

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



PROPUESTA DE VALIDACION DE METODO ANALITICO PARA LA IDENTIFICACION
Y CUANTIFICACION DE CITICOLINA (COMO CITICOLINA SODICA) EN TABLETAS
DE 500 MG POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

TRABAJO DE GRADO EN MODALIDAD DE TRABAJO DE INVESTIGACION

PRESENTADO POR:

TANIA IVETTE ERAZO CISNEROS

KIMBERLY BEATRIZ JOVEL GOMEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA

ABRIL 2024

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO JUAN ROSA QUINTANILLA

SECRETARIO GENERAL

LICENCIADO PEDRO ROSALÍO ESCOBAR CASTANEDA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANA

MAESTRA NANCY ZULEYMA GONZÁLEZ SOSA

SECRETARIA

LICENCIADA EUGENIA SORTO LEMUS

DIRECCIÓN DE PROCESOS DE GRADO

DIRECTORA GENERAL (AD-HONOREM)

MAESTRA KATIA LISSETTE MARTÍNEZ DE PALACIOS

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

MAESTRO

LICENCIADO LUIS DAVID ALONZO HERNANDEZ

TRIBUNAL EVALUADOR

ASESORA

LICENCIADA ZENIA IVONNE ARÉVALO DE MÁRQUEZ

ASESOR

LICENCIADO. HENRY ALFREDO HERNANDEZ CONTRERAS

DOCENTE ASESOR

LICENCIADO LUIS GUILLERMO ESCALANTE ESCOBAR

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por nunca soltarme la mano durante todos estos años, por la sabiduría, fortaleza y valentía que me ha demostrado a través de todas las situaciones difíciles que se han presentado, porque solo Él sabe el camino que he recorrido.

A mi madre María Estela Cisneros, por demostrarme como ser una persona fuerte, que no debe rendirse en el primer intento fallido y seguir con la cabeza en alto hasta el final, por ser una de mis más grandes inspiraciones y razones para no rendirme.

A mi hermano Erick Alexander Cisneros, por ser mi apoyo y darme aliento en cada paso dado en esta carrera, por estar todo el tiempo para mí sin importar las circunstancias.

A mi amiga Sonia Orellana, por animarme en momentos difíciles y hacerme ver lo que puedo lograr si confío en mí.

A mi amiga y colega Alisson Ventura, por siempre apoyarme de manera incondicional, por ser la persona más valiosa que me ha dejado esta etapa de mi vida.

A los decentes asesores, Licenciado Luis Alonzo y Licenciado Luis Escalante, por dar parte de su tiempo y brindarnos su ayuda para poder lograr esta tan importante meta, por compartir parte de sus conocimientos de la mejor manera posible, infinitamente agradecida con ellos.

Al jurado calificador, Licenciada Zenia Ivonne Arévalo, Licenciado Henry Hernández, Licenciada Lorena Mercado, y a todos los involucrados en el proceso, gracias por el apoyo en nuestro trabajo de investigación.

Tania Ivette Erazo Cisneros

DEDICATORIA

A mi madre María Estela Cisneros, por siempre confiar en mí, por darme fortaleza, por su paciencia, apoyarme y nunca dejarme caer, gracias.

A mi hermano Erick Alexander Cisneros, por apoyarme y no soltarme la mano en todos estos años, por estar para mí incondicionalmente, por dar todo de él para que nada me faltara a mí, gracias.

A mi abuela, María Luz Cisneros, por llevarme en sus oraciones y velar por mi bienestar.

Atentamente,

Tania Ivette Erazo Cisneros

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradecida con Dios por darme esta oportunidad de llegar hasta este punto en mi vida académica tan soñada, le agradezco por darme la fuerza, valentía, determinación y salud necesaria para poder recorrer toda mi carrera universitaria, sé sin duda alguna que Dios es fiel y cumple sus promesas si lo ponemos en primer lugar a Él.

Agradezco infinitamente a mi familia, a mi padre y a mi madre en especial por no perder la fe en mí de que podía lograrlo, por animarme de día y noche, por motivarme y decirme que los frutos se ven luego de un arduo trabajo, ahora puedo decir que todo valió la pena. Gracias mami y papi por estar siempre conmigo y apoyarme tanto económicamente como espiritual y emocionalmente. A mi hermano porque también ha estado pendiente de mí y de mi progreso y por qué sé que a pesar de sus bromas sabía que podía lograrlo.

A mis abuelitos Iván Hermógenes Gomez y Oralia Rivera que, aunque ya no están presentes con nosotros me alentaron a no rendirme y sabían con certeza que lograría lo que me pudiera proponer, gracias abuelita por sus desayunos y gracias abuelito por esperarme regresar a casa cada día, por sus esfuerzos y esperanzas puestas en mí.

Al Laboratorio Nacional por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de graduación y darme los medios adecuados para llevarlo a cabo en sus instalaciones.

Gracias al jurado calificador por sus observaciones e intervenciones en el desarrollo de este trabajo, por sus enseñanzas y paciencia y a todos aquellos que también contribuyeron con su conocimiento, animo, alegría y motivación a lo largo de este camino académico. Muchas gracias.

Kimberly Beatriz Jovel Gomez

DEDICATORIA

A mi padre José Wilfredo Jovel y a mi Madre Sara Jeannette Gomez de Jovel, por sus sacrificios, consejos, ánimos y su fe puesta en mí, por no dejarme y apoyarme en cada paso que doy.

A mi hermano, para sepa que todo lo propuesto en esta vida se puede lograr con esfuerzo y sacrificio y sobre todo con la fe puesta en Dios.

A mis abuelitos, por su amor, dedicación y por siempre llevarme en sus oraciones.

Atentamente,

Kimberly Beatriz Jovel Gomez

INDICE GENERAL

	Pág. N°
Capítulo I	
1.0 Introducción	15
Capitulo II	
2.0 Objetivos	
Capitulo III	
3.0 Marco Teórico	20
3.1 Generalidades sobre los medicamentos	20
3.2 Generalidades del principio activo	22
3.3 Cromatografía	22
3.4 Generalidades sobre Cromatografía Líquida de alta eficiencia (HPLC)	23
3.4.1 Procedimiento	24
3.5 Método analítico	25
3.5.1 Tipos de métodos analíticos	26
3.6 Procedimientos analíticos que son objeto de validación	26
3.7 Validación de un método analítico	27
3.7.1 Exactitud	28
3.7.2 Linealidad	28
3.7.3 Precisión	29
3.7.4 Especificidad	30
3.8 Documentación de la Validación	30
3.8.1 Protocolo de Validación	30
3.8.2 Informe de validación	31
3.8.3 Certificado de Validación	31
Capitulo IV	
4.0 Diseño metodológico	34
4.1 Tipo de Estudio	34
4.2 Investigación Bibliográfica	34
4.3 Ámbito de aplicación	34

4.4 Parte experimental	35
Capítulo V	
5.0 Resultados y discusión de resultados	38
5.1 Elaboración de Protocolo para la validación de Citicolina (como Citicolina Sódica) en tabletas recubiertas por Cromatografía líquida de alta eficiencia	38
5.2 Análisis de resultados obtenidos de la validación de la metodología analítica por Cromatografía líquida de alta eficiencia para identificar y cuantificar Citicolina.	61
5.2.1 Especificidad	61
5.2.2 Linealidad del Sistema	63
5.2.3 Linealidad del Método-Exactitud	65
5.2.4 Precisión: Repetibilidad y Precisión Intermedia	67
5.2.5 Estabilidad de muestra	70
5.3 Informe de validación del método analítico para la identificación y cuantificación de Citicolina (como Citicolina sódica) en tabletas recubiertas de 500 mg por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).	72
5.3.1 Introducción	72
5.3.2 Alcance	73
5.3.3 Condiciones	73
5.3.4 Parámetros a evaluar: Dictamen:	73
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	78
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	80
Bibliografía	
Glosario	
Anexos	

INDICE DE TABLAS

Tablas N°	Pág. N°
1. Parámetros de desempeño de los procedimientos analíticos fisicoquímicos	27
2. Preparación de soluciones para linealidad del sistema	53
3. Preparación de soluciones para linealidad del Método	55
4. Resultados de la prueba de Especificidad de las soluciones de muestra y placebo	61-62
5. Recolección de datos obtenidos en el análisis de linealidad del sistema	63
6. Resultados de la prueba de Linealidad del Sistema	64
7. Resultados obtenidos para el porcentaje de recobro	65
8. Resultados obtenidos de la prueba de linealidad del método	65-66
9. Resultados de la prueba de Precisión (Repetibilidad-Precisión intermedia)	67
10. Resultados del criterio de aceptación con relación al parámetro Precisión (Repetibilidad- Intermedia)	68
11. Resultados de la prueba de estabilidad de la muestra analítica	70
12. Resultados de la prueba de estabilidad (Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición)	70
13. Dictamen de los parámetros evaluados	73-75

INDICE DE FIGURAS

Figura N°	Pág. N°
1. Diagrama que muestra los componentes de un HPLC	25
2. Placebo de Producto sin degradar	62
3. Linealidad del sistema al nivel 100%	64
4. Linealidad del método al nivel 50%	66
5. Cromatograma de producto al 100%	69
6. Cromatograma de estándar de Citicolina Sódica al 100%	69

INDICE DE CUADROS

Cuadro N°	Pág. N°
1. Características de estándar y producto terminado	40
2. Información de los equipos a utilizar	41
3. Información de los materiales a utilizar	42
4. Información de los reactivos a utilizar	43
5. Información de los estándares, muestras y placebo a utilizar	43
6. Numero de preparaciones e inyecciones por cada muestra en la especificidad	46

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. Formato de protocolo de validación de metodologías analíticas
2. Fórmulas matemáticas utilizadas en cada uno de los parámetros de validación
3. Formato de hojas de cálculo
4. Cascada de diluciones de los parámetros de validación
5. Imagen de columna y equipo utilizado en la validación
6. Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 11.03.39:06 productos farmacéuticos.
Validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos.
7. Reglamento técnico centroamericano RTCA 11.01.04:10 productos farmacéuticos.
Estudios de estabilidad de medicamentos para uso humano
8. Declaración por parte de la organización mundial para la salud sobre los medicamentos
9. Monografía de Citicolina Sódica

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo por objeto principal proponer la validación de una metodología analítica que identifica y cuantifica Citicolina (como Citicolina sódica) en tabletas recubiertas de 500 mg por el método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), utilizando los equipos MERCK HITACHI modelos CHROMASTER Y PRIMAIDE.

La metodología analítica aplicada para este producto fue desarrollada de forma interna en el departamento de Investigación y Desarrollo y posteriormente se redactó el protocolo de validación con el objetivo de evaluar los parámetros de: Especificidad, Linealidad del sistema, Linealidad del método-exactitud, Precisión; repetibilidad incluyendo la precisión intermedia y la estabilidad de la muestra, parámetros que son descritos por el RTCA 11.03.47:07 de Verificación de Calidad. La investigación que se realizó en el área de Investigación y Desarrollo de un Laboratorio Nacional, ubicado en el departamento de San Salvador, en los meses de febrero a octubre del año 2023.

A partir de los resultados obtenidos de cada uno de los parámetros evaluados, se redactó el informe final de validación para demostrar que la metodología analítica es la adecuada para lo cual fue diseñada. La metodología se transfirió al departamento de Control de Calidad para ser aplicada al producto y que éste pudiera ser liberado al mercado.

Los parámetros estudiados revelaron resultados conformes a la normativa vigente y por tanto es posible concluir que la validación del método se llevó a cabo de manera exitosa y al mismo tiempo, la metodología desarrollada es la idónea para la cuantificación e identificación de Citicolina en tabletas recubiertas de 500 mg.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

En El Salvador, los medicamentos están regidos bajo la Dirección Nacional de Medicamentos, la cual es la entidad regulatoria encargada de velar por la calidad del medicamento, desde su fabricación hasta su comercialización. Para que un Laboratorio fabricante de medicamentos pueda comercializar sus productos, es necesario que cumpla con todos los requerimientos establecidos por la misma, que cumpla la con la calidad debida que garantice su eficacia y seguridad al ser administrados. Para garantizar la calidad de los medicamentos, se requiere que se cumpla con Buenas Prácticas de Manufactura, Buenas Prácticas de Laboratorio como prioridad, pero también, que el procedimiento analítico aplicado a cada forma farmacéutica para su análisis esté debidamente validado y cumplir con el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 11.03.47:07 “Buenas Prácticas de Manufactura de la industria farmacéutica” el cual menciona que todos los métodos analíticos deben estar escritos, aprobados y validados.

En este trabajo de investigación, el objetivo principal fue demostrar mediante la experimentación, que la metodología para identificar y cuantificar Citicolina en tabletas recubiertas de 500 mg, es adecuada para su propósito, es decir, validados. Dicha comprobación se realizó mediante Cromatografía Líquida de alta eficiencia (HPLC) en equipos MERCK HITACHI, modelos CHROMASTER y PRIMAIDE.

La descripción de los parámetros evaluados para esta validación, se encuentra en el RTCA 11.03.36:06 “Validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos”. Los parámetros evaluados fueron; Selectividad/ Especificidad, Linealidad de sistema, Linealidad de método/ exactitud, Precisión (repetibilidad e intermedia) y la Estabilidad de la muestra analítica, parámetros que fueron comprobación de idoneidad del método aplicado a la forma farmacéutica en evaluación. De igual forma, la guía ICH (International Conference on Harmonization) de “Validación de procedimientos analíticos Q2(R2)”, nos indica desde el Protocolo de Validación, el desarrollo de la validación y los reportes de la validación. Los resultados obtenidos y procesados mediante fórmulas matemáticas contenidas en documentos de Excel, fueron registrados en los informes de validación, emitiendo dictamen final de la validación en su totalidad.

Una vez realizada la parte experimental y obteniendo resultados conformes para cada uno de los parámetros evaluados de la validación, se realizó el protocolo de validación a partir de estos resultados, con el fin de comprobar y demostrar que el método identifica y cuantifica Citicolina sódica en tabletas de 500 mg.

Se concluye que la validación propuesta para la metodología que identifica y cuantifica Citicolina en tabletas de 500 mg por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia, es adecuada e idónea para lo que fue desarrollado y propuesto. Por lo tanto, este método está apto para ser transferido al departamento de Control de calidad para su uso y aplicación en este medicamento antes de ser liberado a su comercialización.

La validación se realizó en los meses de febrero a octubre del año 2023, los informes y toda la documentación se encuentra en el área de Investigación y Desarrollo del Laboratorio Nacional ubicado en el departamento de San Salvador, El Salvador.

CAPITULO II

OBJETIVO

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Proponer la validación del método analítico para la identificación y cuantificación de Citicolina (como Citicolina Sódica) en tabletas de 500mg por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

2.2.1 Elaborar el protocolo de validación del método de cromatografía líquida de alta eficiencia para la cuantificación de Citicolina sódica en tabletas de 500 mg.

2.2.2 Desarrollar los parámetros de desempeño de la validación del método analítico para la cuantificación de Citicolina sódica contenida en tabletas.

2.2.3 Identificar el principio activo Citicolina en tabletas de 500 mg, por medio de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.

2.2.4 Cuantificar la cantidad de Citicolina en tabletas de 500mg, por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.

2.2.5 Redactar el reporte de validación con sus respectivos resultados y criterios de aceptación

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

La validación es un procedimiento que proporciona resultados documentables obtenidos por una serie de experimentos, que prueban mediante una serie de parámetros aplicables a una muestra, que el método analítico evaluado es el indicado para comprobar la calidad de la muestra en investigación, con un alto grado de seguridad, exactitud y precisión, por medio de diferentes técnicas. Los resultados obtenidos son evidenciados en un protocolo de validación que describe la metodología que cuantifica e identifica al o los analitos de interés, que en este caso se identificó y cuantificó Citicolina en tabletas de 500 mg, por medio de Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), técnica que nos brinda resultados confiables debido al procesamiento de las muestras, llevándonos a emitir las conclusiones y dictamen final.

3.1 Generalidades sobre los medicamentos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define los Medicamentos como toda preparación o producto farmacéutico empleado para la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de una enfermedad o estado patológico, o para modificar sistemas fisiológicos en beneficio de la persona a quien se le administra. (8).

- **Medicamentos psicoestimulantes:** son un grupo de sustancias que aumentan el estado de alerta, disminuyen la sensación de fatiga, elevan el estado de ánimo, incrementan la iniciativa, la confianza, la capacidad de atención y concentración, así como las actividades motoras y verbales. (9).
- **Medicamentos nootrópicos:** Son sustancias capaces de amplificar las capacidades cognitivas y que se encuentran de forma natural en algunos alimentos. Los diferentes nootrópicos funcionan activando distintos neurotransmisores, con efectos sobre la conducta y capacidad mental. Además, aumentan el riego sanguíneo y funcionan activamente contra el daño celular del cerebro y el declive cognitivo. (10)
- **Forma farmacéutica:** Es la forma física que se le da a un medicamento, la cual facilita la dosificación del o de los principios activos para que puedan ejercer su acción en el lugar y tiempo.

- **Comprimidos:** Los comprimidos son formas farmacéuticas sólidas de dosificación unitaria, obtenidas por compresión mecánica de granulados o de mezclas pulverulentas de uno o varios principios activos, con la adición, en la mayoría de los casos, de diversos excipientes. Se cree que John Wyeth ⁽¹⁾, fundador de la compañía farmacéutica homónima, y su hermano Frank, de Filadelfia, fueron los primeros en utilizar el término ‘Compressed Tablet’ y en registrarlo, en 1877, para proteger y restringir su uso. Esta forma farmacéutica se estrenó en Europa en 1906, con su inclusión en el formulario oficial francés. ⁽¹²⁾

Los comprimidos constituyen en la actualidad la forma farmacéutica sólida más administrada por vía oral. Contienen uno o más principios activos (y diversos excipientes), llamados a veces coadyuvantes, y se obtienen por compresión de la mezcla resultante de unos y otros componentes. Las formas, el tamaño y el peso de los comprimidos pueden variar sensiblemente de unos a otros. Por lo general, el tamaño se sitúa entre 5 y 17 mm; el peso, entre 0,1 y 1,0 g, y la forma puede ser redonda, oblonga, biconvexa, ovoide, etc. ⁽¹⁸⁾.

- **Comprimidos recubiertos:** Son comprimidos (núcleos) recubiertos con una película, que contiene el o los principios activos y aditivos, generalmente de superficie convexa; tal recubrimiento obedece a varios motivos, por ejemplo, enmascarar sabores y olores desagradables, protección del mismo y disminuir la irritación gastrointestinal. ⁽¹¹⁾
- **Principio activo:** Es toda sustancia o mezcla de sustancias destinadas a la fabricación de un medicamento y que, al ser utilizadas en su producción, se convierten en un componente activo de dicho medicamento destinado a ejercer una acción farmacológica, inmunológica o metabólica con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas, o de establecer un diagnóstico.
- **Procedimiento analítico oficial:** Descripción detallada de los pasos necesarios para aplicar un método analítico estandarizado y validado contenido en las bibliografías de referencias oficiales, según listado armonizado por los Países de la Región Centroamericana (Resolución 93-2002, COMIECO 24, septiembre 2002. ⁽³⁾

- **Procedimiento analítico no oficial:** Descripción detallada de los pasos necesarios para aplicar un método analítico desarrollado por el fabricante para la verificación de la calidad de su producto. (3)

3.2 Generalidades del principio activo

Citicolina pertenece al grupo de medicamentos llamados psicoestimulantes y nootrópicos, que actúan mejorando el funcionamiento cerebral. Está indicado en:

- Accidentes cerebrovasculares, que es una interrupción del suministro de sangre en el cerebro por un coagulo o por rotura de vaso sanguíneo.
- Traumatismo craneano reciente, que es un golpe en la cabeza.
- Tratamiento complementario de las manifestaciones de insuficiencia vascular cerebral y de sus secuelas tanto neurológicas como aquellas referidas a la disminución del rendimiento de tipo intelectual y psíquico.

Indicaciones terapéuticas

No tomar este tipo de medicamento si presenta alergia a la citicolina sódica o si padece hipertonía del sistema nervioso parasimpático, que es un estado grave con presión arterial baja, sudoración, taquicardia y desmayos.

Advertencias y precauciones

En el tratamiento de accidente cerebrovascular deberá comenzarse la administración del medicamento, preferentemente dentro de las primeras 6 horas de haber ocurrido el evento. En caso de hemorragia intracraneal se aconseja no superar la dosis de 600 mg/día.

Posología y método de administración

Niños y pacientes menores de 18 años, la experiencia es limitada, por lo que solo debería administrarse si su médico lo considera necesario. Para pacientes geriátricos se requiere adecuación de la dosis.

3.3 Cromatografía

La cromatografía comprende un conjunto de técnicas que tienen como finalidad la separación de mezclas basándose en la diferente capacidad de interacción de cada componente en otra sustancia.

De forma general, consiste en pasar una fase móvil (una muestra constituida por una mezcla que contiene el compuesto deseado en el disolvente) a través de una fase estacionaria fija sólida. La fase estacionaria retrasa el paso de los componentes de la muestra, de forma que los componentes la atraviesan a diferentes velocidades y se separan en el tiempo. Cada uno de los componentes de la mezcla presenta un tiempo característico de paso por el sistema, denominado tiempo de retención. Cuando el tiempo de retención del compuesto deseado difiere del de los otros componentes de la mezcla, éste se puede separar mediante la separación cromatográfica.

3.4 Generalidades sobre Cromatografía Líquida de alta eficiencia (HPLC)

La Cromatografía líquida de alta eficiencia o High performance liquid chromatography (HPLC), es una técnica utilizada para separar componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica la cual es su fase estacionaria. La utilización de esta técnica tiene la ventaja que las separaciones pueden tener lugar a temperatura ambiente para muchas sustancias. Por lo tanto, las sustancias no volátiles o térmicamente inestables pueden separarse sin descomposición o necesidad de hacer derivados volátiles. La afinidad de una sustancia por la fase estacionaria y, por consiguiente, su tiempo de retención en la columna, se controla variando la polaridad de la fase móvil mediante el agregado de un segundo y, a veces, un tercer o hasta un cuarto componente.

- **Analito:** Sustancia contenida en la muestra sometida a análisis
- **Blanco, placebo o matriz de la muestra:** Muestra preparada para la lectura final pero que no contiene analitos
- **Muestra:** Producto resultante de una operación de muestreo. El muestreo debe ser representativo y con un determinado carácter aleatorio.
- **Fase estacionaria:** Puede ser un sólido, un líquido absorbido sobre un sólido o un gel, puede estar empacada en una columna, extendida como una capa, distribuida como película o aplicada mediante otras técnicas.
- **Fase móvil:** Puede ser gaseosa, líquida o un fluido supercrítico.

- **Sistema de bombeo:** Este impulsa cantidades exactas de fase móvil desde el Reservorio de fase móvil a la columna mediante tuberías y uniones aptas para soportar altas presiones. Los sistemas modernos constan de una o varias bombas dosificadoras, controladas por computadora, que pueden programarse para variar la composición de la fase móvil cuando se trabaja con gradiente o para mezclar los componentes de la fase móvil cuando se trabaja en condiciones isocráticas.
- **Sistema de inyección:** Se emplea para introducir la muestra
- **Columna cromatográfica:** En esta ocurre la separación de los componentes de la muestra inyectada. Poseen diferentes tamaños de partículas, longitud, diámetro. En algunos casos las columnas pueden calentarse para mejorar la eficiencia durante la separación, pero rara vez se las emplea a temperaturas por encima de los 40°C, debido a una potencial degradación de la fase estacionaria o a la volatilidad de la fase móvil.
- **Detector:** Generalmente se emplean detectores espectrofotométricos los cuales constan de una celda de flujo colocada a la salida de la columna. Un haz de radiación ultravioleta pasa a través de la celda de flujo en forma perpendicular a la dirección del flujo de la fase móvil e incide en el fotodetector. A medida que las sustancias eluden de la columna, pasan a través de la celda y absorben la radiación, lo que da lugar a cambios cuantificables en el nivel de energía. Los detectores de longitud de onda variable pueden programarse para variar la longitud de onda durante el análisis.
- **Registrador:** Recibe la información del detector y realiza la impresión del cromatograma. Los dispositivos modernos almacenan la señal de salida del detector permitiendo reprocesar el cromatograma luego de cambiar las variables de integración. También pueden emplearse para programar el cromatógrafo controlando la mayoría de las variables y automatizando el proceso.

3.4.1 Procedimiento ⁽¹³⁾.

La composición de la fase móvil influye significativamente en la resolución de las sustancias en la muestra. Se deben emplear solventes de grado HPLC y reactivos de alta pureza. Se debe equilibrar la columna con la fase móvil y preparar las soluciones estándar y muestra según se especifique en la monografía correspondiente. Las soluciones deben ser filtradas, y en el sistema cromatográfico

se deben de adecuar según se especifica en la monografía correspondiente. Inyectar por separado las soluciones estándar y muestra, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos según se especifique en la monografía correspondiente. A partir de los valores obtenidos calcular el contenido de la o las sustancias a ensayar. Los métodos generalmente empleados son los de estándar externo y estándar interno. En general se obtienen resultados confiables por los sistemas de estándar externo, especialmente cuando se emplean inyectores automáticos. Este método compara directamente la respuesta obtenida cromatografiando separadamente soluciones estándar y muestra. Se presenta a continuación los componentes en general, de la técnica de HPLC. (Ver Figura N°1).

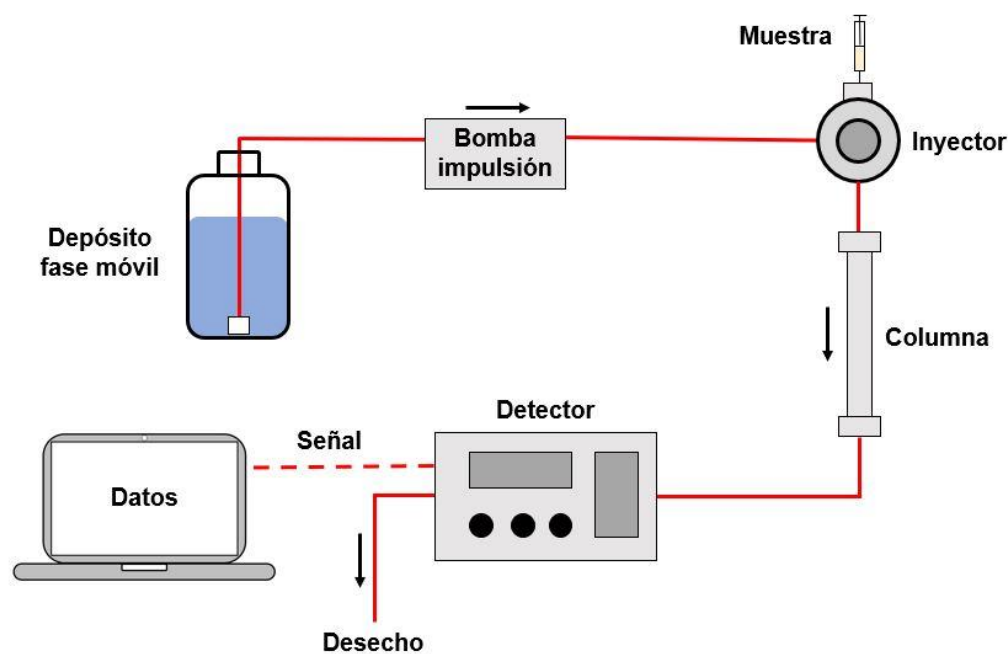


Figura N°1. Diagrama que muestra los componentes de un HPLC¹⁶

3.5 Método analítico

Es una adaptación específica de una técnica analítica para un propósito de medición seleccionado, en la cual se identifican los recursos materiales y el procedimiento (14).

Los métodos analíticos deben de desarrollarse antes de la etapa de producción del producto, pueden mejorarse y optimizarse a medida que avanza el estudio. Estos deben ser validados de acuerdo con los requisitos reglamentarios antes de su uso.

3.5.1 Tipos de métodos analíticos

- **Método Normalizado** Se trata de un método de ensayo normalizado, que se aplica exactamente como está descrito en referencias reconocidas internacionalmente. Ejemplos de referencias reconocidas: USP, FEUM, EP, BP, JP, IP, AOAC, Standard Methods, EPA, PAM, CIPAC, ASTM, ASHTO, ISO, Codex Alimentarius, FDA, FAO, CE, USDA, otras referencias serán evaluadas.
- **Método Normalizado modificado** Se trata de una modificación a un método de ensayo normalizado. Ejemplos: un método de extracción diferente o la aplicación del método en una matriz diferente a la indicada, aplicación del método en rangos distintos trabajos.
- **Método no normalizado** Se trata de un método de ensayo que no se encuentra en referencias reconocidas internacionalmente.

3.6. Procedimientos analíticos que son objeto de validación

Se deben validar los siguientes procedimientos analíticos químicos, físicos y microbiológicos:

- **Categoría I:** pruebas cuantitativas del contenido del (los) principio(s) activo(s), constituyen procedimientos químicos o microbiológicos que miden el (los) analito(s) presente(s) en una muestra determinada
- **Categoría II:** pruebas para la determinación del contenido de impurezas o de valores límites para el control de impurezas. Pueden ser pruebas cuantitativas o una prueba cualitativa para determinar si la impureza está presente en la muestra por encima o por debajo de un valor límite especificado. Cualquiera de los dos pretende reflejar con exactitud las características de pureza de la muestra. Los parámetros de validación requeridos por una prueba cuantitativa son diferentes a los de una prueba cualitativa de cumplimiento de límite.
- **Categoría III:** pruebas físico químicas de desempeño. Constituyen procedimientos de ensayo que miden características propias del desempeño del medicamento, por ejemplo, la prueba de disolución. Las características de la validación son diferentes a las de las otras pruebas, aunque las pueden incluir.

- **Categoría IV:** pruebas de identificación. Aquellas que se realizan para asegurar la identidad de un analito en una muestra. Esto normalmente se realiza por comparación de una propiedad de la muestra, contra la de un estándar de referencia, por ejemplo, espectros, comportamiento cromatográfico, reactividad química y pruebas microcristalinas.

Tabla N°1. Parámetros de desempeño de los procedimientos analíticos fisicoquímicos³

Características de desempeño analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis cuantitativos	Pruebas de limite		
Exactitud	Si	Si	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	No	Si	No
Límite de detección	No	No	Si	*	No
Límite de cuantificación	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No
Intervalo	Si	Si	*	*	No

*Puede requerirse según la naturaleza del ensayo

3.7 Validación de un método analítico

Establece pruebas documentales que demuestran científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. Implica la demostración de la determinación de las fuentes de variabilidad y del error sistemático y al azar de un procedimiento, no sólo dentro de la calibración sino en el análisis de muestras reales (3)

Las características de desempeño analítico habituales que deben considerarse en la validación son:

3.7.1 Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico expresa el grado de concordancia entre el valor que se acepta, ya sea como un valor verdadero convencional o un valor de referencia aceptado y el valor encontrado. La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de analito añadida a la muestra, o como la diferencia entre la media de la valoración y el valor verdadero aceptado, considerando los intervalos de confianza.

Los documentos de ICH recomiendan que se evalúe la exactitud utilizando un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración, cubriendo el intervalo especificado (es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración).

Criterios de aceptación:

El Intervalo de confianza ($IC_{(\mu)}$) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del porcentaje de recobro se incluya en el intervalo: ⁽¹⁵⁾

- 98 – 102% si el método es cromatográfico,

El coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recobro:

- No debe ser de 2% si el método es cromatográfico,

Cualquier otro criterio de aceptación debe ser justificado.

3.7.2 Linealidad ⁽²⁾

La linealidad puede demostrarse directamente en el fármaco (por dilución de una solución madre patrón) y / o pesadas separadas de mezclas sintéticas de los componentes del producto, usando el procedimiento propuesto. El último aspecto puede ser estudiado durante el transcurso de la investigación.

La linealidad debe evaluarse mediante inspección visual de un gráfico de señales en función de concentración o contenido del analito. Si existe una relación lineal, los resultados de la prueba deben evaluarse mediante métodos estadísticos apropiados, por ejemplo, mediante el cálculo de una línea de regresión por el método de mínimos cuadrados. En algunos casos, para obtener linealidad entre los ensayos y las concentraciones de la muestra, es posible que los datos de prueba

deban someterse a una transformación matemática previa al análisis de regresión. Datos de la propia línea de regresión pueden ser útiles para proporcionar estimaciones matemáticas del grado de linealidad.

El rango especificado normalmente se deriva de estudios de linealidad y depende de la aplicación prevista del procedimiento. Se establece al confirmar que el procedimiento analítico proporciona un grado aceptable de linealidad y precisión cuando se aplica a muestras que contienen cantidades de analito dentro o en el extremo del rango especificado del procedimiento analítico.

Para el establecimiento de la linealidad se recomienda un mínimo de 5 concentraciones.

3.7.3 Precisión

Expresa el grado de concordancia entre una serie de mediciones individuales obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea original o bien a partir de varias muestras obtenidas por dilución de la muestra bajo condiciones establecidas. Existen dos formas comunes de determinación:

- **Repetibilidad:** Los analistas deben evaluar el método analítico midiendo las concentraciones de seis estándares separados al 100% de la concentración de la prueba de ensayo. Alternativamente, pueden medir las concentraciones de tres réplicas de tres muestras a diferentes concentraciones. Las tres concentraciones deben estar lo suficientemente cerca para que la repetibilidad sea constante en todo el rango de concentración. En este caso, la repetibilidad en las tres concentraciones se combina para compararla con los criterios de aceptación.

Criterios de aceptación: la desviación estándar relativa es no más de 2,0 % para el producto farmacológico ensayo.

- **Precisión intermedia:** los analistas deben establecer el efecto de los eventos aleatorios en la precisión analítica del método. Las variables típicas incluyen realizar el análisis en diferentes días, usar diferentes instrumentos o tener dos o más analistas. Realizar el método debe tener como mínimo, cualquier combinación de al menos dos de estos factores que totalicen seis experimentos. Esto proporcionará una estimación de precisión intermedia.

La precisión de un procedimiento analítico se expresa generalmente como la varianza, la desviación estándar o el coeficiente de variación de una serie de mediciones. La precisión de un procedimiento analítico se determina mediante el análisis de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea que permita calcular estadísticamente estimaciones validas de la desviación estándar relativa (coeficiente de variación). Los análisis en este contexto son análisis independientes de muestras que se han llevado a cabo mediante el procedimiento analítico completo, desde la preparación de las muestras hasta el resultado final de las pruebas. (2)

3.7.4 Especificidad

Capacidad de evaluar, medir e identificar simultánea o separadamente, los analitos de interés de forma inequívoca sin interferencias de impurezas, productos de degradación, compuestos relacionados, excipientes u otras sustancias previsibles presentes en la matriz de la muestra. (7) Los documentos de ICH afirman que cuando se utilizan procedimientos Cromatográficos, deberán presentarse cromatogramas representativos para demostrar el grado de selectividad y los picos deberán identificarse adecuadamente. Las pruebas de pureza de picos (por ejemplo, utilizando arreglo de diodos o espectrometría de masas) pueden resultar útiles para demostrar que el pico Cromatográficos del analito no puede atribuirse a más de un solo componente.

3.8 Documentación de la Validación (13)

Toda validación comienza a partir de un método ya aprobado, La validación es el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos. Dicha evidencia documental debe ser siempre documentada de acuerdo a lo siguiente:

3.8.1 Protocolo de Validación

El protocolo de validación debe contener información sobre los objetivos previstos del procedimiento analítico y los parámetros de desempeño y sus criterios de aceptación. El protocolo de validación es específico para cada método el cual a su vez es específico para cada producto. Consta de las siguientes partes:

- El encabezado que contiene el número de validación, número de página, logo de la empresa y el nombre del método analítico para el producto que fue validado.
- Título
- Objetivos
- Alcance
- Descripción del equipo de validación (miembros, responsabilidades)
- Parámetros a evaluar y resumen de las características
- Información general sobre reactivos usados, materiales, equipos, muestras, placebo, etc.
- Condiciones de trabajo
- Descripción paso a paso de la realización de la validación
- Anexos

3.8.2 Informe de validación

Los resultados del estudio de validación deben resumirse en un informe de validación. En este se evalúan los resultados obtenidos contra los criterios de aceptación de cada parámetro. Al igual que las conclusiones y la aceptación del método analítico. Incluye las siguientes partes:

- Título de la Validación
- Resultados obtenidos
- Análisis de los resultados
- Comparación de resultados contra criterios de aceptación
- Observaciones
- Conclusiones
- Dictamen
- Anexos

3.8.3 Certificado de Validación

Es el documento final, una vez realizada la validación obteniendo resultados conformes, su documentación finalizada, se procede a realizar el certificado, plasmándolos resultados obtenidos en cada parámetro. Este documento es la aprobación final, firmado por las personas a las que les corresponde. Consta de:

- Un resumen del protocolo
- Nombres de los responsables
- Resumen de los resultados obtenidos
- Conclusiones
- Dictamen

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLÓGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de Estudio

- **Estudio Experimental:** Se realizó la validación del método analítico del contenido de Citicolina Base que se utiliza en las formas farmacéuticas sólidas comercializadas en el Área Metropolitana de San Salvador, llevándose a cabo el análisis de 20 comprimidos recubiertos de Citicolina Sódica, de un mismo lote (0612422) en las instalaciones de un Laboratorio Nacional Privado.

- **Estudio Descriptivo:** Se detalla el procedimiento para realizar la validación por medio de la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia.

4.2 Investigación Bibliográfica

Se realizó en las siguientes bibliotecas:

- Dr. Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Central de la Universidad de El Salvador (UES).
- Farmacopea de Los Estados Unidos de América (USP)
- Internet

4.3 Ámbito de aplicación

Metodología analítica de Citicolina (Como Citicolina Sódica)

Muestra: Formas farmacéuticas sólidas recubiertas con el principio activo de Citicolina comercializadas en El Salvador.

Cantidad de muestra: La presentación del producto es de una caja por 10 comprimidos En total se utilizaron dos cajas, es decir, 20 comprimidos.

Los parámetros de linealidad del sistema, linealidad del método y preparación de estándares, se realizaron con un estándar secundario.

Datos de Estandar Secundario

Nombre: Citicolina Sódica

Lote 200230061021

Fecha de Vencimiento: 01/09/2025

% pureza:

% Humedad:

Los parámetros de precisión, precisión intermedia y especificidad, se realizaron con la cantidad de muestra ya declarada.

Datos de la muestra:

Nombre: Citicolina 500mg (como Citicolina Sódica) Comprimidos Recubiertos

Lote: 0612422

Vence: 06/2024

4.4 Parte experimental

Para la realización de la validación del método analítico que identifica y cuantifica Citicolina (como Citicolina Sódica) en tabletas recubiertas, se elaboró un protocolo de validación (Ver ANEXO N°1 y protocolo de validación en el capítulo V. resultados y discusión de resultados) en el cual se detalla lo resultados y discusión de resultados, este contiene los objetivos, equipo de validación, es decir, los miembros, sus roles y responsabilidades, los parámetros evaluados, resumen de las características del estándar y el producto terminado, al igual que la información general de los equipos utilizados, materiales, reactivos, datos sobre el estándar (lote, pureza, etc.), de muestra y placebo, la preparación de reactivos, las condiciones cromatográficas a las que se trabajaron, la descripción de la validación y los parámetros que se evaluaron, juntos con los criterios de aceptación de cada uno, sus fórmulas y finalmente la bibliografía utilizada.

El proceso para realizar la validación del método analítico para identificar y cuantificar Citicolina (como Citicolina Sódica) en tabletas recubiertas se realizó con la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia, utilizando un equipo MERCK HITACHI modelo CHROMASTER por el primer analista y un MERCK HITACHI modelo PRIMAIDE para el segundo analista, la columna utilizada

fue una Bondapack C18 300 mm x 3.9 mm (10 μ m) (ver ANEXO N°5) a una temperatura de 25°C, flujo de 1.0mL/min, longitud de onda de 210nm, volumen de inyección: 10 μ L, diluyente: agua purificada. Toda la cristalería, balanzas, y equipos, utilizada cuenta con su calibración y certificación y reactivos de calidad HPLC.

Como parte del paso final de una validación, se elaboró el informe, conteniendo los resultados obtenidos para cada parámetro evaluado, sus criterios de aceptación y su respectivo dictamen, conclusiones y recomendación, emitiendo un dictamen final para todo el proceso del desarrollo de la validación del método analítico.

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

En este capítulo se detalla el desarrollo, análisis y resultados de cada parámetro de desempeño evaluado para la validación de método analítico para la identificación y cuantificación de Citicolina (como Citicolina Sódica) en tabletas recubiertas por cromatografía líquida de alta eficiencia.

5.1 Elaboración de Protocolo para la validación de Citicolina (como Citicolina Sódica) en tabletas recubiertas por Cromatografía líquida de alta eficiencia.

El protocolo contiene la información necesaria y detalla sobre el procedimiento de la validación para un método y producto específico, además, de los cálculos y criterios de aceptación para cada parámetro aplicable al producto objeto de estudio y la bibliografía utilizada para su redacción.

A continuación, se presenta el protocolo elaborado para la validación de método analítico para la identificación y cuantificación de Citicolina (como citicolina sódica) en tabletas recubiertas de 500 mg por cromatografía líquida de alta eficiencia.

LOGO	PROTOCOLO DE VALIDACION DEL METODO ANALITICO	PÁGINA
VALIDACIÓN N°: 01		1 DE
Identificación y ensayo para Citicolina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)		

1. Objetivo:

Comprobar mediante cálculos estadísticos que el método analítico utilizado para la identificación y ensayo del principio activo Citicolina en el producto de Comprimidos Recubiertos de 500mg utilizando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) es confiable y reúne las capacidades de desempeño necesarias para cumplir con la aplicación propuesta de acuerdo con los requisitos analíticos establecidos.

2. Alcance:

Aplica para la identificación y ensayo, para el principio activo de Citicolina en el producto terminado de Comprimidos Recubiertos de 500mg.

3. Equipo validación: miembros, roles y responsabilidades

Analista de Desarrollo y Validación de Métodos Analíticos es el encargado de la elaboración de protocolos, de la ejecución del análisis, revisión de resultados y discusión de resultados.

Coordinador de Desarrollo y Validación Métodos Analíticos es el encargado de la revisión del protocolo, revisión de resultados y discusión de resultados.

Líder de Investigación y Desarrollo es el encargado de la aprobación del protocolo y de la validación, metodológica.

LOGO	PROTOCOLO DE VALIDACION DEL METODO ANALITICO	PÁGINA
VALIDACIÓN N°: 01		1 DE
Identificación y ensayo para Citicolina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)		

4. Parámetros a evaluar:

Especificidad, Adecuabilidad del sistema, Linealidad de sistema, Linealidad de método-exactitud, Precisión (Repetibilidad intermedia), Estabilidad analítica de la muestra

5. Resumen de las características:

Cuadro N°1. Características de estándar y producto terminado

Nombre del Estándar Secundario	Formula molecular	Peso Molecular	Descripción
Citicolina Sódica	$C_{14}H_{27}N_4NaO_{11}P_2$	510.31 g/mol	Polvo cristalino blanco.
Nombre de Producto Terminado	Fórmula molecular	Peso Molecular	Descripción
Comprimido recubierto (con recubierta de película) (citicolina 500mg)	$C_{14}H_{26}N_4O_{11}P_2$	488.32 /mol	Comprimido recubierto de color blanco oblongo, biconvexo, con ranura central en ambas caras.

LOGO	PROTOCOLO DE VALIDACION DEL METODO ANALITICO	PÁGINA
VALIDACIÓN N°: 01		1 DE
Identificación y ensayo para Citicolina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)		

6. Información general:

Cuadro N° 2. Información de los equipos a utilizar

Equipo	Código Interno	Descripción	N° Reporte/Certificado	Fecha de Calib./Calific
Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia	EID-030 (HPLC-10)	Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución: Modelo CHROMASTER, Marca: MERCK HITACHI (ver anexo 19)	4963-0822	26-08-2022
Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia	ECC-069 (HPLC-07)	Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución Modelo PRIMAIDE Marca: MERCK HITACHI.	4961-0822	26-08-2022
Balanza analítica	BAL-013	Balanza analítica electrónica: Marca: METTLER TOLEDO, Modelo: MS105DU.	IPP04220429 MT	29-04-2022
pH metro	EID-011	pH Metro: Modelo FE20/EL20, Marca METTLER TOLEDO.	QUI0121121 5RD	15-12-2021
Bomba de vacío	EID-029	Bomba de vacío: Marca GAST, Modelo DOA-P704-AA	N/A	N/A
Agitador Ultrasonido	ECC- 086	Marca: BRANSON. Modelo M8800H,	N/A	N/A
Estufa	ECC-127	Marca: LAB COMPANION Modelo: ON-11E Serie: Z065268	MIT0221070 9RR	14-07-2021

LOGO	PROTOCOLO DE VALIDACION DEL METODO ANALITICO	PÁGINA
VALIDACIÓN N°: 01		1 DE
Identificación y ensayo para Citicolina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)		

7. Materiales:

Cuadro N°3. Información de los materiales a utilizar

Descripción	Cantidades
Micro espátula	1
Balones volumétricos de 1000.0mL	1
Balones volumétricos de 200.0mL	1
Balones volumétricos de 50.0 mL	22
Balones volumétricos de 25.0 mL	22
Balones volumétricos de 20 mL	6
Balones volumétricos de 10 mL	7
Capsula de porcelana	2
Pipetas volumétricas de 1.0 mL	3
Pipetas volumétricas de 3.0 mL	1
Pipetas volumétricas de 5.0 mL	3
Pipetas volumétricas de 15.0 mL	1
Beaker graduado de 100 mL	2
Beaker graduado de 50 mL	2
Probeta graduada de capacidad de 1000 mL	1
Probeta graduada de capacidad de 500 mL	1
Agitador de vidrio	1
Jeringas descartables de 10 mL	3
Filtro jeringa de nylon de 0.45 um	20
Reservorios de HPLC	5
Kit de filtración	1
Filtro de membrana de 0.45 um	6
Tapones de viales HPLC	43
Viales de HPLC	43
Septum	43

LOGO	PROTOCOLO DE VALIDACION DEL METODO ANALITICO	PÁGINA
VALIDACIÓN N°: 01		1 DE
Identificación y ensayo para Citicolina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)		

8. Reactivos:

Cuadro N°4. Información de los reactivos a utilizar

Reactivo	Código	Marca	Cas
Fosfato de Potasio Monobásico (KH ₂ PO ₄)	0101730	Merck	7778-77-0
Hidróxido de Sodio (NaOH)	7100981	Merck	1310-73-2
Acetonitrilo grado HPLC (CH ₃ CN)	7100231	J. T Beaker	75-05-8
Metanol HPLC (CH ₃ OH)	7100035	J. T Beaker	67-56-1
Agua Destilada (H ₂ O)	VAPI-03	N/A	N/A

9. Estándares, muestra y placebo:

Cuadro 5. Información de los estándares, muestras y placebo a utilizar

Nombre	Descripción	Lote	Potencia	Vence
Citicolina Sódica	Estándar secundario	200230061021	99.8%	01/09/25
Comprimidos Recubiertos 500mg	Producto terminado	0612422	N/A	06/2024
Placebo de Comprimidos Recubiertos 500mg	Excipientes	IP-020522	N/A	02/05/2024

LOGO	PROTOCOLO DE VALIDACION DEL METODO ANALITICO	PÁGINA
VALIDACIÓN N°: 01		1 DE
Identificación y ensayo para Citicolina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)		

10. Preparación de reactivos:

- Solución Buffer Fosfato pH 7.0:

Pese 3.40 g de Fosfato de potasio monobásico en un beaker de 50 mL de capacidad, transfiera cuantitativamente a un balón aforado de 1000 mL de capacidad con ayuda de 500 mL de agua purificada y disuelva sobre plancha de agitación con ayuda de un agitador magnético. Ajuste el pH a 7.0 (± 0.1) con Hidróxido de sodio al 50% lleve a volumen con agua purificada y mezcle. Filtre por membrana de 0.45 μm y desgasificar en ultrasonido por 5 minutos.

- Hidróxido de sodio al 50%:

Pese 25.0 g de hidróxido de Sodio en beaker de 100 mL, agregar 50 mL de agua purificada y disuelva sobre la plancha de agitación con ayuda de un agitador magnético.

- **Fase Móvil:** Solución Buffer Fosfato pH 7.0: 100%. Filtrar por membrana de nylon de 0.45 μm . Almacenar en reservorio para fase móvil, identificar y ultrasonificar por cinco (5) minutos.

11. Condiciones de trabajo

11.1 Condiciones Cromatográficas

Aparato:	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia (HPLC)
Detector:	Ultravioleta
Longitud de onda:	210 nm
Columna:	Bondapack C18 (300 mm x 3.9 mm) * (10 μm)

LOGO	PROTOCOLO DE VALIDACION DEL METODO ANALITICO	PÁGINA
VALIDACIÓN N°: 01		1 DE
Identificación y ensayo para Citicolina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)		

Pre-Columna:	No aplica
Temperatura:	<u>25 °C</u>
Flujo fase móvil:	1.0 mL/ min
Volumen a inyectar:	10 µL
Tiempo de retención	± 3.5 minutos
Tiempo de estabilización:	60 minutos, o el tiempo necesario para que cumpla prueba de ruido
Tiempo de corrida:	10 minutos
Platos teóricos	N>2000
Asimetría	<2.0
Porcentaje de coeficiente de variación	%CV ≤ 2.0 %

Nota: Los parámetros de Adecuabilidad del sistema: Numero de Platos teóricos (N), Asimetría (Asym) y % de Coeficiente de Variación (CV), se tomarán de las cinco (5) inyecciones consecutivas del estándar secundario a la concentración de trabajo.

11.2 Condiciones de la estufa:

Tiempo:	1 hora
Temperatura:	105°C

LOGO	PROTOCOLO DE VALIDACION DEL METODO ANALITICO	PÁGINA
VALIDACIÓN N°: 01		1 DE
Identificación y ensayo para Citicolina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)		

12 DESCRIPCIÓN DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

12.1 Parámetro de Validación: ESPECIFICIDAD

12.1.1 Metodología

Consiste en preparar las siguientes soluciones sin/con degradación y consiste en realizar dos (2) preparaciones e inyectar dos (2) inyecciones consecutivas de cada preparación. Ver siguiente cuadro N°6. Ver **ANEXO 4**. Cascada de diluciones de los parámetros de validación

Cuadro N° 6. Numero de preparaciones e inyecciones por cada muestra en la especificidad

N°		N° de preparaciones	N° Inyecciones
1	Fase móvil	1	1
2	Solvente	1	1
3	Placebo Comprimidos Recubiertos 500mg (mezcla de excipientes) (sin degradar)	2	2
4	Placebo Comprimidos Recubiertos 500mg (mezcla de excipientes) con degradación térmica	2	2
5	Placebo Comprimidos Recubiertos 500mg (mezcla de excipientes) con degradación oxidativa	2	2
6	Producto Comprimidos Recubiertos 500mg (sin degradar)	2	2
7	Producto Comprimidos Recubiertos 500mg (con degradación térmica)	2	2
8	Producto Comprimidos Recubiertos 500mg (con degradación oxidativa)	2	2

LOGO	PROTOCOLO DE VALIDACION DEL METODO ANALITICO	PÁGINA 1 DE
VALIDACIÓN N°: 01		
Identificación y ensayo para Citicolina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)		

Criterios de aceptación:

- Respuesta del método únicamente debida al analito (ausencia de cualquier interferente).
- Resolución: ≥ 1.5 con respecto a los interferentes.

12.1.2 DESARROLLO DEL ENSAYO:

- Preparación de solución placebo al 100.0%: Sin degradar

Pesar el equivalente a 73.5 mg de placebo equivalente a 250.0 mg de Citicolina y transferir cuantitativamente a un balón volumétrico aforado de 50.0mL con ayuda de 20 mL de agua purificada. Coloque en el ultrasonido durante 15 minutos a temperatura ambiente hasta disolución completa, luego lleve a volumen con agua purificada y mezcle. Mida una alícuota de 1.0 mL de la solución anterior, transfiera a un balón aforado de 25.0 mL, y luego lleve a volumen con agua purificada y mezcle. **Filtre a través de filtro jeringa 0.45 micras a viales e inyecte en el equipo HPLC. **Concentración final de Citicolina sódica: 0.21mg/mL. Concentración final de Citicolina: 0.20mg/mL (**Realizar este procedimiento por duplicado).

- Preparación de solución placebo al 100.0%: Degradación térmica

Pese un aproximado de 147.0 mg de polvo de placebo de citicolina sódica 500 mg comprimidos Recubiertos y colóquelo en capsula de porcelana, y someter a 105 °C durante 1 hora en estufa y dejar enfriar. Luego **Pesar 73.5 mg de placebo equivalente a 250.0 mg de Citicolina y transferir cuantitativamente a un balón volumétrico aforado de 50.0mL con ayuda de 20 mL de agua purificada. Coloque en el ultrasonido durante 15 minutos a temperatura ambiente hasta disolución completa, luego lleve a volumen con agua purificada y mezcle. Mida a una alícuota de 1.0 mL de la solución anterior, transferencia a un balón aforado de 25.0 mL, y luego lleve a volumen con agua purificada y mezcle. **Filtre a través de filtro 0.45 micras a viales e inyecte en el equipo HPLC.

LOGO	PROTOCOLO DE VALIDACION DEL METODO ANALITICO	PÁGINA
VALIDACIÓN N°: 01		1 DE
Identificación y ensayo para Citicolina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)		

Concentración final de Citicolina sódica: 0.21mg/mL. Concentración final de Citicolina: 0.20mg/mL (**Realizar este procedimiento por duplicado).

- Preparación de solución placebo al 100.0%: Degradación oxidativa

Pesar el equivalente a 73.5 mg de placebo equivalente a 250.0 mg de Citicolina y transferir cuantitativamente a un balón volumétrico aforado de 50.0mL con ayuda de 20 mL de agua purificada. Coloque en el ultrasonido durante 15 minutos a temperatura ambiente hasta disolución completa, **adicionar 7 mL de Peróxido de Hidrogeno al 3% luego lleve a volumen con agua purificada y mezcle. Mida a una alícuota de 1.0 mL de la solución anterior, transferencia a un balón aforado de 25.0 mL, y luego lleve a volumen con agua purificada y mezcle. **Filtre a través de filtro 0.45 micras a viales e inyecte en el equipo HPLC. **Concentración final de Citicolina sódica: 0.21mg/mL. Concentración final de Citicolina: 0.20mg/mL** (**Realizar este procedimiento por duplicado).

- Preparación de solución muestra de producto al 100.0%: Sin degradar

Pesar 10 comprimidos individualmente y determine el peso promedio, luego colóquelos en un mortero y triture hasta polvo fino con ayuda de un pistilo, pese exactamente alrededor de medio peso promedio (equivalente a 250.00 mg de Citicolina, y transfiera cuantitativamente a un balón aforado de 50.0mL con ayuda de 20 mL de agua purificada. Coloque en el ultrasonido durante 15 minutos a temperatura ambiente hasta disolución completa, luego lleve a volumen con agua purificada y mezcle. Mida a una alícuota de 1.0 mL de la solución anterior, transferencia a un balón aforado de 25.0 mL, y luego lleve a volumen con agua purificada y mezcle. **Filtre a través de filtro 0.45 micras a viales e inyecte en el equipo HPLC. ****nota: Filtro jeringa de nylon de 0.45 micras. Concentración final de Citicolina sódica: 0.21mg/mL. Concentración final de Citicolina: 0.20mg/mL.** (**Realizar este procedimiento por duplicado).

LOGO	PROTOCOLO DE VALIDACION DEL METODO ANALITICO	PÁGINA
VALIDACIÓN N°: 01		1 DE
Identificación y ensayo para Citicolina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)		

- Preparación de solución muestra de producto al 100.0%: Degradación térmica

Pesar 10 comprimidos individualmente, determine el peso promedio, colóquelos en capsula de porcelana, y someter a 105 °C durante 1 hora en estufa y dejar enfriar.

Luego colóquelos en un mortero y triture hasta polvo fino con ayuda de un pistilo, pese exactamente alrededor de medio peso promedio equivalente a 250.00 mg de Citicolina, y transfiera cuantitativamente a un balón aforado de 50.0mL con ayuda de 20 mL de agua purificada. Coloque en el ultrasonido durante 15 minutos a temperatura ambiente hasta disolución completa, luego lleve a volumen con agua purificada y mezcle. Mida a una alícuota de 1.0 mL de la solución anterior, transferencia a un balón aforado de 25.0 mL, y luego lleve a volumen con agua purificada y mezcle. ****Filtre a través de filtro 0.45 micras a viales e inyecte en el equipo HPLC. Concentración final de Citicolina sódica: 0.21mg/mL. Concentración final de Citicolina: 0.20mg/mL. (**Realizar este procedimiento por duplicado).**

- Preparación de solución muestra de producto al 100.0%: Degradación oxidativa

Pesar 10 comprimidos individualmente y determine el peso promedio, luego colóquelos en un mortero y triture hasta polvo fino con ayuda de un pistilo, pese exactamente alrededor de medio peso promedio (equivalente a 250.00 mg de Citicolina, y transfiera cuantitativamente a un balón aforado de 50.0mL con ayuda de 20 mL de agua purificada. Coloque en el ultrasonido durante 15 minutos a temperatura ambiente hasta disolución completa, **adicionar 7 mL de Peróxido de Hidrogeno al 3%**, luego lleve a volumen con agua purificada y mezcle. Mida a una alícuota de 1.0 mL de la solución anterior, transferencia a un balón aforado de 25.0 mL, y luego lleve a volumen con agua purificada y mezcle. ****Filtre a través de filtro 0.45 micras a viales e inyecte en el equipo HPLC. Concentración final de Citicolina sódica: 0.21mg/mL. Concentración final de Citicolina: 0.20mg/mL. (**Realizar este procedimiento por duplicado).**

LOGO	PROTOCOLO DE VALIDACION DEL METODO ANALITICO	PÁGINA
VALIDACIÓN N°: 01		1 DE
Identificación y ensayo para Citicolina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)		

12.2 Parámetro de Validación: ADECUABILIDAD

12.2.1 Metodología

Realizar dos (2) preparaciones independientes de estándares secundarios a la concentración de trabajo y realizar cinco (5) inyecciones de cada uno.

Criterio de aceptación: Porcentaje de Coeficiente de Variación (% CV) de las cinco (5) inyecciones debe ser menor o igual que 2.0% [$\%CV \leq 2.0\%$]. Porcentaje de comprobación de estándares (%) debe ser entre 98.00%-102.00%. [98.00%-102.00%]. Numero de platos teóricos mayor a 1000 [$N > 1000$], Asimetría (T) menor o igual 2.0 [≤ 2.0], Factor de capacidad mayor a 2 [$K' > 2$], y Resolución: ≥ 1.5 .

12.2.2 Modelo de cálculo:

- Determinación del promedio
- Determinación de la desviación estándar
- Determinación del porcentaje de coeficiente de variación
- Determinación de la resolución
- Determinación de numero de platos teóricos
- Determinación de numero de platos teóricos
- Determinación de asimetría
- Determinación de la comprobación de estándares:

Nota: ver formulas en el ANEXO N° 2

LOGO	PROTOCOLO DE VALIDACION DEL METODO ANALITICO	PÁGINA
VALIDACIÓN N°: 01		1 DE
Identificación y ensayo para Citicolina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)		

12.2.3 Desarrollo del ensayo:

Solución estándar secundario al 100.0%: Pese exactamente alrededor de 21.00 mg de Citicolina sódica (estándar secundario) equivalentes a 20.09 mg de Citicolina y transfiera cuantitativamente a un balón aforado de 50.0 mL, con ayuda de 10 mL de agua purificada, coloque en ultrasonido durante 5 minutos a temperatura ambiente hasta disolución completa, lleve a volumen con agua purificada y mezcle. Mida una alícuota de 5.0 mL con ayuda de una pipeta volumétrica y transfiera a un balón aforado de 10.0 mL, lleve a volumen con agua purificada y mezcle. ****Filtre a través de filtro 0.45 micras a viales e inyecte en el equipo HPLC. Concentración final de Citicolina sódica: 0.21mg/mL. Concentración final de Citicolina: 0.20mg/mL. Ver ANEXO 4.** Cascada de diluciones de los parámetros de validación

12.3 Parámetro de Validación: LINEALIDAD DE SISTEMA

12.3.1 Metodología

Consiste en realizar mediciones por triplicado (3) de cinco (5) soluciones de estándares secundarios de Citicolina sódica a los niveles de 50.0%, 80.0%, 100.0%, 120.0%, y 150% de concentración en base al valor declarado.

Criterio de aceptación: El coeficiente correlación debe ser mayor que 0.995. [$r > 0.995$]. Coeficiente de determinación debe ser mayor o igual a 0.98 [$r^2 \geq 0.98$]. El intervalo de confianza para la pendiente no incluye cero. [IC(b)=No incluye cero]

11.1.1 Modelo de cálculo:

En la práctica, los cálculos relacionados con análisis de regresión, mínimos cuadrados, pendiente e intercepto, coeficiente de correlación, coeficiente de determinación, análisis de residuos e intervalo de confianza de la pendiente, se efectúan por medio de programas de Excel.

LOGO	PROTOCOLO DE VALIDACION DEL METODO ANALITICO	PÁGINA
VALIDACIÓN N°: 01		1 DE
Identificación y ensayo para Citicolina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)		

- **Determinación de la concentración real de las soluciones estándares de referencia correspondiente a cada nivel** (ver formula en el ANEXO N°2)

11.1.2 Desarrollo del ensayo:

- **Preparación de solución stock de estándar secundario:**

Stock 1: Pesar 84.00 mg de Citicolina Sódica (**estándar secundario**), transferir a un balón volumétrico de 200.0 mL, con ayuda de 10 mL de agua purificada, coloque en ultrasonido durante 5 minutos a temperatura ambiente hasta disolución completa, aforar con agua purificada y homogenizar. **Concentración final: 420.00 µg/mL de Citicolina Sódica**

- **Preparaciones de soluciones:**

Preparar las siguientes soluciones a los niveles de 50.0%, 80.0%, 100.0%, 120.0% y 150.0% tomando las respectivas alícuotas por triplicado de la **solución stock de estándar secundario de Citicolina Sódica** según la siguiente tabla N°2, transfiriendo cada alícuota de la solución stock de Citicolina Sódica al balón volumétrico N°2 que corresponde, aforar con diluyente, y homogenizar. Filtrar a través de filtros de jeringa de nylon de 0.45 µm y transferir a viales HPLC.

Ver **ANEXO 4**. Cascada de diluciones de los parametros de validación

LOGO	PROTOCOLO DE VALIDACION DEL METODO ANALITICO	PÁGINA
VALIDACIÓN N°: 01		1 DE
Identificación y ensayo para Citicolina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)		

Tabla N°2. Preparación de soluciones para linealidad del sistema

Citicolina Sódica					
Niveles	Solución	Alícuota N°1* Triplicado	Balón volumétrico N°2	Conc. final: (µg/mL) Citicolina Sódica	N° de Determinaciones
(%)	Stock: (µg/mL) Citicolina Sódica		(aforo: solvente)		
50.0%	Stock 1 420.00	5.0 mL	20.0 mL	105.000	3
80.0%		10.0 mL	25.0 mL	168.000	3
100.0%		5.0 mL	10.0 mL	210.000	3
120.0%		15.0 mL	25.0 mL	252.000	3
150.0%		15.0 mL	20.0 mL	315.000	3

11.2 Parámetro de Validación: LINEALIDAD DE MÉTODO-EXACTITUD

11.2.1 Metodología

Preparar las siguientes soluciones independiente a los niveles 50.0%, 100.0%, y 150.0% (realizar determinaciones por triplicado (3)) para cada nivel apartir de solución stock 1 con principio activo de Citicolina Sódica.

Criterio de aceptación:

- **Linealidad:** El Coeficiente de determinación debe ser mayor o igual a 0.98 [$r^2 \geq 0.98$]. El Intervalo de confianza para intercepto, incluye la unidad. [IC(a): Incluye la unidad]. Nota: Efectuar mediante programas de Excel.

LOGO	PROTOCOLO DE VALIDACION DEL METODO	PÁGINA
VALIDACIÓN N°: 01	ANALITICO	1 DE
Identificación y ensayo para Citicolina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)		

- **Exactitud:** El Porcentaje de recuperación debe estar comprendido entre el 98.0% y el 102.0%. $\text{Recup} = [98.0\% - 102.0\%]$. El porcentaje del coeficiente variación debe ser menor o igual al 2.0%. $[\%CV \leq 2.0\%]$. Nota: Efectuar mediante programas de Excel.

11.2.2 Modelo de cálculo:

En la práctica, los cálculos relacionados con análisis de regresión, mínimos cuadrados, pendiente e intercepto, coeficiente de correlación, coeficiente de determinación, análisis de residuos e intervalo de confianza de la pendiente, se efectúan por medio de programas de Excel.

- Determinar la concentración real de las soluciones estándares de referencia correspondiente a cada nivel, mediante a siguiente fórmula
- Determinar los microgramos por mililitros adicionados ($\mu\text{g/mL}$) correspondiente a cada nivel en Linealidad del Método
- Determinar los microgramos recuperados correspondiente a cada nivel en Linealidad del Método

Nota: ver formulas en el ANEXO N° 2

11.2.3 Desarrollo del ensayo:

- **Solución stock 1 de placebo adicionado cargado con el principio activo:**

Pesar 250.00 mg Citicolina sódica (estándar secundario) y 73.5 mg de placebo del producto de comprimidos recubiertos 500mg, transferir cuidadosamente a balón volumétrico de 50.0 mL, con ayuda de 20 mL de agua purificada, coloque en ultrasonido durante 5 minutos a temperatura ambiente hasta disolución completa, aforar con solvente y homogenizar. **Concentración final: 5000.00 $\mu\text{g/mL}$ Citicolina sódica**

LOGO	PROTOCOLO DE VALIDACION DEL METODO ANALITICO	PÁGINA
VALIDACIÓN N°: 01		1 DE
Identificación y ensayo para Citicolina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)		

- **Soluciones de placebo adicionado con principio activo:**

Preparar las siguientes soluciones de placebo cargado con principio activo a los niveles 50.0%, y 100.0%, 150.0% tomando las respectivas alícuotas por triplicado de la **Solución stock 1 de placebo adicionado de Citicolina, Concentración final: 5000.00 µg/mL Citicolina sódica**, según la siguiente tabla N°2, transfiriendo cada alícuota a los balones volumétricos correspondientes, aforar con agua purificada y homogenizar. Filtrar a través de filtros de jeringa de nylon de 0.45 µm y transferir a viales HPLC. Ver **ANEXO 4**. Cascada de diluciones de los parametros de validación.

Tabla N°3. Preparación de soluciones para linealidad del Método

Niveles (%)	Solución stock	Alícuota N°1 Triplicado	Balón volumétrico N°2 aforo: agua purificada	Conc. final: (µg/mL)	N° de Determinaciones
50.0%	Stock 1	1.0 mL	50.0 mL	100	3
100.0%	[5000.0 µg/mL]	1.0 mL	25.0 mL	200	3
150.0%		3.0 mL	50.0 mL	300	3

11.3 Parámetro de Validación: PRECISIÓN (REPETIBILIDAD E INTERMEDIA)

11.3.1 Metodología

- **Repetibilidad:** Preparar seis (6) análisis completos de una muestra homogénea a nivel del 100.0% de la concentración de trabajo, y realizar una (1) inyecciones de cada muestra. Dos (2) análisis completos de estándares secundarios al 100% y realizar cinco (5) inyecciones de cada uno. (Analista N°1 y N°2), y realizar cinco (5) inyecciones de cada estándar.
- **Intermedia:** Un segundo analista procede a repetir el análisis de repetibilidad en un día diferente

LOGO	PROTOCOLO DE VALIDACION DEL METODO ANALITICO	PÁGINA
VALIDACIÓN N°: 01		1 DE
Identificación y ensayo para Citalina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)		

utilizando diferentes instrumentos. Los resultados obtenidos se comparan con obtenidos del primer analista.

Criterio de aceptación:

- **Repetibilidad:** El valor del Porcentaje de Coeficiente de Variación (%CV) de los resultados de las seis (6) determinaciones. debe ser menor o igual que 2.0% [%CV ≤ 2.0%]. (Analista N°1). Ensayo
- **Intermedia:** El valor del Porcentaje de Coeficiente de Variación (%CV) de los resultados obtenidos, debe ser menor o igual que 4.0% [%CV ≤ 4.0%]-*Nota: Efectuar mediante programas de Excel.* (Analista N°1 y N°2).

11.3.2 Modelo de cálculo:

- Determinar el porcentaje de comprobación de los estándares
- Determinar la concentración real en microgramos por mililitros (µg/mL) de los estándares secundarios:
- Determinar el porcentaje sobre lo rotulado del Ensayo para cada muestra
- Determinar el promedio, desviación, y porcentaje de coeficiente de variación (%CV) de las seis muestras

Nota: ver formulas en el ANEXO N° 2

LOGO	PROTOCOLO DE VALIDACION DEL METODO ANALITICO	PÁGINA
VALIDACIÓN N°: 01		1 DE
Identificación y ensayo para Citicolina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)		

11.3.3 Desarrollo del ensayo: ensayo

- Preparación estándares secundarios al 100.0%:

Pese exactamente alrededor de 21.00 mg de Citicolina sódica (estándar secundario) (equivalentes a 20.09 mg de Citicolina) y transfiera cuantitativamente a un balón aforado de 50.0 mL, con ayuda de 10 mL de agua purificada, coloque en ultrasonido durante 5 minutos a temperatura ambiente hasta disolución completa, lleve a volumen con agua purificada y mezcle. Mida una alícuota de 5.0 mL con ayuda de una pipeta volumétrica y transfiera a un balón aforado de 10.0 mL, lleve a volumen con agua purificada y mezcle. ****Filtre a través de filtro 0.45 micras a viales e inyecte en el equipo HPLC. Concentración final de Citicolina sódica: 0.21mg/mL. Concentración final de Citicolina: 0.20mg/mL.**

- Preparación muestra de producto al 100.0%:

Pesar 10 comprimidos individualmente y determine el peso promedio, luego colóquelos en un mortero y triture hasta polvo fino con ayuda de un pistilo, pese exactamente alrededor de medio peso promedio equivalente a 250.00 mg de Citicolina, y transfiera cuantitativamente a un balón aforado de 50.0mL con ayuda de 20 mL de agua purificada. Coloque en el ultrasonido durante 15 minutos a temperatura ambiente hasta disolución completa, luego lleve a volumen con agua purificada y mezcle. Mida a una alícuota de 1.0 mL de la solución anterior, transferencia a un balón aforado de 25.0 mL, y luego lleve a volumen con agua purificada y mezcle. ****Filtre a través de filtro 0.45 micras a viales e inyecte en el equipo HPLC. Concentración final de Citicolina sódica: 0.21mg/mL. Concentración final de Citicolina: 0.20mg/mL.** (**Realizar este procedimiento por duplicado).

Ver **ANEXO 4**. Cascada de diluciones de los parametros de validación

LOGO	PROTOCOLO DE VALIDACION DEL METODO ANALITICO	PÁGINA
VALIDACIÓN N°: 01		1 DE
Identificación y ensayo para Citicolina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)		

11.4 Parámetro de Validación: ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA

11.4.1 Metodología

Realizar esta prueba preparando seis (6) soluciones muestras al 100.0 % y tres (3) soluciones estándares de referencia, los que se deberán analizar de forma “DEPENDIENTES” el día de su preparación y 24 horas después de preparadas.

Cada solución muestra y estándar secundario almacenados deberá cuantificarse contra estándares preparados recientemente.

Criterio de aceptación: La diferencia absoluta de media aritmética para Cromatografía.
 $|d_i| \leq 2.0\%$.

11.4.2 Modelo de cálculo:

- Determinar el porcentaje de comprobación de estándares
- Determinar la concentración real en microgramos por mililitros ($\mu\text{g/mL}$) del estándar secundario
- Determinar el porcentaje sobre lo rotulado del Ensayo
- Determinación de la diferencia absoluta de la media aritmética de la condición de almacenaje con respecto a la condición inicial
- Determinación de la Media aritmética de condición de almacenaje
- Determinación de la Media aritmética de condición de inicial

Nota: ver formulas en el ANEXO N° 2

LOGO	PROTOCOLO DE VALIDACION DEL METODO ANALITICO	PÁGINA
VALIDACIÓN N°: 01		1 DE
Identificación y ensayo para Citicolina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)		

11.4.3 Desarrollo del ensayo:

- **Solución estándar secundario de Citicolina sódica al 100.0%:** Ver preparación en el parámetro de Precisión: Ensayo en numeral: 9.1.5.5 (Estándares preparados recientemente).

- **Preparación estándares secundarios al 100.0%: Someter a estabilidad inicial y almacenamiento por 24 horas**

** Pese exactamente alrededor de 21.00 mg de Citicolina sódica (estándar secundario) (equivalentes a 20.09 mg de Citicolina) y transfiera cuantitativamente a un balón aforado de 50.0 mL, con ayuda de 10 mL de agua purificada, coloque en ultrasonido durante 5 minutos a temperatura ambiente hasta disolución completa, lleve a volumen con agua purificada y mezcle. Mida una alícuota de 5.0 mL con ayuda de una pipeta volumétrica y transfiera a un balón aforado de 10.0 mL, lleve a volumen con agua purificada y mezcle. *Filtre a través de filtro 0.45 micras a viales e inyecte en el equipo HPLC. **Concentración final de Citicolina sódica: 0.21mg/mL. Concentración final de Citicolina: 0.20mg/mL. **Nota: Envíale por duplicado para proceder a almacenar a 24 horas.**

- **Preparación muestra de producto al 100.0%:**

Pesar 10 comprimidos individualmente y determine el peso promedio, luego colóquelos en un mortero y triture hasta polvo fino con ayuda de un pistilo, pese exactamente alrededor de medio peso promedio (equivalente a 250.00 mg de Citicolina, y transfiera cuantitativamente a un balón aforado de 50.0mL con ayuda de 20 mL de agua purificada. Coloque en el ultrasonido durante 15 minutos a temperatura ambiente hasta disolución completa, luego lleve a volumen con agua purificada y mezcle. Mida a una alícuota de 1.0 mL de la solución anterior, transferencia a un balón aforado de 25.0 mL, y luego lleve a volumen con agua purificada y mezcle. **Filtre a través de

LOGO	PROTOCOLO DE VALIDACION DEL METODO ANALITICO	PÁGINA
VALIDACIÓN N°: 01		1 DE
Identificación y ensayo para Citicolina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)		

filtro 0.45 micras a viales e inyecte en el equipo HPLC. Concentración final de Citicolina sódica: 0.21mg/mL. Concentración final de Citicolina: 0.20mg/mL. **Nota: Envíale por duplicado para proceder a almacenar a 24 horas.

- Condiciones de almacenamiento:

Almacenar los estándares y muestras a temperatura ambiente, protegidas, adentro de rack del equipo HPLC y una vez transcurridas las 24 horas proceder a realizar el análisis de las "soluciones muestra de producto terminado al 100.0% y estándares secundarios al 100.0% almacenadas", y evaluar contra estándares secundarios recientemente preparados.

Ver **ANEXO 4**. Cascada de diluciones de los parametros de validación

13.0 BIBLIOGRAFIA

Farmacopea de los Estados Unidos de América 43, Formulario Nacional 38.

Desarrollo interno

14.0 ANEXOS

Anexar las hojas de trabajo (Fase Móvil), las hojas de registro de cálculos y las hojas de recolección de datos de todas las pruebas ejecutadas en la validación.

5.2 Análisis de resultados obtenidos de la validación de la metodología analítica por Cromatografía líquida de alta eficiencia para identificar y cuantificar Citicolina.

La validación de la metodología por Cromatografía Líquida de Alta Resolución para Citicolina (como Citicolina Sódica) en tabletas 500 mg se realizó de acuerdo a lo descrito en protocolo de validación de metodología analítica. A continuación, se describen las pruebas realizadas:

5.2.1 Especificidad

Se prepararon soluciones de las muestras (producto terminado) y placebo sin/con degradación térmica y oxidativa, se realizaron dos (2) preparaciones e inyectaron dos (2) inyecciones consecutivas de cada preparación. (Ver **Anexo N°4** cascada de diluciones de los parámetros de validación)

Para la degradación térmica se sometieron las soluciones muestras y soluciones placebo a estufa por 1 a 105°C

La degradación oxidativa consistió en agregar 7 mL de Peróxido de Hidrógeno a las soluciones de muestra y placebo.

Tabla N° 4 Resultados de la prueba de Especificidad de las soluciones de muestra y placebo

Descripciones	N° de Inyecciones	% de la solución	Respuesta
Especificidad de la Solución Placebo al 100.0% Sin Degradar	1	100%	0
	2		0
	3		0
	4		0
Especificidad de la Solución Placebo al 100.0% Degradación Térmica	1	100%	0
	2		0
	3		0
	4		0
Especificidad de la Solución Placebo al 100.0% Degradación Oxidativa	1	100%	0
	2		0
	3		0
	4		0

Tabla N° 4 Resultados de la prueba de Especificidad de las soluciones de muestra y placebo (continuación)

Especificidad de la Solución de Producto al 100.0% Sin Degradar	1	100%	1303630
	2		1304030
	3		1303225
	4		1302526
Especificidad de la Solución Principio Activo al 100.0% Degradación Térmica	1	100%	1346198
	2		1341032
	3		1319319

En la Tabla N°4 se presentan los resultados de la prueba de Especificidad, con la que se pretendía determinar la capacidad del método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés.

Al analizar los resultados obtenidos de forma estadística y compararlos con el criterio de aceptación para este parámetro, se puede confirmar que el método de análisis es específico y selectivo para el principio activo en estudio y que no hubo señales que interfirieran en la identificación de este. Por lo tanto, el método es capaz de seleccionar y reconocer solo el pico de interés.

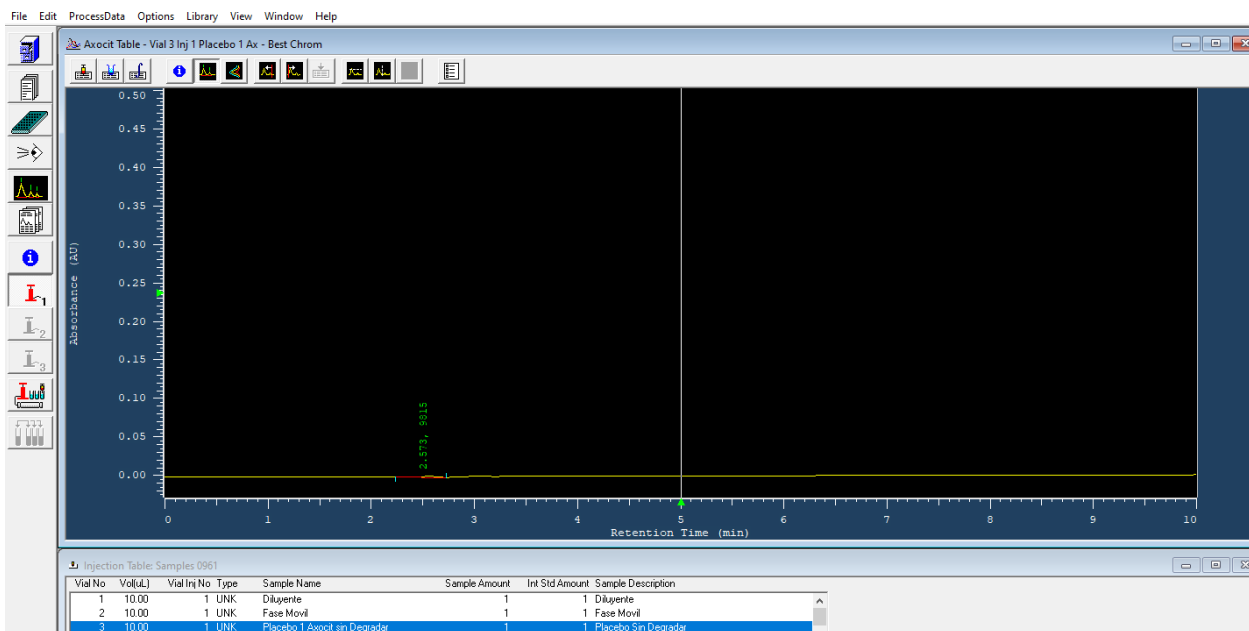


Figura N°2. Placebo de Producto sin degradar

Fuente: Elaboración Propia

5.2.2 Linealidad del Sistema

Se realizaron mediciones por triplicado (3) de cinco (5) soluciones de estándares secundarios de Citicolina sódica a los niveles de 50.0%,80.0%, 100.0%, 120.0%, y 150% de concentración en base al valor declarado.

Tabla N°5 Recolección de datos obtenidos en el análisis de linealidad del sistema

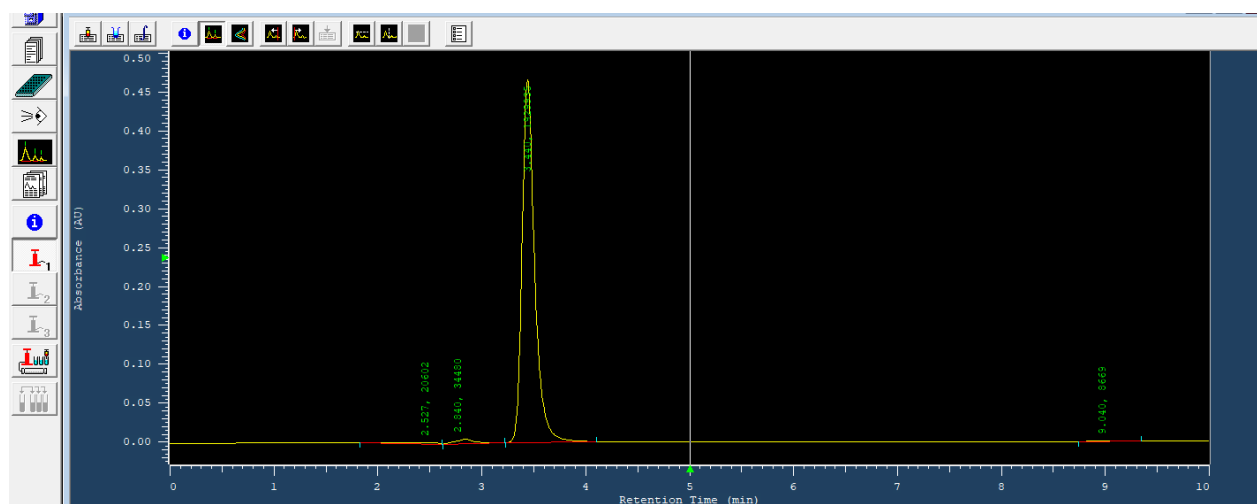
N°	Conc. teórica (mg/mL) Citicolina sódica	Conc. real ("x") (mg/mL) Citicolina sódica	Respuesta ("y") (Áreas)
1	0,1050	0,1031	653510
2		0,1031	654063
3		0,1031	655203
4	0,1680	0,1650	1050036
5		0,1650	1052103
6		0,1650	1052875
7	0,2100	0,2063	1326281
8		0,2063	1296719
9		0,2063	1320449
10	0,2520	0,2475	1558894
11		0,2475	1596568
12		0,2475	1619165
13	0,3150	0,3094	1981505
14		0,3094	1955955
15		0,3094	1983279
		$\sum x =$ 3,0940	$\sum y =$ 19756605

En la Tabla N°5 se presenta la tabulación de todos los datos obtenidos del análisis, sean estos: Las concentraciones teóricas, concentraciones reales y las áreas dadas por cada cromatógrafo según la concentración correspondiente. Los datos de se obtuvieron por medio de fórmulas ingresadas en el programa de una hoja en Excel.

Tabla N°6 Resultados de la prueba de Linealidad del Sistema

Parámetros	Resultados	Criterio de Aceptación	Dictamen
IC(b)	6541192,114; 6291637,461	No debe incluir cero	Conforme
Coefficiente de determinación R^2	1.00	$r^2 \geq 0.98$	Conforme
El coeficiente correlación	0.999	$r > 0.995$	Conforme

En la Tabla N° 6 se presentan los resultados de la prueba de Linealidad del sistema que es la capacidad del instrumento de medición (Cromatógrafo Líquido de Alto Desempeño) de emitir respuestas directamente proporcionales a la cantidad de analito presente en la muestra. Con los resultados obtenidos se demuestra el comportamiento lineal sin necesidad de ninguna transformación matemática y el coeficiente de determinación es mayor a 0.98, el intervalo de confianza de la pendiente no incluye cero. Por lo tanto, se concluye que los valores resultantes son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra, es decir, los resultados son conformes.

**Figura N°3.** Linealidad del sistema al nivel 100%

Fuente: Elaboración Propia

5.2.3 Linealidad del Método-Exactitud

Se prepararon soluciones independientes a los niveles 50.0%, 100.0%, y 150.0% (realizaron determinaciones por triplicado (3)) para cada nivel a partir de solución stock 1 con principio activo de Citicolina Sódica, es decir, se preparó una solución de placebo más estándar y de esta partieron para las soluciones a diferentes concentraciones.

Tabla N°7 Resultados obtenidos para el porcentaje de recobro

N°	Nivel	mg/mL Adicionados	Respuestas	mg/mL Recuperados	%Recobro
1	50%	0,0982	642073	0,0968	98,6
2			641562	0,0967	98,5
3			638789	0,0963	98,1
4	100%	0,1964	1303369	0,1957	99,7
5			1304313	0,1958	99,7
6			1294598	0,1944	99,0
7	150%	0,2946	1929935	0,2895	98,3
8			1947057	0,2920	99,1
9			1948702	0,2923	99,2

En la tabla N°7 se presentan los resultados de porcentaje de recobro que mediante el cálculo del intervalo de confianza de la media poblacional que el promedio obtenido del porcentaje de recobro, se incluye en el intervalo. Se obtiene la Exactitud, este parámetro demuestra la proximidad entre los resultados obtenidos mediante un procedimiento analítico respecto a su valor verdadero. El intervalo de confianza de la media poblacional de esta prueba es de 99.7% -98.1%. (ver **ANEXO N°3** Formato de hojas de cálculo)

Tabla N°8 Resultados obtenidos de la prueba de linealidad del método

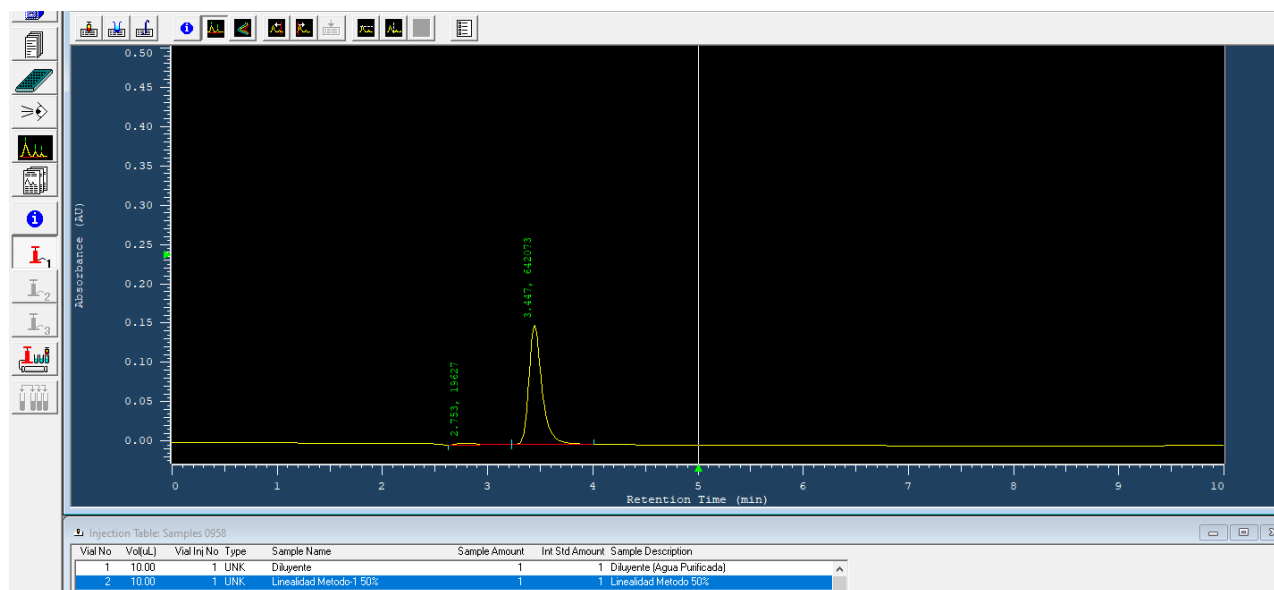
	Resultados	Criterio de aceptación	Dictamen
Determinación de intervalo de confianza de la pendiente IC(b)	1.003-0.979	Debe incluir la unidad	Conforme
Determinación de intervalo de confianza del intercepto IC(a)	0.0022; -0.003	Debe incluir el cero	Conforme

Tabla N°8 Resultados obtenidos de la prueba de linealidad del método (continuación)

Determinación del coeficiente de determinación (r^2)	1,00	0.98	Conforme
Determinación del porcentaje de recuperación	98.9	98.0 - 102.0	Conforme

En las Tabla N° 8 se presentan los resultados de la prueba de Linealidad del método, que es la capacidad del método analítico de emitir resultados de prueba directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo dado.

Se concluye que el comportamiento es directamente proporcional entre la concentración adicionada y la concentración recuperada, y se evidencia con el coeficiente de determinación que es mayor a 0.98, la pendiente de la recta es diferente de cero, el intervalo de confianza de la pendiente de la recta incluye la unidad, el intervalo de confianza para el intercepto incluye el valor de cero. Por lo tanto, se confirma que el comportamiento es directamente proporcional entre la concentración adicionada y la concentración recuperada.

**Figura N°4.** Linealidad del método al nivel 50%

Fuente: Elaboración Propia

5.2.4 Precisión: Repetibilidad y Precisión Intermedia

Para la Repetibilidad; se prepararon seis (6) análisis completos de una muestra homogénea a nivel del 100.0% de la concentración de trabajo, y se realizó una (1) inyecciones de cada muestra. Se realizaron dos (2) análisis completos de estándares secundarios al 100% y se realizaron cinco (5) inyecciones de cada uno. (Analista N°1 y N°2). (Ver **Anexo N°4** cascada de diluciones de los parámetros de validación)

Para la Precisión Intermedia; Un segundo analista procedió a repetir el análisis de repetibilidad en un día diferente utilizando diferentes instrumentos. Los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos del primer analista.

Tabla N°9. Resultados de la prueba de Precisión (repetibilidad-precisión intermedia)

	Muestra	Área	Pmx (mg)	mg	%
Analista 1	1	1307345	338,69	520,7	104,1
	2	1318606	338,66	525,2	105,0
	3	1308998	338,66	521,4	104,3
	4	1311944	338,67	522,5	104,5
	5	1322635	338,69	526,8	105,4
	6	1303134	338,67	519,0	103,8
Analista 2	1	2664482	340,02	509,0	101,8
	2	2668345	340,06	509,7	101,9
	3	2661391	340,07	508,4	101,7
	4	2671465	340,05	510,3	102,1
	5	2681628	340,07	512,2	102,4
	6	2668132	340,08	509,6	101,9
Promedio:				516,2	103,3
Desviación Estándar (s):				7,0	1,4
Coeficiente de variación (%CV):				1,4	1,4

Tabla N°10. Resultados del criterio de aceptación con relación al parámetro Precisión (Repetibilidad- Intermedia)

Precisión: Repetibilidad			
Determinación	Criterio de aceptación:	Resultados	Dictamen:
		Analista N°1	
Porcentaje de coeficiente de variación (%CV): Individualmente	$\leq 2.0\%$	0,6	CONFORME
Determinación	Criterio de aceptación:	Resultados	Dictamen:
		Analista N°2	
Porcentaje de coeficiente de variación (%CV): Individualmente	$\leq 2.0\%$	0,3	CONFORME

Tabla N°10. Resultados del criterio de aceptación con relación al parámetro Precisión (Repetibilidad- Intermedia) (continuación)

Precisión: Intermedia			
Determinación	Criterio de aceptación:	Resultados	Dictamen
		Analista N°1 y Analista N°2	
Porcentaje de coeficiente de variación (%CV): Entre ambos (Analista N°1 y N°2)	$\leq 4.0\%$	1,4	CONFORME

El objetivo de realizar esta prueba de Precisión fue medir la variabilidad o el grado de dispersión del método de ensayo. En esta investigación esta prueba se midió respecto a la Repetibilidad, tales resultados se muestran en la Tabla N° 8 (Analista 1) ya que se estudió la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (mismo analista, mismo equipo, mismos reactivos, etc.) en las mismas instalaciones del laboratorio. Precisión Intermedia tales resultados se muestran en la Tabla N°8 (Analista 2), con la cual se pretendía estudiar la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, pero en condiciones operativas distintas (diferente analista, diferente día de análisis, diferentes reactivos, etc.).

Por lo tanto, como lo refleja la tabla N° 10 se afirma que el método es preciso y reproducible ya que no existe diferencia significativa entre los resultados 64 obtenidos por un analista y otro siendo 1.4 el coeficiente de variación entre ambos analistas. Se concluye que el método es preciso ya que no se comprobó diferencia significativa entre los resultados obtenidos por el analista 1 y analista 2. (ver ANEXO N°3 Formato de hojas de cálculo)

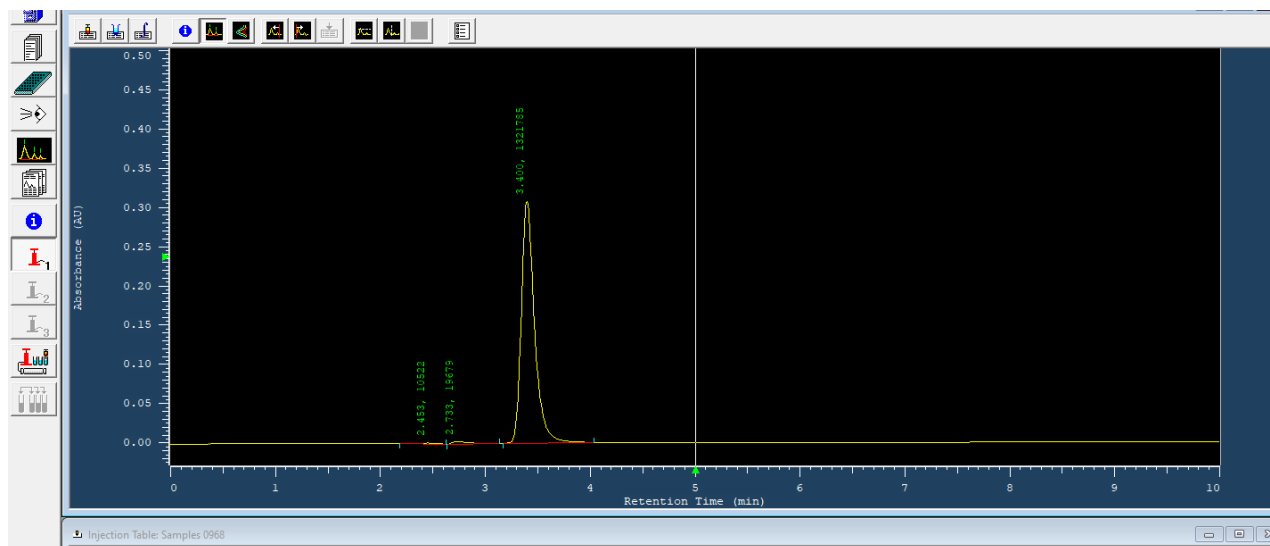


Figura N°5. Cromatograma de Producto al 100%

Fuente: Elaboración Propia

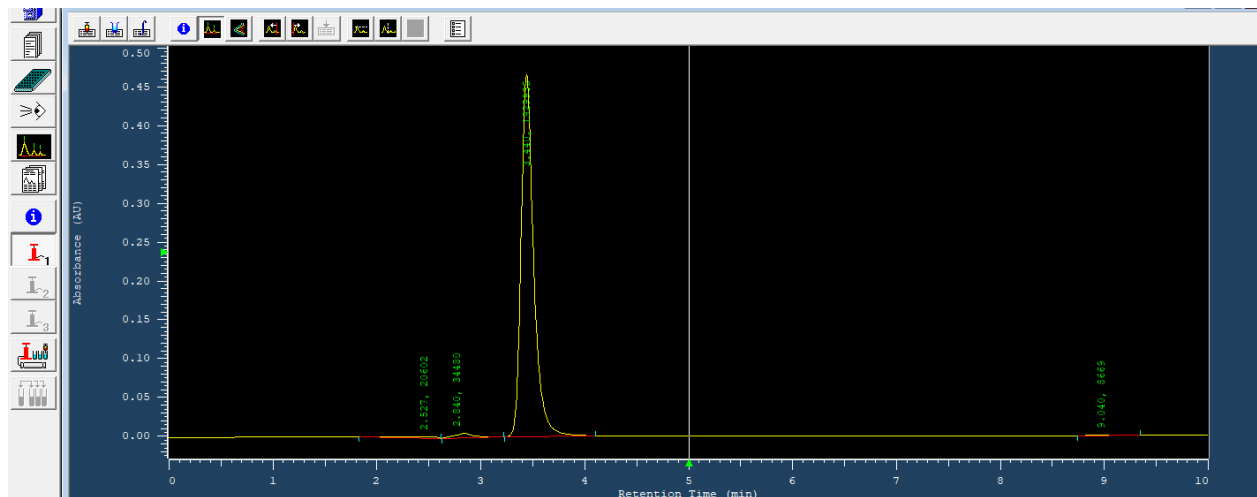


Figura N°6. Cromatograma de Estandar de Citicolina Sódica al 100%

Fuente: Elaboración Propia

5.2.5 Estabilidad de muestra

Se prepararon seis (6) soluciones muestras al 100.0 % y tres (3) soluciones estándares de referencia, los que se analizaron de forma “DEPENDIENTES” el día de su preparación y 24 horas después de preparadas. Cada solución muestra y estándar secundario almacenados se cuantificaron contra estándares preparados recientemente.

Tabla N°11 Resultados de la prueba de estabilidad de la muestra analítica

N°	Muestra Inicial		Muestra después 24H		%
	Área	Criterio de aceptación: %	Área	Criterio de aceptación: %	
1	1307345	104,1	1321146	106,9	102,6
2	1318606	105,0	1325446	107,2	102,1
3	1308998	104,3	1319724	106,8	102,4
4	1311944	104,5	1321636	106,9	102,3
5	1322635	105,4	1306030	105,7	100,3
6	1303134	103,8	1284905	104,0	100,2
Promedio	1312110	105	1313148	106	101,7
Desviación Estándar	7293,3	0,6	15354,7	1,2	1,1
Coefficiente variación	0,6	0,6	1,2	1,2	1,1
Sumatoria		627,11		637,5	609,95

Tabla N°12 Resultados de la prueba de estabilidad (Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición)

Determinación	Criterio de aceptación:	Resultados	Dictamen
$ d_{ii} =$ Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición	$\leq 2.0\%$	1,7	CONFORME

En la tabla N° 11 se presentan los resultados de la prueba de Estabilidad, con la que se pretendía demostrar la propiedad de una muestra preparada, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de ser almacenada en un tiempo y en condiciones determinadas.

Con los resultados obtenidos se confirma que el método cumple con el parámetro de Estabilidad ya que las diferencias absolutas de los valores promedio obtenidos de las condiciones en 24 horas son menores al 2%.

5.3 Informe de validación del método analítico para la identificación y cuantificación de citicolina (como citicolina sódica) en tabletas recubiertas de 500 mg por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

La redacción del informe se realizó basado en los resultados obtenidos en cada uno de los parámetros de desempeño realizados. En este informe contiene una introducción, alcance, condiciones de trabajo, además se detallan cada uno de estos parámetros, los resultados obtenidos, los criterios de aceptación, dictamen de cada uno de los parámetros de desempeño,

LOGO	INFORME DE VALIDACION DEL METODO ANALITICO	PÁGINA 1 DE
VALIDACIÓN N°: 01		
Identificación y ensayo para Citicolina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)		

REALIZO	REVISO	AUTORIZO
Químico analista	Coordinador de Validaciones Metodológicas	Jefe de Control de Calidad
Fecha:	Fecha:	Fecha:

5.3.1 Introducción

A continuación, se presentan los resultados obtenidos del proceso de validación del método analítico por cromatografía de alta eficiencia (HPLC), para la identificación y cuantificación de Citicolina como Citicolina Sódica.

Para el desarrollo del presente método analítico se tomó de referencia el apartado <621> Cromatografía de la Farmacopea de los Estados Unidos, Formulario Nacional (USP 42, NF 37) realizando los ajustes necesarios para su validación.

El objetivo del presente trabajo es demostrar la validez del método analítico desarrollado para la identificación y cuantificación de Citicolina como Citicolina Sódica, basándonos en los parámetros

evaluados siguientes: Linealidad del sistema, Linealidad del Método -Exactitud, Precisión (Repetibilidad- intermedia) y Estabilidad de la muestra.

5.3.2 Alcance

Aplica para la identificación y cuantificación de Citicolina (como Citicolina Sódica) en tabletas recubiertas de 500 mg por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

5.3.3 Condiciones

Todas las determinaciones se realizaron en un Cromatógrafo de Líquido de Alta Eficiencia equipado con la columna, detector UV-Visible, Temperatura, flujo y volumen de inyección, según detalle en el método de análisis.

Se utilizó como estándar secundario de referencia: Citicolina Sódica, Lote 200230061021, vence: 01/09/2025

5.3.4 Parámetros a evaluar: Dictamen:

Tabla N°13. Dictamen de los parámetros evaluados

RESULTADOS DE CITICOLINA (COMO CITICOLINA SODICA) EN TABLETAS RECUBIERTAS DE 500 mg			
PARAMETROS A EVALUAR	CRITERIOS DE ACEPTACION	RESULTADOS	DICTAMEN
1. Especificidad	Respuesta del método únicamente debida al analito	Respuesta del método únicamente debida al analito	Conforme
2. Linealidad del sistema			
Coeficiente de correlación (r)	≥ 0.995	0.999	Conforme
Coeficiente de determinación (r^2)	≥ 0.98	1.00	Conforme
Ecuación de la recta (y= bx+a)	Debe corresponder	Y=6416415x - 6401	Conforme
Intervalo de confianza de la pendiente IC(b)	No debe incluir el cero	6541192.114 6291637.461	Conforme

Tabla N°13. Dictamen de los parámetros evaluados (continuación)

3. Exactitud- Linealidad de método			
Coefficiente de determinación (r^2)	≥ 0.98	1.00	Conforme
% de Recuperación (Exactitud)	98.0% -102.0%	98.9%	Conforme
Porcentaje de coeficiente de Variación (%)	$\leq 2.0\%$	0.6%	Conforme
Intervalo de Coeficiente del intercepto IC(a)	Debe incluir el cero	0.0022; -0.003	Conforme
4. Precisión (Repetibilidad e Intermedia)			
Coefficiente de variación de repetibilidad de los resultados obtenidos del ensayo (Analista 1)	$\leq 2.0\%$	0.6%	Conforme
Coefficiente de variación de repetibilidad de los resultados obtenidos del ensayo (Analista 2)	$\leq 2.0\%$	0.3%	Conforme
Coefficiente de variación de intermedia de los resultados obtenidos del ensayo (Analista N°1 y Analista N°2)	$\leq 4.0\%$	1.4%	Conforme
5. Estabilidad de la Muestra Analítica			
Diferencia Absoluta de la media aritmética de la condición de almacenaje (muestra- ensayo)	$\leq 2.0\%$	1.7%	Conforme

Tabla N°13. Dictamen de los parámetros evaluados (continuación)

Porcentaje de incremento promedio entre la condición inicial y condición de almacenamiento (muestra)	98.0% -102.0%	101.7%	Conforme
Diferencia Absoluta de la media aritmética de la condición de almacenaje (estándares- ensayo)	$\leq 2.0\%$	1.1%	Conforme
Porcentaje de incremento promedio entre la condición inicial y condición de almacenamiento (estándares)	98.0% -102.0%	100.5%	Conforme

Luego de los análisis estadísticos de los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros evaluados se concluye que el método de análisis por Cromatografía de Alta Eficiencia (HPLC) para la identificación y cuantificación de Citicolina (Como Citicolina Sódica) en tabletas recubiertas de 500 mg es exacto dentro del rango establecido ya que se obtuvo resultados de porcentaje de coeficiente de variación (%CV) y porcentajes de recuperación dentro de los límites establecidos. Además, el método analítico es lineal debido a que el coeficiente de correlación es mayor a 0.995 y existe relación lineal entre las cinco concentraciones de referencia evaluadas.

El método cromatográfico es específico y diferencia el principio activo en presencia de los componentes de la formulación, fase móvil y diluyente. El método es capaz de integrar por separado el pico del analito de otros picos presentes.

El método es preciso, debido a que se obtuvieron resultados de porcentaje de coeficiente de variación (%CV) menores o igual a 2.0% en la evaluación del parámetro de Precisión-repetibilidad.

El método es reproducible debido a que se obtuvieron resultados de porcentaje de coeficiente de variación (%CV) menores o igual a 4.0% en la evaluación del parámetro de Precisión- precisión intermedia, al ser evaluada en diferentes días, equipos y analistas.

Respecto al parámetro de estabilidad de la muestra, se determinó que las muestras pueden almacenarse en temperatura ambiente y dentro del rack del equipo hasta un periodo de 24, por el motivo cumple con criterio de aceptación de diferencia absoluta de media aritmética de la condición de almacenaje $|d_i| \leq 2.0\%$ y con el porcentaje de incremento entre la condición inicial y condición de almacenaje de 98.0%- 102.0%.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, la metodología desarrollada para el análisis de identificación y cuantificación de Citicolina (como Citicolina Sódica) en tabletas recubiertas de 500 mg es Válida para proporcionar datos satisfactorios; como ha sido demostrado a través de los parámetros de Linealidad del Sistema, exactitud (linealidad de método), precisión (repetibilidad e intermedia), estabilidad analítica de la muestra y especificidad evaluados.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. El método cromatográfico es específico y diferencia el principio activo en presencia de los componentes de la formulación, fase móvil y diluyente. El método es capaz de integrar por separado el pico del analito de otros picos presentes.
2. El método es también, preciso, debido a que se obtuvieron resultados de porcentaje de coeficiente de variación (%CV) menores o igual a 2.0% en la evaluación del parámetro de Precisión- repetibilidad.
3. El método es reproducible debido a que se obtuvieron resultados de porcentaje de coeficiente de variación (%CV) menores o igual a 4.0% en la evaluación del parámetro de Precisión- precisión intermedia, al ser evaluada en diferentes días, equipos y analistas.
4. Luego de los análisis estadísticos de los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros evaluados se concluye que el método de análisis por Cromatografía de Alta Eficiencia (HPLC) para la identificación y cuantificación de Citicolina (Como Citicolina Sódica) en tabletas recubiertas de 500 mg es exacto dentro del rango establecido ya que se obtuvo resultados de porcentaje de coeficiente de variación (%CV) y porcentajes de recuperación dentro de los límites establecidos. Además, el método analítico es lineal debido a que el coeficiente de correlación es mayor a 0.995 y existe relación lineal entre las cinco concentraciones de referencia evaluadas.
5. Los resultados e informe final, nos llevan a dictaminar que el método desarrollado es válido para la identificación y cuantificación de Citicolina (como Citicolina Sódica) en tabletas recubiertas de 500 mg, cumpliendo así, una de las exigencias de las entidades regulatorias nacionales, en el área farmacéutica, permitiendo que el producto pueda ser liberado, garantizando su calidad y eficacia.
6. La validación realizada para este producto y metodología específica, podrá servir para futuras investigaciones similares, tomando en cuenta que los parámetros de desempeño a evaluar pueden variar para los diferentes productos farmacéuticos y sus diferentes presentaciones.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Al analista de laboratorio se recomienda seguir a cabalidad cada una de las indicaciones que menciona dicha validación para lograr obtener respuestas confiables en cada uno de los parámetros establecidos con respecto al principio activo Citicolina (como citicolina Sódica).
2. Al jefe o coordinador del área Investigación y Desarrollo, se recomienda una vez desarrollada y validada la metodología, realizar el procedimiento de Transferencia de Método analítico al área de Control de Calidad para ser aplicada al análisis del producto verificando su calidad para ser liberado al mercado.
3. Al jefe y analista del área de Investigación y Desarrollo, se recomienda utilizar equipos previamente calificados y calibrados para validaciones de métodos analíticos, así como para los análisis de rutina dentro del Laboratorio, y estos puedan proporcionar resultados confiables.
4. Para el lector y/o analista, interesado en estudios que involucre el mismo o diferente principio activo, esta investigación podrá orientar a evaluar los parámetros descritos, adecuando cantidades y materiales de forma conveniente.
5. Para el lector, se recomienda también apoyarse en la bibliografía citada en este trabajo para lograr una mayor comprensión sobre la validación de métodos analíticos y los parámetros necesarios dependiendo del tipo la categoría de validación a la que pertenezca. Que esta investigación sirva de guía para futuros estudios.

BIBLIOGRAFIA

1. ICH Harmonised Guideline, (2022) Validation of Analytical Procedures Q2(R2), United States of America.
2. ICH Harmonised Tripartite Guideline, (1994) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)
3. RTCA 11.03.39.06. Reglamento Técnico Centroamericano, productos farmacéuticos. (2011) Validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos.
4. Asociación Española de Farmacéuticos en la Industria, (2001) Validación de Métodos Analíticos. Barcelona: Agilent Technologies, Mcc Analitical S.A, Merck eurolab, Perkin Elmer, S.L, PH-C, Sociedad de validación de sistemas SL. España.
5. RTCA 11.03.42:07 Reglamento Técnico Centroamericano, productos farmacéuticos. (2014) Medicamentos de uso humano. Buenas Prácticas de Manufactura para la industria Farmacéutica
6. RTCA 11.03.47:07 Reglamento Técnico Centroamericano, productos farmacéuticos. (2007) Medicamentos para uso humano. Verificación de la calidad.
7. Dirección Nacional De Medicamentos [Fecha de consulta: 11/01/24]
8. OMS, Organización Mundial para la Salud [Internet]. Medicamentos; marzo de 2017 [consultado el 14 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://salud.gob.ar/dels/printpdf/132>
9. José Adán Maravilla Arévalo Lizeth Yomara Lucero de Maravilla José Rogelio Cisneros Santín Douglas Barrera Gil. CONSUMO DE PSICOESTIMULANTES LÍCITOS EN

- estudiantes de doctorado en medicina. Artículo de investigación [Internet]. 2018 [consultado el 16 de septiembre de 2022]
10. Garcia G. The Food Tech [Internet]. Nootrópicos naturales: potenciadores del sistema cognitivo - The Food Tech; julio de 2020 [consultado el 12 de septiembre de 2022].
 11. Finadiet [Internet]. Formas Farmacéuticas Y Su Definición: Finadiet; [consultado el 3 de enero de 2023].
 12. Jose David Aguilar Figueroa. Redaccion de un compendio analitico aplicado al laboratorio de tecnologia farmaceutica a partir de la traduccion del libro: 59 “pharmaceutical dosage forms: tablets” tomo i [Internet]. San Salvador: [editorial desconocido]; 2009. 16 p.
 13. García-Larreta, Grijalva-Endara, Vera-Santos, Mariscal-Santi. (2019).Validación de tabletas de Carbonato de Calcio. Vol. 5. Número 2. [Consultado: 7 de Abril de 2022]. Pag 566.
 14. Rampazoo P. Standardization and validation of analytical methods in the pharmaceutical industry. Il Farmaco 1990; 45:807-15.
 15. Guía de Validación de Métodos Analíticos Físicoquímicos. (2010). del Organismo Salvadoreño de Acreditación (OSA) versión 1 revisión 0.
 16. IMAGEN TOMADA DE SITIO WEB: APUNTESDE <https://apuntesde.es/como-funciona-un-hplc/>

GLOSARIO

- Principio activo ⁽³⁾: Sustancia dotada de un efecto farmacológico específico o que, sin poseer actividad, al ser administrado en el organismo la adquiere luego que sufren cambios en su estructura química.
- Blanco, placebo o matriz de la muestra ⁽²⁾: Muestra preparada para la lectura final pero que no contiene analitos. Puede ser un blanco de los reactivos o bien un blanco de la muestra problema que contenga todos los ingredientes de la muestra problema excepto los analitos. En este último caso se denomina placebo o matriz de la muestra.
- Muestra ⁽²⁾: Producto resultante de una operación de muestreo. El muestreo debe ser representativo y con un determinado carácter aleatorio si bien, en algunos tipos de análisis y en aplicación de la filosofía del peor caso, se propician muestreos sesgados.
- Medicamento ⁽⁶⁾: Sustancia simple o compuesta, natural, sintética, o mezcla de ellas con forma farmacéutica definida, empleada para diagnosticar, tratar, prevenir enfermedades o modificar una función fisiológica de los seres humanos.
- Forma farmacéutica ⁽⁶⁾: Es la forma física que se le da a un medicamento, la cual facilita la dosificación del o de los principios activos para que puedan ejercer su acción en el lugar y tiempo.
- Cromatografía ⁽⁴⁾: es un método por el cual las sustancias se separan mediante un proceso de migración diferencial en un sistema que consta de dos fases. Una fase que fluye continuamente en una dirección dada (fase móvil) y otra que permanece fija (fase estacionaria).
- RTCA: Reglamento Técnico Centroamericano

- DNM (Dirección Nacional de Medicamentos) ⁽⁷⁾: Autoridad sanitaria competente para la regulación y autorización de la inscripción, importación, fabricación, control de precios, vigilancia de mercado, control de la cadena de distribución, hasta el expendio al consumidor final de los medicamentos y productos afines.
- HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de alta eficiencia)
- Calidad ⁽⁵⁾: naturaleza esencial de un producto y la totalidad de sus atributos y propiedades, las cuales determinan su idoneidad para los propósitos a los cuales se destina.
- Especificidad; selectividad ⁽³⁾: Capacidad de evaluar, medir e identificar simultánea o separadamente, los analitos de interés de forma inequívoca sin interferencias de impurezas, productos de degradación, compuestos relacionados, excipientes u otras sustancias previsible presentes en la matriz de la muestra.
- Exactitud ⁽³⁾; veracidad: Es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese método y el valor verdadero.
- Impurezas ⁽³⁾: Sustancias ajenas a la fórmula cuali-cuantitativa que pueden provenir de los procesos de fabricación y de almacenamiento, incluyendo la degradación de las materias primas (principios activos y productos farmacéuticos auxiliares) y formas de dosificación.
- Intervalo ⁽³⁾: amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito (incluyendo esos niveles), en la cual se puede determinar el analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el método según se describe.
- Límite de cuantificación ⁽³⁾: mínima cantidad de los analitos en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con precisión y exactitud aceptable. Es un parámetro del análisis cuantitativo para niveles bajos de compuestos en matrices de muestras y se usa particularmente para la determinación de impurezas y productos de degradación.

- Límite de detección ⁽³⁾: mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada por única medición, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. Es comúnmente expresado como concentración del analito.
- Linealidad ⁽³⁾: capacidad para obtener resultados de prueba que sea proporcionales ya sea directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado.
- Método Analítico ⁽³⁾: adaptación específica de una técnica analítica para un propósito de medio seleccionado, en el cual se identifican los recursos materiales y el procedimiento.
- Parámetros de desempeño analítico ⁽³⁾: características de validación que necesitan ser evaluadas y que típicamente corresponden a la siguiente lista: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad e intervalo de linealidad.
- Precisión ⁽³⁾: Expresa el grado de concordancia entre una serie de mediciones individuales obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea original o bien a partir de varias muestras obtenidas por dilución de la muestra bajo condiciones establecidas. Existen tres formas de determinación: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.
- Procedimiento ⁽⁵⁾: descripción de las operaciones que deben realizarse, las precauciones que deben tomarse y las medidas que deben aplicarse relacionadas directa o indirectamente con la fabricación de un medicamento.
- Procedimiento analítico ⁽³⁾: Descripción detallada de los pasos necesarios para aplicar un método analítico
- Procedimiento analítico oficial ⁽³⁾: Descripción detallada de los pasos necesarios para aplicar un método analítico estandarizado y validado contenido en las bibliografías de referencias

oficiales, según listado armonizado por los Países de la Región Centroamericana (Resolución 93-2002, COMECO 24, septiembre 2002)

- Procedimiento analítico no oficial ⁽³⁾: Descripción detallada de los pasos necesarios para aplicar un método analítico desarrollado por el fabricante para la verificación de la calidad de su producto.
- Protocolo de validación ⁽⁵⁾: documento en el que se describe las actividades que se realizan en una validación, incluido en los criterios de aceptación para la aprobación de un proceso de fabricación o parte del mismo.
- Validación ⁽³⁾: Establecimiento de la evidencia documental que un procedimiento analítico conducirá con un alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y atributos de calidad previamente establecidos.
- Validación de un método analítico ⁽³⁾: Procedimiento para establecer pruebas documentales que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. Implica la demostración de la determinación de las fuentes de variabilidad y del error sistemático y al azar de un procedimiento, no solo dentro de la calibración sino en el análisis de muestras reales.

ANEXO N°1
FORMATO DE PROTOCOLO DE VALIDACION DE METODOLOGIAS
ANALITICAS

LOGO	PROTOCOLO DE VALIDACION DEL METODO ANALITICO	PÁGINA
VALIDACIÓN N°: 01		1 DE
Identificación y ensayo para Citicolina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)		

1. Objetivo:

En esta sección se expone el propósito de la validación del método analítico.

2. Alcance:

Se describe para qué método y la aplicación sobre la cual es ejecutada la validación de este.

3. Equipo validación: miembros, roles y responsabilidades

Se indican los miembros del equipo y unidad de validación, sus responsabilidades y roles en la validación.

4. Parámetros a evaluar:

Se enlistan los parámetros de desempeño a evaluar

5. Resumen de las características:

Esta sección contiene información sobre el producto terminado, el placebo y los estándares secundarios o primarios según aplique. Se indica el nombre del principio activo, descripción, fórmula molecular.

LOGO	PROTOCOLO DE VALIDACION DEL METODO ANALITICO	PÁGINA
VALIDACIÓN N°: 01		1 DE
Identificación y ensayo para Citicolina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)		

6. Información general:

Se indican los equipos a utilizar cada uno con su respectivo número de certificado y fecha de vencimiento de calibración, materiales a utilizar (cristalería, etc.); reactivos (marca, código y cas); estándares, placebo y muestras (Lote, potencia y fecha de vencimiento); lista de preparación de reactivos, condiciones de trabajo.

7. Descripción de la validación del método analítico

7.1 Parámetros de desempeño (Linealidad del Sistema, Linealidad del Método, Adecuabilidad, Especificidad, Precisión Repetibilidad- intermedia y Estabilidad de la muestra).

7.2 Describe la metodología. Se detalla cuantas muestras se preparan y cuantas veces serán inyectadas por el equipo HPLC, a la vez se detalla cuáles son los criterios de aceptación con los que debe cumplir dicha prueba.

7.3 Método de cálculo (si aplica). En este caso se colocan todas las formulas perteneciente a lo que se pretende conseguir con respecto a al parámetro en ejecución ya sea estas concentraciones reales, porcentajes de recobros, número de platos teóricos, asimetría, resolución entre otros.

7.4 Describe el desarrollo de ensayo para cada parámetro. Para cada una de las pruebas a realizar se debe dejar claramente establecido cuál será la cantidad que se pesará y que concentración se obtendrá.

LOGO	PROTOCOLO DE VALIDACION DEL METODO ANALITICO	PÁGINA
VALIDACIÓN N°: 01		1 DE
Identificación y ensayo para Citicolina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)		

Este se describe de una manera clara y sencilla para que cualquier otro analista sea capaz de seguir la marcha sin ningún problema. Seguido se puede representar con una cascada de dilución

8. **BIBLIOGRAFIA**

- Eurachem, La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos, Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados. Primera edición española. 2016
- ICH Harmonised Guideline, (2022) Validation of Analytical Procedures Q2(R2), United States of America.

9. **ANEXOS**

Anexar las hojas de trabajo (Fase Móvil), las hojas de registro de cálculos y las hojas de recolección de datos de todas las pruebas ejecutadas en la validación.

ANEXO N°2

**FORMULAS MATEMATICAS UTILIZADAS EM CADA UNO DE LOS
PARAMETROS DE LA VALIDACION**

- **Determinación del promedio:**

$$\bar{x} = \sum(x_i)/n \text{ (Ecuación 1)}$$

En donde:

x_i : Dato individual.

\bar{x} : Promedio.

n : número total de datos.

\sum : Sumatoria de datos

- **Determinación de la desviación estándar:**

$$s = [(\sum (x_i - \bar{x})^2) / (n - 1)]^{1/2} \text{ (Ecuación 2)}$$

En donde:

x_i : Dato individual.

\bar{x} : Promedio.

n : número total de datos.

\sum : Sumatoria de datos.

- **Determinación del porcentaje de coeficiente de variación:**

$$\% CV = [(s / \bar{x}) * 100] \text{ (Ecuación 3)}$$

En donde:

\bar{x} : Promedio.

s : Desviación estándar

100: Factor.

n : número total de datos.

- **Determinación de la resolución:**

$$RS = 2 \times \frac{tR2 - tR1}{(W1 + W2)} \text{ (Ecuación 4)}$$

En donde:

$tR2$ = Tiempo de retención del componente 1

$tR1$ = Tiempo de retención del componente 2

$W1$ = Ancho de la base obtenida extrapolando los lados relativamente rectos hasta línea base

$W2$ = Ancho de la base obtenida extrapolando los lados relativamente rectos hasta línea base

- **Determinación del factor de capacidad:**

$$AS = \frac{W0.05}{2f} \text{ (Ecuación 5)}$$

En donde:

$W0.05$ = Ancho del pico al 5% de la altura.

f = Distancia del máximo del pico hasta el borde inicial del pico, midiendo la distancia en un punto ubicado al 5% de la altura desde la línea base.

- **Determinación de numero de platos teóricos:**

$$N = 5.54 \left(\frac{tR}{Wh} \right)^2 \text{ (Ecuación 6)}$$

En donde:

tR = Tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición de la respuesta máxima.

Wh = Ancho a la mitad de altura, para el pico.

- **Determinación de asimetría:**

$$AS = \frac{W0.05}{2f} \text{ (Ecuación 7)}$$

En donde:

$W_{0.05}$ = Ancho del pico al 5% de la altura.

f = Distancia del máximo del pico hasta el borde inicial del pico, midiendo la distancia en un punto ubicado al 5% de la altura desde la línea base.

- Determinación de la comprobación de estándares:

$$\% = \frac{\text{Area de Estándar N}^{\circ}1 \times \text{Peso de Estándar N}^{\circ}2}{\text{Area de Estándar N}^{\circ}2 \times \text{Peso de Estándar N}^{\circ}1} \times 100 \text{ (Ecuación 8)}$$

En donde:

Área Estándar 1: Promedio de áreas obtenidas del estándar N°1.

Área Estándar 2: Promedio de áreas obtenidas del estándar N°2

Peso Estándar 1: Peso del estándar N°1 en miligramos (mg).

Peso Estándar 2: Peso del estándar N°1 en miligramos (mg).

- Determinación de la concentración real de las soluciones estándares de referencia correspondiente a cada nivel, en la linealidad del sistema y Linealidad del método- Exactitud mediante la siguiente fórmula:

$$Cs(\mu\text{g/mL}) = \left(\left(\frac{\text{Pst R} \times \text{Volumenes de alícuotas realizadas (mL)}}{\text{Volumenes de aforos realizados (mL)}} \times \frac{\%P - \%H}{100} \right) \right) \times 1000 \text{ (Ecuación 9)}$$

En donde:

Pst R = Peso real en miligramos (mg) del estándar secundario.

%P= Porcentaje de pureza del estándar secundario obtenida del proceso de ‘estandarización’.

100= Factor para determinar la concentración en miligramos por mililitros

1000= Factor para determinar la concentración en microgramos por mililitros ($\mu\text{g/mL}$)

Ejemplo: Nivel 100% en la Linealidad del Sistema

$$Cs(\mu\text{g/mL}) = \left(\left(\frac{84.02 \text{ mg} \times 5.0 \text{ mL}}{200.0 \text{ mL} \times 10.0 \text{ mL}} \times \frac{99.8 -}{100} \right) \right) \times 1000$$

$$Cs(\mu\text{g/mL}) = 210.00 \mu\text{g/mL}$$

- **Determinar los microgramos por mililitros adicionados ($\mu\text{g/mL}$) correspondiente a cada nivel en Linealidad del Método:**

$$C_{mx} \left(\mu \frac{\text{g}}{\text{mL}} \right) = \left(\left(\frac{\text{PR}_{mx} \times \text{Volumenes de alícuotas realizadas (mL)}}{\text{Volumenes de aforos realizados (mL)}} \times \frac{\%P - \%H}{100} \right) \right) \times 1000$$

(Ecuación 10)

En donde:

Pst R = Peso real en miligramos (mg) del estándar secundario.

%P= Porcentaje de pureza del estándar secundario obtenida del proceso de ‘estandarización’.

100= Factor para determinar la concentración en miligramos por mililitros (mg/mL)

1000= Factor para determinar la concentración en microgramos por mililitros ($\mu\text{g/mL}$)

- **Determinar los microgramos recuperados correspondiente a cada nivel en Linealidad del Método:**

$$Cr (\mu\text{g/mL}) = \frac{r_u}{r_s} \times Cs (\mu\text{g/mL}) \quad (\text{Ecuación 11})$$

En donde:

r_s : Área promedio del estándar secundario correspondiente a cada nivel obtenidos en Linealidad del Sistema.

r_u : Área de la solución muestra.

Cr: Microgramos por Mililitros Recuperados en la Solución Muestra de Linealidad de Método ($\mu\text{g/mL}$).

Cmx: Microgramos por Mililitros Adicionados en la Solución Muestra de Linealidad de Método ($\mu\text{g/mL}$).

- **Determinar la concentración real en microgramos por mililitros ($\mu\text{g/mL}$) de los estándares secundarios:**

$$\text{Cst}(\%) = \left(\left(\frac{\text{Pst R}}{\text{Pst T}} \right) \times \%P - \%H \right) \text{ (Ecuación 12)}$$

En donde:

Cst (%): Concentración del estándar secundario en porcentaje (%).

%P: Pureza del estándar secundario en porcentaje (%).

%H: Humedad del estándar secundario en porcentaje (%).

Pst R: Peso real del estándar secundario en miligramos (mg).

Pst T: Peso teórico del estándar secundario en miligramos (mg).

- **Determinar el porcentaje sobre lo rotulado del Ensayo para cada muestra:**

$$\% \text{ Sobre lo rotulado} = \left(\left(\frac{\text{Amx}}{\text{Ast}} \right) \times \text{Cst}(\%) \right) \text{ (Ecuación 13)}$$

En donde:

Ast: Área promedio de la solución estándar secundario.

Amx: Área de solución muestra obtenida en el análisis de **del Ensayo**.

Cst (%): Concentración del estándar secundario en porcentaje (%).

- **Determinar el promedio, desviación, y porcentaje de coeficiente de variación (%CV) de las seis muestras:**

Determinación del promedio:

$$\bar{x} = \sum(x_i)/n \text{ (Ecuación 14)}$$

En donde:

x_i : Dato individual.

\bar{x} : Promedio.

n : número total de datos.

\sum : Sumatoria de datos

- Determinación de la desviación estándar:

$$s = [(\sum (x_i - \bar{x})^2) / (n - 1)]^{1/2} \text{ (Ecuación 15)}$$

En donde:

x_i : Dato individual.

\bar{x} : Promedio.

n : número total de datos.

\sum : Sumatoria de datos

- Determinación del porcentaje de coeficiente de variación:

$$\% CV = [(s / \bar{x}) * 100] \text{ (Ecuación 16)}$$

En donde:

\bar{x} : Promedio.

s : Desviación estándar

100: Factor.

n : número total de datos.

- **condición de almacenaje con respecto a la condición inicial:**

$$|\bar{d}_i| = |\bar{y}_i - \bar{y}_0| \text{ (Ecuación 17)}$$

- **Determinación de la Media aritmética de condición de almacenaje:**

$$\bar{y}_i = \frac{\sum \bar{y}_i}{n_i} \text{ (Ecuación 18)}$$

- **Determinación de la Media aritmética de condición de inicial:**

$$\bar{y}_0 = \frac{\sum \bar{y}_0}{n_0} \text{ (Ecuación 19)}$$

En donde:

di: Diferencia absoluta de la media aritmética de la condición de almacenaje con respecto a la condición inicial.

y_i: Media Aritmética de la condición de almacenaje.

y₀: Media Aritmética de la condición de inicial.

$\sum \bar{y}_0$: Sumatoria de % sobre rotulados obtenidos de la condición inicial.

$\sum \bar{y}_i$: Sumatoria de % sobre rotulados obtenidos de la condición de almacenaje.

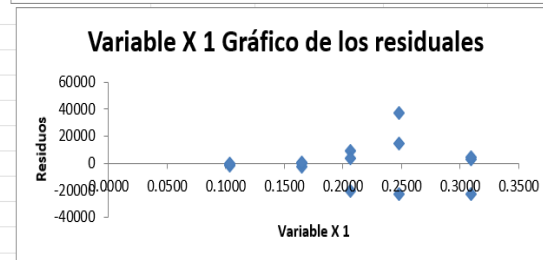
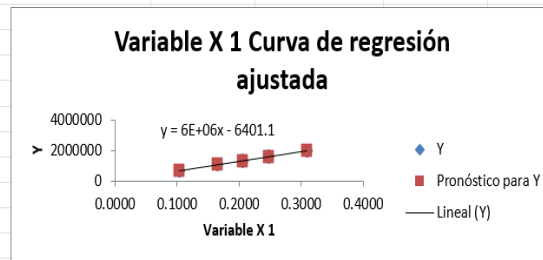
ANEXO N°3

FORMATO DE HOJAS DE CALCULO

- Hoja resumen de linealidad del Sistema

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	Resumen								
2									
3	Estadísticas de la regresión								
4	Coefficiente de correlación múltiple	0.999473559							
5	Coefficiente de determinación R^2	0.998947396							
6	R^2 ajustado	0.998866427							
7	Error típico	15717.76251							
8	Observaciones	15							
9									
10	ANÁLISIS DE VARIANZA								
11		<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>			
12	Regresión	1	3.04791E+12	3.04791E+12	12337.32521	9.58396E-21			
13	Residuos	13	3211624758	247048058.3					
14	Total	14	3.05112E+12						
15									
16		<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
17	Intercepción	-6401.103448	12587.75251	-0.508518375	0.61960946	-33595.28943	20793.08253	-33595.28943	20793.08253
18	Variable X 1	6416414.788	57767.28074	111.0735126	9.58396E-21	6291616.165	6541213.41	6291616.165	6541213.41
19									

19			
20			
21			
22	Análisis de los residuales		
23			
24	<i>Observación</i>	<i>Pronóstico para Y</i>	<i>Residuos</i>
25	1	655352.9483	-1842.948276
26	2	655352.9483	-1289.948276
27	3	655352.9483	-149.9482759
28	4	1052405.379	-2369.37931
29	5	1052405.379	-302.3793103
30	6	1052405.379	469.6206897
31	7	1317107	9174
32	8	1317107	-20388
33	9	1317107	3342
34	10	1581808.621	-22914.62069
35	11	1581808.621	14759.37931
36	12	1581808.621	37356.37931
37	13	1978861.052	2643.948276
38	14	1978861.052	-22906.05172
39	15	1978861.052	4417.948276
40			
41			



Fuente: Elaboración Propia

- Hoja de determinación de concentraciones para el parametro de linealidad del sistema

S38

Determinación de la Concentración de Referencia "x" en miligramos por mililitros (mg/mL)

Fórmula: Determinación de concentración de real en microgramos por mililitros Cs (mg/mL) de la soluciones

$$C_s \text{ (mg/mL)} \times = \frac{\text{Pst R} \times \text{Volumen de alícuotas realizadas (mL)} \times (\%P - \%H)}{\text{Volumenes de aforos realizados (mL)} \times 100}$$

Fórmula: Determinación de miligramos teóricos corregidos

$$\text{mg teóricos corregidos} = \frac{(\text{Pst T}) \times \%P - \%H}{100}$$

En donde:

%P:	99.8	Porcentaje de pureza del estándar secundario (%)
%H:	1.6	Porcentaje de humedad del estándar secundario (%)
100	Factor para determinación de la concentración en miligramos por mililitros (mg/mL) y el peso teórico corregido en miligramos (mg) del estándar secundario	
Pst R:	Peso real del estándar secundario en miligramos (mg)	
Pst T:	Peso teorico del estándar secundario en miligramos (mg)	

Linealidad del sistema

% Teórico	Conc. teórica (mg/mL)	Peso teórico (Pst T) (mg) Citicolina sódica	Peso teórico corregido (mg)	Peso real (Pst R) (mg) Citicolina sódica	Cascada de dilución			Conc. real mg/mL como Citicolina sódica (%)
					Balón N°1 (mL)	Alícuota N°1 (mL)	Balón N°2 (mL)	
50.0	100.50	84.00	85.54	84.02	200.0	5.0	20.0	0.1031
80.0	160.80	84.00	85.54		200.0	10.0	25.0	0.1650
100.0	200.95	84.00	85.54		200.0	5.0	10.0	0.2063
120.0	241.20	84.00	85.54		200.0	6.0	10.0	0.2475
150.0	301.50	84.00	85.54		200.0	15.0	20.0	0.3094

Calculos LS | Calculos LM | Linealidad Sistema | **LS Conc. Corregida**

Listo Accesibilidad: es necesario investigar

Fuente: Elaboración Propia

- Hojas estadística para el parámetro de linealidad del sistema

CÁLCULOS DE LINEALIDAD DEL SISTEMA							
ECUACION DE LA RECTA							
Nº	Conc. teórica (mg/mL) Citalcolina sódica	Conc. real ("x") (mg/mL) Citalcolina sódica	Respuesta ("y") (Areas)	x ²	xy	y ²	y = bx + a
1	0.1050	0.1031	653510	0.010637	67399	427075320100	655353
2		0.1031	654063	0.010637	67456	427798407969	655353
3		0.1031	655203	0.010637	67574	429290971209	655353
4	0.1680	0.1650	1050036	0.027230	173272	1102575601296	1052405
5		0.1650	1052103	0.027230	173613	1106920722609	1052405
6		0.1650	1052875	0.027230	173740	1108545765625	1052405
7	0.2100	0.2063	1326281	0.042547	273571	1759021290961	1317107
8		0.2063	1296719	0.042547	267473	1681480164961	1317107
9		0.2063	1320449	0.042547	272368	1743585561601	1317107
10	0.2520	0.2475	1558894	0.061268	385862	2430150503236	1581809
11		0.2475	1596568	0.061268	395187	2549029378624	1581809
12		0.2475	1619165	0.061268	400780	2621695297225	1581809
13	0.3150	0.3094	1981505	0.095731	613085	3926362065025	1978861
14		0.3094	1955955	0.095731	605180	3825759962025	1978861
15		0.3094	1983279	0.095731	613634	3933395591841	1978861
		Σx=	Σy=	Σx ² =	Σxy=	Σy ² =	
		3.0940	19756605	0.712236	4550195	29072686604307	

Simbolo	Valor	Descripción
nº	15	Grados de libertad
t (0.975, n-2)	2.16	Valor t de student
Σx=	3.0940	Sumatoria de "x"
Σy=	19756605	Sumatoria de "y"
Σxy=	4550195	Sumatoria de "xy"
Σx ² =	0.712236	Sumatoria del cuadrado de "x"
Σy ² =	29072686604307	Sumatoria del cuadrado de "y"
x	0.2062691	Promedio aritmético de "x"
y	1317107	Promedio aritmético de "y"
Σax	0.074031678	Sumatoria de la desviación de los cuadrados de "x" respecto de su media
Σay	3.05112E+12	Sumatoria de la desviación de los cuadrados de "y" respecto de su media
Σaxy	475017.9561	Sumatoria de las desviaciones de "x", "y" respecto de su media
b	6416415	Pendiente de la línea de regresión
a	-6401	Intercepto
r	0.999	Coefficiente de correlación
r ²	1.00	Coefficiente de determinación
ΣΣy	3211624758	Sumatoria de los cuadrados de error
Sy _b	15717.76251	Estimador de la desviación poblacional "y" sobre "x"
S _b	57767.28074	Desviación de la pendiente

DETERMINACIÓN DE INTERVALO DE CONFIANZA DE LA PENDIENTE IC(b)=

Criterio de aceptación: IC(b)	Dictamen	Fórmula:		
No debe incluir cero	CONFORME	$IC(b) = b \pm t_{0.975, n-2} s_a$		
		IC(b)=	6541192.114	6291637.461

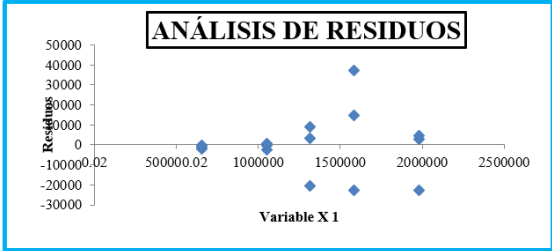
Fuente: Elaboración Propia

- Hojas estadística para el parametro de linealidad del sistema (continuacion)

CÁLCULOS DE LINEALIDAD DEL SISTEMA						
DETERMINACIÓN DE LA REGRESIÓN						
RESUMEN						
	Estadísticas de la regresión	Resultados	Criterio de aceptación	Dictamen		
	Coefficiente de correlación múltiple	0.999	0.995	CONFORME		
	Coefficiente de determinación R ²	1.00	0.98	CONFORME		
	R ² ajustado	0.998866427		INFORMATIVO		
	Error típico	15717.76251		INFORMATIVO		
	Observaciones	15				

DETERMINACIÓN DE ANÁLISIS DE VARIANZA						
ANÁLISIS DE VARIANZA						
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F calculado	Valor crítico de F	Dictamen
Regresión	1	3.04791E+12	3.04791E+12	12337.32521	9.58396E-21	F calculado > F; indica que el modelo es razonable y adecuado
Residuos	13	3211624758	247048058.3			
Total	14	3.05112E+12				

DETERMINACIÓN DE ANÁLISIS DE RESIDUALES						
ANÁLISIS RESIDUALES						
Observación	Pronóstico	Residuos				
1	655352.9483	-1842.948276				
2	655352.9483	-1289.948276				
3	655352.9483	-149.9482759				
4	1052405.379	-2369.37931				
5	1052405.379	-302.3793103				
6	1052405.379	469.6206897				
7	1317107	9174				
8	1317107	-20388				
9	1317107	3342				
10	1581808.621	-22914.62069				
11	1581808.621	14759.37931				
12	1581808.621	37356.37931				
13	1978861.052	2643.948276				
14	1978861.052	-22906.05172				
15	1978861.052	4417.948276				



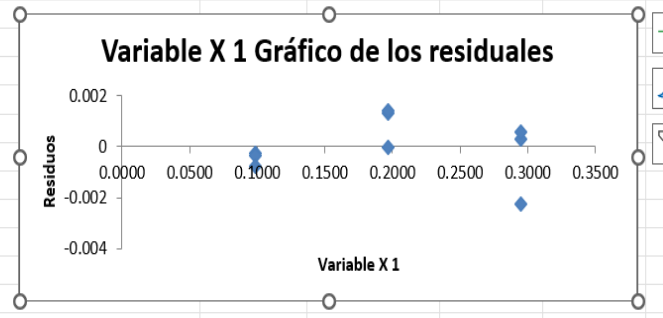
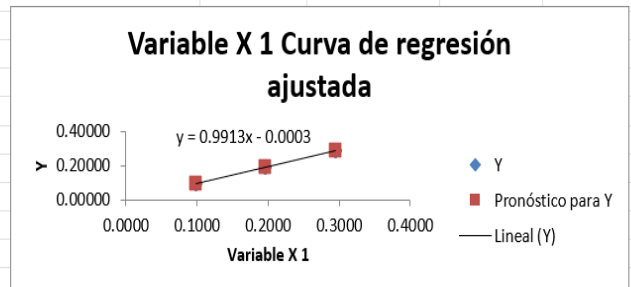
Criterio de aceptación:	Datos aleatorios en gráfico de residuales.
Dictamen:	CONFORME

Fuente: Elaboración Propia

- Hoja resumen del parametro de linealidad del metodo

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	Resumen								
2									
3	Estadísticas de la regresión								
4	Coefficiente de correlación múltiple	0.999911476							
5	Coefficiente de determinación R^2	0.999822959							
6	R^2 ajustado	0.999797667							
7	Error típico	0.00119924							
8	Observaciones	9							
9									
10	ANÁLISIS DE VARIANZA								
11		<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>			
12	Regresión	1	0.056853839	0.056853839	39531.85871	2.14892E-14			
13	Residuos	7	1.00672E-05	1.43818E-06					
14	Total	8	0.056863906						
15									
16		<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>superior 95.0%</i>
17	Intercepción	-0.000258942	0.00105765	-0.244827852	0.813611737	-0.002759887	0.002242	-0.00275989	0.002242
18	Variable X 1	0.991264229	0.004985581	198.8262023	2.14892E-14	0.979475202	1.00305326	0.9794752	1.00305326

19			
20			
21			
22	Análisis de los residuales		
23			
24	<i>Observación</i>	<i>Pronóstico para Y</i>	<i>Residuos</i>
25	1	0.097083955	-0.00026424
26	2	0.097091407	-0.000348747
27	3	0.097083955	-0.000759442
28	4	0.194426853	0.00131427
29	5	0.194449208	0.001433685
30	6	0.194426853	-2.96679E-06
31	7	0.291777202	-0.002257122
32	8	0.29176975	0.000318894
33	9	0.29176975	0.000565669
34			
35			
36			
37			
38			
39			
40			
41			



Fuente: Elaboración Propia

- Hoja de determinación de concentraciones para el parámetro de linealidad del método

23											
24	En donde:										
25	%P:	99.8	Porcentaje de pureza (%)								
26	%H:	1.6	Porcentaje de humedad (%)								
27	100	Factor para determinación de la concentración en miligramos por mililitros (mg/mL) y el peso teórico corregido en miligramos (mg) del estándar de referencia									
28	Pst R:	Peso real en miligramos (mg)									
29	Pst T:	Peso teórico en miligramos (mg)									
30	488.32	Peso molecular de Citicolina (anhídrica) en gramos moles (g/mol)									
31	510.31	Peso molecular de Citicolina sódica (humedad) en gramos moles (g/mol)									
32											
33	Linealidad del método con Placebo adicionado (Principio activo más Placebo)					<i>Cascada de dilución</i>					
34	% teórico	Conc teórica (mg/mL) Citicolina	Peso teórico Pst T (mg) Citicolina sódica	Peso teórico corregido (mg) Citicolina sódica	Peso real Pst R (mg) Citicolina sódica	Balón N°1 (mL)	Alicuota N°1 (mL)	Placebo (mg)	Balón N°2 (mL)	Conc. Real N°1 mg/mL (x) Citicolina sódica	Conc. Real N°1 mg/mL (x) Citicolina (anhídrica)
35	50.0	0.1000	130.63	130.89	130.63	50.0	1.00	36.76	25.0	0.1026	0.0982
36	50.0	0.1000		130.89	130.64	50.0	1.00	36.77	25.0	0.1026	0.0982
37	50.0	0.1000		130.89	130.63	50.0	1.00	36.75	25.0	0.1026	0.0982
38	100.0	0.2000	261.26	261.78	261.26	50.0	1.00	73.51	25.0	0.2052	0.1964
39	100.0	0.2000		261.78	261.29	50.0	1.00	73.53	25.0	0.2053	0.1964
40	100.0	0.2000		261.78	261.26	50.0	1.00	73.54	25.0	0.2052	0.1964
41	150.0	0.3000	391.89	261.78	391.90	50.0	1.00	110.26	25.0	0.3079	0.2946
42	150.0	0.3000		261.78	391.89	50.0	1.00	110.25	25.0	0.3079	0.2946
43	150.0	0.3000		261.78	391.89	50.0	1.00	110.25	25.0	0.3079	0.2946
44											
45	Determinación de la concentración recuperada en miligramos por mililitros Cr (mg/mL)										
46	Fórmula: Determinación de concentración recuperada en miligramos por mililitros Cr (mg/mL) de las soluciones										
47	$Cr \text{ (mg/mL) ("y")} = \left(\frac{Au}{As} \times Cs \right) \times \frac{488.32 \text{ g/mol}}{510.31 \text{ g/mol}}$										
48											
49											
50											
51	En donde:										
52	Au	Área de la solución muestra del nivel correspondiente									
53	As	Área promedio de las soluciones de referencias de los niveles correspondientes en Linealidad del Sistema									
54	Cs	Concentración promedio de las soluciones de referencias de los niveles correspondientes en Linealidad del Sistema									
55											
56	<i>Linealidad del Sistema</i>				<i>Linealidad del método (exactitud)</i>						
57	Nivel (%)	Conc. de las soluciones estándares (mg/mL) como Citicolina sódica	Respuesta	Nivel (%)	Respuesta	Concentración (mg/mL) Adicionada Citicolina (anhídrica)	Concentración (mg/mL) Recuperada Citicolina (anhídrica)				
58	50.0	0.1031	654259	50.0	642073	0.0982	0.09682				
59					641562	0.0982	0.09674				
60					638789	0.0982	0.09632				
61	100.0	0.2063	1314483	100.0	1303369	0.1964	0.19574				
62					1304313	0.1964	0.19588				
63					1294598	0.1964	0.19442				
64	150.0	0.3094	1973580	150.0	1929935	0.2946	0.28952				
65					1947057	0.2946	0.29209				
66					1948702	0.2946	0.29234				

Fuente: Elaboración Propia

- Hojas estadística para el parámetro de linealidad del método

CÁLCULOS DE LINEALIDAD DEL MÉTODO - EXACTITUD							% Recuperación (y/x)	Dictamen
Conc teórica (mg/mL) Citicolina	"x" Conc.adicionada (mg/mL) Citicolina (anhídrica)	"y" Conc.recuperada (mg/mL) Citicolina (anhídrica)	x ²	xy	y ²	y = bx + a		
0.1000	0.0982	0.09682	0.01	0.01	0.01	0.10	98.6	CONFORME
	0.0982	0.09674	0.01	0.01	0.01	0.10	98.5	CONFORME
	0.0982	0.09632	0.01	0.01	0.01	0.10	98.1	CONFORME
0.2000	0.1964	0.19574	0.04	0.04	0.04	0.19	99.7	CONFORME
	0.1964	0.19588	0.04	0.04	0.04	0.19	99.7	CONFORME
	0.1964	0.19442	0.04	0.04	0.04	0.19	99.0	CONFORME
0.3000	0.2946	0.28952	0.09	0.09	0.08	0.29	98.3	CONFORME
	0.2946	0.29209	0.09	0.09	0.09	0.29	99.1	CONFORME
	0.2946	0.29234	0.09	0.09	0.09	0.29	99.2	CONFORME
suma	Σx=	Σy=	Σx ² =	Σxy=	Σy ² =			
	1.77	1.75	0.41	0.40	0.40	Σ(y/x)=	890.2	
						Promedio (\bar{x})	98.9	
						Desviación estándar (s)	0.6	
						Porcentaje de variación (%CV)	0.6	

Página 1

Valor	Descripción
9	Grados de libertad
2.365	Valor t de student
1.77	Sumatoria de "x"
1.75	Sumatoria de "y"
0.40	Sumatoria de "xy"
0.41	Sumatoria del cuadrado de "x"
0.40	Sumatoria del cuadrado de "y"
0.19640569	Promedio aritmético de "x"
0.194430227	Promedio aritmético de "y"
0.057860332	Sumatoria de la desviación de los cuadrados de "x" respecto de su media
0.056865255	Sumatoria de la desviación de los cuadrados de "y" respecto de su media
0.057355554	Sumatoria de las desviaciones de "x", "y" respecto de su media
0.9913	Pendiente de la línea de regresión
-0.0003	Intercepto
1.00	Coefficiente de determinación
1.00758E-05	Sumatoria de los cuadrados de error
0.001199751	Estimador de la desviación poblacional "y" sobre "x"
0.004987704	Desviación de la pendiente
0.0010581	Desviación del intercepto
0.6171	Coefficiente de variación corregido "y/x"

Fuente: Elaboración Propia

- Hojas estadística para el parámetro de linealidad del método (continuación)

50
51 **DETERMINACIÓN DE INTERVALO DE CONFIANZA DE LA MEDIA POBLACIONAL IC(μ)=**

53 Criterio de aceptación:	Dictamen
54 se incluye dentro del intervalo ó	-
56 obtenido del porcentaje de recobro se incluye el intervalo.	CONFORME

Fórmula:		
$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975} n - 1 \frac{S}{\sqrt{n}}$		
IC(μ)=	99.36	98.46

61 **DETERMINACION DE INTERVALO DE CONFIANZA DE LA PENDIENTE IC(b)=**

63 Criterio de aceptación: IC(b)	Dictamen
64 Debe incluir la unidad	CONFORME

Fórmula:		
$IC(b) = b \pm t_{0.975} n - 2 sb$		
IC(b)=	1.003	0.979

70 **DETERMINACIÓN DE INTERVALO DE CONFIANZA DEL INTERCEPTO IC(a)=**

72 Criterio de aceptación: IC(a)	Dictamen
73 Debe incluir el cero	CONFORME

Fórmula:		
$IC(a) = a \pm t_{0.975} n - 2 sa$		
IC(a)=	0.0022	-0.003

78 **DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (r²)**

Determinación	Criterio de aceptación:	Resultados	Dictamen:
Coefficiente de determinación (r ²)	0.98	1.00	CONFORME

85 **DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN**

Determinación	Criterio de aceptación:	Resultados	Dictamen:
Porcentaje de recuperación:	98.0 102.0	98.9	CONFORME

Fuente: Elaboración Propia

- Hoja de calculo para la determinacion de concentraciones de estandar secundario

11	ANALISTA N°1		
12	CÁLCULOS DE PRECISIÓN (REPRODUCIBILIDAD- INTERMEDIA)		
13	Fórmula: Determinación de la concentraciones reales de los estándares de referencias en porcentajes (%)		
14	$Cfp \left(\frac{mg}{mL} \right) \text{ como Citicolina sódica (anhidra)}$ $= \left(\left(\frac{Pst R \times \text{Volumenes de alícuotas realizadas (mL)}}{\text{Volumenes de aforos realizados (mL)}} \times \frac{\%P - \%H}{100} \right) \right)$		
15			
16			
17	Estándar referencia N°1		
18	Pst R (mg):	21.03	Peso real en miligramos (mg)
19	Pst T (mg):	21.00	Peso teórico en miligramos (mg)
20	%P:	99.80	Porcentaje de pureza (%)
21	%H:	1.6	Porcentaje de humedad (%)
22	Cst (mg/mL)	0.2	Concentración real en miligramos por mililitro (mg/mL)
23	Alicuota 1 (mL)	5.0	Página 1 Cascada de dilución del estándar
24	Balón 1 (mL)	50.0	
25	Balón 2 (mL)	10.0	
26			
27	Estándar referencia N°2		
28	Pst R (mg):	21.01	Peso real en miligramos (mg)
29	Pst T (mg):	21.00	Peso teórico en miligramos (mg)
30	%P:	99.8	Porcentaje de pureza (%)
31	%H:	1.6	Porcentaje de humedad (%)
32	Cst (mg/mL)	0.2	Concentración real en miligramos por mililitro (mg/mL)
33	Alicuota 1 (mL)	5.0	Cascada de dilución del estándar
34	Balón 1 (mL)	50.0	
35	Balón 2 (mL)	10.0	
36			
37	Determinación de la concentración real N°1		
38	mg/mL=		0.21

Fuente: Elaboración Propia

- Hoja estadística del parámetro de precisión (repetibilidad y precisión intermedia)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	
20		Fórmula : Determinación del Porcentaje obtenido de Ensayo en la Solución Muestra									
21		$\% = \frac{mg \text{ obtenidos}}{\text{rotulado}} * 100$									
22											
23											
24											
25	En donde:										
26	Amx:	Area de la solución muestra									
27	Ast:	Area de la solución estándar									
28	Cfp:	Concentración final del patrón de Citicolina sódica en miligramos por mililitros (mg/mL)									
29	%	Porcentaje obtenido del ensayo de la solución muestra (%)									
30	Pp:	Peso promedio de los comprimidos en miligramos (mg) (Analista 1)	677.32								
31		Peso promedio de los comprimidos en miligramos (mg) (Analista 2)	680.08								
32	R:	Cantidad que rotula de Citicolina en el producto en miligramos/comprimido							500.0		
33	Pmx:	Peso de la muestra en miligramos (mg)									
34	488.32	Peso molecular de la Citicolina en gramos por moles (g/mol)									
35	510.31	Peso molecular de la Citicolina Sódica en gramos por moles (g/mol)									
36											
37		ANALISTA 1									
38		Estándar de referencia N°1	Area	Concentración (mg/mL)							
39		1	1260336	0.21							
40		2	1258075								
41		3	1262615								
42		4	1262266								
43		5	1263246								
44		Promedio (\bar{x}) :	1261308								
45		Desviación Estándar (s):	2108.3								
46		Coefficiente de variación (%CV):	0.2								
47											
48		Estándar de referencia N°2	Area	Concentración							
49		1	1260821	0.21							
50		2	1261493								
51		3	1261700								
52		4	1261947								
53		5	1261592								
54		Promedio (\bar{x}) :	1261511								
55		Desviación Estándar (s):	421.0								
56		Coefficiente de variación (%CV):	0.0								
57											

Fuente: Elaboración Propia

- Hoja estadística del parámetro de precisión (repetibilidad y precisión intermedia)
(continuación)

ANALISTA 2		
Estándar de referencia N°1	Area	Concentración (mg/mL)
1	2632174	0.21
2	2629746	
3	2629927	
4	2626359	
5	2631009	
Promedio (\bar{x}):	2629843	
Desviación Estándar (s):	2176.5	
Coefficiente de variación (%CV):	0.1	

Estándar de referencia N°2	Area	Concentración
1	2636621	0.21
2	2658882	
3	2659621	
4	2652748	
5	2648697	
Promedio (\bar{x}):	2651314	
Desviación Estándar (s):	9368.4	
Coefficiente de variación (%CV):	0.4	

Precisión Intermedia					
	Muestra	Area	Pmx (mg)	mg	%
Analista 1	1	1307345	338.69	520.7	104.1
	2	1318606	338.66	525.2	105.0
	3	1308998	338.66	521.4	104.3
	4	1311944	338.67	522.5	104.5
	5	1322635	338.69	526.8	105.4
	6	1303134	338.67	519.0	103.8
Analista 2	1	2664482	340.02	509.0	101.8
	2	2668345	340.06	509.7	101.9
	3	2661391	340.07	508.4	101.7
	4	2671465	340.05	510.3	102.1
	5	2681628	340.07	512.2	102.4
	6	2668132	340.08	509.6	101.9
Promedio (\bar{x}):				516.2	103.25
Desviación Estándar (s):				7.0	1.4
Coefficiente de variación (%CV):				1.4	1.4

Fuente: Elaboración Propia

- Hoja estadística del parámetro de precisión (repetibilidad y precisión intermedia) (continuación)

120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135

DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE COEFICIENTE DE VARIACION (%CV)

Precisión: a) Repetibilidad			
Determinación	Criterio de aceptación:	Resultados	Dictamen:
		Analista N°1	
Porcentaje de coeficiente de variación (%CV): Individualmente	≤0.0%	0.6	CONFORME
Determinación	Criterio de aceptación:	Resultados	Dictamen:
		Analista N°2	
Porcentaje de coeficiente de variación (%CV): Individualmente	≤0.0%	0.3	CONFORME
Precisión: b) Intermedia			
Determinación	Criterio de aceptación:	Resultados	Dictamen
		Analista N°1 y Analista N°2	
Porcentaje de coeficiente de variación (%CV): Entre ambos (Analista N°1 y N°2)	≤4.0%	1.4	CONFORME

- Hoja de estadística para el parámetro de Adecuabilidad

ANALISTA N°1									
Estándar de referencia N°1					Estándar de referencia N°2				
N°	Area	Altura	Platos Teóricos (N)	Asimetría (T)	N°	Area	Altura	Platos Teóricos (N)	Asimetría (T)
1	1260336	148500	4256	1.5	1	1260821	148999	4199	1.4
2	1258075	148768	4260	1.4	2	1261493	149133	4207	1.4
3	1262615	148668	4207	1.4	3	1261700	149026	4173	1.4
4	1262266	148730	4198	1.4	4	1261947	149085	4173	1.4
5	1263246	147647	4099	1.4	5	1261592	148809	4157	1.4
Promedio	1261308	148463	4204	1.4	Promedio	1261511	149010	4182	1.4
Desviación Estándar (s)	2108.3				Desviación Estándar (s)	4210			
Porcentaje de variación (%CV)	0.2				Porcentaje de variación (%CV)	0.0			
ANALISTA N°2									
Estándar de referencia N°1					Estándar de referencia N°2				
N°	Area	Altura	Platos Teóricos (N)	Asimetría (T)	N°	Area	Altura	Platos Teóricos (N)	Asimetría (T)
1	2632174	324569	4283	1.3	1	2636621	328123	4264	1.3
2	2629746	323115	4258	1.3	2	2658882	327834	4245	1.3
3	2629927	323946	4264	1.3	3	2659621	327596	4231	1.3
4	2626359	323506	4270	1.3	4	2652748	326403	4214	1.3
5	2631009	324514	4258	1.3	5	2648697	327018	4241	1.3
Promedio	2629843	323930	4267	1.3	Promedio	2651314	327395	4239	1.3
Desviación Estándar (s)	2176.5				Desviación Estándar (s)	9368.4			
Porcentaje de variación (%CV)	0.1				Porcentaje de variación (%CV)	0.4			

Fuente: Elaboración Propia

- Hoja estadística del parámetro estabilidad del sistema

24	En donde:		
25	Amx:	Area de la solución muestra	
26	Ast:	Area de la solución estándar	
27	Cfp:	Concentración final del patrón de Citicolina sódica en miligramos por mililitros (mg/mL)	
28	%	Porcentaje obtenido del ensayo de la solución muestra (%)	
29	Pp:	Peso promedio de los comprimidos en miligramos (mg)	677.32
30	R:	Cantidad que rotula de Citicolina en el producto en miligramos/comprimido	500.0
31	Pmx:	Peso de la muestra en miligramos (mg)	
32	488.32	Peso molecular de la Citicolina en gramos por moles (g/mol)	
33	510.31	Peso molecular de la Citicolina Sódica en gramos por moles (g/mol)	
34			
35			
36			
37			
38	CONDICION INICIAL (0) -Preparación reciente		
39	Estándar de referencia N°1	Area	mg/mL
40	1	1260336	0.21
41	2	1258075	
42	3	1262615	
43	4	1262266	
44	5	1263246	
45	Promedio (\bar{x}) :	1261308	0.21
46	Desviación Estándar (s):	2108.3	
47	Coefficiente de variación (%CV):	0.2	
48			
49	Estándar Secundario N°2	Area	mg/mL
50	1	1260821	0.21
51	2	1261493	
52	3	1261700	
53	4	1261947	
54	5	1261592	
55	Promedio (\bar{x}) :	1261511	0.21
56	Desviación Estándar (s):	421	
57	Coefficiente de variación (%CV):	0.0	
58			
	CONDICION ALMACENAJE (24) -Preparación reciente		
	Estándar de referencia N°1	Area	mg/mL
	1	1242668	0.21
	2	1239110	
	3	1239484	
	4	1243648	
	5	1243715	
	Promedio (\bar{x}) :	1241725	0.21
	Desviación Estándar (s):	2258.7	
	Coefficiente de variación (%CV):	0.2	
	Estándar Secundario N°2	Area	mg/mL
	1	1245865	0.21
	2	1242411	
	3	1246168	
	4	1243062	
	5	1247450	
	Promedio (\bar{x}) :	1244991	0.21
	Desviación Estándar (s):	2155	
	Coefficiente de variación (%CV):	0.2	

Fuente: Elaboración Propia

- Hoja estadística del parámetro estabilidad del sistema (continuación)

REGISTRO DE PESOS

Nº	Pmx R (mg)
1	338.69
2	338.66
3	338.66
4	338.67
5	338.69
6	338.67

RESULTADOS-MUESTRAS

Nº	Muestra Inicial		Muestra despues 24H		98.0%-102.0%
	Area	Criterio de aceptación: % Y0	Area	Criterio de aceptación: % Y1	
1	1307345	104.1	1321146	106.9	102.6
2	1318606	105.0	1325446	107.2	102.1
3	1308998	104.3	1319724	106.8	102.4
4	1311944	104.5	1321636	106.9	102.3
5	1322635	105.4	1306030	105.7	100.3
6	1303134	103.8	1284905	104.0	100.2
Promedio (x̄):	1312110	105	1313148	106	101.7
Desviación Estándar (s):	7293.3	0.6	15354.7	1.2	1.1
Coficiente de variación (%CV):	0.6	0.6	1.2	1.2	1.1
Sumatoria (Σ)		627.11		637.5	609.95

DETERMINACION DE MEDIA ARITMETICA DEL ANALISIS INICIAL Y ALMACENAJE

MEDIA ARITMETICA DEL ANALISIS INICIAL

$$\bar{y}_0 = \frac{\sum y_0}{n_0}$$

Donde:

n₀ = numero de muestras del análisis inicial.
(y₀) = Media aritmética del análisis inicial.

(y₀) = 104.5

MEDIA ARITMETICA DEL ANALISIS ALMACENAJE

$$\bar{y}_1 = \frac{\sum y_1}{n_1}$$

Donde:

n₁ = numero de muestras del análisis de la condición de almacenaje.
(y₁) = Media aritmética de de la condición de almacenaje

(y₁) 24h = 106.3

DETERMINACION DE LA DIFERENCIA ABSOLUTA DE LA CONDICION DE ALMACENAJE CON RESPECTO AL INICIAL

Fórmula: $Idi = \bar{y}_1 - \bar{y}_0$

Donde:

(y₀) = Media aritmética del análisis inicial
(y₁) = Media aritmética de la condición almacenada
idi = Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje con respecto del análisis inicial.

idi 24h = 1.7

Determinación	Criterio de aceptación:	Resultados	Dictamen
idi = Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición	≤ 2.0%	1.7	CONFORME

Fuente: Elaboración Propia

- Hoja estadística del parámetro estabilidad del sistema (continuación)

REGISTRO DE PESOS					
N°	Pst R (mg)	Pst T(mg)			
1	21.03	21.00			
2	21.00				
3	21.00				

RESULTADOS- ESTANDARES					
N°	Muestra Inicial-Estándares		Muestra despues 24H-Estándares		98.0%-102.0%
	Area	Criterio de aceptación: mg/mL Y0	Area	Criterio de aceptación: mg/mL Y1	
1	1257172	0.21	1264492	0.21	100.5
2	1257129	0.21	1262909	0.21	100.3
3	1258485	0.21	1269087	0.21	100.2
4	1262633	0.21	1265688	0.21	99.9
5	1248079	0.21	1259431	0.21	101.1
6	1246807	0.21	1261404	0.21	101.2
Promedio (X̄) :	1255051	0.05	1263835	0	100.5
Desviación Estándar (s):	6239.7	0.6	3394.4	0.0	1.1
Coefficiente de variación (%CV):	0.5	0.6	0.3	0.0	1.1
Sumatoria (Σ)		627.11		637.5	609.95

DETERMINACION DE MEDIA ARITMETICA DEL ANALISIS INICIAL Y ALMACENAJE			
MEDIA ARITMETICA DEL ANALISIS INICIAL $\bar{y}_0 = \frac{\sum y_0}{n_0}$		MEDIA ARITMETICA DEL ANALISIS ALMACENAJE $\bar{y}_i = \frac{\sum y_i}{n_i}$	
Donde: n ₀ = numero de muestras del análisis inicial. (y ₀) = Media aritmética del análisis inicial.		Donde: n _i = numero de muestras del análisis de la condición de almacenaje. (y _i) = Media aritmética de de la condición de almacenaje	
(y ₀) =	104.5	(y _i) 24h =	106.3
DETERMINACION DE LA DIFERENCIA ABSOLUTA DE LA CONDICION DE ALMACENAJE CON RESPECTO AL INICIAL			
Fórmula: $idi = \bar{y}_i - \bar{y}_0$			
Donde: (y ₀) = Media aritmética del análisis inicial (y _i) = Media aritmética de la condición almacenada idi = Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje con respecto del análisis inicial.			
idi 24h =	1.7		
Determinación	Criterio de aceptación:	Resultados	Dictamen
idi = Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición	≤2.0%	1.1	CONFORME

Fuente: Elaboración Propia

- Hojas estadísticas del parámetro Especificidad

11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
103

ESPECIFICIDAD

Especificidad de la Solución Placebo al 100.0% Sin Degradar

N°	%	Respuesta
1	100.0	0
2		0
3		0
4		0

Especificidad de la Solución Placebo al 100.0% Degradacion Termica

N°	%	Respuesta
1	100.0	0
2		0
3		0
4		0

Especificidad de la Solución Placebo al 100.0% Degradacion Oxidativa

N°	%	Respuesta
1	100.0	0
2		0
3		0
4		0

Página 1

Especificidad de la Solución de Producto al 100.0% Sin Degradar

N°	%	Respuesta
1	100.0	1303630
2		1304030
3		1303225
4		1302526

Especificidad de la Solución Principio Activo al 100.0% Degradacion Termica

N°	%	Respuesta
1	100.0	1346198
2		1341032
3		1319319
4		1320057

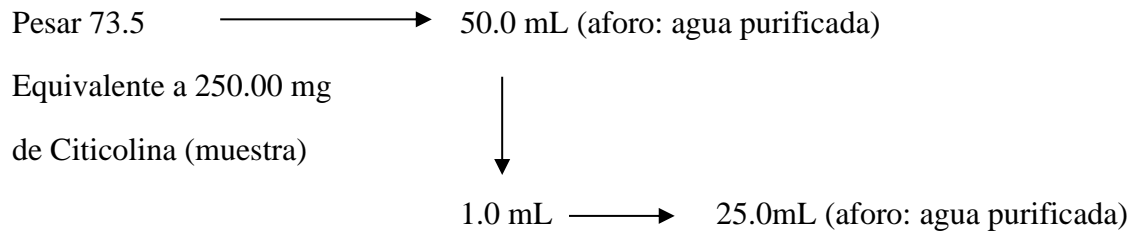
Especificidad de la Solución de Producto al 100.0% Degradacion Oxidativa

N°	%	Respuesta
1	100.0	1311244
2		1311605
3		1308231
4		1306908

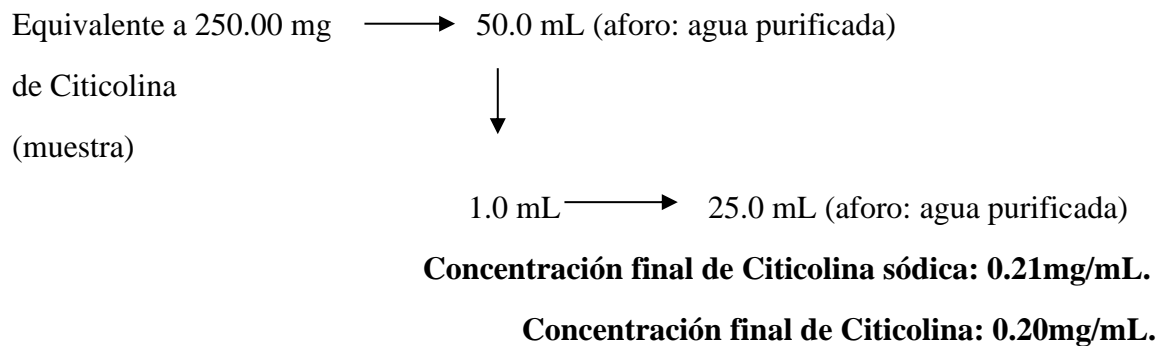
ANEXO N°4

CASCADA DE DILUCIONES DE LOS PARAMETROS DE VALIDACION

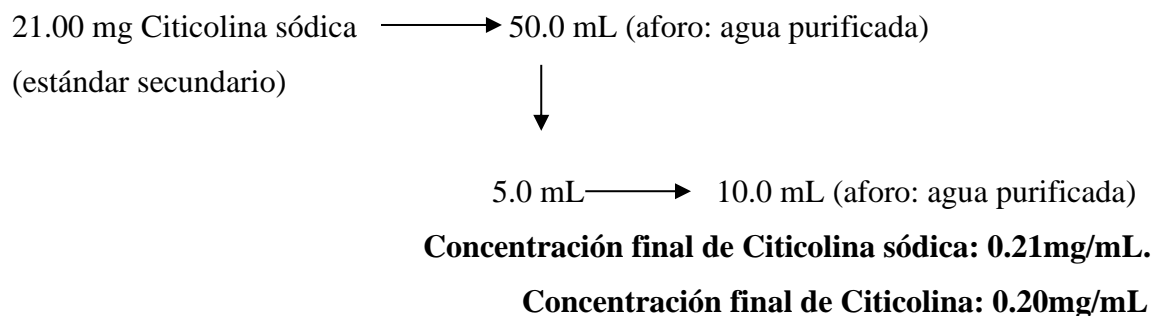
- **Preparación de solución placebo al 100.0%: Sin degradar, degradación termina y degradación Oxidativa**



- **Preparación de solución muestra de producto al 100.0%: Sin degradar, degradación termina y degradación Oxidativa**



- **Solución estándar secundario al 100.0%:**



- **Preparación de solución muestra de producto al 100.0%**

Equivalente a 250.00 mg \longrightarrow 50.0 mL (aforo: agua purificada)
de Citicolina
(muestra) \downarrow

1.0 mL \longrightarrow 25.0 mL (aforo: agua purificada)

Concentración final de Citicolina sódica: 0.21mg/mL.

Concentración final de Citicolina: 0.20mg/mL

ANEXO N°5

IMAGEN DE COLUMNA Y EQUIPO UTILIZADO EN LA VALIDACION

- **Columna Bondapak C18 300 mm x 3.9 mm (10 μ m)**



Fuente: Elaboración Propia

- **Cromatógrafo líquido de alta eficiencia, MERCK HITACHI modelo PRIMAIDE**



Fuente: Elaboración Propia

ANEXO N°7

**REGLAMENTO TÉCNICO CENTROAMERICANO RTCA 11.03.39:06 PRODUCTOS
FARMACÉUTICOS. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA
EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS MEDICAMENTOS.**

ANEXO DE LA RESOLUCIÓN No. 188-2006 (COMIECO-XL)

**REGLAMENTO
TÉCNICO
CENTROAMERICANO**

RTCA 11.03.39: 06

**PRODUCTOS FARMACÉUTICOS. VALIDACIÓN DE
MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA
EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
MEDICAMENTOS**

Correspondencia: No hay correspondencia con ninguna norma internacional

ICS 11.120.01

RTCA 11.03.39:06

Reglamento Técnico Centroamericano editado por:

- **Ministerio de Economía, MINECO**
- **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT**
- **Ministerio de Fomento, Industria y Comercio, MIFIC**
- **Secretaría de Industria y Comercio, SIC**
- **Ministerio de Economía, Industria y Comercio, MEIC**

ANEXO N° 8

**REGLAMENTO TÉCNICO CENTROAMERICANO RTCA 11.01.04:10 PRODUCTOS
FARMACÉUTICOS. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE MEDICAMENTOS PARA
USO HUMANO**

ANEXO DE LA RESOLUCIÓN No. 256-2010 (COMIECO-LIX)

**REGLAMENTO TÉCNICO
CENTROAMERICANO**

RTCA 11.01.04:10

Primera Actualización

**PRODUCTOS FARMACEUTICOS. ESTUDIOS DE
ESTABILIDAD DE MEDICAMENTOS PARA USO
HUMANO**

CORRESPONDENCIA: Este reglamento no tiene correspondencia con ninguna norma internacional.

ICS 11.120.1

RTCA 11.01.04:10

Reglamento Técnico Centroamericano, editado por:

- Ministerio de Economía, MINECO
 - Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT
 - Ministerio de Fomento, Industria y Comercio, MIFIC
 - Secretaría de Industria y Comercio, SIC
 - Ministerio de Economía Industria y Comercio, MEIC
-

ANEXO N° 9

**DECLARACION POR PARTE DE LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL PARA LA SALUD
SOBRE LOS MEDICAMENTOS**



Medicamentos

Cantafio, Fabio Fidel

Abogado, UBA. Actualización en Propiedad Intelectual y en Bioética, Facultad de Derecho, UBA.
Asesor Legal de la ANMAT.

El enfoque de estudio del **medicamento** que se propone, lo capta desde el momento en que se convierte en un producto manufacturado. Esta visión permite analizarlo desde las múltiples disciplinas jurídicas que le son aplicables (v.gr., defensa del consumidor, de la competencia, lealtad comercial) como también, para poner de manifiesto sus características distintivas de otras mercancías. Entre estas últimas se destaca la utilización del medicamento en pro de la salud de las personas cuya fabricación está alcanzada por la esfera de gobierno perteneciente a la salud pública, desde la cual se ha desplegado una profusa reglamentación en todos los Estados del orbe.

Se llega así a la actual caracterización del medicamento como un bien colectivo (o bien social), que define su íntima conexión con la salud y la vida de las personas en su faz individual o existencial, tan indisolublemente ligada a su dimensión social o comunitaria. Otra característica propia del medicamento es su universalidad, en tanto su producción industrial, altamente tecnificada, conforma una de las condiciones materiales para satisfacer las necesidades vitales de los pueblos, en la medida que se corresponda con el derecho al acceso.

Finalmente cabe señalar, por su relevancia, las determinaciones más generales, a saber: la función intrínseca del medicamento (su efecto o actividad), científicamente comprobada, en beneficio de la persona (eficacia), que se vincula, formando un binomio, con su seguridad (aludido en el concepto de “balance riesgo-beneficio”); por último, su calidad que, en su conjunto, lo definen como tal.

La definición de medicamento. A modo de aclaración previa, en la literatura y en los documentos técnicos se emplea el término medicamento y producto farmacéutico o medicinal como sinónimos (y sus palabras en inglés *medicines, drugs* y *pharmaceutical products*).

En una acepción, el **medicamento** es “toda preparación o producto farmacéutico empleado para la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de una enfermedad o estado patológico, o para modificar sistemas fisiológicos en beneficio de la persona a quien se le administra” ([decr. 150/92](#) –texto ordenado, 1993–, art. 1º, inc. a). Con los mismos términos se lo define en el Volumen IV de la Farmacopea Argentina, VII Edición.

La definición anterior de medicamento especifica la legal que incluye en su texto, de modo amplio y visión previsor, a “las drogas, productos químicos, reactivos, formas farmacéuticas, medicamentos, elementos de diagnóstico y *todo otro producto de uso y aplicación en la medicina humana*” (art. 1º, [ley 16.463](#) de medicamentos del año 1964).

Otro concepto importante, el de “**especialidad medicinal o farmacéutica**”, se aplica a todo medicamento fabricado industrialmente y de modo uniforme por los laboratorios farmacéuticos, habilitados especialmente para ello, cuyas notas de “composición cuantitativa definida declarada y verificable, de forma farmacéutica estable y de acción terapéutica comprobable” la definen.

El término **medicamento magistral** se incluye en la [Farmacopea Argentina, VII Edición](#), referido a “todo medicamento prescripto en una receta magistral para un paciente individualizado, posteriormente preparado, envasado y rotulado por un farmacéutico en el laboratorio de su farmacia y dispensado en la misma”. Esta forma de medicamento se diferencia del producto manufacturado.

Retomando la idea del medicamento como producto fabricado industrialmente o en serie, como todos ellos, su existencia como tal comienza con su desarrollo y diseño o concepción y se materializa con su producción (producto final o terminado).