % para enoxolona.

VI. CONCLUSIONES

1. El método analítico por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para la cuantificación de Levotiroxina sódica en tabletas cumple con los parámetros de validación.
2. En la evaluación del parámetro de especificidad, no se observaron interferencias significativas obteniendo una recuperación de 100,2 % y 100,8 % para analito y analito más placebo respectivamente, además se verificó que existe una alta pureza de pico en analito y analito más placebo 999,998 y 999,986 respectivamente. En las degradaciones se observó una alta pureza de pico siendo estas mayores a 999,5 en todas las condiciones de estudio. Estos resultados demuestran que el método analítico es específico.
3. La linealidad del sistema nos mostró un coeficiente de determinación de $r^2 = 0,9997$. Para la linealidad del método el resultado del coeficiente de determinación fue de $r^2 = 0,9996$. Por lo cual se verificó que existe un buen desempeño del método analítico en el Intervalo de trabajo de 70 % a 130 %. Demostrando así que el método analítico es lineal en el intervalo de trabajo.
4. Se observó un buen desempeño del método analítico en la evaluación de la exactitud, en el intervalo de trabajo de 70 % a 130 %, dando como resultado una recuperación de 99,58 %. Para la precisión del método analítico, el resultado de repetibilidad y precisión intermedia fue de 0,22 % y 0,14 % respectivamente. Demostrando que el método analítico es exacto y preciso.

VII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda seguir los pasos establecidos en la metodología para obtener resultados reproducibles. Es necesario hacer una correcta molienda de las tabletas, para así poder lograr una mezcla homogénea.
2. La metodología validada debe ser considerada y aplicada en el análisis de productos que contienen levotiroxina sódica como IFA. La metodología garantiza la obtención de resultados confiables.
3. Si se desea trabajar con tabletas que contengan diferente proporción de analito y placebo. Se recomienda realizar una evaluación de la linealidad de método a las mismas concentraciones de analito utilizado en la presente validación.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cordero R. Guía para la Validación de Métodos Analíticos de Jarabes por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en un Laboratorio Farmacéutico (Maestría en gestión de la calidad). Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala; 2019.
2. Organización Panamericana de salud [Internet]. Washington DC. [citado 29 de octubre de 2021]. Disponible en: https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13_Modulo_VALIDACION_de_Metodos_Fisicoqcos.pdf
3. Samaniego J, Arias G. Desarrollo y validación de una metodología analítica por HPLC para la cuantificación simultánea de fenilefrina clorhidrato, paracetamol, salicilamida, cafeína y clorfeniramina maleato en tabletas. Rev Soc Quím Perú. 30 de junio de 2016;82(2):196-207.
4. Morreale G, Escobar F. Metabolismo de las hormonas tiroideas y el yodo en el embarazo. Razones experimentales para mantener una ingesta de yodo adecuada en la gestación. Endocrinol Nutr. enero de 2008;55:7-17.
5. Arévalo L. Desarrollo y validación de un método analítico para determinar ácidos grasos oleico, palmítico y esteárico por HPLC en aceites vegetales. Quito. Universidad Central del Ecuador. 2021 [citado 10 de noviembre de 2021]; Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/23565>
6. Mustafá G, Yasgi C, Abdil O. Simultaneous Determination of Amoxicillin, Lansoprazole, and Levofloxacin in Pharmaceuticals by HPLC with UV-Vis Detector. J Anal Test. enero de 2020;4(1):45-53. doi:0.1007/s41664-020-00121-4
7. Logoyda L, Abdel-megied A, Kondratova Y, Trofimenko O, Korobko D, Dakhym I. Development and validation of hplc method for the simultaneous determination of enalapril maleate in presence of their impurities: application to tablet analysis. Int J Appl Pharm. 6 de enero de 2018;10(1):98. doi: 10.22159/ijap.2018v10i1.22805
8. Choque C. Desarrollo y validación de un método analítico indicador de estabilidad para el análisis de ácido acetil salicílico en tabletas por HPLC (Tesis para optar el título de maestro en ciencias en tecnología farmacéutica y control de calidad de medicamentos). La Paz. Universidad Mayor de San Andrés; 2019 [Internet]. [citado 10 de noviembre de 2021]. Disponible en: <http://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/25313>
9. Jitendra D, Hardel D, Laxmidhar S. International Journal of Drug Development and Research. Int J Drug Dev Res [Internet]; 2017 [citado 11 de noviembre de 2021]. ISSN: 0975-9344. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Sajal-Jha-2/publication/318900476_International_Journal_of_Drug_Development_and_Research/links/59842ec4a6fdccb3bfc4403/International-Journal-of-Drug-Development-and-Research.pdf

10. Hurtado N. Desarrollo y validación de una metodología analítica para la determinación de diez residuos de antibióticos veterinarios en *Oncorhynchus mykiss*, utilizando cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a un detector de masas de triple cuadrupolo (Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico). Lima. Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2021 [Internet]. [citado 8 de noviembre de 2021]. Disponible en: https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/9609/Desarrollo_HurtadoGalindo_Nathaly.pdf?sequence=1&isAllowed=y
11. Bocanegra J. Validación de un método por cromatografía líquida de alta resolución para determinar cinco vitaminas hidrosolubles en solución endovenosa inyectable (Tesis para optar el grado académico de maestro en ciencias químicas). Trujillo. Universidad Nacional de Trujillo; 2021 [Internet]. [citado 8 de noviembre de 2021]; Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/17620>
12. Bardales M, Reyes J. Validación de una metodología por cromatografía líquida de alta resolución para la valoración de cloruro de benzalconio en Gentamicina 0,3 % solución oftálmica (Tesis para optar el grado académico de bachiller en farmacia y Bioquímica). Trujillo. Universidad Nacional de Trujillo; 2021 [Internet]. [citado 8 de noviembre de 2021]; Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/18000>
13. Fabian K. Validación del método analítico por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de triprolidina clorhidrato y dextrometorfano bromhidrato en jarabe (Informe para optar el grado académico de químico farmacéutico). Trujillo. Universidad Nacional de Trujillo; 2021 [Internet]. 3 de abril de 2021 [citado 8 de noviembre de 2021]; Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/16398>
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 para optar el grado académico de químico farmacéutico). Arequipa. Universidad Católica Santa María - UCSM [Internet]. 17 de enero de 2018 [citado 8 de noviembre de 2021]; Disponible en: <https://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/handle/UCSM/7224>
15. Tietje C, Brouder A. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. En: Handbook of Transnational Economic Governance Regimes [Internet]. Brill | Nijhoff; 2010 [citado 27 de julio de 2021]. p. 1041-53. Disponible en: https://brill.com/view/book/edcoll/9789004181564/Bej.9789004163300.i-1081_085.xml
16. Usp.org [Internet]. Estados Unidos [citado del 27 de julio de 2021 al 11 de junio de 2022]. Disponible en: <https://online.uspnf.com/uspnf>
17. Ospina D, Hernández Y. Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. Fundación Universidad de América Rev Semilleros. 2018; 4:8. ISSN: 2619-5267

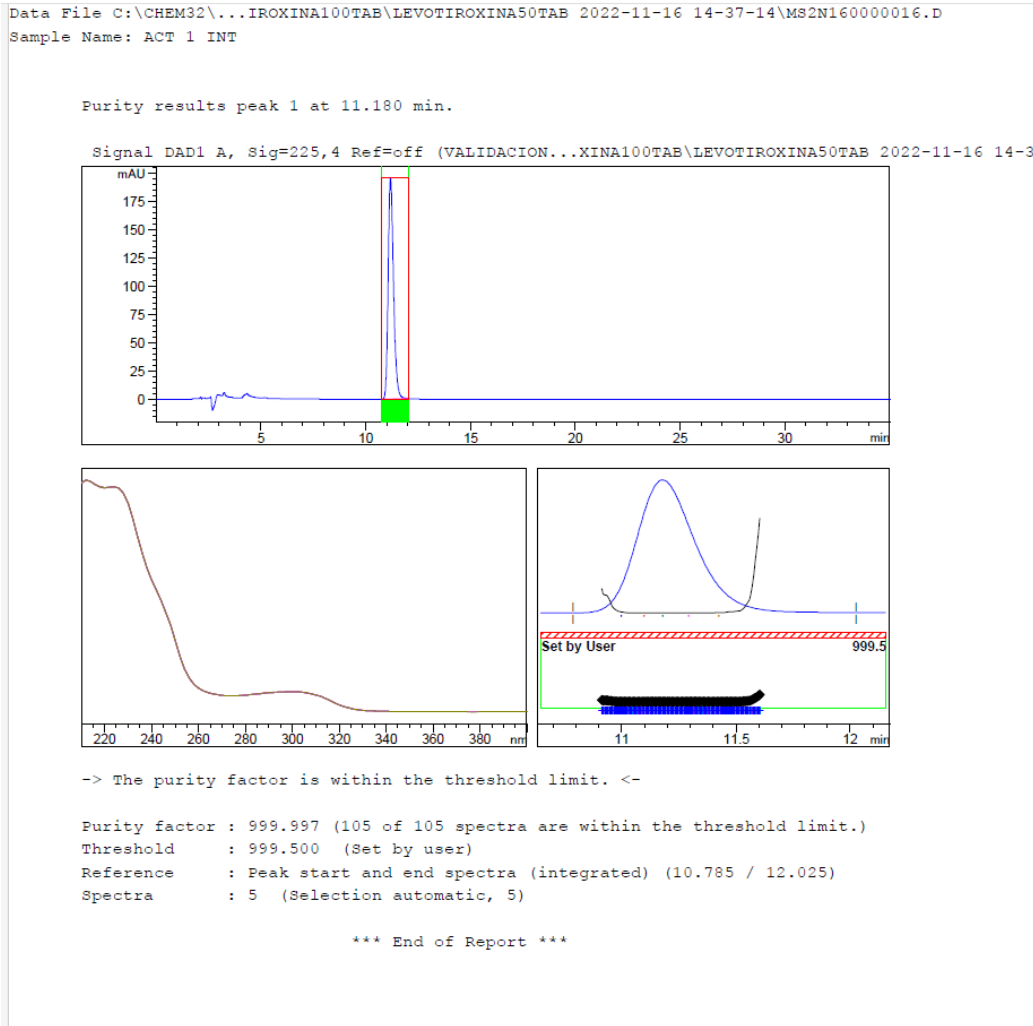
18. Quattrocchi O, Abelaira S, Laba R. Introducción a la HPLC, Aplicación y práctica. Argentina: Artes gráficas Farro S.A; 1992.
19. Drugs.com [Internet]. [2000; actualizado 2 de diciembre de 2021; citado 5 de diciembre de 2021]. Disponible en: <https://www.drugs.com/levothyroxine.html>
20. Bertram K. Farmacología Básica y Clínica. 14.^a ed. México, D. F: Edit. McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V; 2019.
21. Aemps.gob.pe [Internet]. España [actualizado 1 de diciembre de 2021; citado 6 de diciembre de 2021]. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/77048/FichaTecnica_77048.html
22. Digemid.minsa.gob.pe [Internet]. Perú [citado 25 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.digemid.minsa.gob.pe/registro-sanitario/medicamentos>
23. Skoog D, West D, Holler F, Crouch S. Fundamentos de Química Analítica. 8^o ed. México: Thomson; 2005
24. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). Validación de Métodos Analíticos. Barcelona: Graficas Gispert S. A.; 2001.
25. Miller JN, Miller JC. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4^o ed. Madrid: Pearson Educación. S. A.; 2002.
26. Gary C, Química Analítica. 6^o ed. México: Mc Graw Hill; 2009.

ANEXOS

Anexo 1. Desviación estándar de tiempos de retención y áreas en la evaluación de la precisión instrumental de inyecciones repetidas de una muestra de levotiroxina sódica. Lima-2022.

Número de inyecciones	TR (minutos)	Áreas
1	11,23859	3946,19727
2	11,23632	3948,38770
3	11,23699	3949,77881
4	11,23704	3953,58374
5	11,23840	3955,87354
6	11,23705	3951,21973
Promedio	11,23739	3950,84013
RSD	0,01	0,09

Anexo 2. Especificidad - Interferencias. Resultado de pureza de pico de analito (levotiroxina sódica). Lima-2022.

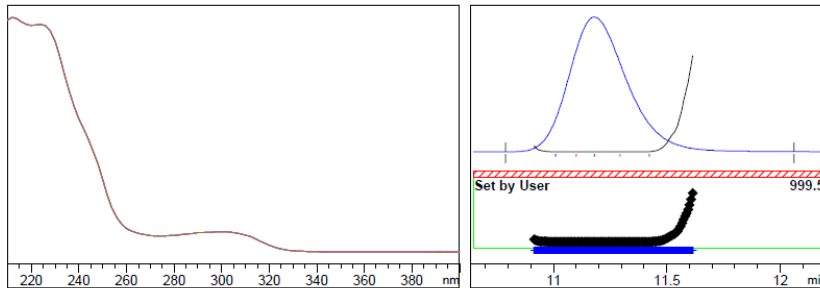
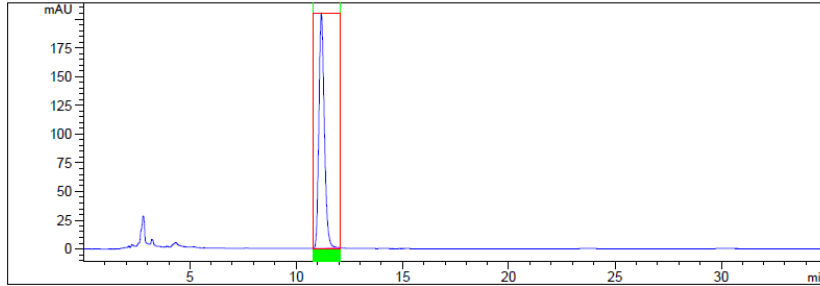


Anexo 3. Especificidad - Interferencias. Resultado de pureza de pico de analito (levotiroxina sódica) en presencia de placebo. Lima-2022.

Data File C:\CHEM32\...\IROXINA100TAB\LEVOTIROXINA50TAB 2022-11-16 14-37-14\MS2N160000020.D
Sample Name: MTRA 1 INT

Purity results peak 1 at 11.182 min.

Signal DAD1 A, Sig=225,4 Ref=off (VALIDACION...XINA100TAB\LEVOTIROXINA50TAB 2022-11-16 14-3

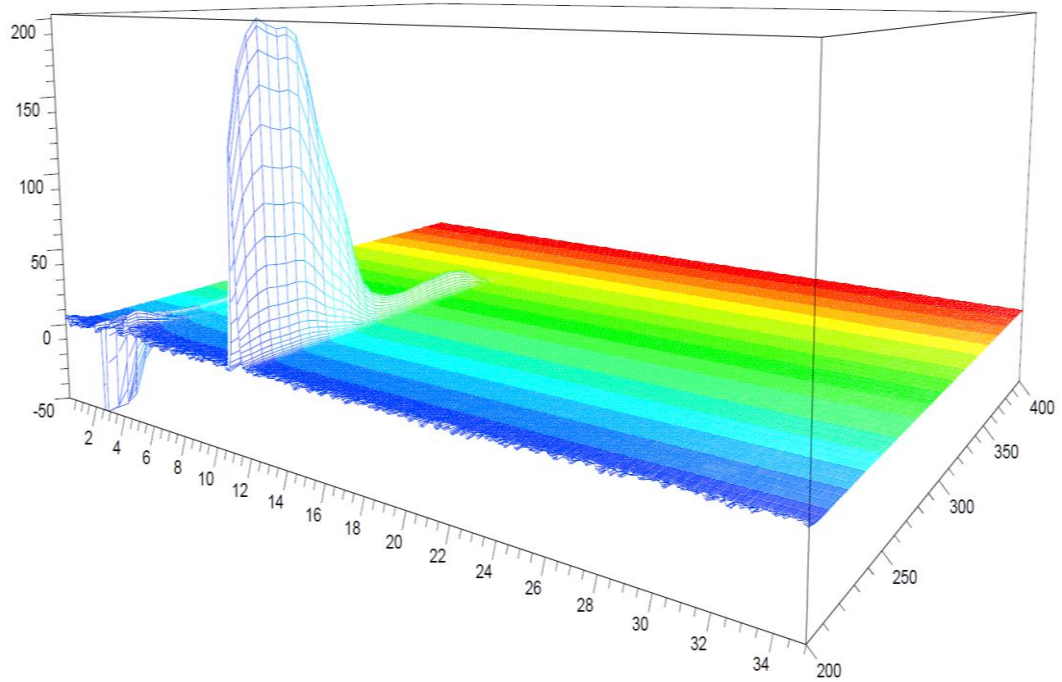


-> The purity factor is within the threshold limit. <-

Purity factor : 999.973 (106 of 106 spectra are within the threshold limit.)
Threshold : 999.500 (Set by user)
Reference : Peak start and end spectra (integrated) (10.787 / 12.060)
Spectra : 5 (Selection automatic, 5)

*** End of Report ***

Anexo 4. Espectro tridimensional de estándar de Levotiroxina sódica. Lima-2022.



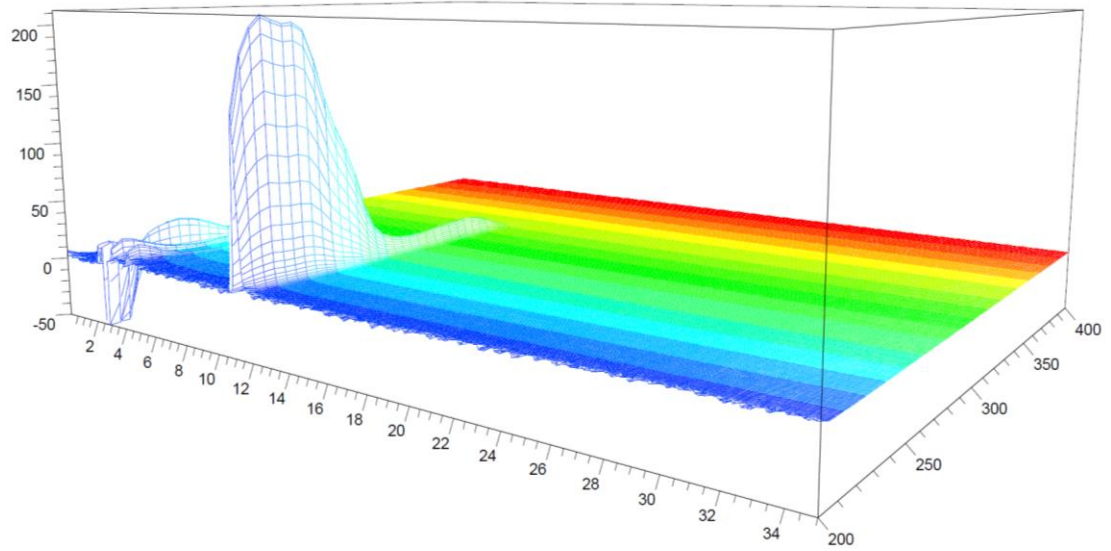
Donde:

eje x : tiempo en minutos

eje y : unidades de absorbancia

eje z : longitud de onda en nanómetros (nm)

Anexo 5. Espectro tridimensional de muestra (Levotiroxina sódica tableta). Lima-2022.



Donde:

eje x : tiempo en minutos

eje y : unidades de absorbancia

eje z : longitud de onda en nanómetros (nm)

Anexo 6. Identificación. Comparación de muestra que contiene el analito con base de datos (espectros) de diferentes estándares de referencia. Lima-2022

Conc.	Dato (n)	x (mg/mL)	y	f (y/x)	Varianza (s ²)
50%	1	0.00505	2033.55933	402982.50	37672032.551652
	2	0.00493	1953.96485	395984.23	
	3	0.00502	1961.74396	390749.28	
75%	1	0.00757	2943.48560	388866.02	8968793.316157
	2	0.00740	2921.71949	394737.51	
	3	0.00753	2942.82300	390776.78	
100%	1	0.01009	3956.23364	391995.68	2421609.636938
	2	0.00987	3882.13171	393370.16	
	3	0.01004	3918.62195	390264.67	
125%	1	0.01262	4936.51294	391299.79	4760026.605360
	2	0.01234	4865.83179	394437.52	
	3	0.01255	4898.00074	390242.62	
150%	1	0.01514	5918.97778	390980.23	8720769.440567
	2	0.01480	5851.43140	395277.42	
	3	0.01506	5868.22095	389619.84	
SUMA	15				62543231.55067

Search result of : DAD1,10.998 (43.7 Fl, -) Ref=11.345 & 5.685
 Library used : C:\CHEM32\SPECLIBS\DEMODADN.UVL
 Library Name : PAH spectra
 Parameters : Threshold 1 mAU

Library search results

#	Match	Entry	Time [min]	Name
1	999.9992	22	10.991	LEVOTIROXINA SODICA
2	693.2537	4	9.300	Fluoranthene
3	633.8585	16	6.270	Acenaphthene
4	607.7759	18	5.500	ACENAPHTHALENE
5	543.6695	17	16.200	PERYLENE
6	541.3536	1	4.700	NAPHTHALENE
7	500.0752	9	16.200	Benzo(b)fluoranthene
8	462.7328	15	24.500	Anthanthrene
9	441.1949	8	15.600	Benz(e)pyrene
10	416.7624	14	21.500	Indeno(1,2,3-cd)pyrene

Anexo 7. Estadísticas de curva de calibración de concentración versus área, para la evaluación de la linealidad del sistema, del método analítico. Lima-2022.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación	0,9998
Coeficiente de determinación R ²	0,9997
Observaciones	15

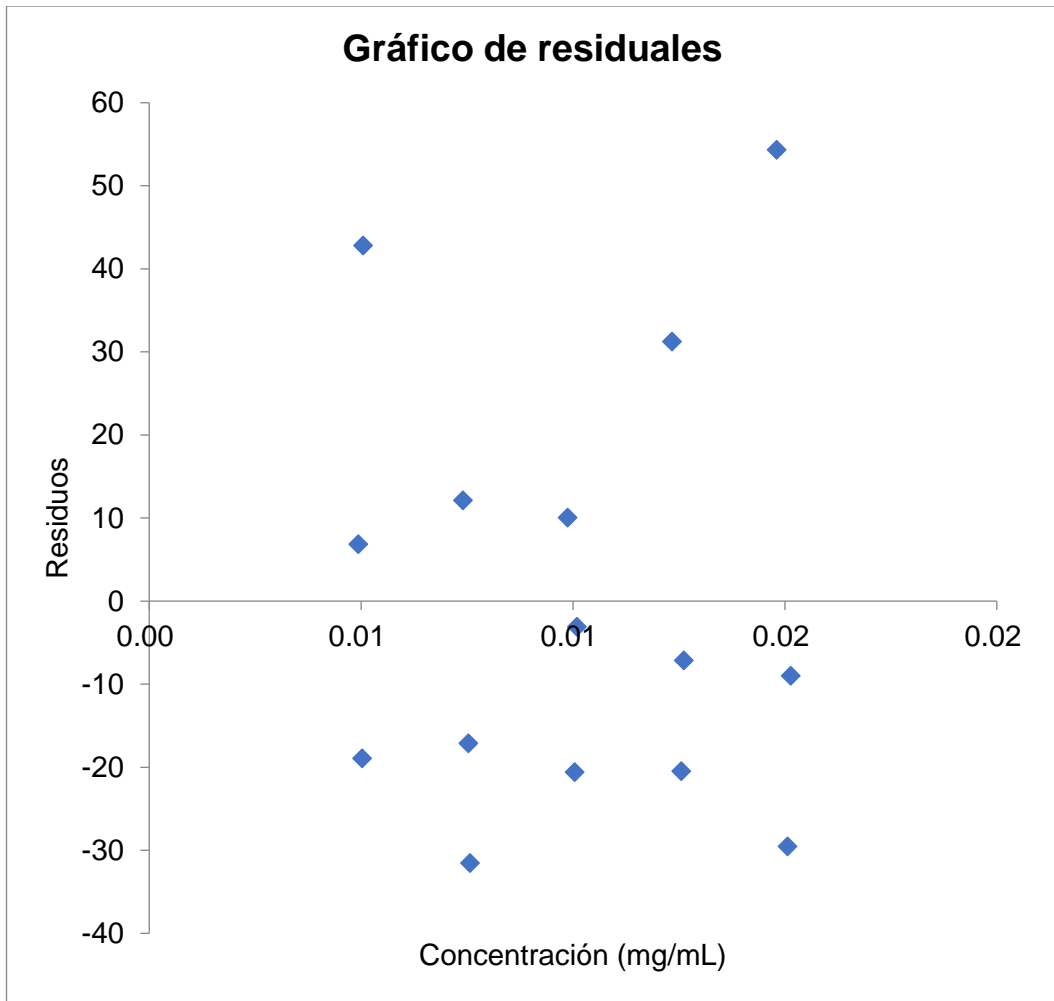
Anexo 8. Estadísticas de curva de calibración de concentración versus área, para la evaluación de la linealidad del método analítico y exactitud. Lima – 2022.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación	0,9998
Coeficiente de determinación R ²	0,9996
Observaciones	9

Anexo 9. Resumen de datos y resultados de linealidad de sistema. Lima-2022.

Concentración	Dato (n)	Peso (mg)	x (mg/mL)	Áreas	y Promedio de áreas	f (y/x)
50 %	M1	35,20	0,00505	2034,86206 2032,25659	2033,55933	402982,50
	M2	34,42	0,00493	1951,41663 1956,51306	1953,96485	395984,23
	M3	35,02	0,00502	1961,47327 1962,01465	1961,74396	390749,28
75 %	M1	35,20	0,00757	2930,53589 2956,43530	2943,48560	388866,02
	M2	34,42	0,00740	2922,14502 2921,29395	2921,71949	394737,51
	M3	35,02	0,00753	2943,04297 2942,60303	2942,82300	390776,78
100 %	M1	35,20	0,01009	3952,80151 3959,66577	3956,23364	391995,68
	M2	34,42	0,00987	3880,69653 3883,56689	3882,13171	393370,16
	M3	35,02	0,01004	3917,22949 3920,01440	3918,62195	390264,67
125 %	M1	35,20	0,01262	4930,19922 4942,82666	4936,51294	391299,79
	M2	34,42	0,01234	4865,66064 4866,00293	4865,83179	394437,52
	M3	35,02	0,01255	4896,32129 4899,68018	4898,00074	390242,62
150 %	M1	35,20	0,01514	5922,15234 5915,80322	5918,97778	390980,23
	M2	34,42	0,01480	5854,26709 5848,59570	5851,43140	395277,42
	M3	35,02	0,01506	5863,34326 5873,09863	5868,22095	389619,84

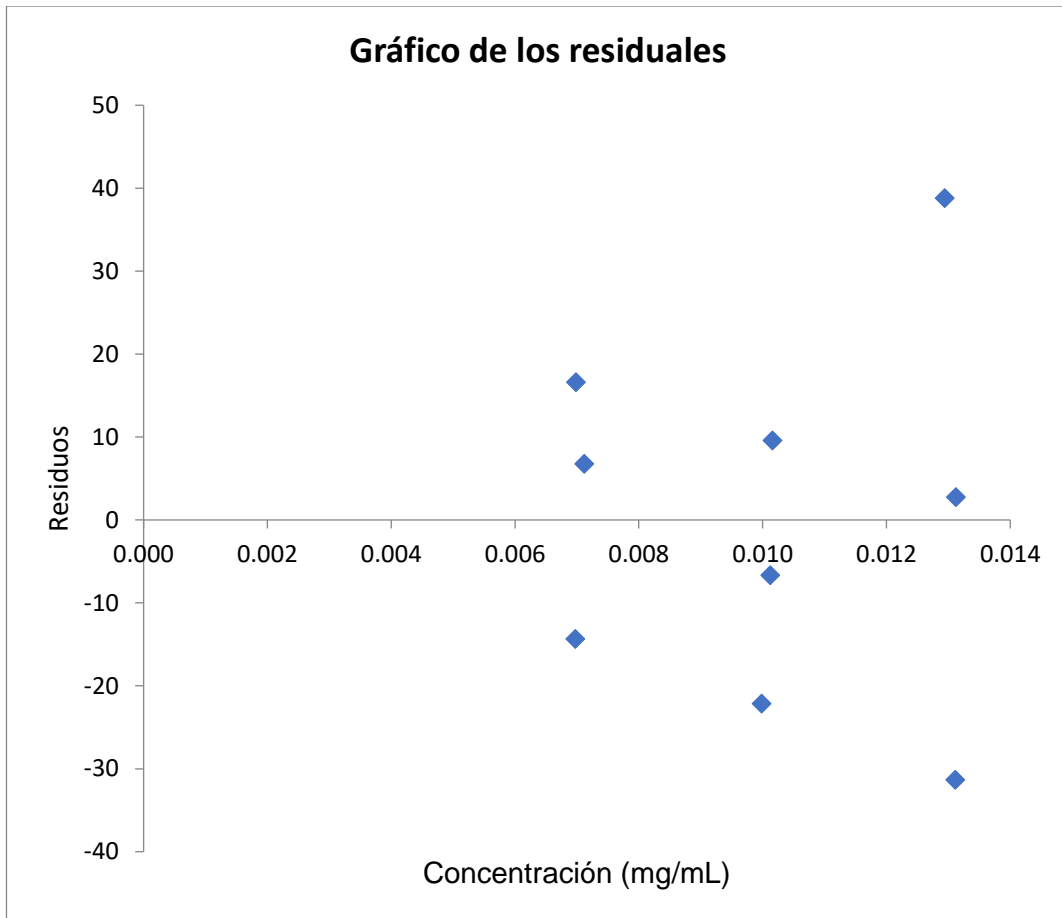
Anexo 10. Residuales, concentración versus residuos, para la evaluación de la aleatoriedad de los resultados en la prueba de linealidad de sistema. Lima- 2022.



Anexo 11. Resumen de datos y resultados de linealidad de método. Lima-2022.

Concentración	Dato (n)	Peso (mg)	x (mg/mL)	Áreas	y Promedio de áreas	f (y/x)
70 %	M1	19,48	0,00698	2722,63159	2722,64551	389972,65
				2722,65942		
	M2	19,86	0,00712	2765,90210	2766,77149	385526,83
				2767,64087		
	M3	19,46	0,00697	2682,79810	2688,84302	387982,08
				2694,88794		
100 %	M1	28,34	0,01016	3974,36865	3874,01038	394579,17
				3973,40796		
	M2	27,86	0,00999	3873,83813	5106,57422	389252,46
				3874,18262		
	M3	28,25	0,01012	3943,45825	5103,20557	388710,30
				3946,25073		
130 %	M1	36,11	0,01294	5098,37158	3973,88831	391244,11
				5114,77686		
	M2	36,61	0,01312	5141,60107	3944,85449	389622,95
				5141,44531		
	M3	36,58	0,01311	5105,36670	5141,52319	391853,81
				5101,04443		

Anexo 12. Residuales, concentración versus residuos, para la evaluación de la aleatoriedad de los resultados en la prueba de linealidad de método. Lima-2022.



Anexo 13. Resultados y evaluación estadística de la linealidad. Lima-2022.

PARÁMETROS	LÍMITES	RESULTADOS
Linealidad:		
Linealidad de Sistema		
Ecuación de la recta	$y=bx\pm a$	$y = 390111,21x + 22,13$
Coeficiente de correlación	Mayor a 0,999	0,9998
Coeficiente de determinación	Mayor a 0,998	0,9997
Homogeneidad de varianzas (Test de Cochran)	$G_{exp} < G_{tablas}$	$0,60 < 0,68$
Tes de ANOVA	$F_{exp} > F_{tabla}$	$38836,52 > 4,67$
Tes de Linealidad:		
Coeficiente de Variación de los Factores de Respuesta "f"	$RSD \leq 2\%$	0,91 %
Intervalo de confianza de la pendiente "b"	$b \pm t_{tabla} \cdot Sb$ $t_{exp} > t_{tabla}$	$385834,64 - 394387,79$ $197,07 > 2,16$
Tes de Proporcionalidad		
Intervalo de confianza del intercepto "a"	$a \pm t_{tabla} \cdot Sa$ $t_{exp} < t_{tabla}$	$-23,24 - 67,49$ $1,05 < 2,16$
Linealidad de Método		
Ecuación de la recta	$y=bx\pm a$	$y = 396253,44x - 60,46$
Coeficiente de correlación	Mayor a 0,999	0,9998
Coeficiente de determinación	Mayor a 0,998	0,9996
Homogeneidad de varianzas (Test de Cochran)	$G_{exp} < G_{tablas}$	$0,47 < 0,87$
Tes de ANOVA	$F_{exp} > F_{tabla}$	$16469,51 > 5,59$
Tes de Linealidad:		
Coeficiente de Variación de los Factores de Respuesta "f"	$RSD \leq 2\%$	0,66 %
Intervalo de confianza de la pendiente "b"	$b \pm t_{tabla} \cdot Sb$ $t_{exp} > t_{tabla}$	$388952,23 - 403554,65$ $128,33 > 2,36$
Tes de Proporcionalidad		
Intervalo de confianza del intercepto "a"	$a \pm t_{tabla} \cdot Sa$ $t_{exp} < t_{tabla}$	$-136,06 - 15,14$ $1,89 < 2,36$

Anexo 14: Matriz de consistencia

TITULO: "Validación de un método analítico por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para la cuantificación de Levotiroxina sódica en tabletas". Lima-2022.

AUTOR: SICHA GUTIERREZ, Michel.

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	MARCO TEÓRICO	METODOLOGÍA
Validación de un método analítico por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para la cuantificación de Levotiroxina sódica en tabletas, Lima – 2021.	¿Será confiable el método analítico para la cuantificación de Levotiroxina sódica en tabletas por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), para obtener resultados dentro de las especificaciones establecidas en el protocolo de validación?	<p>General: Validar un método analítico para la cuantificación de Levotiroxina sódica en tabletas por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y documentar los resultados obtenidos</p> <p>Objetivos específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> •Determinar la especificidad del método analítico. •Determinar la linealidad del sistema, linealidad del método y el intervalo del método analítico. •Determinar la exactitud, repetibilidad y precisión intermedia del método analítico. 	La validación de un método analítico por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para la cuantificación de Levotiroxina sódica en tabletas, es confiable para obtener los resultados dentro de las especificaciones establecidas en el protocolo de validación.	<p>Variable principal: Validación de un método analítico por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).</p> <p>Indicadores: Parámetros de validación:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Especificidad - Linealidad - Precisión - Exactitud - Intervalo 	<p>Validación Es un proceso que establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento, cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. Para la cuantificación de ingredientes activos en muestra de sustancia o fármacos la ICH y la USP establece la evaluación de los siguientes parámetros de validación:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Especificidad - Linealidad - Precisión - Exactitud - Intervalo <p>Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) Es un tipo de cromatografía de elución versátil y ampliamente utilizado como una técnica de separación, basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida, que se emplean para separar los componentes de una muestra. El gran poder de la cromatografía reside en la combinación de un amplio intervalo de posibles propiedades para la fase móvil, junto con la elección de numerosos tipos de fases estacionarias, significativamente diferentes, así como una amplia variedad de detectores.</p> <p>Levotiroxina sódica La levotiroxina es un medicamento que reemplaza una hormona producida normalmente por la glándula tiroidea para regular la energía y el metabolismo del cuerpo. Está indicado en el tratamiento de enfermedades como el bocio, cáncer de tiroides e hipotiroidismo.</p>	<p>Tipo de investigación: Descriptivo transversal</p> <p>Nivel de investigación: Básica</p> <p>Población: Tablet de Levotiroxina sódica</p> <p>Muestra: 500 tabletas que contienen Levotiroxina sódica</p> <p>Metodología Levotiroxina sódica</p> <ul style="list-style-type: none"> -Fase móvil: metanol: agua purificada y ácido orto fosfórico (670:330:0.5). -Columna cromatográfica: L1 (Hypersil DBS C18), 250 mm x 4.6 mm x 5 µm. -Velocidad de flujo: 1.0 mL/minuto. -Tratamiento de estándar y muestra: La concentración de la solución muestra y solución estándar fue de 0.01 mg/mL de Levotiroxina sódica. Se utilizó como diluyente una solución de Hidróxido de sodio 0.01 N. <p>Análisis estadístico Los resultados fueron expresados en cuadros y gráficos. Estas fueron sometidas al Análisis estadístico de t de student, y ANOVA, con un nivel de significancia de 0,05.</p>

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

RESOLUCIÓN DECANAL N°1014-2023-UNSCH-FCSA-D

BACHILLER: Michel, SICHA GUTIERREZ

En la ciudad de Ayacucho, siendo las once de la mañana del día veintidós del mes de diciembre del año dos mil veintitres, se reunieron en el auditorium de la Facultad de Ciencias de la Salud los docentes miembros del jurado evaluador, para el acto de sustentación de trabajo de tesis titulado: "Validación de un método analítico por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para la cuantificación de Levotiroxina sódica en tabletas, Lima 2022"; presentando por la bachiller Michel SICHA GUTIERREZ para optar el título profesional de Químico Farmacéutico. El jurado evaluador está conformado por:

Presidente : Prof. José A. Yarlequé Mujica

Miembros : Prof. Edwin C. Enciso Roca
Prof. Pablo W. Común Ventura
Prof. Kirianova Godoy Bautista

Asesor : Prof. Maricela López Sierralta

Secretario Docente (e): Prof. Mónica Gómez Quispe

Con el quorum de reglamento se dio inicio la sustentación de tesis, el presidente de la comisión pide al secretario docente dar lectura a los documentos presentados por el recurrente, resolución decanal y algunas indicaciones al sustentante.

Da inicio la exposición la Bachiller: Michel Sicha Gutiérrez, y una vez concluida, el presidente de la comisión solicita a los miembros del jurado evaluador realizar sus respectivas preguntas, seguidamente se da pase al asesor de tesis, para que pueda aclarar algunas preguntas, interrogantes, aclaraciones.

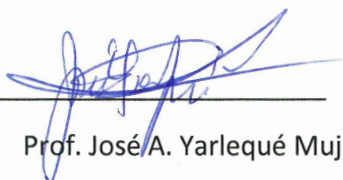
El presidente invita a la sustentante abandonar el auditorium para que pueda proceder con la calificación.

RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN FINAL

Bachiller: Michel Sicha Gutiérrez

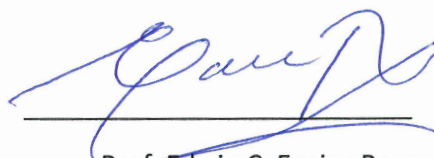
JURADOS	TEXTO	EXPOSICIÓN	PREGUNTAS	P.FINAL
Prof. José A. Yarlequé Mujica	-	-	-	-
Prof. Edwin C. Enciso Roca	17	17	17	17
Prof. Pablo W. Común Ventura	16	16	16	16
Prof. Kirianova Godoy Bautista	16	17	17	17
Prof. Maricela López Sierralta	-	-	-	-
PROMEDIO FINAL				17

De la evaluación realizada por los miembros del jurado calificador, llegaron al siguiente resultado: Aprobar a la Bachiller Michel Sicha Gutiérrez; quien obtuvo la nota final de diecisiete para la cual los miembros del jurado evaluador firman al pie del presente, siendo las 12:35 del mediodía, se da por concluido el presente acto académico.



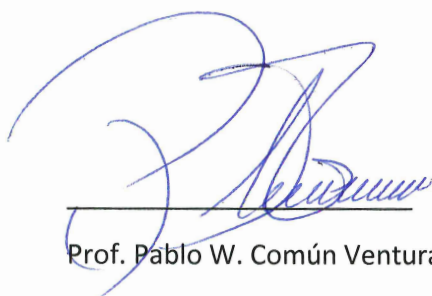
Prof. José A. Yarlequé Mujica

Presidente



Prof. Edwin C. Enciso Roca

Miembro



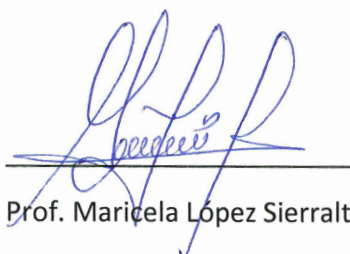
Prof. Pablo W. Común Ventura

Miembro



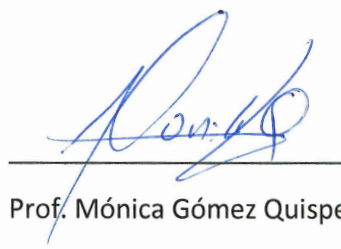
Prof. Kirianova Godoy Bautista

Miembro



Prof. Mariçela López Sierralta

Miembro asesor



Prof. Mónica Gómez Quispe

Secretaria Docente



UNSCH

**FACULTAD DE
CIENCIAS DE LA SALUD**

**ESCUELA PROFESIONAL DE
FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**DOCENTES INSTRUCTORES
DEL SOFTWARE ANTIPLAGIO**



CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD PRIMERA INSTANCIA DE TRABAJO DE TESIS - 020 - 2023

El suscrito docente – instructor responsable de operativizar, verificar, garantizar y controlar la originalidad de los trabajos de tesis de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica designado por Resolución Decanal N° 0453 – 2023 – UNSCH – FCSEA/D de fecha 15 de mayo de 2023, deja constancia que el trabajo de tesis titulado: **“Validación de un método analítico por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para la cuantificación de Levotiroxina sódica en tabletas, Lima - 2022”**

Autor: Bach. **Miguel SICA GUTIERREZ**

Asesora: Profesora **Maricela LÓPEZ SIERRALTA**

Ha sido sometido al análisis del sistema antiplagio TURNITIN concluyendo que presenta un porcentaje de **28 % de Índice de Similitud**.

Por lo que, de acuerdo con el porcentaje establecido en el Artículo 13 del Reglamento de Originalidad de Trabajos de Investigación de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga es procedente conceder **la Constancia de Originalidad en Primera Instancia**.

Ayacucho, 17 de setiembre de 2023

Firmado
digitalmente por
Enrique Javier
Aguilar Felices
Fecha:
2023.09.17
20:15:41 -05'00'

Mg. Enrique Javier AGUILAR FELICES
Docente – Instructor



UNSCH

FACULTAD DE
CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE
FARMACIA Y BIOQUÍMICA



CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD SEGUNDA INSTANCIA:
TESIS DE PREGRADO

(C° 37-2023-EPFB-UNSCH)

La que suscribe, directora de escuela y docente instructor en segunda instancia de Tesis de Pregrado, luego de verificar la originalidad de la tesis de la Escuela profesional de Farmacia y bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud, en representación de la decana y delegada por Resolución Decanal N° 077-2021-UNSCH-FCSA/D, deja constancia que el trabajo de tesis titulado:

Validación de un método analítico por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para la cuantificación de Levotiroxina sódica en tabletas, Lima - 2022

PRESENTADO POR **Bach. SICHA GUTIERREZ, Michel**

Ha sido sometido al análisis mediante el sistema TURNITIN concluyendo que presenta un porcentaje de **26% de índice de similitud.**

Por lo que, de acuerdo con el porcentaje establecido en el Artículo 13° del Reglamento de Originalidad de Trabajos de investigación de pregrado de la UNSCH. Por tanto, **ES PROCEDENTE** conceder la Constancia de originalidad en segunda instancia.

Ayacucho, 19 de setiembre del 2023



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Mg. Maricela López Sierralta

DIRECTORA
Docente. Instructor

Segunda instancia

cc.
Archivo.

Validación de un método analítico por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para la cuantificación de Levotiroxina sódica en tabletas, Lima - 2022

por Michel Sicha Gutierrez

Fecha de entrega: 19-sep-2023 06:31p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2171047569

Nombre del archivo: TESIS_Michel_Sicha.pdf (1M)

Total de palabras: 15388

Total de caracteres: 79316

Validación de un método analítico por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para la cuantificación de Levotiroxina sódica en tabletas, Lima - 2022

INFORME DE ORIGINALIDAD

26%

INDICE DE SIMILITUD

27%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

7%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	dspace.unitru.edu.pe Fuente de Internet	7%
2	repositorio.unsch.edu.pe Fuente de Internet	4%
3	1library.co Fuente de Internet	2%
4	idoc.pub Fuente de Internet	1%
5	www.dspace.unitru.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	qdoc.tips Fuente de Internet	1%
7	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Trabajo del estudiante	1%
8	repositorio.upch.edu.pe Fuente de Internet	1%

9	repositorio.concytec.gob.pe Fuente de Internet	1 %
10	tesis.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	1 %
11	fdocuments.ec Fuente de Internet	1 %
12	www.dspace.uce.edu.ec Fuente de Internet	1 %
13	repositorio.unapiquitos.edu.pe Fuente de Internet	1 %
14	www.scribd.com Fuente de Internet	1 %
15	biblioteca2.ucab.edu.ve Fuente de Internet	1 %
16	hdl.handle.net Fuente de Internet	<1 %
17	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
18	bdigital.unal.edu.co Fuente de Internet	<1 %
19	repositorio.umsa.bo Fuente de Internet	<1 %
20	Submitted to Universidad de Salamanca Trabajo del estudiante	<1 %

21 repositorio.uwiener.edu.pe

Fuente de Internet

<1 %

22 repository.icesi.edu.co

Fuente de Internet

<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía

Activo