

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA Y
BIOQUÍMICA**



**Validación de un método analítico para la
cuantificación de Diclofenaco Ácido Libre en
Dolfenex® 9mg/5ml Suspensión Oral por
Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC).
Lima - 2012.**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICA**

**Presentado por:
Bach. VELARDE GALINDO, MELINNA SINDY**

**AYACUCHO-PERÚ
2013**

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

R.D. N° 076 – 13 – UNSCH – FCB – D

Bach.: Melinna Sindy VELARDE GALINDO

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde del viernes catorce de junio del año dos mil trece en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas bajo La presidencia del Mg. José Manuel Diez Macavilca en representación del Decano de la Facultad, quien además es jurado calificador, y con la asistencia de los docentes miembros del jurado calificador: Magister Edgar Cárdenas Landeo (Asesor) y Magister Maricela López Sierralta quien además actuará como secretaria docente; para recepcionar la sustentación de tesis "Validación de un método analítico para la cuantificación Diclofenaco Ácido Libre en Dolfenex 9mg/5mL Suspensión Oral por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC). Lima – 2012", y es presentado por la Bachiller en Farmacia y Bioquímica, Señorita Melinna Sindy Velarde Galindo, quien pretende optar el título profesional de Químico Farmacéutica.

El presidente encargado inicia el acto de sustentación solicitando a la secretaria docente (e) la lectura de la Resolución Decanal N° 076 – 13 – UNSCH – FCB – D y revisa la documentación correspondiente en mesa, luego autoriza a la sustentante proceder a la exposición de su trabajo profesional, luego del cuál los miembros proceden a realizar las observaciones, aclaraciones y preguntas que crean por conveniente para realizar la evaluación. Seguidamente el presidente (e) solicita a la sustentante y asistentes que abandonen el auditorio para que la comisión Académica pueda deliberar y emitir la calificación correspondiente como sigue:

| JURADO CALIFICADOR | EXPOSICIÓN | RESPUESTAS | PROMEDIO |
|--------------------------------|------------|------------|----------|
| Mg. José Manuel Diez Macavilca | 19 | 19 | 19 |
| Mg. Maricela López Sierralta | 18 | 18 | 18 |
| Mg. Edgar Cárdenas Landeo | 19 | 19 | 19 |

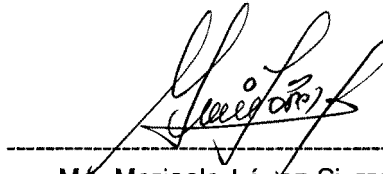
TOTAL= 19

De la evaluación realizada el sustentante obtiene la calificación promedio de Diecinueve (19) de la cual dan fe los miembros del jurado calificador estampando su firma al pie de la presente.

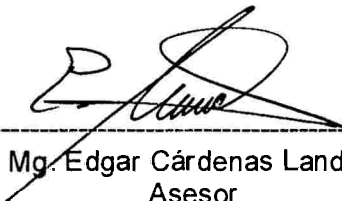
Culmina el Acto de Sustentación siendo las seis de la noche.



Mg. José Manuel Diez Macavilca
Presidente (e)
Miembro calificador



Mg. Maricela López Sierralta
Secretaria Docente (e)
Miembro calificador



Mg. Edgar Cárdenas Landeo
Asesor
Miembro calificador

DEDICATORIA

A mi madre Yeni María Galindo Vilchez,

A mi segunda madre Lizbeth Galindo.

A mi papá, mi hermana, mis abuelitos y,
tíos.

AGRADECIMIENTOS

A mi *alma mater* la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por acogernos en sus aulas y forjarnos como profesionales con visión y líderes para un mundo competitivo.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica, a todos los docentes y personal administrativo quienes la integran pues cada uno de ellos aportó en nuestra formación académica, y nos enseñaron que la vida universitaria es sacrificada, pero trae grandes satisfacciones.

A mis asesores Mg. Q.F. Edgar Cárdenas Landeo y Q.F. Jonh Huamán Ccopa por sus orientaciones y enseñanzas impartidas para el desarrollo de este proyecto.

Al Instituto Quimioterápico S.A "IQFARMA", por brindarme las facilidades para desarrollar el presente trabajo.

Al Q.F. Franmax Romero Leiva, por su paciencia, constancia y enseñanzas que permitió la elaboración del presente proyecto.

ÍNDICE GENERAL

| | Página |
|---|--------|
| DEDICATORIA | ii |
| AGRADECIMIENTOS | iii |
| ÍNDICE GENERAL | iv |
| ÍNDICE DE TABLAS | v |
| ÍNDICE DE FIGURAS | vi |
| ÍNDICE DE ANEXOS | vii |
| RESUMEN | x |
| I. INTRODUCCIÓN | 01 |
| II. MARCO TEÓRICO | 03 |
| 2.1. Antecedentes | 03 |
| 2.2. Validación | 04 |
| 2.3. Parámetros de validación de métodos analíticos | 08 |
| 2.4. Cromatografía líquida de alta performance | 13 |
| 2.5. Suspensión | 14 |
| 2.6. Diclofenaco ácido libre | 14 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 17 |
| 3.1. Lugar de ejecución | 17 |
| 3.2. Población | 17 |
| 3.3. Muestra | 17 |
| 3.4. Sistema de muestreo | 17 |
| 3.5. Tipo de investigación | 17 |
| 3.6. Diseño metodológico para la recolección de datos | 18 |
| 3.7. Análisis de datos | 22 |
| IV. RESULTADOS | 30 |
| V. DISCUSIÓN | 37 |
| VI. CONCLUSIONES | 45 |
| VII. RECOMENDACIONES | 46 |
| VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 47 |
| ANEXOS | 50 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Página |
|--|--------|
| Tabla 01. Características de desempeño para la validación de métodos analíticos | 08 |
| Tabla 02. Porcentaje de recuperación de diclofenaco ácido libre en función de la cantidad agregada. Lima - 2012. | 32 |
| Tabla 03. Porcentaje de recuperación de diclofenaco ácido libre en Dolfenex® 9mg/5ml. Lima - 2012. | 33 |
| Tabla 04. Recuperación de diclofenaco ácido libre en Dolfenex® 9mg/5ml por dos analistas diferentes. Lima - 2012. | 34 |
| Tabla 05. Porcentaje de recuperación de diclofenaco ácido libre en Dolfenex® 9mg/5ml disminuyendo el flujo a 0,6 ml/min. Lima -2012. | 35 |
| Tabla 06. Selectividad del método según tiempo de retención del diclofenaco ácido libre en Dolfenex® 9mg/5ml. Lima – 2012. | 36 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| Figura 01. Estructura molecular del diclofenaco ácido libre. | 15 |
| Figura 02. Recta de regresión lineal concentración versus área bajo la curva de las soluciones estándar de diclofenaco ácido libre. Lima -2012. | 31 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | Página |
|--|--------|
| Anexo 01. Técnica analítica a validar. IQFARMA, Lima – 2012. | 51 |
| Anexo 02. Protocolo de análisis de materia prima para el diclofenaco ácido libre. IQFARMA, Lima 2012. | 53 |
| Anexo 03. Resultados de los parámetros estadísticos de la linealidad. | 54 |
| Anexo 04. Niveles de concentración del estándar de diclofenaco ácido libre según muestras. | 55 |
| Anexo 05. Cromatograma del estándar de diclofenaco ácido libre a una concentración de 50%. | 56 |
| Anexo 06. Cromatograma del estándar de diclofenaco ácido libre a una concentración de 75 | 57 |
| Anexo 07. Cromatograma del estándar de diclofenaco ácido libre a una concentración de 100%. | 58 |
| Anexo 08. Cromatograma del estándar de diclofenaco ácido libre a una concentración de 125%. | 59 |
| Anexo 09. Cromatograma del estándar de diclofenaco ácido libre a una concentración de 150%. | 60 |
| Anexo 10. Áreas cromatográficas y tiempos de retención del estándar de diclofenaco ácido libre. | 61 |
| Anexo 11. Test estadístico de Cochran en función al porcentaje de muestra recuperada. | 62 |
| Anexo 12. Cromatograma del estándar de diclofenaco ácido libre a una concentración de 100% de la exactitud del método. | 63 |
| Anexo 13. Cromatograma de la concentración al 80% de la exactitud del método. | 64 |
| Anexo 14. Cromatograma de la concentración al 100% de la exactitud del método. | 65 |
| Anexo 15. Cromatograma de la concentración al 120% de la exactitud del método. | 66 |

| | |
|---|----|
| Anexo 16. Áreas cromatográficas y tiempos de retención de la exactitud del método. | 67 |
| Anexo 17. Cromatograma del estándar de diclofenaco ácido libre a una concentración de 100% de la repetibilidad del método. | 68 |
| Anexo 18. Cromatograma de la muestra de Dolfenex® 9mg/5ml suspensión oral (lote: P-1105122) a una concentración de 100%. | 69 |
| Anexo 19. Áreas cromatográficas y tiempos de retención de la repetibilidad del método. | 70 |
| Anexo 20. Cromatograma del estándar de diclofenaco ácido libre preparada por otro analista. | 71 |
| Anexo 21. Cromatograma de la muestra de Dolfenex® 9mg/5ml suspensión oral (lote: P-1105122) preparada por otro analista. | 72 |
| Anexo 22. Áreas cromatográficas y tiempos de retención de la precisión intermedia del método. | 73 |
| Anexo 23. Cromatograma del estándar de diclofenaco ácido libre variando el flujo a la mitad (0,6 ml/min) de la robustez del método. | 74 |
| Anexo 24. Cromatograma de la muestra de Dolfenex® 9mg/5ml suspensión oral (lote: P-1105122) de la robustez del método. | 75 |
| Anexo 25. Áreas cromatográficas y tiempos de retención de la robustez del método. | 76 |
| Anexo 26. Orden de manufactura para el piloto de Dolfenex® 9mg/5ml, lote: P-1105122. | 77 |
| Anexo 27. Cromatograma del estándar de diclofenaco ácido libre de la selectividad del método. | 78 |
| Anexo 28. Cromatograma del placebo de Dolfenex® 9mg/5ml suspensión oral de la selectividad del método. | 79 |

| | |
|---|----|
| Anexo 29. Cromatograma de la muestras de Dolfenex® 9mg/5ml (lote: P-1105122) de la selectividad del método. | 80 |
| Anexo 30. Cromatogramas de la goma xantan y avicel RC 591 (excipientes de la matriz) de la selectividad del método. | 81 |
| Anexo 31. Cromatogramas del sodio fosfato dibásico anhidro y ácido cítrico (excipientes de la matriz) de la selectividad del método. | 82 |
| Anexo 32. Cromatogramas del acesulfame potásico y sorbitol 70% (excipientes de la matriz) de la selectividad del método. | 83 |
| Anexo 33. Cromatogramas de la esencia de tutti fruti y butilhidroxianisol (BHA) (excipientes de la matriz) de la selectividad del método. | 84 |
| Anexo 34. Cromatogramas del propilenglicol y simeticona al 30% (excipientes de la matriz) de la selectividad del método. | 85 |
| Anexo 35. Cromatogramas del metilparabeno y propilparabeno (excipientes de la matriz) de la selectividad del método. | 86 |
| Anexo 36. Identificación de picos cromatograficos, en el cromatograma de la muestra de Dolfenex® 9mg/5ml | 87 |
| Anexo 37. Matriz de consistencia. | 88 |

RESUMEN

La validación de un método analítico es parte integral del sistema de control de calidad, puesto que métodos validados conducen a resultados precisos y exactos. Además la validación de métodos es una exigencia de la Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas (DIGEMID) contemplada en el manual de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM).

El presente trabajo se propone validar el método analítico por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para la cuantificación de diclofenaco ácido libre en Dolfenex® 9mg/5ml suspensión oral, debido a que este principio activo no se encuentra contemplado en ninguna monografías oficiales como la farmacopea de los Estados Unidos (USP) o farmacopea Británica (BP), el presente estudio descriptivo se realizó en el área de investigación y desarrollo del Instituto Quimioterápico S.A. (IQFARMA), entre los meses de agosto a diciembre de 2012.

Se estableció los parámetros de validación de acuerdo a lo planteado en la farmacopea de los Estados Unidos (USP 35 – NF 30) para la categoría I, siguiendo la metodología propuesta por la international conference on harmonization (ICH), siendo estos: linealidad, exactitud, precisión, robustez y selectividad. Se determinó la linealidad del sistema en el intervalo de 50% a 150%, obteniéndose la siguiente ecuación: $y = 8\,465,849x + 43,923$ y un coeficiente de determinación ($r^2 = 0,997$) concluyendo que el método es lineal; para la exactitud se obtuvo un porcentaje de recuperación (100,219%) que no presentó diferencia significativa con el 100%, en la precisión se obtuvo un coeficiente de variación (CV = 0,235%) que evidencia resultados repetitivos y en la precisión intermedia se obtuvo coeficiente de variación (CV = 0,247%); para dos analistas diferentes, El método es robusto porque presentó un coeficiente de variación (CV= 0,239%), frente a la modificación del flujo a la mitad (0,6 ml/min); y finalmente el método es selectivo porque permite el análisis del principio activo sin la interferencia de los excipientes de la formulación.

Se concluye que el método analítico para la cuantificación de diclofenaco ácido libre en Dolfenex® 9mg/5ml suspensión oral, esta validado por cumplir con los parámetros de validación propuestos por la farmacopea de los Estados Unidos (USP 35 – NF 30)

Palabras Claves: Validación, Cromatografía, Diclofenaco.

I. INTRODUCCIÓN

El fin de la industria farmacéutica siempre ha sido producir medicamentos de calidad y con total garantía, y es en el avance para conseguir un total dominio de la calidad cuando surge el concepto de validación.

La validación, busca obtener evidencia documentada de que un procedimiento conducirá con un alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de especificaciones de calidad establecidos. Además en el mercado farmacéutico existen varios medicamentos cuyas métodos analíticos, no se encuentran publicados en obras oficiales como la farmacopea de los Estados Unidos (USP) o farmacopea Británica (BP), lo cual hace necesario el desarrollo y validación de estos métodos.

Por otra parte, la validación de métodos analíticos se realiza para cumplir las exigencias de la Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas (DIGEMID) contemplada en el artículo 176° del manual de buenas prácticas de manufactura de productos farmacéuticos (BPM), el cual a su vez se rige a reglamentaciones internacionales dadas por la Food and Drug Administration (FDA), Organización Mundial de la Salud (OMS), International Conference on Harmonization (ICH).

En el presente trabajo se valida el método analítico para la cuantificación de

diclofenaco ácido libre en Dolfenex® 9mg/5ml suspensión oral siguiendo los lineamientos propuestos por la farmacopea de los Estados Unidos (USP 35 – NF 30) y la International Conference on Harmonization (ICH Q2(R1)), usando la cromatografía líquida de alta performance por ser una técnica muy sensible, de fácil adaptación a determinaciones cuantitativas exactas, y presenta idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo por su gran aplicabilidad a sustancias que son de interés en la industria.¹

La validación del método se realizó en el área de investigación y desarrollo del Instituto Quimioterápico S.A. (IQFARMA), entre los meses de agosto – diciembre de 2012; desarrollando los siguientes parámetros de validación: linealidad; exactitud; precisión; robustez y selectividad.

La presente investigación, busca dejar evidencia documentada y a su vez aportar conocimientos que pueden ser aplicados en las áreas de control de calidad de los diferentes laboratorios farmacéuticos; planteándonos los siguientes objetivos:

Objetivo General

Validar el método analítico por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para la cuantificación de diclofenaco ácido libre en Dolfenex® 9mg/5ml suspensión oral.

Objetivos Específicos

Determinar que el método analítico cumpla con los parámetros de validación propuestos (linealidad, exactitud, precisión, robustez y selectividad), en las condiciones descritas y así obtener pruebas documentales para la cuantificación de diclofenaco ácido libre en una suspensión oral.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

El desarrollo y validación de técnicas analíticas para materias primas y/o productos terminados es una tarea que se viene realizando en diferentes laboratorios farmacéuticos en los últimos años, debido a las exigencias de calidad y a la mejora de la productividad. Es así que la validación de técnicas analíticas establece la evidencia documentada de que un procedimiento analítico conducirá con un alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos, motivo por el cual se han desarrollado diversos trabajos de investigación:

En la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Azaña y Cornelio² han investigado sobre el desarrollo y validación de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para cuantificar clonixinato de lisina 125 mg y pargeverina clorhidrato 10 mg en tabletas recubiertas, demostrando que esta técnica analítica cumple con los parámetros de desempeño de la validación.

En la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Enciso³ realizó el trabajo de investigación sobre la validación prospectiva de la técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para el Pectoflem® Jarabe,

demostrando que la técnica analítica cumple con los parámetros de validación como selectividad, linealidad, exactitud y precisión, para la cuantificación de dextrometorfano bromhidrato y guaifenesina.

Bellido,⁴ realizó el desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para la determinación cuantitativa del ambroxol clorhidrato en jarabe, indicando que el método por HPLC es adecuado para la cuantificación del ambroxol clorhidrato en un jarabe.

Así como también Flores,⁵ realizó el desarrollo y validación de la técnica analítica por cromatografía líquida de alta eficiencia (H.P.L.C.) para la determinación de contenido de vitamina D₃ colecalciferol en una suspensión oral indicando que dicha técnica cumple las especificaciones y parámetros de validación.

2.2. Validación

La validación consiste en establecer evidencia documentada que proporciona un alto grado de seguridad de que un proceso específico conducirá consistentemente a un producto que cumpla con sus especificaciones y atributos de calidad predeterminados.⁶

2.2.1. Validación de métodos analíticos

La validación es el establecimiento de la evidencia documentada 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.⁷

Según la USP 35 – NF 30,⁸ la validación de un procedimiento analítico es el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumple los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.

Según Aguirre, *et al.*,⁷ las razones para justificar la validación de métodos analíticos son:

- Demostrar que los métodos son adecuados a los análisis propuestos en las condiciones descritas. La validación es la herramienta que permite obtener las pruebas documentales al respecto.
- Trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados, lo cual a su vez minimizará el número de fallas y repeticiones permitiendo un importante ahorro de costes.
- La validación es también un paso o requisito previo de los procesos de transferencia de métodos analíticos.
- Cumplir con las exigencias de la Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas (DIGEMID), la cual se contempla en el artículo 176° del Manual de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) de productos farmacéuticos.⁹

2.2.2. Tipos de validaciones

Validación prospectiva

Se realiza cuando la verificación del cumplimiento de las condiciones establecidas para un proceso o método analítico se lleva a cabo antes de la comercialización del producto. Este tipo de validación se aplica cuando se elabora un nuevo método analítico, es típico de los laboratorios de investigación y desarrollo, y se realiza de acuerdo con un protocolo perfectamente planificado; comprende el estudio de todos los criterios necesarios para demostrar el buen funcionamiento del método.⁷

Validación retrospectiva

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

comercializado, se aplica a métodos no validados previamente y de los que se tiene una amplia historia de resultados.⁷

Está basado principalmente en la revisión y análisis de la información histórica del mismo, se realiza en productos que se encuentran en el mercado cuyo proceso de manufactura se considera estable y cuando las características del producto, económicamente no justifica hacer una validación prospectiva o concurrente.¹⁰

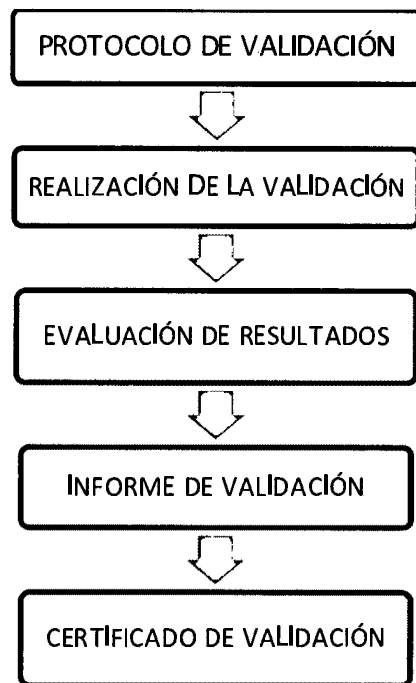
Revalidación

La revalidación de un método analítico consiste en repetir de forma total o parcial su validación, ya sea debido a modificaciones del método, equipos, en la muestra a analizar, etc., para garantizar la obtención de resultados fiables.⁷

La repetición de la validación de cambios de un proceso se da para proporcionar la seguridad de que los cambios introducidos en el mismo, de acuerdo al procedimiento de cambios no afectaran adversamente las características del proceso ni la calidad del producto.¹¹

2.2.3. Documentación de la validación

La documentación es parte esencial de la validación, esta tiene por objetivo definir las especificaciones de todos los materiales y métodos empleados, asegura que las personas autorizadas posean toda la información necesaria para decidir la aprobación de la validación. El diseño y uso de un documento depende del fabricante. La documentación debe estar diseñada de acuerdo con el proceso, sistema o producto específico. Se comienza con un protocolo y se culmina con un informe técnico.⁷



2.2.4. Categorías para validar

Según la farmacopea de los Estados Unidos (USP 35 – NF 30), los requisitos de las pruebas farmacopeicas varían desde determinaciones analíticas muy rigurosas hasta evaluaciones subjetivas de atributos. Considerando esta amplia variedad, es lógico que diferentes procedimientos de prueba requieran diferentes esquemas de validación,⁸ por lo cual se presentan las diferentes categorías a continuación:

Categoría I

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

Categoría II

Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación de productos farmacéuticos terminados.

Estos procedimientos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.

Categoría III

Procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño (Ej., disolución, liberación de fármacos, etc.).

Categoría IV

Pruebas de identificación.

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

Tabla 01. Características de desempeño para la validación de métodos analíticos.

| Características de desempeño analítico | Categoría I | Categoría II | | Categoría III | Categoría IV |
|--|-------------|------------------------|-------------------|---------------|--------------|
| | | Análisis cuantitativos | Pruebas de límite | | |
| Exactitud | Sí | Sí | * | * | No |
| Precisión | Sí | Sí | No | Sí | No |
| Especificidad | Sí | Sí | Sí | * | Sí |
| Límite de Detección | No | No | Sí | * | No |
| Límite de Cuantificación | No | No | No | * | No |
| Linealidad | Sí | Sí | No | * | No |
| Intervalo | Sí | Sí | * | * | No |

Fuente: USP 35– NF 30, 2012⁸

(*) Puede requerirse, depende de la naturaleza de la prueba específica.

2.3. Parámetros de validación de métodos analíticos

2.3.1. Linealidad

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales a la concentración del analito en muestras dentro de un intervalo dado. El objetivo es obtener un modelo que describa con precisión la relación concentración en función de la respuesta.⁸

Capacidad del método de proporcionar resultados que son directamente

proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro del rango establecido.⁷

Consideraciones para la determinación de la linealidad

Para evaluar la linealidad existen unos criterios mínimos aplicables a cualquier procedimiento, como señala Aguirre *et al.*⁷

- Dentro de un rango establecido se recomienda estudiar al menos cinco niveles de concentración y analizarlas por triplicado. Estadísticamente lo correcto sería analizar a las muestras de forma aleatoria, no obstante, se establece como criterio práctico analizarlas en sentido creciente de concentración.
- El número de repeticiones de cada muestra (el número de inyecciones en HPLC) dependerá de la precisión del sistema instrumental empleado, y de lo que se decida incluir en el procedimiento analítico a validar.

2.3.2. Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero. La exactitud de un procedimiento analítico debe establecerse en todo su intervalo.⁸

Es la capacidad del método analítico para proporcionar resultados lo más cercano posible al valor teórico o nominal. Matemáticamente se expresa como el valor numérico del error sistemático (diferencia entre el valor medio hallado y el verdadero) o bien como el valor porcentual.⁷

Consideraciones para la determinación de la exactitud

La exactitud debe demostrarse en todo el rango especificado para el método analítico. Se recomienda un mínimo de nueve determinaciones sobre tres niveles de concentración del analito que cubran el rango especificado, que podrían ser la concentración central y las concentraciones en los extremos del rango. En

función del tipo de método a validar y de cada caso concreto se deberá tener en cuenta el rango de concentración de trabajo.⁷

- Riqueza del principio activo en materia prima o en producto acabado: 80-120%.
- Impurezas: desde el 50% del nivel de especificación hasta el 120% de dicho nivel.

Ensayo de disolución: si se trata de un producto de liberación inmediata sería de Q-20% a Q+20%; si se trata de un producto de liberación controlada, sobre cada límite de disolución en cada periodo de tiempo se aplicaría ($\pm 20\%$).⁷

2.3.3. Selectividad

Es la capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultáneamente o separadamente los analitos de interés, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que estén presentes en la muestra.⁷

Frecuentemente el término “especificidad” se usa como sinónimo de esta, aunque debería reservarse para aquellas situaciones donde la respuesta obtenida solo se puede producir con una única entidad química; por eso el término selectividad es normalmente apropiado.⁷

Los documentos de la International Conference on Harmonization (ICH) definen “especificidad” como la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz.⁸

- Pruebas de identificación: garantiza la identidad del analito.
- Pruebas de pureza: garantiza que todos los procedimientos analíticos efectuados permiten declarar con exactitud el contenido de impurezas del analito.

2.3.4. Robustez

La robustez de un procedimiento analítico es la medida de su capacidad para no ser afectado por variaciones pequeñas, aunque deliberadas, en los parámetros del procedimiento indicado en la documentación y provee una indicación de su aptitud durante condiciones normales de uso, esta puede determinarse durante la etapa de desarrollo de un procedimiento analítico.⁸

La International Conference on Harmonization (ICH), define la robustez de un método analítico como la medida de su capacidad para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando idea de su fiabilidad de “estabilidad” durante su empleo en rutina.¹²

Es por tanto la capacidad que demuestra el procedimiento de análisis para proporcionar resultados validados en presencia de pequeños cambios respecto de las condiciones descritas en el método, susceptibles de producirse durante su utilización.⁷

2.3.5. Precisión

La precisión de un procedimiento analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica un procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. La precisión de un procedimiento analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de medidas. La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad del procedimiento analítico en condiciones normales de operación.⁸

Es decir la precisión expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra

homogénea en las condiciones descritas, se puede estudiar en tres niveles.⁷

2.3.5.1. Repetibilidad

Se refiere a la utilización del procedimiento analítico en un laboratorio durante un periodo corto por el mismo analista con el mismo equipo.⁸

Evalúa la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (aparatos, reactivos, analistas) en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.⁷

2.3.5.2. Precisión intermedia

También conocida como tolerancia o fortaleza, expresa la variación dentro de un laboratorio por ejemplo en diferentes días con diferentes analistas o con equipos diferentes dentro del mismo laboratorio.⁸

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra pero en condiciones operativas diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, etc.), y en un mismo laboratorio.⁷

2.3.5.3. Reproducibilidad

Se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios, como por ejemplo en un estudio en colaboración.⁸

Estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios.⁷

2.3.6. Límite de detección

Es la cantidad mínima de analito que puede detectarse en una muestra, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas. El límite de detección se expresa habitualmente como concentración de analito en la muestra.⁸

Mínima cantidad de analito que puede ser detectado aunque no necesariamente cuantificado con precisión y exactitud, en las condiciones experimentales.⁷

2.3.7.Límite de cuantificación

El límite de cuantificación es una característica de las valoraciones cuantitativas de compuestos que se encuentran en baja concentración en la matriz de una muestra, tales como impurezas y productos de degradación. Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas.⁸

Mínima cantidad del analito que puede determinarse cuantitativamente con una adecuada exactitud y precisión.⁷

2.4. Cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

La cromatografía líquida de alta presión es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. Las separaciones se logran por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada.¹³

2.4.1.Partes del cromatógrafo

El cromatógrafo líquido, tiene las siguientes partes.¹³

- Reservorio de fase móvil, el cual contiene la fase móvil filtrada y desgasificada.
- Sistema de Bombeo, controla el caudal, regula la presión y administra cantidades exactas de la fase móvil desde los recipientes hasta la columna.
- Sistema de Inyección, el cual a través de un inyector introduce la muestra a la fase móvil.
- Columna cromatográfica, es el corazón del cromatógrafo, debido a que permite la separación de los compuestos de la muestra.
- Detector, produce una señal característica.
- Dispositivo de recolección de datos, como por ejemplo una computadora, que

emite el resultado en forma de cromatogramas.

2.5. Suspensión

Una suspensión farmacéutica puede definirse como una dispersión grosera que contiene material insoluble, finamente dividido que se encuentra suspendido en un medio líquido, hay ciertos criterios que una suspensión debe cumplir, como por ejemplo las partículas dispersas deben ser de un tamaño tal que no sedimenten rápidamente en el recipiente; sin embargo, en el caso que se produzca sedimentación, no debe formar un pasta dura, sino más bien ser capaz de redispersarse con un mínimo de esfuerzo por parte del paciente. Por último el producto debe ser fácil de verter, tener sabor agradable y ser resistente al ataque microbiano.¹⁴

2.5.1. Componentes de las suspensiones orales

En las suspensiones extemporáneas, el producto sólido suele ser una mezcla del fármaco y sustancias auxiliares que mejoran la estabilidad de la suspensión final. Como agentes suspensoros son habituales goma xantán o derivados de la celulosa; como estabilizantes, el ácido cítrico y el citrato sódico; como edulcorantes, el azúcar y la sacarina sódica y como conservantes, el metilparabeno, propilparabeno y el benzoato sódico, el vehículo suele ser el agua purificada, jarabes u otro líquido apropiado.¹⁴

2.6. Diclofenaco ácido libre

2.6.1. Propiedades fisicoquímicas

- **Nomenclatura IUPAC**

2-{2-[(2,6- diclorofenil) amino] fenil} ácido acético.¹⁵

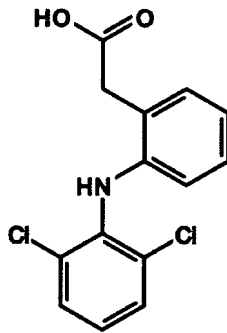


Figura 01. Estructura molecular del diclofenaco ácido libre.¹⁵

- **Formula química:** $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$ ¹⁵.
- **Peso molecular:** 296,149¹⁵.
- **Descripción**

Polvo cristalino blanco a casi blanco. Libre de puntos negros y partículas extrañas.¹⁶

- **Solubilidad**

Escasamente soluble en metanol, acetona, cloroformo e hidróxido de sodio 0,1N,¹⁶

2.6.2. Propiedades farmacológicas

El diclofenaco ácido libre, pertenece al grupo farmacoterapéutico de los analgésicos, antiinflamatorios no esteroideos (AINES). Los AINES constituyen un grupo de sustancias de estructura muy variada, pero todos tienen la facultad de inhibir la ciclooxigenasa (COX), y la inhibición resultante de la síntesis de las prostaglandinas.¹⁸

- **Farmacodinamia**

El diclofenaco ácido libre por pertenecer al grupo de los AINES tiene propiedades analgésicas y antiinflamatorias. Los principales efectos terapéuticos y muchas reacciones adversas de los AINES pueden explicarse por su efecto inhibidor de las ciclooxigenasas, enzimas que convierten el ácido araquidónico

que se encuentra en las membranas celulares en endoperoxidos cíclicos inestables, los cuales se transforman en prostaglandinas y tromboxanos. Algunos de estos eicosanoides participan, en grado diverso, en los mecanismos patógenos de la inflamación, el dolor y la fiebre, por lo que la inhibición de su síntesis por los AINES sería responsable de su actividad terapéutica.¹⁸

- **Farmacocinética**

Los AINES, se absorben bien por vía oral ($t_{máx}$ de 2-3 horas), aunque el fenómeno del primer paso hepático limita su biodisponibilidad al 50%. Se une a proteínas plasmáticas en un 99% y se elimina por la orina (65%) y bilis (35%), tras sufrir hidroxilación y conjugación; su semivida de eliminación es de 1-2 horas.¹⁸

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo se desarrolló en el área de investigación y desarrollo del Instituto Quimioterápico S.A. (IQFARMA) ubicada en la Av. Pedro Ruiz Gallo N° 935, del Distrito de Ate Vitarte – Lima; durante los meses de agosto a diciembre de 2012.

3.2. Población

Pilotos de Dolfenex® 9mg/5ml suspensión oral (diclofenaco ácido libre) desarrollados en el área de investigación y desarrollo del Instituto Quimioterápico S.A. (IQFARMA).

3.3. Muestra

Piloto de Dolfenex® 9mg/5ml suspensión oral (diclofenaco ácido libre) desarrollado en el área de investigación y desarrollo del Instituto Quimioterápico S.A. (IQFARMA) correspondiente al lote P-1105122.

3.4. Sistema de muestreo

Libre por conveniencia.¹⁹

3.5. Tipo de investigación

Descriptivo.¹⁹

3.6. Diseño metodológico para la recolección de datos

Los datos fueron recolectados de las corridas cromatográficas de los diferentes parámetros de validación

3.6.1. Condiciones cromatográficas

Columna : purospher STAR® 100 RP-8 (5µm); 150mm x 4,6mm

Fase móvil : metanol: Buffer fosfato pH 2,5 (70:30)

Longitud de onda : 254 nm

Flujo : 1,2 ml/min

Volumen de Inyección : 10 µl

3.6.2. Preparación de la fase móvil

- **Preparación del buffer fosfato pH 2,5**

Se mezcló volúmenes iguales de ácido fosfórico 0,01M y fosfato de sodio monobásico 0,01 M, se llevó a pH 2,5 ± 0,2 con ácido fosfórico o hidróxido de sodio.

- **Fase móvil**

Se preparó una mezcla de metanol y buffer fosfato pH 2,5 (70:30). Se filtró por membrana de nylon 0,2 µm de porosidad y se dejó al vacío por tres minutos para desgasificar.

3.6.3. Desarrollo de los parámetros de validación

3.6.3.1. Linealidad

Se partió de la solución madre de la cual se realizó cinco diluciones para obtener soluciones en el siguiente intervalo: 50%, 75%, 100%, 125% y 150% que establecieron la recta de calibración, las cuales fueron analizadas por duplicado.

- **Solución madre del estándar de referencia:**

Se pesó aproximadamente de 28,125 mg de diclofenaco ácido libre (estándar de

referencia) en una fiola de 50 ml, se enraso con metanol (concentración 0,5625 mg/ml de diclofenaco ácido libre).

- **Solución estándar 50%**

Se midió 2 ml de la solución madre del estándar en una fiola de 25 ml, se enrazó con metanol y se filtró por membrana de nylon 0,2 μm de porosidad (concentración aproximada: diclofenaco ácido libre 0,045 mg/ml).

- **Solución estándar 75%**

Se midió 3 ml de la solución madre del estándar en una fiola de 25 ml, se enrazó con metanol y se filtró por membrana de nylon 0,2 μm de porosidad (concentración aproximada: diclofenaco ácido libre 0,0675 mg/ml).

- **Solución estándar 100%**

Se midió 4 ml de la solución madre del estándar en una fiola de 25 ml, se enrazó con metanol y se filtró por membrana de nylon 0,2 μm de porosidad (concentración aproximada: diclofenaco ácido libre 0,090 mg/ml).

- **Solución estándar 125%**

Se midió 5 ml de la solución madre del estándar en una fiola de 25 ml, se enrazó con metanol y filtró por membrana de nylon 0,2 μm de porosidad (concentración aproximada: diclofenaco ácido libre 0,1125 mg/ml).

- **Solución estándar 150%**

Se midió 6 ml de la solución madre del estándar en una fiola de 25 ml, se enrazó con metanol y filtró por membrana de nylon 0,2 μm de porosidad (concentración aproximada: diclofenaco ácido libre 0,135 mg/ml).

3.6.3.2. Exactitud

Para la evaluación de este parámetro se empleó el método del placebo cargado, que consiste en adicionar una cantidad de analito sobre el placebo equivalente al

volumen de la muestra en este caso 5 ml. La adición de los estándares se realizó a tres niveles de concentración: 80%, 100% y 120%, y se realizaron tres determinaciones de cada concentración.

- **Muestra al 80%**

Se pesó por triplicado aproximadamente 7,2 mg de diclofenaco ácido libre (estándar de referencia) en fioles de 100 ml, a las cuales se adicionó 5 ml de la suspensión placebo (concentración de 0,072 mg/ml de diclofenaco ácido libre). Las muestras fueron tratadas según indica la técnica analítica, e inyectadas al sistema cromatográfico por duplicado.

- **Muestra al 100%**

Se pesó por triplicado aproximadamente 9,0 mg de diclofenaco ácido libre (estándar de referencia) en fioles de 100 ml, a las cuales se adicionó 5 ml de la suspensión placebo (concentración de 0,090 mg/ml de diclofenaco ácido libre). Las muestras fueron tratadas según indica la técnica analítica, e inyectadas al sistema cromatográfico por duplicado.

- **Muestra al 120%**

Se pesó por triplicado aproximadamente 10,8 mg de diclofenaco ácido libre (estándar de referencia) en fioles de 100 ml, a las cuales se adicionó 5 ml de la suspensión placebo (concentración de 0,108 mg/ml de diclofenaco ácido libre). Las muestras fueron tratadas según indica la técnica analítica, e inyectadas al sistema cromatográfico por duplicado.

3.6.3.3. Precisión

- **Repetibilidad**

Se evaluaron seis muestras a una concentración de 0,09 mg/ml, para las cuales

se pesó una cantidad equivalente a 9 mg de diclofenaco ácido libre (aproximadamente 5 ml de suspensión) en fiolas de 100 ml, se le adicionó metanol. Las muestras fueron tratadas según indica la técnica analítica por un mismo analista, y fueron inyectadas al sistema cromatográfico por duplicado y contrastado frente a un estándar.

- **Precisión Intermedia**

Se realizó la preparación del estándar y seis muestras a la concentración de 0,09 mg/ml, por dos analistas diferentes y en diferentes sesiones, siguiendo el procedimiento citado en el ensayo de repetibilidad, las cuales fueron inyectadas al sistema cromatográfico por duplicado.

3.6.3.4. Selectividad

a. Identificación de los picos pertenecientes al estándar y muestra de diclofenaco ácido libre

- **Preparación del estándar**

Se pesó aproximadamente 22,5 mg de diclofenaco ácido libre (estándar de referencia) en una fiola de 50 ml, se completó a volumen con metanol, se transfirió 5 ml de la solución anterior a una fiola de 25 ml, se completó a volumen con metanol, y se filtró por membrana de nylon 0,2 μm de porosidad. (Concentración aproximada: diclofenaco ácido libre 0,09 mg/ml), el cual fue inyectado cinco veces al sistema cromatográfico.

- **Preparación de la muestra**

Se pesó una cantidad equivalente a 9 mg de diclofenaco ácido libre (aproximadamente 5 ml de suspensión) en una fiola de 100 ml, la muestra fue tratada según indica la técnica analítica, e inyectada al sistema cromatográfico.

b. Identificación de los picos pertenecientes al placebo y excipientes de la suspensión

• **Preparación del placebo**

Se midió 5 ml de la suspensión placebo en una fiola de 100 ml. La muestra fue tratada según Indica la técnica analítica, e inyectada al sistema cromatográfico.

• **Preparación de los excipientes**

Se pesó cada excipiente de la formulación equivalente a un volumen de 5 ml y se trasvasó a flolas de 100 ml. Las muestras fueron tratadas según indica la técnica analítica, e inyectadas al sistema cromatográfico.

3.6.3.5. Robustez

La evaluación de este parámetro se dio a partir del estándar y dos muestras a una concentración de 0,09 mg/ml, siguiendo el procedimiento citado en el ensayo de repetibilidad, las cuales fueron tratadas según indica la técnica analítica, se procedió a cromatografiar, variando el flujo de 1,2 ml/mln a 0,6 ml/min.

3.7. Análisis de datos

Los datos fueron procesados utilizando el programa Microsoft Excel® 2010.

3.7.1. Linealidad

a. Cálculo de la recta de regresión

Se determina la recta de regresión lineal, sobre los puntos individuales y sin promediar. Para el caso de la recta la función toma la forma:

$$y = b x + a$$

Donde:

y : respuesta cromatográfica

x : concentración del analito.

b : valor de la pendiente.

a : ordenada en el origen (termino independiente o intercepto).

• **Fórmula para calcular la pendiente “b”**

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

• **Fórmula para calcular el valor independiente “a”**

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

n= Número de determinaciones

• **Fórmula para calcular el coeficiente de correlación (r):**

Nos refleja el grado de relación entre la variable concentración “x”, y la variable respuesta “y”, se calcula con la siguiente fórmula:

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

Criterio de aceptación: cuando el coeficiente de correlación es mayor o igual a 0,995.

• **Fórmula para calcular el coeficiente de determinación (r^2):**

Es el cuadrado del coeficiente de correlación e indica la proporción de la variación total de “y”.

b. Interpretación estadística de la regresión lineal

Se realiza la interpretación de la regresión lineal, a través del cálculo de:

• **Test estadístico para el coeficiente de correlación “r”:**

En el cual se calcula el valor de t experimental con n-2 grados de libertad y un

intervalo de confianza de 95% (probabilidad $\alpha=0,05$), Para:

H₀: el coeficiente de correlación es igual a cero ($r = 0$).

H_a: el coeficiente de correlación debe ser significativamente diferente de cero ($r \neq 0$).

Criterio de aceptación: Si $t_{exp} > t_{tabla}$ se rechaza la H₀, por consiguiente se afirma que el coeficiente de correlación es diferente de cero y cercano a la unidad.

• **Test de hipótesis para demostrar la regresión lineal en función del coeficiente de correlación “r”:**

H₀: no hay correlación entre “x” e “y”

H_a: hay correlación entre “x” e “y”

Criterio de aceptación: Si $t_{exp} > t_{tabla}$, calculada para n-2 grados de libertad y un nivel de significancia del 95% (probabilidad $\alpha=0,05$), entonces existe correlación lineal significativa.

• **Fórmula para hallar t_{exp}:**

$$t_{exp} = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

• **Test de linealidad a partir de la significancia estadística de la desviación estándar de la pendiente “b”:**

Se realiza estableciendo una comparación entre t_{exp} y t_{tabla} para:

H₀: la pendiente es igual a cero ($b = 0$).

H_a: la pendiente es diferente de cero ($b \neq 0$)

Criterio de aceptación: Si $t_{exp} > t_{tabla}$ se rechaza la H₀ y por tanto la pendiente es significativamente diferente de cero.

• **fórmula para hallar t_{exp}:**

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b}$$

Pero S_b se calcula en función de su varianza (S_b^2).

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

Dónde: S_{xy}^2 , es la varianza del error experimental total (determinación de la varianza de "x" sobre "y"), entonces:

$$S_{xy}^2 = \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n - 2}$$

A partir de esta se calcula la desviación estándar de la pendiente que es igual:

$$S_b = \sqrt{S_b^2}$$

Y también se calcula la desviación estándar relativa porcentual ($S_{b \text{ relativa}}\%$)

$$S_{b \text{ relativa}}\% = \frac{S_b * 100}{b}$$

Estableciéndose límites de confianza para la pendiente a partir de:

$$b = b \pm t_{tabla} S_b$$

Dónde: t_{tabla} es el valor de la distribución t- Student para n-2 grados de libertad y una probabilidad de 95% ($\alpha = 0,05$).

• **Test de linealidad a partir del coeficiente de variación de los factores de respuesta (f):**

El coeficiente de variación para los factores respuesta para las concentraciones de 50% al 150% se obtiene de la siguiente manera:

$$CV = \frac{S_f}{\bar{f}} * 100$$

Dónde:

S_f : desviación estándar de los factores de respuesta.

\bar{f} = promedio de los factores de respuesta.

Criterio de aceptación, el coeficiente de variación debe ser menor o igual a cinco ($CV \leq 5\%$)

• **Test de proporcionalidad a partir de la significancia estadística del intercepto "a"**

Se realiza estableciendo una comparación entre t_{exp} y t_{tabla} para:

H_0 : el intercepto es igual a cero ($a = 0$).

H_a : el intercepto es diferente de cero ($a \neq 0$)

Criterio de aceptación: Si $t_{exp} > t_{tabla}$ se rechaza la H_0

• **Fórmula para hallar t_{exp}**

$$t_{exp} = \frac{|a|}{S_a}$$

Pero S_a se calcula en función de la varianza del intercepto (S_a^2).

$$S_a^2 = S_b^2 * \frac{\sum x^2}{n}$$

A partir de esta se calcula la desviación estándar del intercepto que es igual:

$$S_a = \sqrt{S_a^2}$$

Y también se calcula la desviación estándar relativa porcentual ($S_{a\text{relativa}}\%$)

$$S_{a\text{relativa}}\% = \frac{S_a * 100}{a}$$

Estableciéndose límites de confianza para la pendiente a partir de:

$$a = a \pm t_{tabla} S_a$$

Donde: t_{tabla} , es el valor de la distribución t- Student para n-2 grados de libertad y una probabilidad de 95% ($\alpha = 0,05$).

3.7.2. Exactitud

La exactitud se expresa como porcentaje de recuperación, en la valoración de

una cantidad conocida de analito.

• **Porcentaje de recuperación (R)**

$$R = \frac{X_m}{\mu} \times 100$$

Donde:

X_m : valor medio hallado.

μ : valor aceptado como verdadero.

a. **Interpretación estadística de la exactitud**

Se determinó mediante la aplicación, de los siguientes test:

• **Test de Cochran**

Es un test de igualdad de varianzas aplicado a varios grupos muestrales del mismo tamaño, a través del cual se determina si el factor concentración tiene alguna influencia en los resultados.

$$G_{exp} = \frac{s_{max}^2}{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2}$$

Criterio de aceptación: si $G_{exp} < G_{tablas}$, para K grupo con "n" números de determinaciones y un nivel de significancia del 95% ($\alpha=0,05$), entonces las varianzas de las concentraciones utilizadas son equivalentes; es decir que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

• **Test t de Student**

Mediante el cual se confirma si la recuperación es satisfactoria.

$$t_{exp} = \frac{|100 - R_{prom}| * \sqrt{n}}{CV}$$

Donde:

R_{prom} : recuperación promedio.

n : número de datos.

CV : coeficiente de variación

Criterio de aceptación: si $t_{\text{exp}} < t_{\text{tablas}}$, para (n-1) grados de libertad y un nivel de significancia del 95% ($\alpha=0,05$), entonces no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100%; por lo que se cumple la exactitud.

3.7.3. Precisión

a. Repetibilidad

La precisión de un método analítico se expresa generalmente como el coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas y se calcula matemáticamente de la siguiente manera:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} * 100$$

Donde:

s : Desviación estándar.

\bar{x} : Media aritmética de los resultados.

Criterio de aceptación: el coeficiente de variación debe ser menor o igual al 2% ($CV \leq 2\%$).

• Intervalos de confianza para la media

La International Conference of Harmonization (ICH)¹² recomienda introducir los intervalos de confianza en el estudio de precisión. Los cuales son calculados a partir de:

$$\mu = \bar{x} \pm t * \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Donde:

\bar{x} : media de una serie de resultados obtenidos en un mismo nivel de concentración.

t : valor de la t de Student de tablas para n-1 grados de libertad y $\alpha=0,05$.

n: número de análisis.

s: desviación estándar.

b. Precisión intermedia

La estimación de la precisión intermedia se realiza con el cálculo del coeficiente de variación de las respuestas obtenidas, considerando independientemente cada resultado de los analistas.

Criterio de aceptación: el coeficiente de variación debe ser menor o igual al 2% ($CV \leq 2\%$).

3.7.4. Selectividad

Se evaluaron por separado los cromatogramas del estándar, placebo, muestra y cada uno de los excipientes de la formulación de Dolfenex® 9mg/5ml suspensión oral.

Criterio de aceptación: el método debe ser selectivo para diferenciar el diclofenaco ácido libre de los demás excipientes de la formulación; es decir ninguno de los excipientes de la formulación debe eluir en el mismo tiempo de retención del activo.

3.7.5. Robustez

La evaluación de la robustez nos permite conocer la estabilidad del método frente a modificaciones de las condiciones descritas en la técnica analítica. Para lo cual se calcula el coeficiente de variación de los resultados tras la variación del flujo.

Criterio de aceptación: el coeficiente de variación debe ser menor o igual al 2% ($CV \leq 2\%$), es decir el método debe ser robusto frente a alguna variación de las condiciones cromatográficas.

IV. RESULTADOS

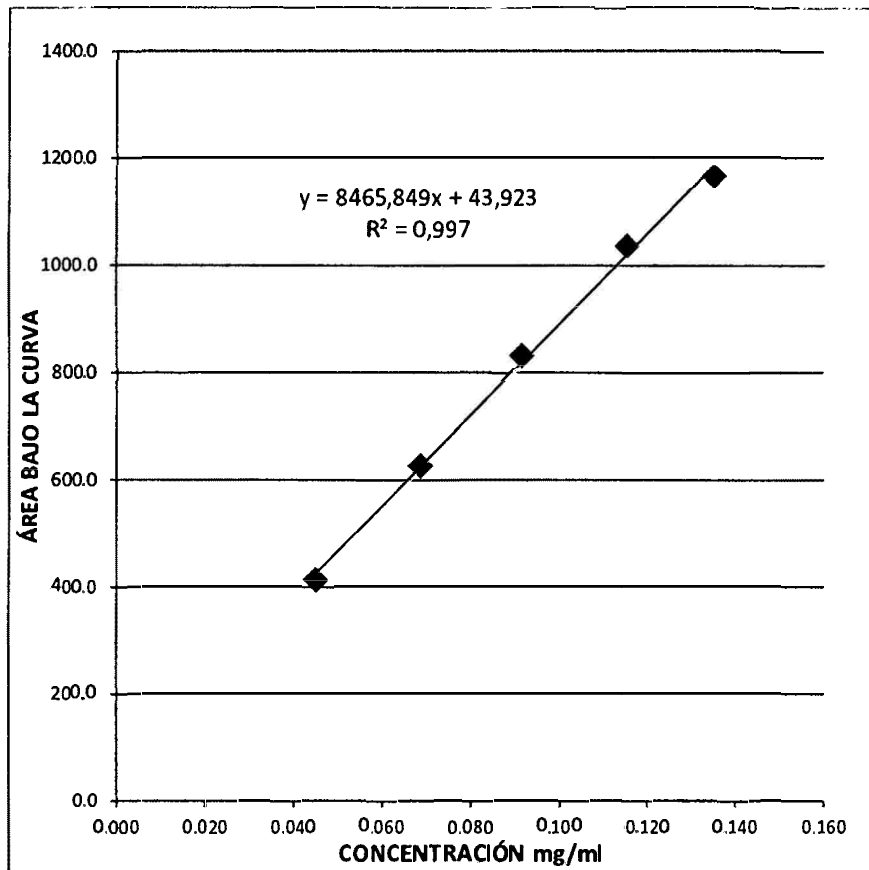


Figura 02. Recta de regresión lineal concentración versus área bajo la curva de las soluciones estándar de diclofenaco ácido libre. Lima - 2012.

Tabla 02. Porcentaje de recuperación de diclofenaco ácido libre en función de la cantidad agregada. Lima - 2012.

| Muestra (%) | Cantidad agregada (mg) | Área | Cantidad recuperada (mg) | Promedio muestra recuperada (mg) | Porcentaje de muestra recuperada (%) | Porcentaje de recuperación (%) |
|---|------------------------|------------|--------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| 80% | 7,21 | 762,91943 | 7,209 | 7,208 | 80,086 | 99,941 |
| | | 762,65546 | 7,207 | | | |
| | 7,22 | 767,74652 | 7,255 | 7,222 | 80,248 | 100,019 |
| | | 760,92480 | 7,190 | | | |
| | 7,21 | 763,39032 | 7,213 | 7,205 | 80,052 | 99,940 |
| | | 761,53882 | 7,196 | | | |
| 100% | 9,06 | 976,63391 | 9,228 | 9,145 | 101,612 | 100,906 |
| | | 959,00305 | 9,062 | | | |
| | 9,06 | 981,92517 | 9,278 | 9,169 | 101,873 | 101,187 |
| | | 958,66888 | 9,059 | | | |
| | 9,11 | 965,61279 | 9,124 | 9,114 | 101,682 | 100,013 |
| | | 963,46948 | 9,104 | | | |
| 120% | 10,81 | 1142,81750 | 10,79871 | 10,802 | 120,020 | 99,971 |
| | | 1143,47473 | 10,80492 | | | |
| | 10,83 | 1145,60010 | 10,82500 | 10,829 | 120,319 | 100,015 |
| | | 1146,37793 | 10,83235 | | | |
| | 10,82 | 1144,54297 | 10,81502 | 10,817 | 120,185 | 99,978 |
| | | 1144,88770 | 10,81827 | | | |
| Promedio | | | | | | 100,219 |
| Desviación Estándar | | | | | | 0,475 |
| Coeficiente de Variación | | | | | | 0,474 |
| Número de Datos (n) | | | | | | 9 |
| Grados de Libertad | | | | | | 8 |
| t_{tablas} | | | | | | 2,306 |
| t_{exp} | | | | | | 1,384 |
| Criterio de aceptación $t_{exp} < t_{tablas}$ | | | | | | CUMPLE |

Tabla 03. Porcentaje de recuperación de diclofenaco ácido libre en Dolfenex® 9mg/5ml. Lima - 2012.

| Nº | Peso muestra (g) | Área | Concentración por inyección (mg/5ml) | Concentración por muestra (mg/5ml) | Porcentaje de recuperación (%) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|------------------|-----------|--------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|----------|--------|-----------|-------|-------|---------|---------------------|-------|----------|--------|-----------|-------|------------------------------|---------|---------------------|-------|----------|--------|------------------------|-------|------------------------------|---------|---------------------|-------|---------------------|--------|------------------------|-------|------------------------------|---------|--|-------|---------------------|--------|------------------------|--------|--|---------|--|-------|---------------------|---------|--------------------------------|--------|--|---------|--|--------|---------------------|---------|--------------------------------|--------|--|-------|--|--------|---------------------|---------|--------------------------------|--------|--|-------|--|--------|---------------------|---------|--------------------------------|--------|--|-------|--|--------|--|---------|--------------------------------|--------|--|--|--|--------|--|---------|--------------------------------|--|
| 1 | 5,2168 | 839,06543 | 9,023 | 9,026 | 100,293 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 839,77045 | 9,030 | | | 2 | 5,2370 | 840,61243 | 9,004 | 9,018 | 100,196 | 843,09625 | 9,031 | 3 | 5,2399 | 844,94604 | 9,046 | 9,043 | 100,474 | 844,36694 | 9,040 | 4 | 5,2359 | 842,57300 | 9,027 | 9,043 | 100,476 | 845,49170 | 9,059 | 5 | 5,2350 | 843,10608 | 9,035 | 9,031 | 100,340 | 842,37567 | 9,027 | 6 | 5,2678 | 853,53088 | 9,089 | 9,078 | 100,869 | 851,45294 | 9,067 | Promedio | | | | | 100,441 | Desviación Estándar | | | | | 0,236 | Coeficiente de Variación (%) | | | | | 0,235 | Número de análisis (n) | | | | | 6 | t _{tablas} | | | | | 2,571 | Límite de confianza inferior para la media | | | | | 98,957 | Límite de confianza superior para la media | | | | | 101,925 | Criterio de aceptación CV ≤ 2% | |
| 2 | 5,2370 | 840,61243 | 9,004 | 9,018 | 100,196 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 843,09625 | 9,031 | | | 3 | 5,2399 | 844,94604 | 9,046 | 9,043 | 100,474 | 844,36694 | 9,040 | 4 | 5,2359 | 842,57300 | 9,027 | 9,043 | 100,476 | 845,49170 | 9,059 | 5 | 5,2350 | 843,10608 | 9,035 | 9,031 | 100,340 | 842,37567 | 9,027 | 6 | 5,2678 | 853,53088 | 9,089 | 9,078 | 100,869 | 851,45294 | 9,067 | Promedio | | | | | 100,441 | Desviación Estándar | | | | | 0,236 | Coeficiente de Variación (%) | | | | | 0,235 | Número de análisis (n) | | | | | 6 | t _{tablas} | | | | | 2,571 | Límite de confianza inferior para la media | | | | | 98,957 | Límite de confianza superior para la media | | | | | 101,925 | Criterio de aceptación CV ≤ 2% | | | | | CUMPLE | | | | |
| 3 | 5,2399 | 844,94604 | 9,046 | 9,043 | 100,474 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 844,36694 | 9,040 | | | 4 | 5,2359 | 842,57300 | 9,027 | 9,043 | 100,476 | 845,49170 | 9,059 | 5 | 5,2350 | 843,10608 | 9,035 | 9,031 | 100,340 | 842,37567 | 9,027 | 6 | 5,2678 | 853,53088 | 9,089 | 9,078 | 100,869 | 851,45294 | 9,067 | Promedio | | | | | 100,441 | Desviación Estándar | | | | | 0,236 | Coeficiente de Variación (%) | | | | | 0,235 | Número de análisis (n) | | | | | 6 | t _{tablas} | | | | | 2,571 | Límite de confianza inferior para la media | | | | | 98,957 | Límite de confianza superior para la media | | | | | 101,925 | Criterio de aceptación CV ≤ 2% | | | | | CUMPLE | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 5,2359 | 842,57300 | 9,027 | 9,043 | 100,476 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 845,49170 | 9,059 | | | 5 | 5,2350 | 843,10608 | 9,035 | 9,031 | 100,340 | 842,37567 | 9,027 | 6 | 5,2678 | 853,53088 | 9,089 | 9,078 | 100,869 | 851,45294 | 9,067 | Promedio | | | | | 100,441 | Desviación Estándar | | | | | 0,236 | Coeficiente de Variación (%) | | | | | 0,235 | Número de análisis (n) | | | | | 6 | t _{tablas} | | | | | 2,571 | Límite de confianza inferior para la media | | | | | 98,957 | Límite de confianza superior para la media | | | | | 101,925 | Criterio de aceptación CV ≤ 2% | | | | | CUMPLE | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 5,2350 | 843,10608 | 9,035 | 9,031 | 100,340 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 842,37567 | 9,027 | | | 6 | 5,2678 | 853,53088 | 9,089 | 9,078 | 100,869 | 851,45294 | 9,067 | Promedio | | | | | 100,441 | Desviación Estándar | | | | | 0,236 | Coeficiente de Variación (%) | | | | | 0,235 | Número de análisis (n) | | | | | 6 | t _{tablas} | | | | | 2,571 | Límite de confianza inferior para la media | | | | | 98,957 | Límite de confianza superior para la media | | | | | 101,925 | Criterio de aceptación CV ≤ 2% | | | | | CUMPLE | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 5,2678 | 853,53088 | 9,089 | 9,078 | 100,869 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 851,45294 | 9,067 | | | Promedio | | | | | 100,441 | Desviación Estándar | | | | | 0,236 | Coeficiente de Variación (%) | | | | | 0,235 | Número de análisis (n) | | | | | 6 | t _{tablas} | | | | | 2,571 | Límite de confianza inferior para la media | | | | | 98,957 | Límite de confianza superior para la media | | | | | 101,925 | Criterio de aceptación CV ≤ 2% | | | | | CUMPLE | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Promedio | | | | | 100,441 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Desviación Estándar | | | | | 0,236 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Coeficiente de Variación (%) | | | | | 0,235 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Número de análisis (n) | | | | | 6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| t _{tablas} | | | | | 2,571 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Límite de confianza inferior para la media | | | | | 98,957 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Límite de confianza superior para la media | | | | | 101,925 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Criterio de aceptación CV ≤ 2% | | | | | CUMPLE | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Tabla 04. Recuperación de diclofenaco ácido libre en Dolfenex® 9mg/5ml por dos analistas diferentes. Lima - 2012.

| N° | Día 1 | | Día2 | |
|--------------------------------|-----------------------------|---|-----------------------------|---|
| | Peso muestra analista 1 (g) | Porcentaje de recuperación analista 1 (%) | Peso muestra analista 2 (g) | Porcentaje de recuperación analista 2 (%) |
| 1 | 5,2357 | 100,224 | 5,2168 | 100,293 |
| 2 | 5,2373 | 100,597 | 5,2370 | 100,196 |
| 3 | 5,2350 | 100,167 | 5,2399 | 100,474 |
| 4 | 5,2385 | 100,671 | 5,2359 | 100,476 |
| 5 | 5,2389 | 100,879 | 5,2350 | 100,340 |
| 6 | 5,2377 | 100,619 | 5,2678 | 100,869 |
| Promedio | | 100,526 | | 100,441 |
| Desviación Estándar | | 0,275 | | 0,236 |
| CV% | | 0,274 | | 0,235 |
| CV% precisión intermedia | | | 0,247 | |
| Criterio de aceptación CV ≤ 2% | | | CUMPLE | |

Tabla 05. Porcentaje de recuperación de diclofenaco ácido libre en Dolfenex® 9mg/5ml disminuyendo el flujo a 0,6 ml/min. Lima - 2012.

| N° | Peso (g) | Tiempo de retención (min) | Área | Concentración (mg/5ml) | Porcentaje de recuperación (%) |
|--------------------------------|----------|---------------------------|------------|------------------------|--------------------------------|
| 1 | 5,2543 | 11,783 | 1691,59570 | 9,046 | 100,541 |
| | | 11,783 | 1692,64661 | 9,052 | |
| 2 | 5,2522 | 11,786 | 1682,40491 | 9,000 | 100,201 |
| | | 11,789 | 1689,06152 | 9,036 | |
| Promedio | | | | | 100,371 |
| Desviación Estándar | | | | | 0,240 |
| Coeficiente de Variación(%) | | | | | 0,239 |
| Criterio de aceptación CV ≤ 2% | | | | | CUMPLE |

Tabla 06. Selectividad del método según tiempo de retención del diclofenaco ácido libre en Dolfenex® 9mg/5ml. Lima - 2012.

| N° | Muestra | Tiempo de retención (min) |
|---|--------------------------|---------------------------|
| 1 | Estándar | 10,294 |
| 2 | Muestra P-1105122 | 10,576 |
| 3 | Placebo | - |
| 4 | Goma xantan | - |
| 5 | Avicel RC-591 | - |
| 6 | Sodio fosfato dibásico | - |
| 7 | Ácido cítrico anhidro | - |
| 8 | Acesulfame potásico | - |
| 9 | Sorbitol 70% | - |
| 10 | Esencia de tutti frutti | - |
| 11 | Butilhidroxianisol (BHA) | - |
| 12 | Propilenglicol | - |
| 13 | Metilparabeno | - |
| 14 | Propilparabeno | - |
| 15 | Símeticona 30% emulsión | - |
| Criterio de aceptación: Ninguno de los excipientes debe eluir en el mismo tiempo de retención del estándar | | CUMPLE |

V. DISCUSIÓN

Se busca validar el método analítico para la cuantificación de diclofenaco ácido libre, en una suspensión oral, para lo cual se desarrolló y evaluó los parámetros establecidos en la categoría I de la farmacopea de los Estados Unidos (USP 35 – NF 30)⁸ como: linealidad, exactitud, precisión, selectividad y robustez siguiendo los lineamientos establecidos por la International Conference on Harmonization (ICH)¹² y la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (EFI).⁷

En la Figura 02, se observa la recta de regresión lineal de las soluciones estándar de diclofenaco ácido libre, en donde se muestra la relación entre la concentración y áreas cromatográficas del estándar. Para este parámetro se trabajó con cinco niveles de concentración a partir de una solución madre, comprendiendo las siguientes concentraciones de trabajo: 50%; 75%; 100%; 125% y 150% (siendo el 100% igual a 0,09 mg/ml), las cuales al ser evaluadas estadísticamente dan como resultado la siguiente ecuación: $y=8465,849 x + 43,923$, con un coeficiente de correlación ($r=0,999$); siendo el valor mínimo permitido 0,995. Cuanto más se aproxime el valor de "r" a la unidad ($r=1$), indica que existe correlación entre las variables concentración y área. También se calculó el coeficiente de determinación ($r^2= 0,997$), que indica correlación entre

variables con un 99,70% de probabilidad, por lo tanto con los valores hallados podemos señalar que existe relación lineal entre variables concentración y áreas bajo la curva. Nuestros resultados no difieren de otros estudios realizados como el de Bellido,⁴ donde valida una técnica analítica para la determinación de ambroxol jarabe por HPLC, en el cual indica que existe correlación lineal entre sus variables con un 99,98% de probabilidad, al igual que en el trabajo realizado por Medina y Berrocal,²¹ de validación de método analítico de valoración de naproxeno sódico 550 mg tableta por HPLC, donde señala que existe correlación lineal en el rango de 50% -150% para un coeficiente de correlación ($r= 0,999$) y un coeficiente de determinación ($r^2=0,999$), planteándose como valor mínimo permisible 0,997; con lo cual queda demostrada la existencia de correlación lineal entre variables.

Pero el mejor indicador del modelo lineal no es “r”, sino un test estadístico, en el cual se compara el valor de t-tabulado (t_{exp}) frente al valor de t_{tabla} para $n-2$ grados de libertad y el valor de confianza requerido, donde si el valor de $t_{exp} > t_{tabla}$, se afirma que existe correlación lineal significativa.⁵ Por ello, en el Anexo 03 se aplica un test de hipótesis para el coeficiente de correlación (r), donde la hipótesis nula establece que no hay correlación entre “x” e “y”, por lo cual se debe cumplir que el valor de t_{exp} (80,041) debe ser mayor al t_{tabla} (2,101) para 18 grados de libertad y una probabilidad de cometer error de 95% ($\alpha=0,05$), con lo cual se corrobora la existencia de correlación lineal entre variables, con un 99,70% de probabilidad. Así mismo, se realizó la determinación de la varianza de la pendiente “b”, donde debe cumplirse: $t_{exp} > t_{tabla}$; obteniéndose t_{exp} (80,041) $>$ t_{tabla} (2,101), con lo que se demuestra la existencia de una relación lineal significativa, por lo tanto “b” es significativamente diferente de cero, y los límites de confianza inferior y superior son 8 243,629 y 8 688,070 respectivamente los

cuales no incluyen al cero. En la evaluación de la linealidad a partir de los coeficientes de variación de los factores respuesta se obtuvo un coeficiente de variación (CV = 2,287%), lo cual expresa que existe relación entre la concentración y áreas bajo la curva; ya que los valores superiores al 5% indicarían una falta de linealidad. Finalmente se aplica un test de proporcionalidad del intercepto "a", donde se debe cumplir: $t_{exp} > t_{tabla}$, obteniéndose $t_{exp} (4,299) > t_{tabla} (2,101)$, lo cual indica la proporcionalidad entre variables, quedando estadísticamente demostrada la linealidad del sistema.

Estos resultados son refrendados por Flores,⁵ quien realizó la linealidad tanto para el estándar como para las muestras donde obtuvo $t_{exp}(137,703) > t_{tabla} (2,093)$ para el estándar y $t_{exp} (137,703) > t_{tabla} (2,093)$ para la muestra con lo que demuestra que existe correlación lineal significativa entre "x" e "y", así mismo obtuvo un RSD de 1,59% para el estándar y 1,40% para la muestra esto para los factores respuesta siendo el valor máximo permisible 5%, en la evaluación de la varianza de la pendiente "b" obtuvo $t_{exp} (73,681) > t_{tabla} (2,093)$ para el estándar y un $t_{exp} (63,291) > t_{tabla} (2,093)$ para la muestra, además los límites de confianza para la pendiente "b" son significativamente mayores que cero, con lo cual confirma estadísticamente la linealidad del sistema.

En la Tabla 02 se evidencia los resultados del porcentaje de recuperación en función de la cantidad agregada de diclofenaco ácido libre para la determinación de la exactitud del método, obteniéndose un promedio de recuperación de 100,219%, el cual se encuentra dentro de los límites establecidos (98% - 102%) propuestos por la Food and Drug Administration (FDA)²¹ además se obtuvo un coeficiente de variación de 0,475% siendo el valor máximo aceptado 2%. Pero para demostrar que no existe diferencia entre la cantidad recuperada y el 100% se aplicó el test estadístico t-student, donde debe cumplirse: el valor de $t_{exp} <$

t_{tabla} , para $n-1$ grados de libertad y una probabilidad de cometer error de 95% ($\alpha=0,05$), obteniéndose $t_{\text{exp}}(1,384) < t_{\text{tabla}}(2,306)$ para 8 grados de libertad y con ($\alpha=0,05$) probabilidad de cometer error, y un nivel de significancia de 95%, con lo cual se corrobora que el método es exacto y que no existe diferencia significativa entre el porcentaje de recuperación hallado y el 100%. Lo cual también podemos evidenciar en el trabajo de Flores,⁵ en el cual concluye que su técnica es exacta y que no existe diferencia entre el valor medio hallado y el valor agregado (100%), obteniendo una recuperación media de 99,85% y tras la aplicación de un test de t - student obtuvo para $t_{\text{exp}} (1,72) < t_{\text{tabla}} (2,15)$, con un 95% de significancia y una probabilidad de cometer error de ($\alpha=0,05$) para $n-1$ grados de libertad.

Así como también Prado,²² validó un método para la cuantificación de dexametasona y ciprofloxacino en una suspensión oftálmica por HPLC, en donde determinó que el porcentaje de recuperación para ciprofloxacino es de 100,53% y para la dexametasona es 100,27%, los cuales se encuentran dentro de los límites establecidos; además obtuvo un $t_{\text{exp}} (1,555) < t_{\text{tabla}} (2,776)$ para dexametasona y un $t_{\text{exp}} (1,773) < t_{\text{tabla}} (2,776)$ para el ciprofloxacino, concluyendo que la cantidad agregada de analito y la cantidad recuperada no son estadísticamente diferentes; por la tanto la exactitud es correcta.

Pero como para la determinación de la exactitud se trabajó con tres niveles concentración (80%; 100% y 120%), en el Anexo 11 se observa la aplicación del test de igualdad de varianzas (test estadístico de Cochran), para determinar si el factor concentración tiene alguna influencia en los resultados, donde debe cumplirse $G_{\text{exp}} < G_{\text{tabla}}$, para "k" grupos; "n" número de determinaciones por grupo y una probabilidad de cometer error de 95% ($\alpha=0,05$), obteniéndose lo siguiente $G_{\text{exp}} (0,734) < G_{\text{tabla}} (0,798)$, lo cual significa que las varianzas entre las tres

concentraciones son equivalentes, es decir el factor concentración no influye en los resultados. Este resultado es refrendado por Velandia,²³ en su trabajo de validación del método analítico para cuantificación de bacitracina, donde obtiene el valor de $G_{exp} = 0,682$ para bacitracina zinc y $G_{exp} = 0,790$ para bacitracina metileno disalicilato, los cuales son inferiores al $G_{tabla} = 0,871$ (para tres grupos con dos determinaciones y $\alpha=0,05\%$), concluyendo que no existe diferencia significativa entre las varianzas, por lo tanto se puede afirmar que nuestro método es exacto en base a los resultados obtenidos y corroborado frente a los investigadores mencionados.

En las Tablas 03 y 04, se aprecian los resultados para la determinación de la precisión del método. En la Tabla 03, se evidencia que el método tiene una buena repetibilidad, debido a que se obtuvo un promedio de recuperación de 100,441% (equivalente a 9,04mg/5ml), y un coeficiente de variación de 0,235%, siendo el valor máximo aceptado 2%, adicionalmente se estableció límites inferiores y superiores a partir de la recuperación promedio y el valor de t_{tabla} (2,571), siendo los límites 98,957% y 101,925% respectivamente. Por lo tanto el método analítico es repetible.

En la Tabla 04, se observa los resultados de dos analistas diferentes, en diferentes días para la determinación de la precisión intermedia del método, donde se evidencia que el método es preciso, debido a que se obtuvieron los siguientes promedios de recuperación; 100,526% y 100,441% y un coeficiente de variación de 0,247%, siendo el valor máximo aceptado 2%. Por lo tanto podemos afirmar que el sistema es preciso por tener buena repetibilidad y que la técnica es precisa por ser reproducible frente al ensayo con dos analistas en diferentes días. Estos resultados son refrendados por Morales,¹⁰ quien en su estudio determinó la precisión del sistema obteniendo una desviación estándar

relativa de 0,58%, siendo el valor máximo 3,9%, demostrando la repetibilidad de los resultados; así como también determinó la precisión del método, obteniendo una desviación estándar relativa de 0,88% siendo el valor máximo 5,5% demostrando así la reproducibilidad de los resultados. Flores,⁵ en su trabajo de investigación reportó una desviación estándar relativa de 0,778% para el ensayo de repetibilidad con un criterio de aceptación no mayor al 2%, y una desviación estándar relativa de 0,622% para la reproducibilidad con un criterio de aceptación no mayor al 4% demostrando así que el método es reproducible y repetible. Así mismo Medina y Berrocal,²⁰ determinaron los valores de desviación estándar relativa de 0,17% para repetibilidad y 0,16% para la precisión intermedia, demostrando así la precisión del método analítico.

En la Tabla 05, podemos ver los resultados que se presentan al variar el flujo al 50% (0,6 ml/min) del valor de las condiciones cromatográficas normales para determinar la robustez del método, obteniéndose un coeficiente de variación de 0,239%, siendo el valor máximo permitido 2%, con lo cual se determinó que nuestro método es robusto frente a variaciones deliberadas como el flujo. Pero también se observó que cuando el flujo se disminuye a la mitad, el tiempo de retención se duplica como podemos observar en los Anexos 17 y 23, se observa las corridas cromatográficas del estándar para la precisión que se trabajó a un flujo normal (1,2 ml/min) y se observa que tiene un tiempo de retención de 5,942 min; mientras que para la corrida cromatográfica del estándar para la robustez se modificó el flujo (0,6 ml/min) se obtuvo un tiempo de retención de 11,776 min, lo cual también se puede evidenciar para las muestras en los Anexos 19 y 25, ya que al disminuir el flujo de la fase móvil, el analito es retenido con mayor facilidad dentro de la columna, debido a que se disminuye el paso de la fase móvil por el sistema y por consiguiente aumenta la interacción entre el analito y la capa de

sílize que recubre la columna, aumentando así el tiempo de elución del analito.²⁴

Velastegui,²⁵ en su investigación donde valida el método analítico para la valoración de amoxicilina en polvo para suspensión oral, prueba la robustez del método aumentando el flujo en un 10% obteniendo una desviación estándar relativa del 1,5%, estableciendo como valor máximo permitido 3,69%. La Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI),⁷ menciona que la International Conference on Harmonization (ICH) y la farmacopea de los Estados Unidos (USP) definen la robustez junto con los parámetros de validación de un método analítico, aunque este parámetro no es considerado todavía un requisito necesario, sino que surgió con el fin de resolver los problemas que se plantean en la transferencia de métodos analíticos entre laboratorios.

En la Tabla 06, se muestra los resultados de la selectividad del método en el cual se compara los tiempos de retención para el estándar, la muestra, el placebo y los excipientes de la formulación, donde podemos evidenciar que el estándar tiene un tiempo de elución de 10,299 min y la muestra tiene un tiempo de elución de 10,576 min; pero para el caso del placebo y los excipientes no muestran señales en este tiempo de retención, cumpliendo el criterio de aceptación que menciona que ninguno de los excipientes debe eluir en el mismo tiempo de retención del estándar. Pero si observamos los Anexos 28 y 29, de las corridas cromatográficas del placebo y la muestra se observan picos cromatográficos que tienen tiempos de elución en el rango de 1 - 4 minutos, las cuales corresponden al acesulfame potásico, esencia de tutti frutti, metilparabeno y propilparabeno respectivamente (Anexo 36) las cuales se pueden evidenciar en los Anexos del 30 al 35, donde se observan las corridas cromatográficas de los excipientes que forman parte de la formulación. Por tanto, podemos afirmar que el método es específico porque identifica los picos del estándar y el activo

en tiempos de retención similares y es selectivo porque ninguno de los excipientes interfiere con el pico del activo. Este resultado puede ser refrendado por estudios como el de Medina y Berrocal,²⁰ donde se determina que el método estudiado es selectivo porque permite obtener picos cromatográficos de naproxeno sódico con tiempos de retención similares entre el estándar y la muestra, además el análisis cromatográfico del placebo demuestra que ninguno de los excipientes interfiere con el pico del principio activo.

Morales,¹⁰ en su trabajo de investigación determinó que el método analítico estudiado es selectivo, porque los excipientes de la formulación no interfieren en la determinación del principio activo, así mismo muestra tiempos de retenciones similares para el estándar y la muestra (6,3 min).

Basándonos en los análisis estadísticos realizados a los diferentes parámetros podemos afirmar que el método analítico cumple con los parámetros de validación establecidos por la farmacopea vigente (USP 35 – NF 30), por ser un método lineal, exacto, preciso, selectivo y robusto, con lo cual establecemos evidencia documentada que permiten asegurar que el método analítico es confiable y se encuentra validado.

VI. CONCLUSIONES

1. El método analítico para la cuantificación de diclofenaco ácido libre en Dolfenex® 9mg/5ml suspensión oral está validado por cumplir con los parámetros de validación propuestos por la farmacopea vigente (USP 35 – NF 30).
2. El método analítico para la cuantificación de diclofenaco ácido libre cumple con los análisis de validación, en la que el método es lineal en el intervalo de 50% a 150%, obteniendo un coeficiente de determinación ($r^2 = 0,997$), es exacto porque permite la recuperación del analito sin presentar diferencia significativa entre el porcentaje recuperado (100,219%) y el 100%, es preciso porque nos permite obtener resultados repetitivos con un coeficiente de variación (CV=0,235%) y además es reproducible al ser probado por dos analistas diferentes. Obteniendo un coeficiente de variación (CV= 0,247%); es robusto porque presentando un (CV=0,239%), frente a ligeras variaciones como la modificación del flujo a la mitad (0,6 ml/min). y es selectivo porque permite el análisis del principio activo sin la interferencia de los excipientes.

VII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda validar las técnicas analíticas de uso rutinario y sobre todo las técnicas para productos nuevos, en especial las consideradas como "técnica propia", por ser una disposición de la autoridad sanitaria (DIGEMID).
2. Se recomienda realizar el análisis de suspensiones que tengan diclofenaco ácido libre por el método de cromatografía líquida de alta resolución por su gran sensibilidad y selectividad en la identificación de dicho principio activo.
3. Se recomienda la aplicación de este método analítico para la cuantificación de diclofenaco ácido libre en suspensiones orales, por los diferentes laboratorios farmacéuticos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Skoog D, Holle F, Nieman T. Principios de análisis instrumental. 5ª ed. España: McGraw– Hill Interamericana; 2001.
2. Azaña Y, Cornelio J. Desarrollo y validación de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para cuantificar clonixinato de lisina 125mg y pargeverina clorhidrato 10mg en tabletas recubiertas [Tesis pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007.
3. Enciso M. Validación prospectiva de la técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para el Pectoflem Jarabe [Tesis pregrado]. Ayacucho, Perú: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2010.
4. Bellido N. Validación de método analítico por cromatografía líquida de alta resolución para determinación cuantitativa de ambroxol clorhidrato en jarabe [Tesis pregrado]. Ayacucho, Perú: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2007.
5. Flores Y. Desarrollo y validación de la técnica analítica por cromatografía líquida de alta eficiencia (H.P.L.C.) para la determinación de contenido de vitamina D₃ colecalciferol en suspensión oral [Tesis pregrado]. Ayacucho, Perú: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2011.
6. Breña M. Validación de técnicas analíticas. Presentado en el curso internacional "Registros sanitarios de medicamentos y cosméticos"; 2012 Jul 14 y 21; Lima, Perú.
7. Aguirre L, García J, García T, Ilera M, Juncadella M, Juncadella M, Lizondo M, Lluch A, Martín M, Mateos B, Ochoa C, Pujol M, Reig M, Torres M. Validación de métodos analíticos. A.E.F.I., Sección Catalana. Madrid; 2001.
8. Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos de América. Farmacopea de los estados Unidos. Trigésima Quinta Revisión. Estados Unidos de America: United Book Press; 2012. P. 282-283; 967- 972. (USP 35 – NF 30; vol 1).
9. Ministerio de Salud - DIGEMID. Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de productos Farmacéuticos. [Internet]. Lima: DIGEMID, febrero de 1999


[fecha de acceso 23 de julio de 2012]. Disponible en:
URL:<http://bvccenadim.digemid.minsa.gob.pe/lildbi/textcomp/PUBDIGEMID0007.pdf>

10. Morales C. Desarrollo y validación prospectiva de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta Performance HPLC para enalapril 10 mg tabletas recubiertas. [Tesis pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2004.
11. OMS. WHO expert committee on specifications for pharmaceutical preparations. [Internet]. Singapore: WHO; 2003. [fecha de acceso 10 de enero de 2013] Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_908.pdf
12. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Humans Use (ICH). Validation of analytical procedures text and methodology Q2(R1). [Internet]. 2005. [fecha de acceso 25 de julio de 2012] Disponible en: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf
13. Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos de América. Farmacopea de los estados Unidos. Trigésima Revisión. Estados Unidos de America: Port City Press; 2006. P. 272 - 276 (USP 30 – NF 25; vol 1).
14. Gennaro A. Remington Farmacia Vol 1. 20^a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2003.
15. DrugBank. Open Data Drug & Drug Target Database [base de datos en Internet]. 2005; [fecha de acceso 27 de julio de 2012]. Disponible en: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00586>
16. Bellido N. Protocolo de análisis de materia prima N° MP 325-11. Lima: Área de control de calidad del Instituto Quimioterapico S.A. (IQFARMA); 2012.
17. Neal M. Farmacología Médica en esquemas. 5a ed. Londres: Servicios bibliográficos S.A; 2007.
18. Florez J, Arminio J, Mediavilla A. Farmacología humana. 4^a ed. Barcelona: MASSON S.A.; 2003.
19. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación. 4^a

- ed. México: McGraw - Hill interamericana; 2006.
20. Medina J, Berrocal J. Validación de método analítico de valoración de naproxeno sódico 550mg tabletas por cromatografía líquida de alta Performance [Tesis pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2008.
 21. FDA. Guidance for industry process validation: general principles and practice. [Internet]. United States: department of health and human services FDA; January 2011, [fecha de acceso 21 de Julio de 2012]. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070336.pdf>
 22. Prado C. Desarrollo y validación de la técnica analítica por cromatografía líquida de alta eficiencia (H.P.L.C.) para la determinación de contenido de Ciprofloxacino 3mg/ml y Dexametasona 1mg/ml, en suspensión oftálmica. Lima [Tesis pregrado]. Ayacucho, Perú: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2008.
 23. Velandia J. Validación del método analítico para la cuantificación de Bacitracina en el laboratorio de control de calidad de una industria farmacéutica veterinaria. [Tesis pregrado]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2008.
 24. Barquero M. Mecanismos y aplicaciones de la cromatografía líquida de alto desempeño. Costa Rica: Editorial de la universidad de Costa Rica; 2004.
 25. Velastegui J. Validación del método analítico de valoración de Amoxicilina en polvo para suspensión oral producido por Betapharma S.A, mediante HPLC. [Tesis pregrado]. Riobamba – Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2011.

ANEXOS

Anexo 01

| | | | |
|---|--|--|-----------------|
|  | IQFARMA Instituto Quimioterápico S.A. DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO | T.A. N° IDTPT420 | Pág.: 1 de 2 |
| Sustituye a: Nuevo | TECNICA ANALITICA DE PRODUCTOS TERMINADOS | N° Revisión: 00 | |
| Vigente desde: Marzo 2012 | DOLFENEX 9mg/5mL SUSPENSION ORAL (Diclofenaco) | Fecha Próxima Revisión: Marzo 2014 | |
| Elaborado por: A.: F.Romero | Revisado por: J.D.: J. Espinoza | Aprobado por: D.T.: C. Villena | |

1. **ASPECTO**
 Colocar la suspensión en una placa de petri y observar sobre fondo blanco y con luz blanca.
 Especificación: Suspensión de color blanco a casi blanco, con olor característico

 2. **VOLUMEN VERTIDO**
 Determinar el volumen de 10 unidades individualmente y determinar el promedio según USP Vigente
 Técnica General <698>.
 Especificación: Mínimo 60 mL/fco.


 3. **DETERMINACION DE pH**
 Determinar el pH según USP Vigente. Técnica general <791>.
 Especificación: 3,0 – 5,0

 4. **IDENTIFICACION DE DICLOFENACO**
 Método : Cromatografía Líquida (HPLC)
 Referencia : Técnica Propia
 Procedimiento: Seguir las condiciones cromatográficas, la preparación de estándar y la preparación de muestra de acuerdo al método de Valoración de Diclofenaco ácido libre.
 Especificación: El tiempo de retención del principio activo en la muestra se corresponde con el del estándar (HPLC).

 5. **VALORACION DE DICLOFENACO ACIDO LIBRE**
 Declarado : Diclofenaco Acido Libre 9 mg/5ml.
 Método : Cromatografía Líquida (HPLC)
 Referencia : Técnica Propia
 Consideraciones : Proteger de la luz.
 Especificación : 8,1 mg/5mL. – 9.9 mg/5mL. (90,0 % - 110,0 %)
- 5.1 SISTEMA CROMATOGRAFICO**
- Equipo
- a) (HPLC) Agilent 1100 series
 - Desgasificador : JP40725027
 - Pump : DE43608076
 - Autosampler : DE33230296
 - Detector (DAD) : DE43603455
 - Column oven : DE43648493

 - b) (HPLC) Agilent 1200 series
 - Desgasificador : JP94172806
 - Pump : DE62958865
 - Autosampler : DE64776454
 - Detector(DAD) : DE64262917
 - Column oven : DE90374759

 - c) (HPLC) Agilent 1260
 - Pump : DEAB704457
 - Autosampler : DEAAC11452
 - Detector (DAD) : DEAA303024

| | | | |
|---|---|---|-----------------|
|  | IQFARMA Instituto Quimioterápico S.A. DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO | T.A.Nº IDTPT420 | Pág.: 2 de 2 |
| | Sustituye a: Nuevo | TECNICA ANALITICA DE PRODUCTOS TERMINADOS DOLFENEX 9mg/5mL SUSPENSION ORAL | Nº Revisión: 0 |

Column oven : DEACNI2626

Columna Cromatográfica: Purospher STAR®100 RP-8 (5 µm); 150 mm x 4,6 mm

5.2 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Longitud de Onda : 254 nm
 Flujo : 1,2 mL/min
 Volumen de inyección : 10 µL
 DSRiny : No mayor de 2,0 %
 Tiempo de corte aprox. : 10 min.

5.3 REACTIVOS

Buffer fosfato pH 2,5: Mezclar volúmenes iguales de ácido fosfórico 0,01 M y fosfato de sodio monobásico 0,01 M y llevarlo a pH 2,5 ± 0,2 con ácido fosfórico o hidróxido de sodio.
Fase Móvil: Preparar una mezcla de metanol y Buffer fosfato pH 2,5 (70:30). Filtrar por membrana de nylon 0,2 µm de porosidad y dejar al vacío por 3 minutos para desgasificar.
Diluyente: Metanol

5.4 PROCEDIMIENTO

Solución estándar: Pesar aproximadamente 22,5 mg de Diclofenaco ácido libre estándar de referencia, transferir a una fiola de 50 mL, adicionar 30 mL de metanol, sonicar por 10 minutos enfriar a temperatura ambiente y completar a volumen con metanol, mezclar, transferir 5 mL de la solución anterior y llevarlo a fiola de 25 mL, completar a volumen con metanol. Filtrar por membrana de nylon 0,4 µm de porosidad. (Concentración aproximada: Diclofenaco ácido libre 0,09 mg/mL)

Preparación de la muestra: Pesar una cantidad equivalente a 9 mg de Diclofenaco (aproximadamente 5 mL de suspensión) a una fiola de 100 mL. Agregar 60 mL de Metanol, sonicar por 15 minutos con agitación constante (hasta completa dispersión de la muestra), enfriar a temperatura ambiente, completar a volumen con Metanol y mezclar. Filtrar por membrana de nylon 0,2 µm de porosidad. (Concentración aproximada: Diclofenaco ácido libre 0,09 mg/mL).

5.5 CALCULOS

$$X = \frac{Amp}{Ast} \times \frac{Wst}{50} \times \frac{5}{25} \times \frac{Pot\% / c}{100} \times \frac{100}{Wmp} \times Gex^5.$$

Donde:

X : mg de Diclofenaco ácido libre por cada 5 mL.
 Pot % / c : Potencia del estándar de referencia en porcentaje de droga tal cual.
 Amp : Área de muestra problema
 Ast : Área de estándar
 Wst : Peso estándar de en mg
 Wmp : Peso de muestra en g
 Ge. : Gravedad específica de la muestra.

6. ENSAYO MICROBIOLÓGICO:

Especificación:
 Recuento Total de Microorganismos Aerobios: No mayor de 100 ufc/g
 Recuento Total Combinado de Mohos y Levaduras: No mayor de 10 ufc/g
 Determinación de Microorganismos Específicos: *Escherichia coli* Ausencia/g
 Técnica operatoria: Método USP vigente.

7. REFERENCIA: Técnica Propia

Métodos Generales basados en USP Vigente.

Figura 03. Técnica analítica a validar. IQFARMA, Lima – 2012.

Anexo 02



PROTOCOLO DE ANÁLISIS DE MATERIA PRIMA

| | | | |
|-------------------------------|--|-----------------------|-------------------------|
| Nombre | DICLOFENACO ACIDO LIBRE | | |
| Cantidad | 5,0 kg | | |
| Cod. M.P. | IMP00337 | Marca | AARTI DRUGS LTD LIMITED |
| Lote | DF A/ 11070004 | Protocolo de Análisis | MP 325-II |
| Fecha de recep | 24-01-2012 | Proveedor | AARTI DRUGS LTD |
| Nº Documento | 011943 | Guía/Factura | EXP/1532/533A |
| Condiciones de Almacenamiento | Conservar en envases bien cerrados, protegidos de la luz | | |
| Envase | 01 ENVASE | | |

| ENSAYO FISICOQUIMICO | ESPECIFICACIONES | RESULTADOS |
|-------------------------|--|---------------------------------------|
| DESCRIPCIÓN | Polvo cristalino blanco a casi blanco Libre de puntos negros y partículas extrañas | CONFORME |
| SOLUBILIDAD | Escasamente soluble en metanol, acetona, cloroformo e hidróxido de sodio 0,1N | CONFORME |
| IDENTIFICACIÓN | a) El espectro infrarrojo de la muestra es semejante al espectro infrarrojo del estándar b) El espectro ultravioleta de la muestra es semejante al espectro ultravioleta del estándar | CUMPLE |
| PERDIDA POR SECADO | No más de 0,5% | 0,28% |
| TEMPERATURA DE FUSIÓN | Entre 162 °C a 168 °C | 164 °C |
| RESIDUO DE INCINERACIÓN | No más de 0,1% | 0,039% |
| VALORACIÓN | No menos de 98,0% y no más de 101,0% de C ₁₄ H ₁₁ O ₂ NO ₂ , calculado con respecto a la sustancia seca | 98,869% Tal cual 99,055% Base seca |

| ENSAYO MICROBIOLÓGICO | ESPECIFICACIONES | RESULTADOS | |
|---|----------------------|-------------------|------------|
| Recuento Total de Microorganismos Aerobios | No mayor de 30 ufc/g | Menor de 10 ufc/g | |
| Recuento Total Combinado de Mohos y Levaduras | No mayor de 10 ufc/g | Menor de 10 ufc/g | |
| Determinación de Patógenos: | | | |
| <i>Escherichia coli</i> | Ausente/10 g | Ausente/10 g | |
| <i>Salmonella</i> spp. | Ausente/10 g | Ausente/10 g | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Ausente/10 g | Ausente/10 g | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Ausente/10 g | Ausente/10 g | |
| Fecha de Siembra | 25-01-2012 | Fecha de Lectura | 31-01-2012 |

| | | | |
|-------------------|------------|----------------------|----------------|
| Observaciones | | | |
| Resultado | APROBADO | Técnica según | Técnica Propia |
| Fecha de Análisis | 25-01-2012 | Fecha de Reanálisis | 01/2014 |
| | | Fecha de Vencimiento | 06/2016 |



 Q.F. ANALISTA



 JEFE CONTROL CALIDAD

CC/F-066.02

Figura 04. Protocolo de análisis de materia prima para el diclofenaco ácido libre. IQFARMA, Lima 2012.

Anexo 03

Tabla 07. Resultados de los parámetros estadísticos de la linealidad.

| Parámetros estadísticos | Resultados |
|---|------------|
| Test de hipótesis para el coeficiente de correlación "r" | |
| Coefficiente de correlación "r" | 0,999 |
| t_{exp} | 80,041 |
| t_{tabla} | 2,101 |
| Criterio de aceptación $t_{exp} > t_{tabla}$ | CUMPLE |
| Test de linealidad a partir de la desviación estándar de la pendiente "b" | |
| Varianza de la pendiente (S_b^2) | 11187,078 |
| Desviación estándar de la pendiente (S_b) | 105,769 |
| Límite de confianza inferior | 8243,629 |
| Límite de confianza superior | 8688,070 |
| t_{exp} | 80,041 |
| t_{tabla} | 2,101 |
| Criterio de aceptación $t_{exp} > t_{tabla}$ | CUMPLE |
| Test de linealidad a partir del coeficiente de variación de los factores respuesta (f) | |
| Promedio de los factores respuesta (\bar{f}) | 9009,205 |
| Desviación estándar de los factores respuesta (S_f) | 206,063 |
| Coefficiente de variación (CV) | 2,287 |
| Criterio de aceptación $CV \leq 5\%$ | CUMPLE |
| Test de proporcionalidad a partir de la significancia estadística del intercepto "a" | |
| Varianza del Intercepto (S_a^2) | 104,384 |
| Desviación estándar del intercepto (S_a) | 10,217 |
| Límite de confianza inferior | 22,457 |
| Límite de confianza superior | 65,388 |
| t_{exp} | 4,299 |
| t_{tabla} | 2,101 |
| Criterio de aceptación $t_{exp} > t_{tabla}$ | CUMPLE |

Anexo 04

Tabla 08. Niveles de concentración del estándar de diclofenaco ácido libre según muestras.

| Muestra (%) | Nº | Concentración mg/ml (x) | Área (y) | x ² | y ² | x.y | f = (y/x) |
|-------------|----|-------------------------|-----------|----------------|----------------|----------|------------|
| 50% | 1 | 0,0450 | 409,5876 | 0,0020 | 167761,994 | 18,432 | 9101,436 |
| | 2 | 0,0450 | 411,3742 | 0,0020 | 169228,716 | 18,513 | 9141,136 |
| | 3 | 0,0450 | 418,8316 | 0,0020 | 175419,909 | 18,848 | 9306,847 |
| | 4 | 0,0450 | 415,8292 | 0,0020 | 172913,890 | 18,713 | 9240,130 |
| 75% | 5 | 0,0686 | 628,5257 | 0,0047 | 395044,556 | 43,104 | 9164,996 |
| | 6 | 0,0686 | 621,5473 | 0,0047 | 386321,046 | 42,625 | 9063,239 |
| | 7 | 0,0686 | 628,7828 | 0,0047 | 395367,860 | 43,121 | 9168,746 |
| | 8 | 0,0686 | 624,5836 | 0,0047 | 390104,698 | 42,833 | 9107,514 |
| 100% | 9 | 0,0915 | 831,0939 | 0,0084 | 690717,120 | 76,045 | 9082,969 |
| | 10 | 0,0915 | 830,7775 | 0,0084 | 690191,205 | 76,016 | 9079,510 |
| | 11 | 0,0915 | 833,6970 | 0,0084 | 695050,621 | 76,283 | 9111,417 |
| | 12 | 0,0915 | 831,9070 | 0,0084 | 692069,223 | 76,120 | 9091,855 |
| 125% | 13 | 0,1153 | 1040,5241 | 0,0133 | 1082690,299 | 119,934 | 9027,378 |
| | 14 | 0,1153 | 1032,8135 | 0,0133 | 1066703,684 | 119,045 | 8960,482 |
| | 15 | 0,1153 | 1037,1770 | 0,0133 | 1075736,129 | 119,548 | 8998,339 |
| | 16 | 0,1153 | 1032,7068 | 0,0133 | 1066483,314 | 119,033 | 8959,557 |
| 150% | 17 | 0,1352 | 1174,7606 | 0,0183 | 1380062,514 | 158,778 | 8691,766 |
| | 18 | 0,1352 | 1173,5679 | 0,0183 | 1377261,545 | 158,617 | 8682,941 |
| | 19 | 0,1352 | 1156,0541 | 0,0183 | 1336461,036 | 156,250 | 8553,361 |
| | 20 | 0,1352 | 1169,1818 | 0,0183 | 1366985,988 | 158,024 | 8650,489 |
| SUMA | | 1,8220110 | 16303,323 | 0,1866 | 14772575,349 | 1659,885 | 180184,105 |
| PROMEDIO | | 0,0911005 | 815,166 | 0,0093 | 738628,767 | 82,994 | 9009,205 |

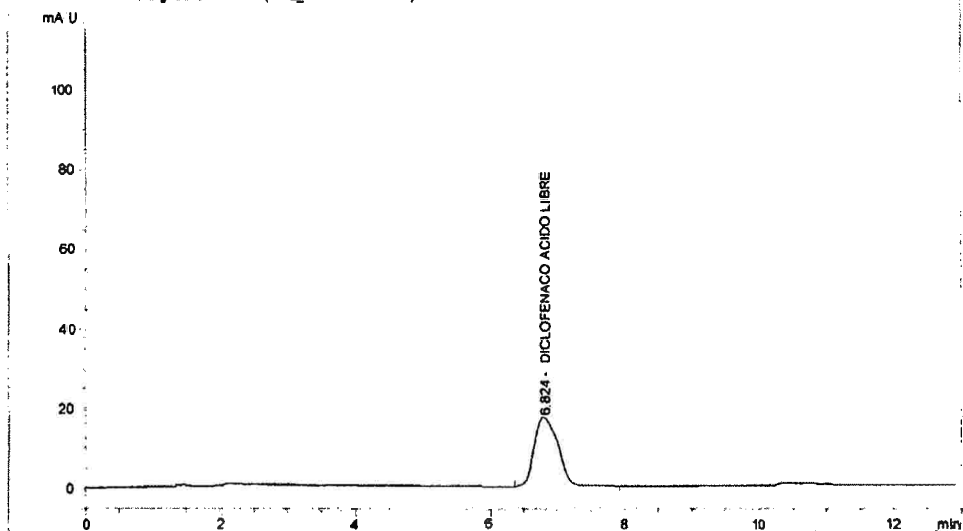
Anexo 05

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\DOL_VAL\SIG10001.D

Sample Name: 50%_REP1

```

=====
Injection Date : 13/10/2012 01:47:00 p.m.      Seq. Line : 1
Sample Name    : 50%_REP1                      Location  : Vial 1
Acq. Operator  : M.VELARDE/F.ROMERO           Inj       : 1
                                           Inj Volume: 10 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\DOL_VAL.M
Last changed   : 13/10/2012 01:44:51 p.m. by M.VELARDE/F.ROMERO
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\DOL_VAL.M
Last changed   : 18/10/2012 07:59:20 p.m. by M.VELAROE/F.ROMERO
LINEALIDAD DE LA VALORACION DE DOLFENEX 9mg/5mL SUSPENSION ORAL
DAD1 A Sig=254.4 Ref=off (DOL_VAL\SIG10001.D)
=====
    
```



External Standard Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Thursday, 18 October 2012 07:59:20 p.m.
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=off

| RetTime [min] | Type | Area [mAU*s] | Amt/Area | Amount [ng/ul] | Grp | Name |
|---------------|------|--------------|------------|----------------|-----|-------------------------|
| 6.824 | BBA | 409.58759 | 1.08668e-4 | 4.45090e-2 | | DICLOFENACO ACIDO LIBRE |

Totals : 4.45090e-2

Results obtained with enhanced integrator!

Figura 05. Cromatograma del estándar de diclofenaco ácido libre a una concentración de 50%.

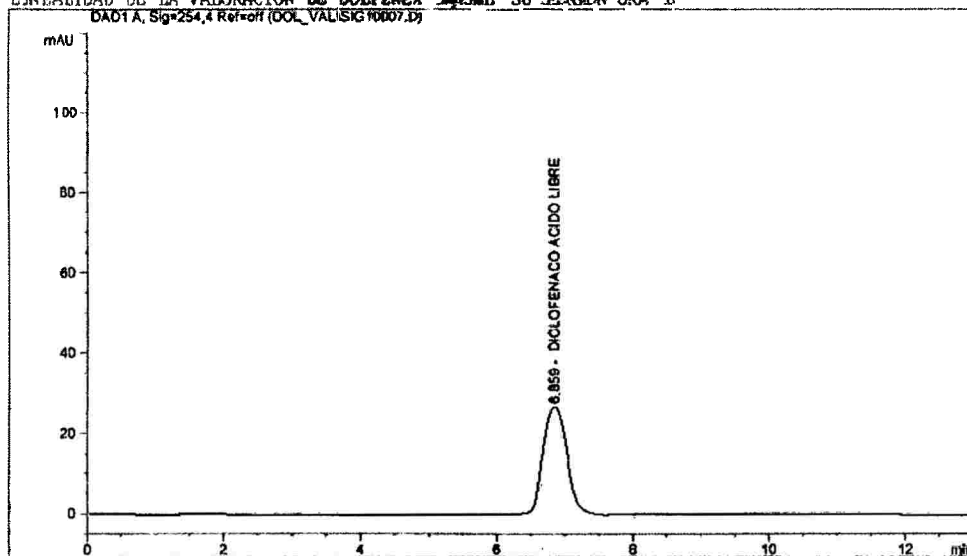
Anexo 06

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\DOL_VA_L\SIG10007.D

Sample Name: 75%_REP1

```

=====
Injection Date : 13/10/2012 03:13:08 p.m.      Seq. Line : 7
Sample Name    : 75%_REP1                      Location  : Vial 3
Acq. Operator  : M.VELARDE/F.ROMERO           Inj      : 1
                                           Inj Volume : 10 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\DOL_VAL.M
Last changed   : 13/10/2012 01:44:51 p.m. by M.VELARDE/F.ROMERO
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DOL_VAL.M
Last changed   : 18/10/2012 07:59:20 p.m. by M.VELARDE/F.ROMERO
LINEALIDAD DE LA VALORACION DE DOLFENEX 9mg/5mL SU SUSPENSION ORAL
=====
  
```



External Standard Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Thursday, 18 October 18e 2012 07:59:20 p.m.
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Use Multiplier& Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254.4 Ref=off

| RetTime [min] | Type | Area [mAU*s] | Am/Area | Amount [ng/ul] | Grp | Name |
|---------------|------|--------------|------------|----------------|-----|-------------------------|
| 6.859 | PBA | 628.52570 | 1.10307e-4 | 6.93307e-2 | | DICLOFENACO ACIDO LIBRE |

Totals : 6.93307e-2

Results obtained with enhanced integrator!

Figura 06. Cromatograma del estándar de diclofenaco ácido libre a una concentración de 75%.

Anexo 07

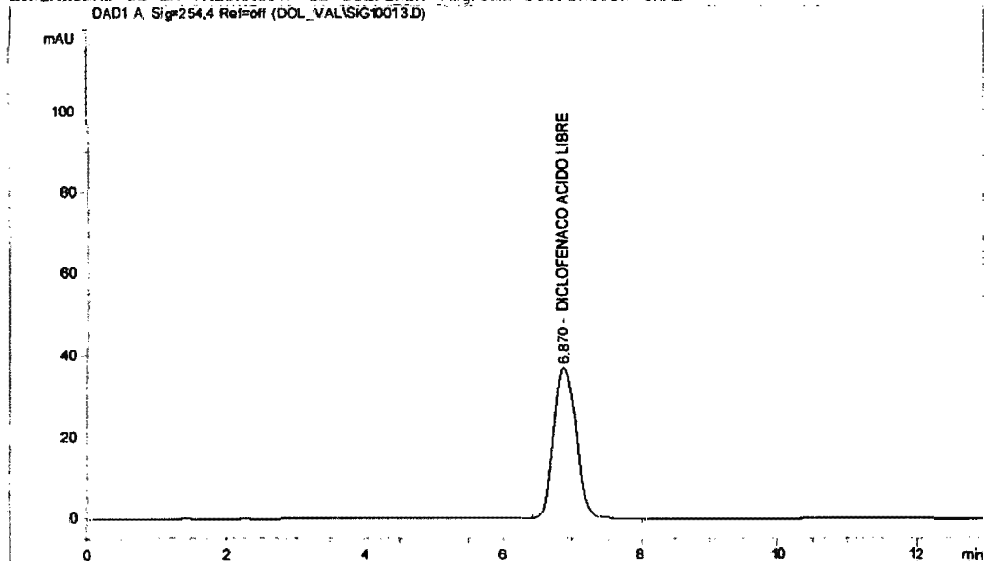
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\DOL VAL\SIG10013.D

Sample Name: 100%_REP1

```

-----
Injection Date : 13/10/2012 04:39:15 p.m.      Seq. Line : 13
Sample Name    : 100%_REP1                    Location  : Vial 5
Acq. Operator  : M.VELARDE/F.ROMERO           Inj       : 1
                                           Inj Volume: 10 µl

Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\DOL_VAL.M
Last changed  : 13/10/2012 01:44:51 p.m. by M.VELARDE/F.ROMERO
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DOL_VAL.M
Last changed  : 18/10/2012 07:59:20 p.m. by M.VELARDE/F.ROMERO
LINEALIDAD DE LA VALORACION DE DOLFENEX 9mg/5mL SUSPENSION ORAL
DAD1 A Sig=254,4 Ref=off (DOL_VAL\SIG10013.D)
    
```



External Standard Report

```

-----
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Thursday, 18 18e October 18e 2012 07:59:20 p.m.
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=off

| RetTime [min] | Type | Area [mAU*s] | Amt/Area | Amount [ng/ul] | Grp | Name |
|---------------|------|--------------|------------|----------------|-----|-------------------------|
| 6.870 | BBA | 831.09393 | 1.11054e-4 | 9.22965e-2 | | DICLOFENACO ACIDO LIBRE |

Totals: 9.22965e-2

Results obtained with enhanced integrator!

Figura 07. Cromatograma del estándar de diclofenaco ácido libre a una concentración de 100%.

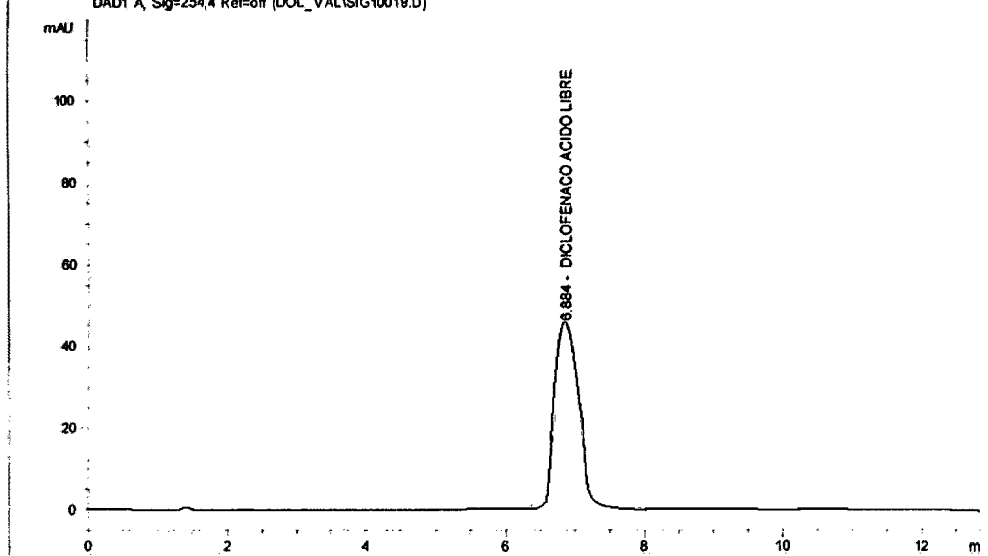
Anexo 08

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\DOL_VAL\SIG10019.D

Sample Name: 125%_REP

```

-----
Injection Date : 13/10/2012 06:05:22 p.m.      Seq. Line : 19
Sample Name    : 125%_REP1                     Location  : Vial 7
Acq. Operator  : M.VELARDE/F.ROMERO           Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 10 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\DOL_VAL.M
Last changed   : 13/10/2012 06:05:27 p.m. by M.VELARDE/F.ROMERO
                (modified after loading)
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\DOL_VAL.M
Last changed   : 18/10/2012 07:59:20 p.m. by M.VELARDE/F.ROMERO
LINEALIDAD DE LA VALORACION DE DOL FENEX 9mg/5mL SUSPENSION ORAL
                DAD1 A, Sig=254,4 Ref=off (DOL_VAL\SIG10019.D)
    
```



External Standard Report

```

-----
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Thursday, 18 18e October 18e 2012 07:59:20 p.m.
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=off

| RetTime [min] | Type | Area [mAU*s] | Amt/Area | Amount [ng/ul] | Grp | Name |
|---------------|------|--------------|------------|----------------|-----|-------------------------|
| 6.884 | PBA | 1040.52405 | 1.11521e-4 | 1.16040e-1 | | DICLOFENACO ACIDO LIBRE |

Totals: 1.16040e-1

Results obtained with enhanced integrator!

Figura 08. Cromatograma del estándar de diclofenaco ácido libre a una concentración de 125%.

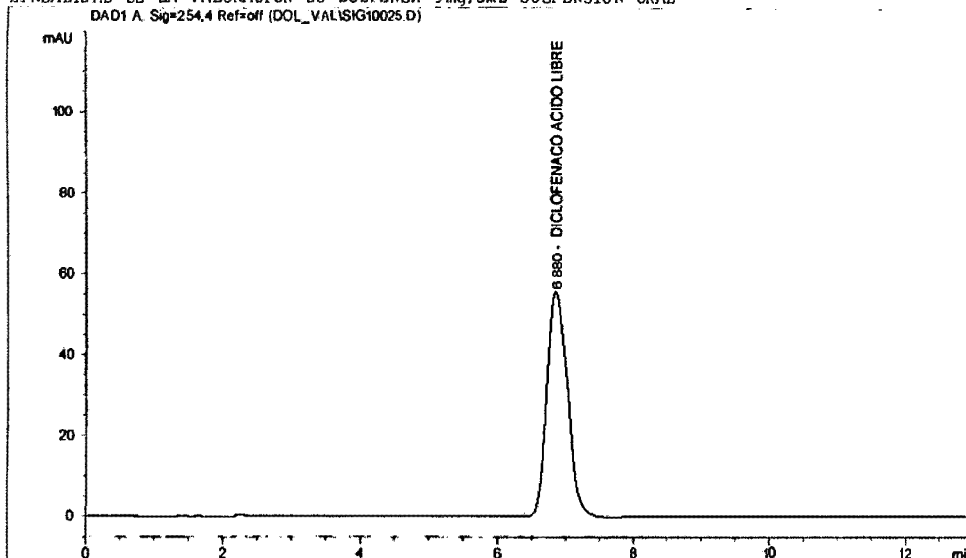
Anexo 09

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\DOL_VAL\SIG10025.D

Sample Name: 150%_REP1

```

=====
Injection Date : 13/10/2012 07:32:13 p.m.      Seg. Line : 25
Sample Name   : 150%_REP1                      Location  : Vial 9
Acq. Operator : M.VELARDE/F.ROMERO             Inj       : 1
                                           Inj Volume: 10 µl
Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\DOL_VAL.M
Last changed  : 13/10/2012 07:31:03 p.m. by M.VELARDE/F.ROMERO
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DOL_VAL.M
Last changed  : 18/10/2012 07:59:20 p.m. by M.VELARDE/F.ROMERO
LINEALIDAD DE LA VALORACION DE DOLFENEX 9mg/5mL SUSPENSION ORAL
DAD1 A, Sig=254,4 Ref=off (DOL_VAL\SIG10025.D)
    
```



External Standard Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Thursday, 18 18e October 18e 2012 07:59:20 p.m.
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=off

| RetTime [min] | Type | Area [mAU*s] | Amt/Area | Amount [ng/ul] | Grp | Name |
|---------------|------|--------------|------------|----------------|-----|-------------------------|
| 6.880 | BBA | 1174.76062 | 1.11733e-4 | 1.31259e-1 | | DICLOFENACO ACIDO LIBRE |

Totals : 1.31259e-1

Results obtained with enhanced integrator!

Figura 09. Cromatograma del estándar de diclofenaco ácido libre a una concentración de 150%.

Anexo 10

Tabla 09. Áreas cromatográficas y tiempos de retención del estándar de diclofenaco ácido libre.

Sequence file C:\HPCHEM\1\SEQUENCE\DOL_VAL.S

Statistic Report

Sequence table: C:\HPCHEM\1\SEQUENCE\DOL_VAL.S
 Data directory path: C:\HPCHEM\1\DATA\DOL_VAL
 Operator: M.VELARDE/F.ROMERO

Method file name: C:\HPCHEM\1\METHODS\DOL_VAL.M

| Run # | Location | Inj # | Inj. Date/Time | File Name | Sample Name |
|-------|----------|-------|--------------------------|------------|-------------|
| 1 | Vial 1 | 1 | 13/10/2012 01:47:00 p.m. | SIG10001.D | 50%_REP1 |
| 2 | Vial 1 | 1 | 13/10/2012 02:01:23 p.m. | SIG10002.D | 50%_REP2 |
| 3 | Vial 2 | 1 | 13/10/2012 02:30:04 p.m. | SIG10004.D | 50%_REP1 |
| 4 | Vial 2 | 1 | 13/10/2012 02:44:24 p.m. | SIG10005.D | 50%_REP2 |
| 5 | Vial 3 | 1 | 13/10/2012 03:13:08 p.m. | SIG10007.D | 75%_REP1 |
| 6 | Vial 3 | 1 | 13/10/2012 03:27:29 p.m. | SIG10008.D | 75%_REP2 |
| 7 | Vial 4 | 1 | 13/10/2012 03:56:10 p.m. | SIG10010.D | 75%_REP1 |
| 8 | Vial 4 | 1 | 13/10/2012 04:10:31 p.m. | SIG10011.D | 75%_REP2 |
| 9 | Vial 5 | 1 | 13/10/2012 04:39:15 p.m. | SIG10013.D | 100%_REP1 |
| 10 | Vial 5 | 1 | 13/10/2012 04:53:37 p.m. | SIG10014.D | 100%_REP2 |
| 11 | Vial 6 | 1 | 13/10/2012 05:22:19 p.m. | SIG10016.D | 100%_REP1 |
| 12 | Vial 6 | 1 | 13/10/2012 05:36:40 p.m. | SIG10017.D | 100%_REP2 |
| 13 | Vial 7 | 1 | 13/10/2012 06:05:22 p.m. | SIG10019.D | 125%_REP1 |
| 14 | Vial 7 | 1 | 13/10/2012 06:20:25 p.m. | SIG10020.D | 125%_REP2 |
| 15 | Vial 8 | 1 | 13/10/2012 06:49:09 p.m. | SIG10022.D | 125%_REP1 |
| 16 | Vial 8 | 1 | 13/10/2012 07:03:30 p.m. | SIG10023.D | 125%_REP2 |
| 17 | Vial 9 | 1 | 13/10/2012 07:32:13 p.m. | SIG10025.D | 150%_REP1 |
| 18 | Vial 9 | 1 | 13/10/2012 07:46:35 p.m. | SIG10026.D | 150%_REP2 |
| 19 | Vial 10 | 1 | 13/10/2012 08:15:22 p.m. | SIG10028.D | 150%_REP1 |
| 20 | Vial 10 | 1 | 13/10/2012 08:29:47 p.m. | SIG10029.D | 150%_REP2 |

Compound: DICLOFENACO ACIDO LIBRE (Signal: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=off)

| Run # | Type | RetTime [min] | Amount [ng/ul] | Area [mAU*s] | Height [nAU] | Width [min] | Symm. |
|---------|------|---------------|----------------|--------------|--------------|-------------|-------|
| 1 | BBA | 6.824 | 4.46284e-2 | 409.58759 | 16.56993 | 0.4004 | 0.82 |
| 2 | BBA | 6.844 | 4.48060e-2 | 411.37418 | 16.90467 | 0.3959 | 0.84 |
| 3 | BBA | 6.848 | 4.55745e-2 | 418.83160 | 17.32868 | 0.3940 | 0.84 |
| 4 | PBA | 6.852 | 4.52166e-2 | 415.82916 | 17.33366 | 0.3919 | 0.86 |
| 5 | PBA | 6.859 | 6.92792e-2 | 628.52570 | 26.42021 | 0.3895 | 0.86 |
| 6 | BBA | 6.861 | 6.85555e-2 | 621.54730 | 26.78447 | 0.3827 | 0.88 |
| 7 | PBA | 6.869 | 6.93516e-2 | 628.78284 | 27.59925 | 0.3618 | 0.87 |
| 8 | BBA | 6.871 | 6.88838e-2 | 624.58362 | 26.86503 | 0.3992 | 0.86 |
| 9 | BBA | 6.870 | 9.23131e-2 | 831.09393 | 37.07113 | 0.3575 | 0.86 |
| 10 | BBA | 6.871 | 9.22806e-2 | 830.77747 | 35.92823 | 0.3658 | 0.86 |
| 11 | BBA | 6.874 | 9.25919e-2 | 833.69696 | 37.57231 | 0.3549 | 0.87 |
| 12 | BBA | 6.874 | 9.23887e-2 | 831.90698 | 37.07265 | 0.3578 | 0.87 |
| 13 | PBA | 6.884 | 1.15882e-1 | 1040.52405 | 45.00837 | 0.3817 | 0.85 |
| 14 | PBA | 6.884 | 1.15137e-1 | 1032.81348 | 44.51479 | 0.3827 | 0.85 |
| 15 | PBA | 6.885 | 1.15626e-1 | 1037.17700 | 47.56559 | 0.3504 | 0.88 |
| 16 | BBA | 6.878 | 1.15154e-1 | 1032.70679 | 47.09559 | 0.3518 | 0.88 |
| 17 | BBA | 6.880 | 1.30934e-1 | 1174.76062 | 55.25858 | 0.3440 | 0.87 |
| 18 | BBA | 6.882 | 1.30830e-1 | 1173.56787 | 54.86743 | 0.3455 | 0.88 |
| 19 | PBA | 6.881 | 1.29151e-1 | 1156.05408 | 54.34225 | 0.3442 | 0.88 |
| 20 | PBA | 6.884 | 1.30627e-1 | 1169.18176 | 54.97665 | 0.3441 | 0.88 |
| ----- | | | | | | | |
| Mean: | | 6.869 | 9.04606e-2 | 815.16615 | 36.35400 | 0.3698 | 0.86 |
| S.D.: | | 0.016 | 3.16042e-2 | 279.34683 | 13.77670 | 0.0209 | 0.02 |
| R.S.D.: | | 0.237 | 34.93699 | 34.26870 | 37.89596 | 5.6473 | 1.80 |
| 95% CI: | | 7.61e-3 | 1.47912e-2 | 130.73832 | 6.44769 | 9.77e-3 | 7e-3 |

Anexo 11

Tabla 10. Test estadístico de Cochran en función al porcentaje de muestra recuperada.

| Muestra | Porcentaje de muestra recuperada (%) | Promedio (%) | Desviación estándar | Varianza |
|---|--------------------------------------|--------------|---------------------|----------|
| 80% | 80,08589 | 80,129 | 0,105 | 0,011 |
| | 80,24844 | | | |
| | 80,05200 | | | |
| 100% | 101,61233 | 101,584 | 0,303 | 0,092 |
| | 101,87256 | | | |
| | 101,26828 | | | |
| 120% | 120,02017 | 120,175 | 0,150 | 0,022 |
| | 120,31861 | | | |
| | 120,18494 | | | |
| G_{exp} | | | | 0,734 |
| Número de Grupos (K) | | | | 3 |
| Número de Determinaciones (n) | | | | 3 |
| G_{tabla} | | | | 0,798 |
| Criterio de aceptación $G_{exp} < G_{tablas}$ | | | | CUMPLE |

Anexo 12

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\DOL_EX\001-0301.D

Sample Name: ST_DICLOFENACO A

```

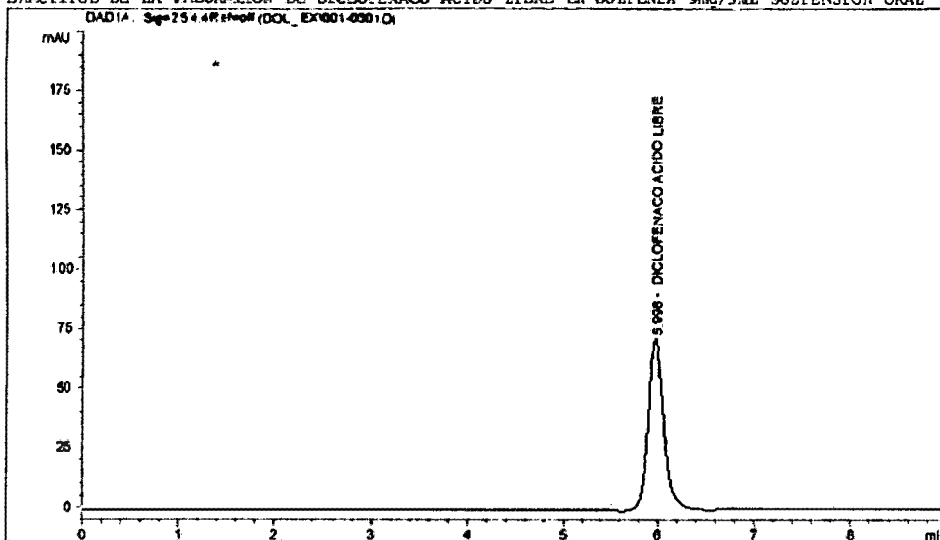
-----
Injection Date : 20/10/2012 03:22:13 a.m.      Seq. Lire : 3
Sample Name    : ST_DICLOFENACO A              Location  : Vial 1
Acq. Operator  : M.VELARDE/F.ROMERO           Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 10 µl
    
```

```

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\DOL_VAL.M
Last changed   : 20/10/2012 03:21:00 a.m. by M.VELARDE/F.ROMERO
                (modified after loading)
    
```

```

Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DOL_VAL.M
Last changed    : 22/10/2012 11:53:23 a.m. by M.VELARDE/F.ROMERO
EXACTITUD DE LA VALORACION DE DICLOFENACO ACIDO LIBRE EN DOLFENEX 9mg/5ml SUSPENSION ORAL
    
```



----- External Standard Report -----

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Monday, 22 22e October 22e 2012 11:53:23 a.m.
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DADI A, Sig=254,4 Ref-off

| RetTime [min] | Type | Area [mAU*s] | Ant/Area | Amount [mg] | Grp | Name |
|---------------|------|--------------|------------|-------------|-----|-------------------------|
| 5.998 | 1BA | 842.94623 | 9.44920e-3 | 7.96517 | | DICLOFENACO ACIDO LIBRE |

Totals : 7.96517

Results obtained with enhanced integrator!

Figura 10. Cromatograma del estándar de diclofenaco ácido libre a una concentración de 100% de la exactitud del método.

Anexo 13

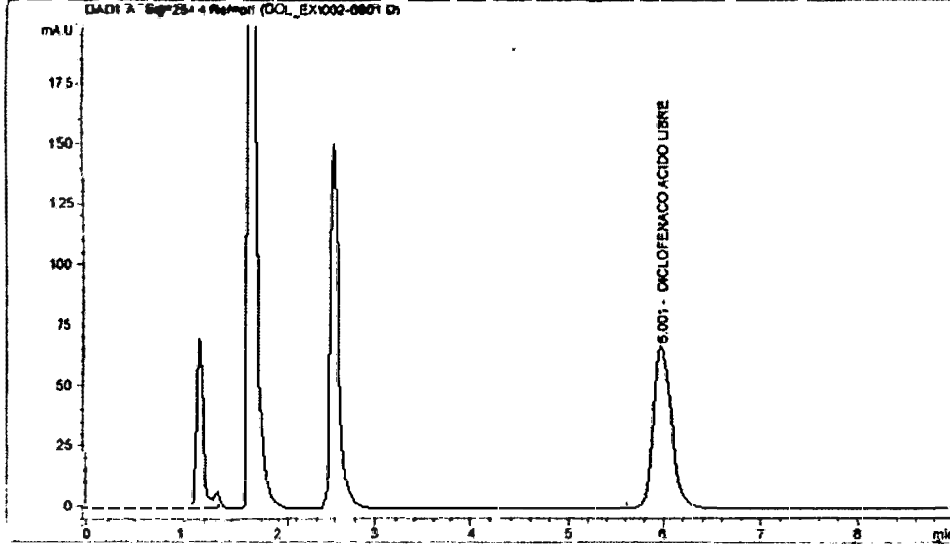
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\001_EX\002-0801.D

Sample Name: MT1_80%

```

-----
Injection Date : 20/10/2012 04:19:22 a.m.      Seq. Line : 8
Sample Name    : MT1_80%                       Location  : Vial 2
Acq. Operator  : M.VELARDE/F.ROMERO            Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 10 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\001_VAL.M
Last changed   : 20/10/2012 04:18:09 a.m. by M.VELARDE/F.ROMERO
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\001_VAL.M
Last changed   : 22/10/2012 11:53:23 a.m. by M.VELARDE/F.ROMERO
EA CTI TUD DE LA VALO RACI DICLOFENACO ACIDO LIBRE E ENDOLFE HEX 5mg/5m L SUS PENSION ORAL
DADI A Sig=254,4 Ref=off (001_EX\002-0801.D)
    
```



External Standard Report

```

-----
Sorted By      : Signal
Calib. Date Modified : Monday, 22 22e October 22e 2012 11:53:23 a.m.
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DADI A, Sig=254,4 Ref=off

| RetTime [min] | Type | Area [a.u.*s] | Amt/Area | Amount [mg] | Grp | Name |
|---------------|------|---------------|------------|-------------|-----|-------------------------|
| 6.001 | BSA | 762.91943 | 9.44920e-3 | 7.20898 | | DICLOFENACO ACIDO LIBRE |

Totals : 7.20898

Results obtained with enhanced integrator!

Figura 11. Cromatograma de la concentración al 80% de la exactitud del método.

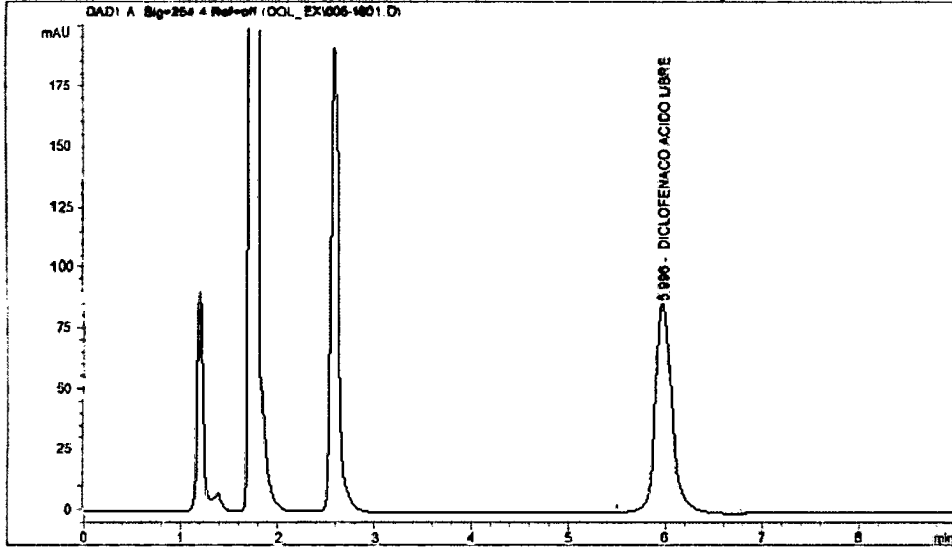
Anexo 14

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\DOL_EX\005-1601.D

Sample Name: HT1_1001

```

-----
Injection Date : 20/10/2012 05:50:36 a.m.      Seq. Line : 16
Sample Name   : HT1_1001                      Location  : Vial 5
Acq. Operator : M.VELARDE/F.ROMERO           Inj      : 1
                                           Inj Volume: 10 µl
Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\DOL_VAL.M
Last changed  : 20/10/2012 05:49:25 a.m. by M.VELARDE/F.ROMERO
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DOL_VAL.M
Last changed  : 22/10/2012 11:53:23 a.m. by M.VELARDE/F.ROMERO
EVALUACION DE LA VALORACION DE DICLOFENACO ACIDO LIBRE EN DOLFENEX 9mg/5ml SUSPENSION OPAL
-----
    
```



External Standard Report

```

-----
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Monday, 22 October 22e 2012 11:53:23 a.m.
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DADI A, Sig=254,4 Ref-off

| RetTime [min] | Type | Area [mAU*s] | Ant/Area | Amount [µg] | Grp | Name |
|---------------|------|--------------|----------|-------------|-----|-------------------------|
| 5.996 | Peak | 976.63391 | 9.22841 | 9.22841 | | DICLOFENACO ACIDO LIBRE |

Totals : 9.22841

Results obtained with enhanced integrator!

Figura 12. Cromatograma de la concentración al 100% de la exactitud del método.

Anexo 15

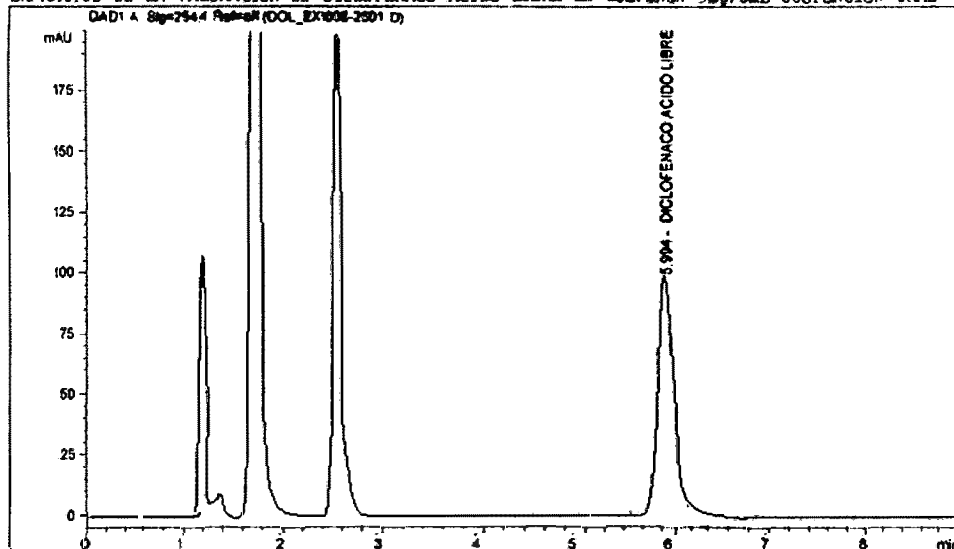
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\DOL_EX\008-2501.D

Sample Name: MT1_1208

```

-----
Injection Date : 20/10/2012 07:32:55 a.m.      Seq. Line : 25
Sample Name    : MT1_1208                      Location  : Vial 8
Acq. Operator  : M.VELARDE/F.ROMERO           Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 10 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\DOL_VAL.M
Last changed   : 20/10/2012 07:31:43 a.m. by M.VELARDE/F.ROMERO
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DOL_VAL.M
Last changed   : 22/10/2012 11:53:23 a.m. by M.VELARDE/F.ROMERO
EXACTITUD DE LA VALORACION DE DICLOFENACO ACIDO LIBRE EN DOLFINEX 500g/5mL SUSPENSION ORAL
    
```



External Standard Report

```

-----
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Monday, 22 October 22, 2012 11:53:23 a.m.
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=off

| RetTime [min] | Type | Area [mAU*s] | Ant/Area | Amount [ng] | Grp | Name |
|---------------|------|--------------|------------|-------------|-----|-------------------------|
| 5.994 | BBA | 1142.81750 | 9.44920e-3 | 10.79671 | | DICLOFENACO ACIDO LIBRE |

Totals : 10.79671

Results obtained with enhanced integrator!

Figura 13. Cromatograma de la concentración al 120% de la exactitud del método.

Anexo 16

Tabla 11. Áreas cromatográficas y tiempos de retención de la exactitud del método.

S t a t i s t i c R e p o r t

Sequence file: C:\HPCHEM\SEQUENCE\DOL_EX_3

Sequence table: C:\HPCHEM\SEQUENCE\DOL_EX_3
 Data directory path: C:\HPCHEM\DATA\DOL_EX
 Operator: M.VELARDE/F.ROMERO

Method file name: C:\HPCHEM\METHODS\DOL_VAL.M

| Run Location | Inj # | Inj. Date/Time | File Name | Sample Name |
|--------------|--------|----------------------------|------------|------------------|
| 1 | Vial 1 | 1 20/10/2012 03:10:48 a.m. | 001-0201.D | ST_DICLOFENACO A |
| 2 | Vial 1 | 1 20/10/2012 03:22:13 a.m. | 001-0301.D | ST_DICLOFENACO A |
| 3 | Vial 1 | 1 20/10/2012 03:33:39 a.m. | 001-0401.D | ST_DICLOFENACO A |
| 4 | Vial 1 | 1 20/10/2012 03:45:04 a.m. | 001-0501.D | ST_DICLOFENACO A |
| 5 | Vial 1 | 1 20/10/2012 03:56:31 a.m. | 001-0601.D | ST_DICLOFENACO A |

Compound: DICLOFENACO ACIDO LIBRE (Signal: DAD1 A, Sig=254.4 Ref=off)

| Run Type | RetTime [min] | Amount [ng] | Area [mAU*s] | Height [mV] | Width [min] | Symm. | |
|----------|---------------|-------------|--------------|-------------|-------------|--------|------|
| 1 | BBA | 5.999 | 7.94511 | 832.49475 | 70.53504 | 0.2179 | 0.92 |
| 2 | BBA | 5.998 | 7.98591 | 842.94623 | 70.67895 | 0.2191 | 0.90 |
| 3 | PBA | 6.000 | 7.93658 | 836.87097 | 70.67336 | 0.2182 | 0.89 |
| 4 | BBA | 6.000 | 8.06662 | 854.94067 | 70.86567 | 0.2207 | 0.89 |
| 5 | PBA | 6.002 | 7.89827 | 835.85658 | 70.64494 | 0.2180 | 0.93 |

Mean: 6.000 7.56730 840.82384 70.68239 0.2188 0.91
 S.D.: 1.33e-3 6.4373e-2 9.6770e 1.31568e-1 1.18e-3 0.02
 RSD: 0.022 8.07969e-1 1.02602 1.86139e-1 0.5374 1.66
 95% CI: 1.65e-3 7.99300e-2 10.71191 1.63363e-1 1.46e-3 0.02

S t a t i s t i c R e p o r t

Sequence file: C:\HPCHEM\SEQUENCE\DOL_EX_3

Sequence table: C:\HPCHEM\SEQUENCE\DOL_EX_3
 Data directory path: C:\HPCHEM\DATA\DOL_EX
 Operator: M.VELARDE/F.ROMERO

Method file name: C:\HPCHEM\METHODS\DOL_VAL.M

| Run Location | Inj # | Inj. Date/Time | File Name | Sample Name |
|--------------|---------|----------------------------|------------|-------------|
| 7 | Vial 2 | 1 20/10/2012 04:20:47 a.m. | 002-0901.D | MT3_120A |
| 8 | Vial 3 | 1 20/10/2012 04:32:41 a.m. | 003-1101.D | MT2_120A |
| 9 | Vial 3 | 1 20/10/2012 04:45:10 a.m. | 003-1201.D | MT2_120A |
| 10 | Vial 4 | 1 20/10/2012 04:57:52 a.m. | 004-1401.D | MT3_120A |
| 11 | Vial 4 | 1 20/10/2012 05:10:44 a.m. | 004-1501.D | MT3_120A |
| 12 | Vial 5 | 1 20/10/2012 05:23:36 a.m. | 005-1601.D | MT3_120A |
| 13 | Vial 5 | 1 20/10/2012 05:36:28 a.m. | 005-1701.D | MT3_120A |
| 14 | Vial 6 | 1 20/10/2012 05:49:20 a.m. | 006-1801.D | MT2_120A |
| 15 | Vial 6 | 1 20/10/2012 06:02:12 a.m. | 006-1901.D | MT2_120A |
| 16 | Vial 7 | 1 20/10/2012 06:15:04 a.m. | 007-2001.D | MT2_120A |
| 17 | Vial 7 | 1 20/10/2012 06:27:56 a.m. | 007-2101.D | MT2_120A |
| 18 | Vial 8 | 1 20/10/2012 06:40:48 a.m. | 008-2201.D | MT2_120A |
| 19 | Vial 8 | 1 20/10/2012 06:53:40 a.m. | 008-2301.D | MT2_120A |
| 20 | Vial 9 | 1 20/10/2012 07:06:32 a.m. | 009-2401.D | MT2_120A |
| 21 | Vial 9 | 1 20/10/2012 07:19:24 a.m. | 009-2501.D | MT2_120A |
| 22 | Vial 10 | 1 20/10/2012 07:32:16 a.m. | 010-2601.D | MT3_120A |
| 23 | Vial 10 | 1 20/10/2012 07:45:08 a.m. | 010-2701.D | MT3_120A |

Compound: DICLOFENACO ACIDO LIBRE (Signal: DAD1 A, Sig=254.4 Ref=off)

| Run Type | RetTime [min] | Amount [ng] | Area [mAU*s] | Height [mV] | Width [min] | Symm. | |
|----------|---------------|-------------|--------------|-------------|-------------|--------|------|
| 6 | BBA | 6.001 | 7.20828 | 762.21943 | 66.06285 | 0.2147 | 0.93 |
| 7 | BBA | 5.998 | 7.20648 | 762.05544 | 65.94085 | 0.2149 | 0.93 |
| 8 | BBA | 5.995 | 7.18013 | 760.23180 | 65.89700 | 0.2135 | 0.93 |
| 9 | BBA | 5.995 | 7.21343 | 763.39032 | 65.91544 | 0.2151 | 0.93 |
| 10 | BBA | 5.994 | 7.19591 | 761.53882 | 65.53923 | 0.2156 | 0.93 |
| 11 | BBA | 5.995 | 7.21681 | 764.52537 | 66.12879 | 0.2169 | 0.92 |
| 12 | BBA | 5.995 | 7.21681 | 764.52537 | 66.12879 | 0.2169 | 0.92 |
| 13 | BBA | 5.994 | 7.06191 | 659.09305 | 61.46084 | 0.2141 | 0.94 |
| 14 | BBA | 5.994 | 7.05855 | 658.65889 | 61.10443 | 0.2146 | 0.93 |
| 15 | BBA | 5.994 | 7.05519 | 658.22473 | 60.74802 | 0.2141 | 0.93 |
| 16 | BBA | 5.995 | 7.10462 | 665.46568 | 63.51021 | 0.2144 | 0.93 |
| 17 | BBA | 5.994 | 7.09871 | 664.81730 | 63.35012 | 0.2142 | 0.93 |
| 18 | BBA | 5.994 | 7.09280 | 664.16882 | 63.19003 | 0.2142 | 0.93 |
| 19 | BBA | 5.994 | 7.08689 | 663.52034 | 63.02994 | 0.2142 | 0.93 |
| 20 | BBA | 5.995 | 7.08098 | 662.87186 | 62.86985 | 0.2142 | 0.93 |
| 21 | BBA | 5.995 | 7.07507 | 662.22338 | 62.70976 | 0.2142 | 0.93 |
| 22 | BBA | 5.995 | 7.06916 | 661.57490 | 62.54967 | 0.2142 | 0.93 |
| 23 | BBA | 5.995 | 7.06325 | 660.92642 | 62.38958 | 0.2142 | 0.93 |

Mean: 5.995 7.05663 658.45499 61.18884 0.2146 0.93
 S.D.: 1.73e-3 1.31619 160.45703 14.38834 0.07644 0e+0
 RSD: 0.028 0.19884e-1 2.43884e-1 2.30132e-1 0.35374e-1 0.00000e+0
 95% CI: 8.59e-4 7.53844e-1 76.70133 7.00589 0.327e-4 2e-3

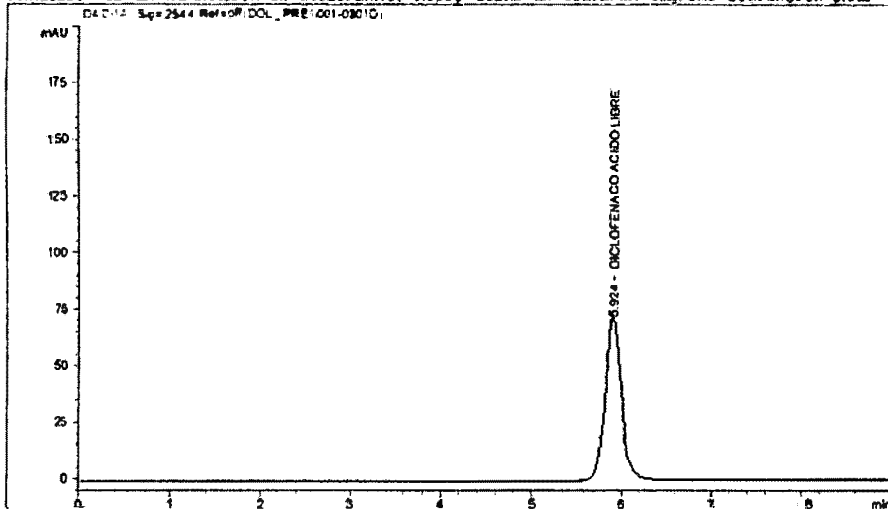
Anexo 17

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\DOL_PRE\001-0301.D

Sample Name: ST_DICLOFENACO A

```

Injection Date : 27/10/2012 01:56:56 p.m.      Seq. Line : 3
Sample Name    : ST_DICLOFENACO A              Location: Vial 1
Acq. Operator  : M.VELARDE/F.ROMERO           Inj : 1
                                                    Inj Volume: 10 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\DOL_VAL.M
Last changed   : 27/10/2012 12:43:38 p.m. by M.VELARDE/F.ROMERO
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DOL_VAL.M
Last changed   : 29/10/2012 11:26:32 a.m. by M.VELARDE/F.ROMERO
PRECISION DE LA VALORACION DE DICLOFENACO ACIDO LIBRE EN DOLFENEX 9mg/5mL SUSPENSION ORAL
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Monday, 29 29a October 29a 2012 11:26:32 a.m.
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254.4 Ref=off

| RetTime [min] | Type | Area [mAU*s] | Amt/Area | Amount [mg/5mL] | Grp | Name |
|---------------|------|--------------|------------|-----------------|-----|-------------------------|
| 5.924 | BBA | 843.66608 | 1.06546e-4 | 8.98896e-2 | | DICLOFENACO ACIDO LIBRE |

Totals: 8.98896e-2

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Figura 14. Cromatogramadel estándar de diclofenaco ácido libre a una concentración de 100% de la repetibilidad del método.

Anexo 18

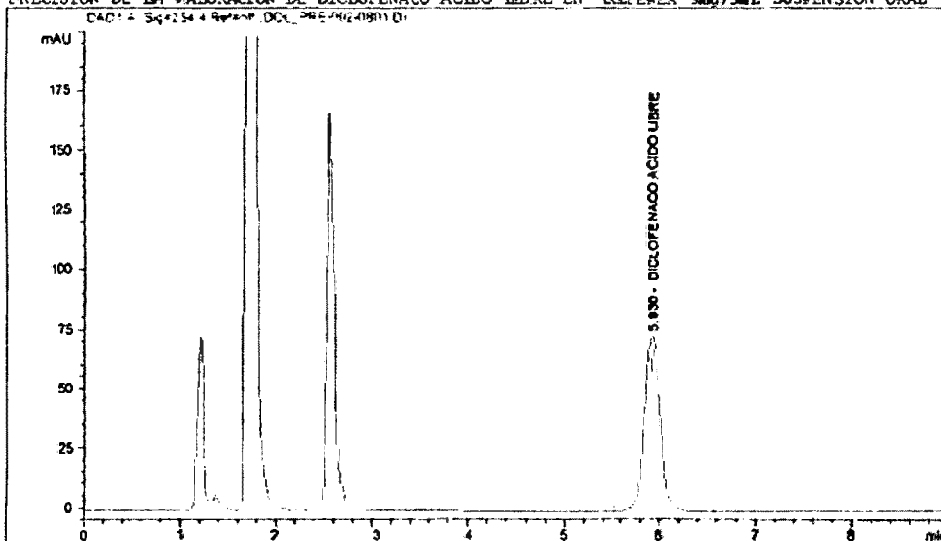
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\DOL_PRE\002-0801.D

Sample Name: P_M1_P-1105122

```

-----
Injection Date : 27/10/2012 02:53:37 p.m.      Seq. Line : 8
Sample Name   : P_M1_P-1105122                Locator  : Vial 2
Acq. Operator : M.VELARDE/F.ROMERO            Inj      : 1
                                           Inj Volume: 10 µl

Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\DOL_VAL.M
Last changed  : 27/10/2012 12:43:38 p.m. by M.VELARDE/F.ROMERO
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DOL_VAL.M
Last changed  : 29/10/2012 11:26:32 a.m. by M.VELARDE/F.ROMERO
PRECISION DE LA VALORACION DE DICLOFENACO ACIDO LIBRE EN ECLIFENEX 9mg/5ml. SUSPENSION ORAL
    
```



```

-----
                          Report
-----
Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified :      Monday, 29 29e October 29e 2012 11:26:32 a.m.
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref-off

RetTime  Type   Area      Ant/Area   Amount  Grp  Name
  (min)                [mAU*s]                (mg/5ml)
-----
  5.930  BV      839.06543  1.06546e-4  8.93994e-2  DICLOFENACO ACIDO LIBRE

Totals:                                8.93994e-2

Results obtained with enhanced integrator!
-----
*** End of Report ***
    
```



Figura 15. Cromatograma de la muestra de Dolifenex® 9mg/5ml suspensión oral (lote: P-1105122) a una concentración de 100%.

Anexo 19

Tabla 12. Áreas cromatográficas y tiempos de retención de la repetibilidad del método.

| Sequence File | | Statistic Report | | | | |
|---|-------------------------------------|----------------------|-------------------------------------|--------------|------------------|-------------|
| Sequence File | C:\ARCHIVOS\ALISEQUENCIA\BOL_PRES.S | Sequence Table: | C:\ARCHIVOS\ALISEQUENCIA\BOL_PRES.S | | | |
| Data directory path: | C:\ARCHIVOS\ALISEQUENCIA\BOL_PRES | Data directory path: | C:\ARCHIVOS\ALISEQUENCIA\BOL_PRES | | | |
| Operator: | N. VELAZQUEZ F. MORENO | Operator: | N. VELAZQUEZ F. MORENO | | | |
| Method file name: | C:\ARCHIVOS\ALISEQUENCIA\BOL_PRES.M | Method file name: | C:\ARCHIVOS\ALISEQUENCIA\BOL_PRES.M | | | |
| Run # | Location | Inj. | Date/Time | File Name | Sample Name | |
| 1 | Vial 1 | 1 | 27/10/2012 01:56:13 P.M. | 001-0001.D | BT_DICLOFENACO A | |
| 2 | Vial 1 | 1 | 27/10/2012 02:09:13 P.M. | 001-0001.D | BT_DICLOFENACO A | |
| 3 | Vial 1 | 1 | 27/10/2012 02:19:13 P.M. | 001-0501.D | BT_DICLOFENACO A | |
| 4 | Vial 1 | 1 | 27/10/2012 02:30:13 P.M. | 001-0601.D | BT_DICLOFENACO A | |
| 5 | Vial 1 | 1 | 27/10/2012 02:42:13 P.M. | 001-0701.D | BT_DICLOFENACO A | |
| Compound: DICLOFENACO ACTIVO LIMBE (Signal: DMS1 A, Sig=254, Ref=off) | | | | | | |
| Run # | Type | RetTime [min] | Amount [ng/5ul] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Width [min] |
| 1 | BSA | 5.924 | 9.001036e-2 | 813.46483 | 69.89296 | 0.2209 |
| 2 | BSA | 5.924 | 9.009576e-2 | 815.20682 | 70.11762 | 0.2206 |
| 3 | BSA | 5.925 | 9.008028e-2 | 815.44731 | 70.11728 | 0.2206 |
| 4 | BSA | 5.925 | 9.009538e-2 | 814.47101 | 70.11375 | 0.2208 |
| 5 | BSA | 5.926 | 9.001736e-2 | 815.14367 | 69.93019 | 0.2209 |
| Mean: 5.925 9.00435e-2 814.17925 70.03042 0.2207 0.92 | | | | | | |
| S.D.: 1.89e-3 4.05006e-5 7.32143e-1 1.1010e-1 2.0654 3.01 | | | | | | |
| RSD: 0.018 0.16428e-2 9.67115e-2 1.57210e-1 0.0534 0.03 | | | | | | |
| 93% CI: 1.35e-3 5.177161e-5 1.16411e-1 1.36113e-1 2.35e-4 4e-4 | | | | | | |
| Mean: 5.930 9.02251 875.04513 72.00059 0.2113 0.94 | | | | | | |
| S.D.: 2.332 9.00112 932.17815 72.00059 0.2113 0.94 | | | | | | |
| SBSA: 5.934 9.00131 840.61243 73.20810 0.2114 0.93 | | | | | | |
| 9 BSA: 5.935 9.00072 843.88253 73.20810 0.2114 0.93 | | | | | | |
| 10 BSA: 5.935 9.04952 844.46584 73.89826 0.2113 0.94 | | | | | | |
| 11 BSA: 5.936 9.03952 844.31694 73.89826 0.2113 0.94 | | | | | | |
| 12 BSA: 5.936 9.01721 844.31360 73.71015 0.2113 0.93 | | | | | | |
| 13 BSA: 5.936 9.05849 845.43170 74.92009 0.2113 0.93 | | | | | | |
| 14 BSA: 5.935 9.01448 843.10466 73.60321 0.2113 0.93 | | | | | | |
| 15 BSA: 5.937 9.02665 842.31561 73.30891 0.2113 0.93 | | | | | | |
| 16 BSA: 5.937 9.08023 853.33086 73.81149 0.2114 0.93 | | | | | | |
| 17 BSA: 5.935 9.06718 851.43394 74.52316 0.2113 0.93 | | | | | | |
| Mean: 5.935 9.01660 844.79889 73.63410 0.2128 0.93 | | | | | | |
| S.D.: 2.36e-3 2.2609e-2 1.613 6.1611e-1 0.72e-4 0.93 | | | | | | |
| RSD: 0.025 2.5090e-1 0.654 0.10250e-1 0.4060 0.95 | | | | | | |
| 93% CI: 1.31e-3 1.41139e-2 2.7 70e3 3.93110e-1 5.56e-4 6e-3 | | | | | | |

Anexo 20

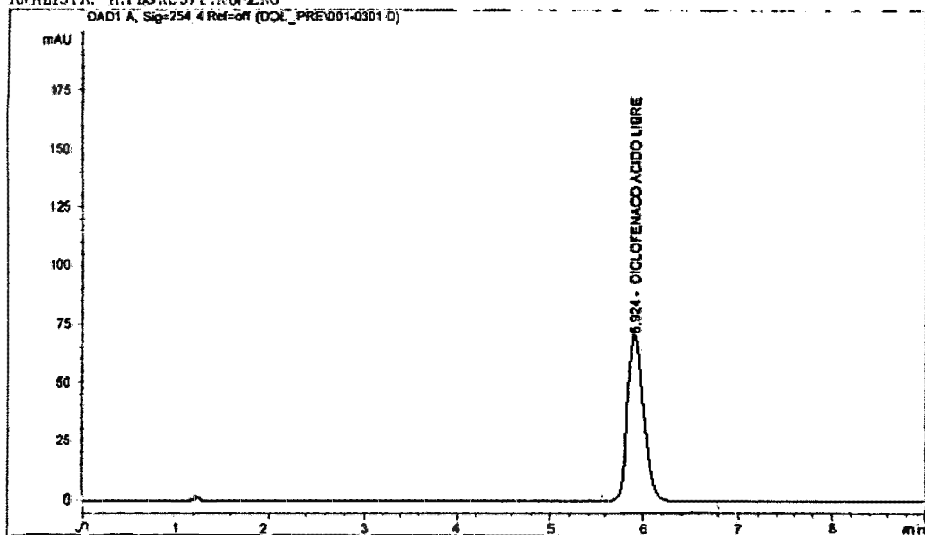
Data File C:\HPCHEM\DATA\001_PRE\001-0301.D

Sample Name: ST_DICLOFENACO A

```

-----
Injection Date : 27/10/2012 01:56:56 p.m.      Seq. Line : 3
Sample Name    : ST_DICLOFENACO A              Location  : Vial 1
Acq. Operator  : M.VELARDE/F.ROMERO           Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 10 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\METHODS\DDL_VAL.M
Last changed   : 27/10/2012 12:43:38 p.m. by M.VELARDE/F.ROMERO
Analysis Method : C:\HPCHEM\METHODS\DDL_VAL.M
Last changed   : 29/10/2012 11:35:51 a.m. by M.FLORES/F.ROMERO
PRECISION INTERMEDIA DE LA VALORACION DE DICLOFENACO ACIDO LIBRE EN DOLFENEX 9mg/5ml
SUSPENSION ORAL
ANALISTA: M.FLORES/F.ROMERO
    
```



External Standard Report

```

-----
Sorted By      : Signal
Calib. Date Modified : Monday, 29 October 29e 2012 11:35:51 a.m.
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DADI A, Sig=254.4 Ref-off

| RetTime [min] | Type | Area [mAU*s] | Amt/Area | Amount [mg/5ml] | Grp | Name |
|---------------|------|--------------|------------|-----------------|-----|-------------------------|
| 5.924 | BBA | 843.66608 | 1.06546e-4 | 9.98896e-2 | | DICLOFENACO ACIDO LIBRE |

Totals : 9.98896e-2

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Figura 16. Cromatograma del estándar de diclofenaco ácido libre preparada por otro analista.

Anexo 21

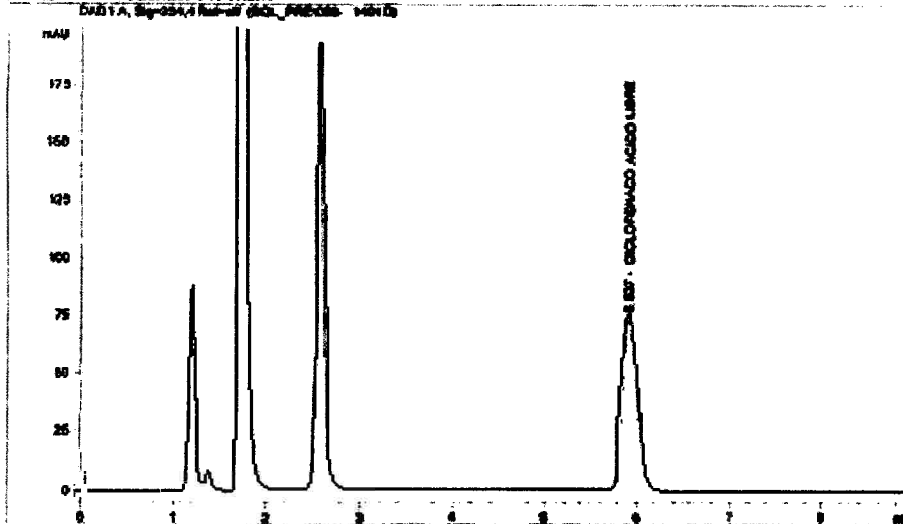
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\DOL_PRE\00W-1401.D

Sample Name: P1_M1_P-1105122

```

-----
Injection Date : 27/10/2012 06:37:58 p.m.      Seq. Line: 14
Sample Name    : P1_M1_P-1105122              Location: Vial #
Acq. Operator  : N.VELARDE/F.ROMERO          Inj : 1
                                           Inj Volume : 10 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\DOL.VAL.M
Last changed   : 27/10/2012 12:47:38 p.m. by N.VELARDE/F.ROMERO
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DOL.VAL.M
Last changed   : 29/10/2012 11:35:51 a.m. by N.FLORES/F.ROMERO
PRECISION INTERMEDIA DE LA VALORACION DE DICLOFENACO ACIDO LIBRE EN DOLFENEX 9mg/5ml
SUSPENSION ORAL
ANALISTA: N. FLORES/F. ROMERO
    
```



External Standard Report

```

-----
Sorted By      : Skytal
Calib. Data Modified : Monday, 29 29e October 29e 2012 11:35:51 a.m.
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254, & Ref-off

| RetTime (min) | Type | Area (AUI*s) | Act/Area | Amount (µg/5ml) | Cap | Mass |
|---------------|------|--------------|-----------|-----------------|-----|--------------------------|
| 5.57 | BBA | 842.6592 | 1.0050e-4 | 8.97796e-2 | | DICCLOFENACO ACIDO LIBRE |

Totals : 8.97796e-2

(Results obtained with enhanced integrator)

*** End of Report ***

Figura 17. Cromatograma de la muestra de Dolfenex® 9mg/5ml suspensión oral (lote: P-1105122) preparada por otro analista.

Anexo 22

Tabla 13. Áreas cromatográficas y tiempos de retención de la precisión Intermedia del método.

S t a t i s t i c R e p o r t

Sequence File C:\HPCHEM\1\SEQUENCE\1\DOL_PRE.S

Sequence table: C:\HPCHEM\1\SEQUENCE\1\DOL_PRE.S
 Data directory path: C:\HPCHEM\1\DATA\1\DOL_PRE_1
 Operator: M.FLORES/F.ROMERO

Method file name: C:\HPCHEM\1\METHODS\1\DOL_VAL.M

| Run Location Inj # | Inj. Date/Time | File Name | Sample Name |
|--------------------|--------------------------|------------|------------------|
| 1 | 27/10/2012 01:56:56 P.m. | 001-0301.D | ST DICLOFENACO A |
| 2 | 27/10/2012 02:08:17 P.m. | 001-0401.D | ST DICLOFENACO A |
| 3 | 27/10/2012 02:19:37 P.m. | 001-0501.D | ST DICLOFENACO A |
| 4 | 27/10/2012 02:30:56 P.m. | 001-0601.D | ST DICLOFENACO A |
| 5 | 27/10/2012 02:42:16 P.m. | 001-0701.D | ST DICLOFENACO A |

S t a t i s t i c R e p o r t

Sequence File C:\HPCHEM\1\SEQUENCE\1\DOL_PRE.S

Sequence table: C:\HPCHEM\1\SEQUENCE\1\DOL_PRE.S
 Data directory path: C:\HPCHEM\1\DATA\1\DOL_PRE_1
 Operator: M.FLORES/F.ROMERO

Method file name: C:\HPCHEM\1\METHODS\1\DOL_VAL.M

| Run Location Inj # | Inj. Date/Time | File Name | Sample Name |
|--------------------|--------------------------|------------|----------------|
| 6 | 27/10/2012 05:12:57 P.m. | 000-1101.D | PL.M.P-1105122 |
| 7 | 27/10/2012 06:12:15 P.m. | 000-1201.D | PL.M.P-1105122 |
| 8 | 27/10/2012 07:12:15 P.m. | 000-1301.D | PL.M.P-1105122 |
| 9 | 27/10/2012 08:12:15 P.m. | 000-1401.D | PL.M.P-1105122 |
| 10 | 27/10/2012 09:12:15 P.m. | 000-1501.D | PL.M.P-1105122 |
| 11 | 27/10/2012 10:12:15 P.m. | 000-1601.D | PL.M.P-1105122 |
| 12 | 27/10/2012 11:12:15 P.m. | 000-1701.D | PL.M.P-1105122 |
| 13 | 27/10/2012 12:12:15 P.m. | 000-1801.D | PL.M.P-1105122 |
| 14 | 27/10/2012 13:12:15 P.m. | 000-1901.D | PL.M.P-1105122 |
| 15 | 27/10/2012 14:12:15 P.m. | 000-2001.D | PL.M.P-1105122 |
| 16 | 27/10/2012 15:12:15 P.m. | 000-2101.D | PL.M.P-1105122 |
| 17 | 27/10/2012 16:12:15 P.m. | 000-2201.D | PL.M.P-1105122 |
| 18 | 27/10/2012 17:12:15 P.m. | 000-2301.D | PL.M.P-1105122 |
| 19 | 27/10/2012 18:12:15 P.m. | 000-2401.D | PL.M.P-1105122 |
| 20 | 27/10/2012 19:12:15 P.m. | 000-2501.D | PL.M.P-1105122 |

Compound: DICLOFENACO ACIDO LIBRE (Signal: DAD1 A, Sig=254,A Ref=off)

| Run # | Type | RetTime [min] | Amount [ng/5uL] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Width [min] | Symm. |
|-------|------|---------------|-----------------|--------------|--------------|-------------|-------|
| 1 | BBA | 5.924 | 9.00103e-2 | 843.66608 | 69.89296 | 0.2208 | 0.92 |
| 2 | BBA | 5.924 | 9.00957e-2 | 845.26862 | 70.11762 | 0.2206 | 0.92 |
| 3 | BBA | 5.925 | 9.00800e-2 | 845.44751 | 70.01726 | 0.2209 | 0.92 |
| 4 | BBA | 5.925 | 8.99845e-2 | 844.47101 | 70.17375 | 0.2204 | 0.92 |
| 5 | BBA | 5.926 | 9.00470e-2 | 845.14307 | 69.99049 | 0.2209 | 0.92 |

Mean: 5.925 9.00435e-2 844.79926 70.03842 0.2207 0.92
 S.D.: 1.09e-3 4.65006e-5 7.33243e-1 1.10104e-1 2.068e-4 3e-4
 RSD: 0.018 5.16423e-2 8.67949e-2 1.57206e-1 0.0934 0.03
 95% CI: 1.35e-3 5.77381e-5 9.10444e-1 1.36713e-1 2.56e-4 1e-4

Compound: DICLOFENACO ACIDO LIBRE (Signal: DAD1 A, Sig=254,A Ref=off)

| Run # | Type | RetTime [min] | Amount [ng/5uL] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Width [min] | Symm. |
|-------|------|---------------|-----------------|--------------|--------------|-------------|-------|
| 6 | BBA | 5.937 | 9.02820 | 842.63342 | 74.33225 | 0.2123 | 0.94 |
| 7 | BBA | 5.937 | 9.01215 | 843.13594 | 73.32964 | 0.2138 | 0.94 |
| 8 | BBA | 5.935 | 9.04660 | 846.47359 | 74.05672 | 0.2134 | 0.94 |
| 9 | BBA | 5.936 | 9.04062 | 844.86902 | 73.73693 | 0.2125 | 0.94 |
| 10 | BBA | 5.935 | 9.00736 | 840.57568 | 72.51164 | 0.2152 | 0.93 |
| 11 | BBA | 5.936 | 9.02567 | 842.89452 | 73.27349 | 0.2141 | 0.93 |
| 12 | BBA | 5.935 | 9.03924 | 845.48240 | 73.87390 | 0.2136 | 0.94 |
| 13 | BBA | 5.936 | 9.05160 | 846.20276 | 73.76571 | 0.2137 | 0.94 |
| 14 | BBA | 5.936 | 9.07571 | 847.67833 | 73.90173 | 0.2138 | 0.94 |
| 15 | BBA | 5.936 | 9.08144 | 848.12214 | 73.06714 | 0.2138 | 0.94 |
| 16 | BBA | 5.936 | 9.06035 | 845.95246 | 73.79304 | 0.2134 | 0.94 |
| 17 | BBA | 5.931 | 9.05102 | 845.06513 | 73.60306 | 0.2138 | 0.94 |

Mean: 5.936 9.04733 846.64810 73.70051 0.2137 0.94
 S.D.: 7.59e-4 2.7554e-2 2.3143E 1.71003E 6.791E 0.02
 RSD: 0.013 2.44838e-1 3.00718E-1 6.48268e-1 0.291 0.02
 95% CI: 4.92e-4 1.57339e-2 1.6142E 3.02339e-1 4.74e-4 2e-3

Anexo 23

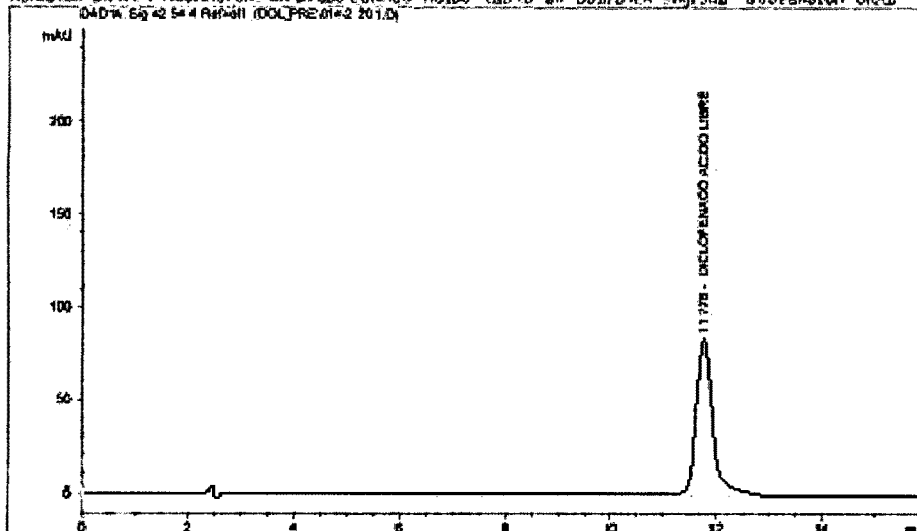
Data File C:\APCHEMA\DATA\COL_PHE\014-2201.D

Sample Name: ST_DICLOFENACO A

```

Injection Date : 27/10/2012 10:17:11 p.m.      Seq. Line : 22
Sample Name    : ST_DICLOFENACO A              Location  : Vial 14
Acq. Operator  : M.VELARDE/F.ROMERO           Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 10 µl

Acq. Method    : C:\APCHEMA\METHODS\COL_VA22.M
Last changed   : 27/10/2012 12:17:15 p.m. by M.VELARDE/F.ROMERO
Analysis Method : C:\APCHEMA\METHODS\COL_VA22.M
Last changed   : 29/10/2012 12:12:27 p.m. by M.VELARDE/F.ROMERO
ROBUSTEZ DE LA V ALOPACON DE DICLOFENACO ACIDO LIBRE EN DOLIFENEX 5mg/5mL SUSPENSION ORAL
04-Div. Eq. 2 544 Ref. 011 (COL_PHE) 2 2012
    
```



 Sample No. 544 Ref. 011 "Report" *****

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Monday, 29 October 2012 12:12:27 p.m.
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Slo=254.4 Ret=off

| RetTime (min) | Type | Area (mAU*s) | AmI/Area | Amount (ng/5mL) | Grp | Name |
|---------------|------|--------------|------------|-----------------|-----|-------------------------|
| 11.776 | BSA | 1692.09229 | 5.33667e-5 | 9.03013e-2 | | DICLOFENACO ACIDO LIBRE |

Totals: 9.03013e-2

Results obtained with enhanced integrator!

 *** END OF REPORT ***

Figura 18. Cromatograma del estándar de diclofenaco ácido libre variando el flujo a la mitad (0,6 ml/min) de la robustez del método.

Anexo 24

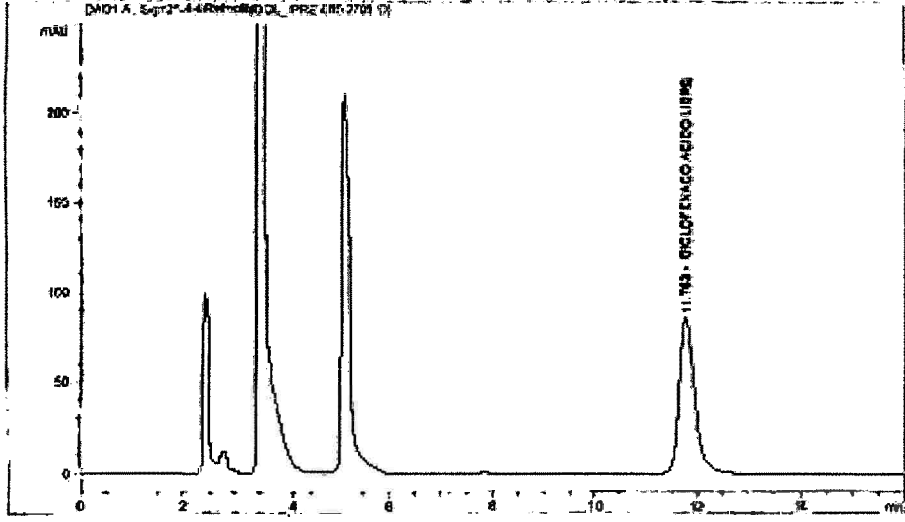
Data File C:\BPCHEM\1\DATA\001_PCE1015-2701.D

Sample Name: R_M1_P-1105122

```

Injection Date : 29/10/2012 11:43:55 p.m.      Seq. Line : 29
Sample Name    : R_M1_P-1105122                Location  : Vial 15
Acq. Operator  : H.VELARDE/F.RONERO           Inj      : 1
                                                    Inj Volume: 10 µl

Acq. Method    : C:\BPCHEM\1\METHODS\001_VAL2.M
Last changed   : 29/10/2012 12:27:15 p.m. by H.VELARDE/F.RONERO
Analysis Method : C:\BPCHEM\1\METHODS\001_VAL2.M
Last changed   : 29/10/2012 12:12:27 p.m. by H.VELARDE/F.RONERO
ROBUSTEZ DE LA DETERMINACION DE DICLOFENACO ACIDO LIBRE EN DOLFENEX 9mg/5ml SUSPENSION ORAL
DATA A. Sep-14-2012 09:44:00 PRE-4852701.D
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Date Modified : Monday, 29 29e October 29e 2012 12:12:27 p.m.
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISUs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254.4 nm-off

| RetTime [min] | Type | Area [Counts] | FWHM [sec] | Amount [µg/5ml] | Grp | Name |
|---------------|------|---------------|------------|-----------------|-----|-------------------------|
| 11.703 | EBP | 1691.96578 | 0.33667e-5 | 9.02748e-2 | | DICLOFENACO ACIDO LIBRE |

Totals : 9.02748e-2

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

10/20/2012 12:15:35 p.m. H.VELARDE/F.RONERO

Page 1 of 1

Figura 19. Cromatograma de la muestra de Dolfenex® 9mg/5ml suspensión oral (lote: P-1105122) de la robustez del método.

Anexo 25

Tabla 14. Áreas cromatográficas y tiempos de retención de la robustez del método.

| Sequence file C:\MPCHEM\1\SECUENCIA\001_PRES.S | | S T A T I S T I C R E P O R T | | |
|--|---------|----------------------------------|------------|------------------|
| Sequence table: | | C:\MPCHEM\1\SECUENCIA\001_PRES.S | | |
| Data directory path: | | C:\MPCHEM\1\DATA\001_PRES_ | | |
| Operator: | | M.VELAZQUEZ/E.ROMERO | | |
| Method file name: | | C:\MPCHEM\1\METHODS\001_VAL1.M | | |
| Run Location | Inj | Inj. Date/Time | File Name | Sample Name |
| 1 | Vial 14 | 1 27/10/2012 10:17:11 p.m. | 014-2301.D | ST_DICLOFENACO A |
| 2 | Vial 14 | 1 27/10/2012 10:34:31 p.m. | 014-2301.D | ST_DICLOFENACO A |
| 3 | Vial 14 | 1 27/10/2012 10:51:52 p.m. | 014-2401.D | ST_DICLOFENACO A |
| 4 | Vial 14 | 1 27/10/2012 11:09:12 p.m. | 014-2501.D | ST_DICLOFENACO A |
| 5 | Vial 14 | 1 27/10/2012 11:26:31 p.m. | 014-2601.D | ST_DICLOFENACO A |

| Sequence file C:\MPCHEM\1\SECUENCIA\001_PRES.S | | S T A T I S T I C R E P O R T | | |
|--|---------|----------------------------------|------------|----------------|
| Sequence table: | | C:\MPCHEM\1\SECUENCIA\001_PRES.S | | |
| Data directory path: | | C:\MPCHEM\1\DATA\001_PRES_ | | |
| Operator: | | M.VELAZQUEZ/E.ROMERO | | |
| Method file name: | | C:\MPCHEM\1\METHODS\001_VAL1.M | | |
| Run Location | Inj | Inj. Date/Time | File Name | Sample Name |
| 6 | Vial 15 | 1 27/10/2012 11:43:55 p.m. | 015-2701.D | R_M1_P-1105122 |
| 7 | Vial 15 | 2 28/10/2012 12:01:16 a.m. | 015-2702.D | R_M1_P-1105122 |
| 8 | Vial 16 | 2 28/10/2012 12:53:19 a.m. | 016-2802.D | R_M2_P-1105122 |
| 9 | Vial 16 | 3 28/10/2012 01:13:40 a.m. | 016-2803.D | R_M2_P-1105122 |

| Compound: DICLOFENACO ACIDO LIBRE (Signal: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=off) | | | | | | |
|---|---------------|-----------------|--------------|--------------|-------------|-------|
| Run Type | RetTime [min] | Amount [ng/5ul] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Width [min] | Symm. |
| 6 BPA | 11.773 | 9.01586 | 1691.53370 | 86.28580 | 0.2927 | 0.74 |
| 7 BPA | 11.783 | 7.05148 | 1692.64561 | 85.89687 | 0.2929 | 0.73 |
| 8 BV | 11.786 | 9.00032 | 1682.40491 | 85.50216 | 0.2933 | 0.73 |
| 9 BV | 11.789 | 9.03593 | 1629.06152 | 85.34395 | 0.3024 | 0.72 |

| Compound: DICLOFENACO ACIDO LIBRE (Signal: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=off) | | | | | | |
|---|---------------|-----------------|--------------|--------------|-------------|-------|
| Run Type | RetTime [min] | Amount [ng/5ul] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Width [min] | Symm. |
| Mean | 11.785 | 9.03340 | 1688.92719 | 85.82869 | 0.2956 | 0.73 |
| S.D.1 | 2.87e-3 | 2.29731e-2 | 4.601e0 | 3.41853e-1 | 4.55e-3 | 9e-3 |
| RSD 1 | 0.024 | 2.51313e-1 | 1.70334e-1 | 3.92322e-1 | 1.3387 | 1.27 |
| 95% CI: | 4.45e-3 | 3.65553e-2 | 3.32154 | 5.43964e-1 | 7.249e-3 | 0.40 |

| Compound: DICLOFENACO ACIDO LIBRE (Signal: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=off) | | | | | | |
|---|---------------|-----------------|--------------|--------------|-------------|-------|
| Run Type | RetTime [min] | Amount [ng/5ul] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Width [min] | Symm. |
| 1 BPA | 11.776 | 9.02091e-2 | 1692.03229 | 82.74953 | 0.3077 | 0.74 |
| 2 BPA | 11.782 | 9.01936e-2 | 1691.17586 | 82.65807 | 0.3078 | 0.74 |
| 3 BPA | 11.773 | 9.01917e-2 | 1690.04919 | 83.14501 | 0.3091 | 0.73 |
| 4 BPA | 11.773 | 9.01621e-2 | 1689.95642 | 83.43476 | 0.3083 | 0.73 |
| 5 BPA | 11.773 | 9.01870e-2 | 1688.45020 | 83.13174 | 0.3080 | 0.72 |

| Compound: DICLOFENACO ACIDO LIBRE (Signal: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=off) | | | | | | |
|---|---------------|-----------------|--------------|--------------|-------------|-------|
| Run Type | RetTime [min] | Amount [ng/5ul] | Area [mAU*s] | Height [mAU] | Width [min] | Symm. |
| Mean | 11.776 | 4.01625e-2 | 1690.34495 | 93.42382 | 0.3084 | 0.73 |
| S.D.1 | 3.70e-3 | 3.78255e-5 | 1.75884 | 2.84658e-1 | 6.41e-4 | 5e-3 |
| RSD 1 | 0.031 | 4.19555e-2 | 8.33942e-2 | 3.41220e-1 | 0.2080 | 0.79 |
| 95% CI: | 4.59e-3 | 4.69760e-5 | 1.76833 | 3.55450e-1 | 7.96e-4 | 7e-3 |

Anexo 26

Tabla 15. Orden de manufactura para el piloto de Dolfenex® 9mg/5ml, lote: P-1105122.

| IQFARMA | | ORDEN DE MANUFACTURA | | | | ID/F-012.01 | |
|-----------|----------------------------------|----------------------|---------------------|----------------------|-------|-------------------|--|
| | | | | | | Vigente: 16-09-11 | |
| PRODUCTO: | DOLFENEX 9mg/5mL SUSPENSIÓN ORAL | | | | | | |
| CANTIDAD: | 5000ml | EQUIVALENTE A: | 250 FRASCOS x 20 mL | | | | |
| CODIGO: | ----- | LOTE: | P-1105122 | ORDEN DE PRODUCCIÓN: | 512 | | |
| LINEA: | IQFARMA | VCTO: | ----- | TIEMPO DE VIDA UTIL: | ----- | | |

| FORMULA | | | | | | | | | |
|----------|--------------------------------|-------------|------------------|---------------|---------|----------|-------------|---------------|--------------|
| CODIGO | MATERIA PRIMA | Nº ANALISIS | CANTIDAD TEORICA | BALANZA USADA | ADICION | DEVOLUC. | CANT. USADA | ENTREGADO POR | RECIBIDO POR |
| IMP00234 | DICLOFENACO ACIDO LIBRE | | | g | | | | | |
| NAC00078 | GOMAXANTAN | | | g | | | | | |
| NAC00023 | AVICEL RC59I | | | g | | | | | |
| IMP00082 | SODIO FOSFATO DIBASICO ANHIDRO | | | g | | | | | |
| NAC00006 | ACIDO CITRICO ANHIDRO | | | g | | | | | |
| NAC00003 | ACESULFAME POTASICO | | | g | | | | | |
| NAC00119 | SORBITOL 70% | | | g | | | | | |
| NAC00065 | ESENCIA DE TUTTI FRUTI | | | mL | | | | | |
| IMP00027 | BUTILHIDROXIANISOL | | | g | | | | | |
| NAC00096 | PROPILENGLICOL | | | mL | | | | | |
| NAC00089 | METILPARABENO | | | g | | | | | |
| NAC00090 | PROPILPARABENO | | | g | | | | | |
| NAC00111 | SIMETICONA AL 30% EMULSIÓN | | | g | | | | | |
| OOO00001 | AGUA PURIFICADA C.S.P. | | 5000.00 | mL | | | | | |

Cada 5mL contiene:
DICLOFENACO ACIDO LIBRE 9mg

| | | |
|--|--|---|
| <div style="border: 1px solid black; width: 100%; height: 40px; margin-bottom: 5px;"></div> DIRECCION TÉCNICA FECHA:..... | <div style="border: 1px solid black; width: 100%; height: 40px; margin-bottom: 5px;"></div> ALMACÉN FECHA:..... | <div style="border: 1px solid black; width: 100%; height: 40px; margin-bottom: 5px;"></div> PRODUCCIÓN FECHA:..... |
|--|--|---|

| | | | |
|--------|------------|------|---------------|
| FECHA: | 15/10/2012 | R.S. | VIGENCIA R.S. |
|--------|------------|------|---------------|

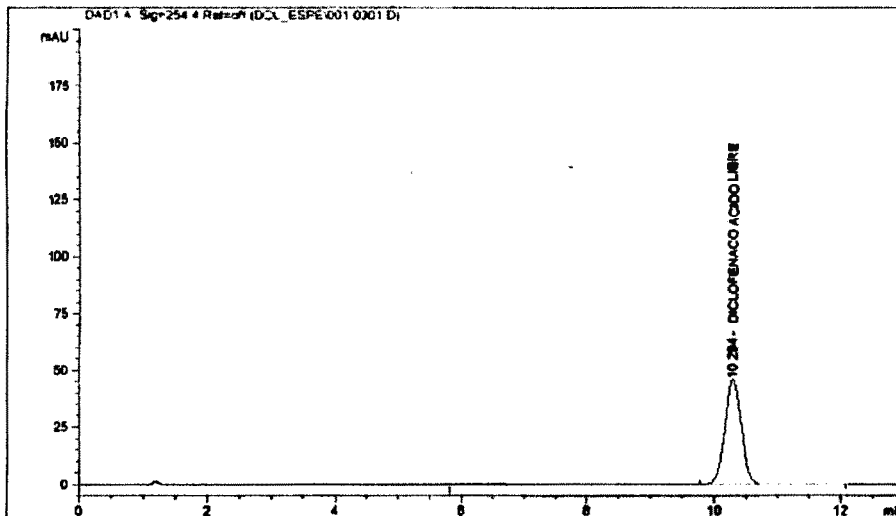
Anexo 27

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\DOL_ESPE\001-0301.D

Sample Name: ST_DICLOFENACO A

```

Injection Date : 29/10/2012 06:59:15 p.m.      Seq. Line : 3
Sample Name    : ST_DICLOFENACO A              Location  : Vial 1
Acq. Operator  : M.VELARDE/F.ROMERO            Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 10 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\DOL_VAL.M
Last changed   : 29/10/2012 06:58:06 p.m. by M.VELARDE/F.ROMERO
                (modified after loading)
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\DOL_VAL.M
Last changed   : 31/10/2012 12:03:36 p.m. by M.VELARDE/F.ROMERO
    
```



 External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 31/10/2012 12:03:26 p.m.
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254.4 Ref=off

| RetTime [min] | Type | Area [mAU*s] | Amt/Area | Amount | Grp | Name |
|---------------|------|--------------|----------|---------|-----|-------------------------|
| 10.254 | BBA | 85.06970 | 1.00000 | 1.00000 | | DICLOFENACO ACIDO LIBRE |

Totals : 1.00000

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Figura 20. Cromatograma del estándar de diclofenaco ácido libre de la selectividad del método.

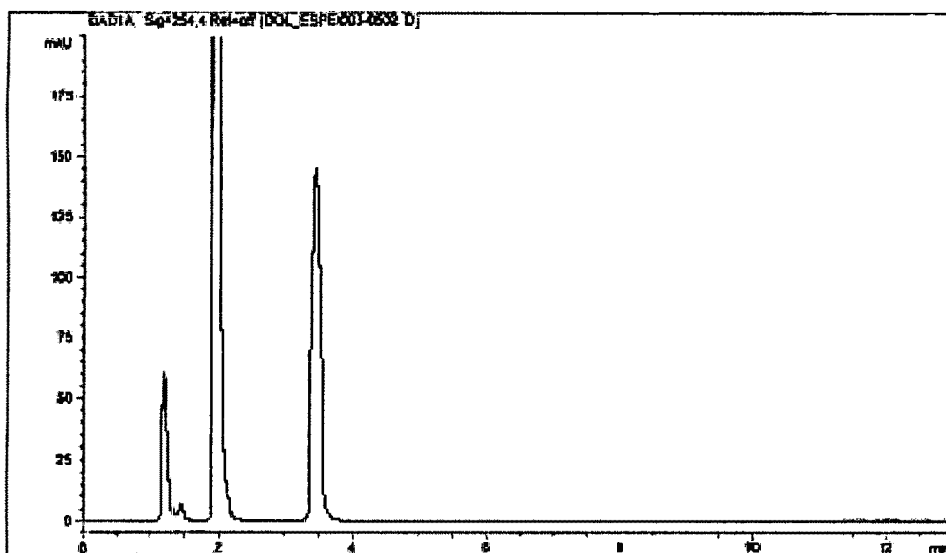
Anexo 28

Data File C:\BPCHEM\1\DATA\BOL_EBPE003-0502.D

Sample Name: PLACEBO

```

-----
Injection Date : 29/10/2012 08:07:42 p.m.   "Seq" Line : 3
Sample Name    : PLACEBO                     Location  : Vial 3
Acq. Operator  : M.VELARDE/F.ROMERO         Inj       : 2
                                                Inj Volume: 10 µl
Acq. Method    : C:\BPCHEM\1\METHODS\BOL_VAL.M
Last changed   : 29/10/2012 07:59:31 p.m. by M.VELARDE/F.ROMERO
                (modified after loading)
Analysis Method: C:\BPCHEM\1\METHODS\BOL_VAL.M
Last changed   : 31/10/2012 12:07:21 p.m. by M.VELARDE/F.ROMERO
                (modified after loading)
    
```



External Standard Report

```

-----
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Wednesday, 31 October 2012 12:07:21 p.m.
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254.4 Ref=off

| RetTime [min] | Type | Area [mAU*s] | Ant/Area | Amount | Grp | Name |
|---------------|------|--------------|----------|--------|-----|-------------------------|
| 10.294 | - | - | - | - | - | DICLOFENACO ACIDO LIBRE |

Totals : 0.00000

Results obtained with enhanced integrator
 1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

Figura 21. Cromatograma del placebo de Dolfenex® 9mg/5ml suspensión oral de la selectividad del método.

Anexo 29

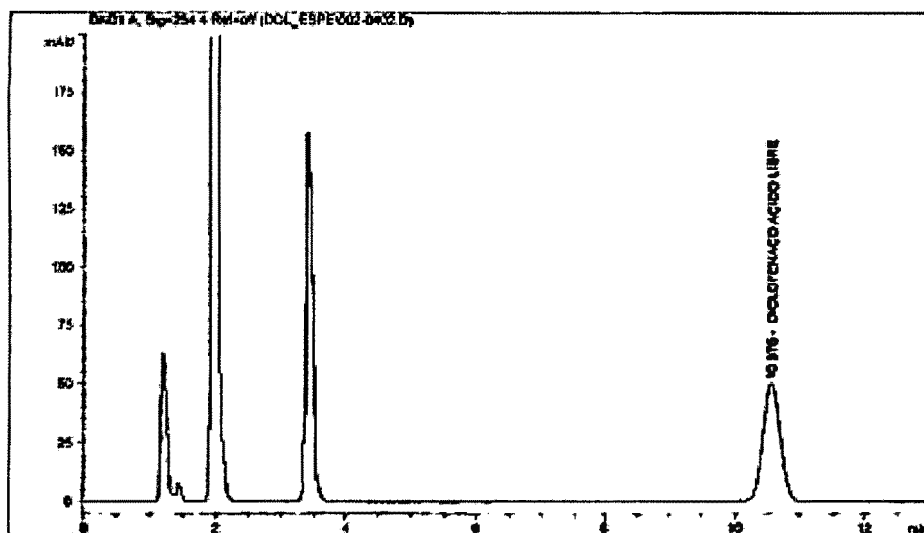
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\DOC_ESPEV002-0402.D

Sample Name: MI_P-1105122

```

*****
Injection Date : 29/10/2012 07:29:57 p.m.      Seq. Line : 4
Sample Name   : MI_P-1105122                  Location  : Vial 2
Acq. Operator : M.VELARDE/F.RONERO           Inj      : 2
                                           Inj Volume: 10 µl

Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\DOC_VAL.M
Last changed  : 29/10/2012 07:28:49 p.m. by M.VELARDE/F.RONERO
               (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DOC_VAL.M
Last changed  : 31/10/2012 12:07:21 p.m. by M.VELARDE/F.RONERO
               (modified after loading)
    
```



External Standard report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Wednesday, 31 October 2012 12:07:21 p.m.
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254.4 Ref=off

| RetTime [min] | Type | Area [mAU*s] | Ant./Area | Amount | Grp | Name |
|---------------|------|--------------|------------|---------|-----|-------------------------|
| 10.576 | MSA | 918.24666 | 1.17086e-3 | 1.07514 | | DICLOFENACO ACTIVO LIMB |

Totals : 1.07514

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Figura 22. Cromatograma de la muestras de Dolfenex® 9mg/5ml (lote: P-1105122) de la selectividad del método.

Anexo 30

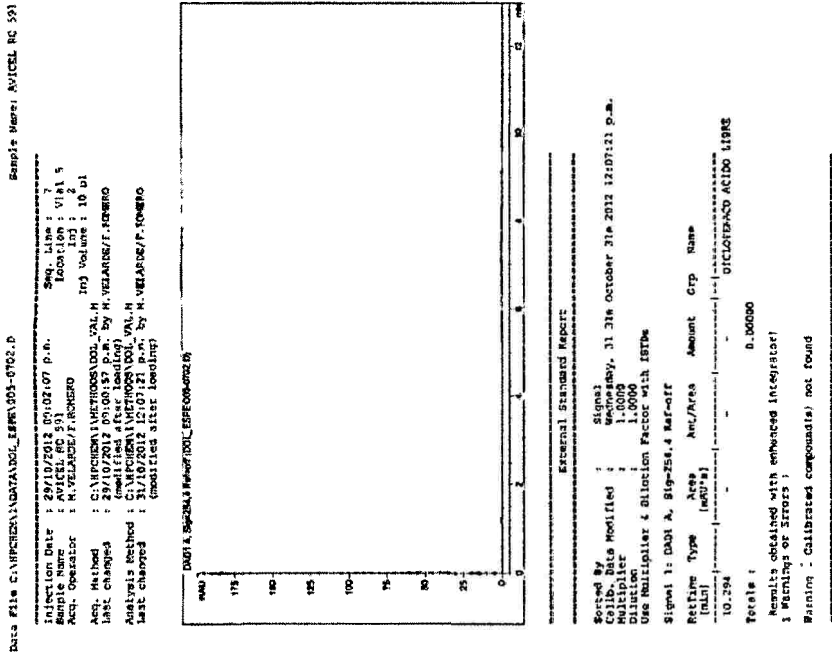
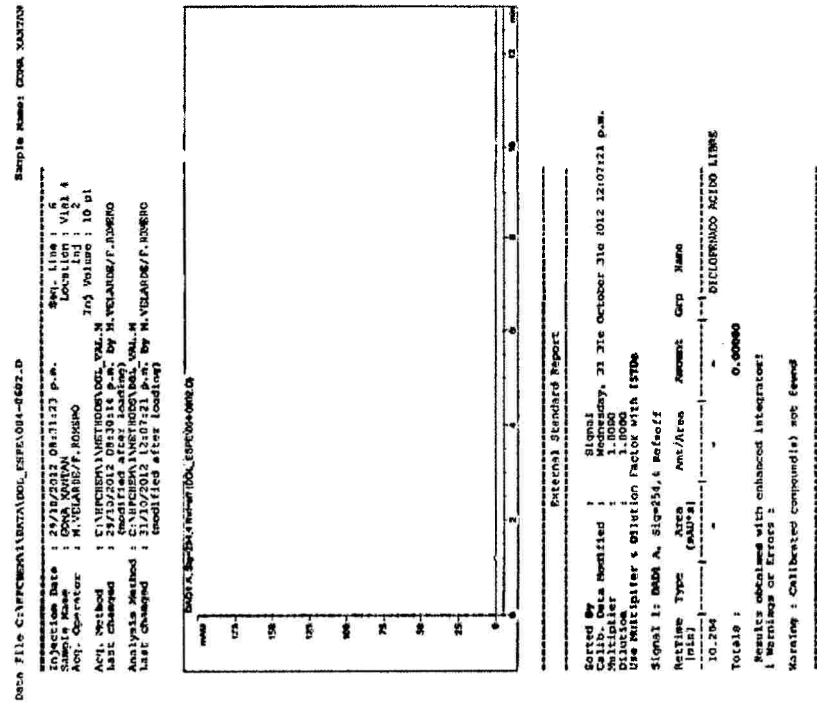
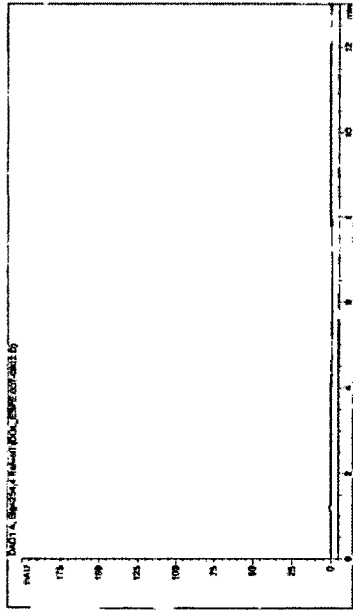


Figura 23. Cromatogramas de la goma xaan y avicel RC 591 (excipientes de la matriz) de la selectividad del método.

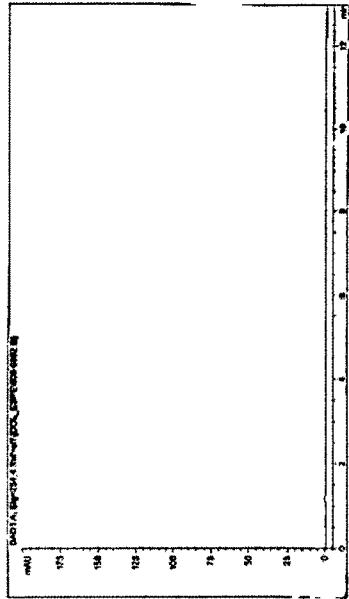
Anexo 31

Data File: C:\MSDCHEM\1\DATA\1001_03PFA007-0102.D Sample Name: AC. CITRICO ANHIDRO
 Injection Date: 29/10/2012 10:02:33 P.M. Seq. Line: 9
 Location: Location: V11.7
 Acq. Operator: M. VELAZQUEZ/RODRIGO Inj Volume: 10 ul
 Acq. Method: C:\MSDCHEM\1\METHODS\MSD_001.M Inj Volume: 10 ul
 Last Changed: 24/10/2012 10:02:33 P.M. Modified after loading: By M. VELAZQUEZ/RODRIGO
 Analysis Method: C:\MSDCHEM\1\METHODS\MSD_001.M
 Last Changed: 24/10/2012 10:02:33 P.M. Modified after loading: By M. VELAZQUEZ/RODRIGO
 List Changed: (modified after loading)



External Standard Report
 Sorted By: Signal
 Calibration Date Modified: Wednesday, 31 Oct 2012 12:07:21 P.M.
 Multiplier: 1.0000
 Dilution: 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
 Signal: 1: D001 A, Sig=254.4 Ref=off
 RetTime Type Area Amt/Arms Amount Crp Name
 (min:s) (mM) (ug/g) (ug) (ug)
 10.234 0.00000
 Total: 0.00000
 Results obtained with enhanced integrator!
 Warnings or Errors:
 Warning: Calibrated compound(s) not found

Data File: C:\MSDCHEM\1\DATA\1001_03PFA007-0102.D Sample Name: SODIO FOSFATO DI
 Injection Date: 29/10/2012 09:27:58 P.M. Seq. Line: 8
 Location: Location: V11.6
 Acq. Operator: M. VELAZQUEZ/RODRIGO Inj Volume: 10 ul
 Acq. Method: C:\MSDCHEM\1\METHODS\MSD_001.M Inj Volume: 10 ul
 Last Changed: 24/10/2012 10:02:33 P.M. Modified after loading: By M. VELAZQUEZ/RODRIGO
 Analysis Method: C:\MSDCHEM\1\METHODS\MSD_001.M
 Last Changed: 24/10/2012 10:02:33 P.M. Modified after loading: By M. VELAZQUEZ/RODRIGO
 List Changed: (modified after loading)



External Standard Report
 Sorted By: Signal
 Calibration Date Modified: Wednesday, 31 Oct 2012 12:07:21 P.M.
 Multiplier: 1.0000
 Dilution: 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
 Signal: 1: D001 A, Sig=254.4 Ref=off
 RetTime Type Area Amt/Arms Amount Crp Name
 (min:s) (mM) (ug/g) (ug) (ug)
 10.234 0.00000
 Total: 0.00000
 Results obtained with enhanced integrator!
 Warnings or Errors:
 Warning: Calibrated compound(s) not found

Figura 24. Cromatogramas del sodio fosfato dibásico anhidro y ácido cítrico (excipientes de la matriz) de la selectividad del método.

Anexo 32

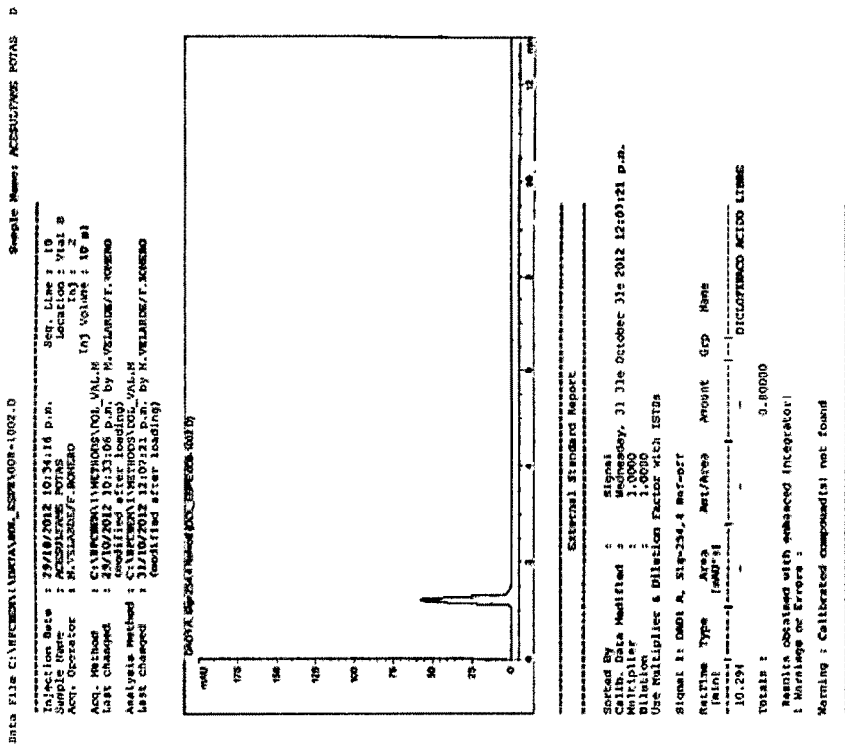
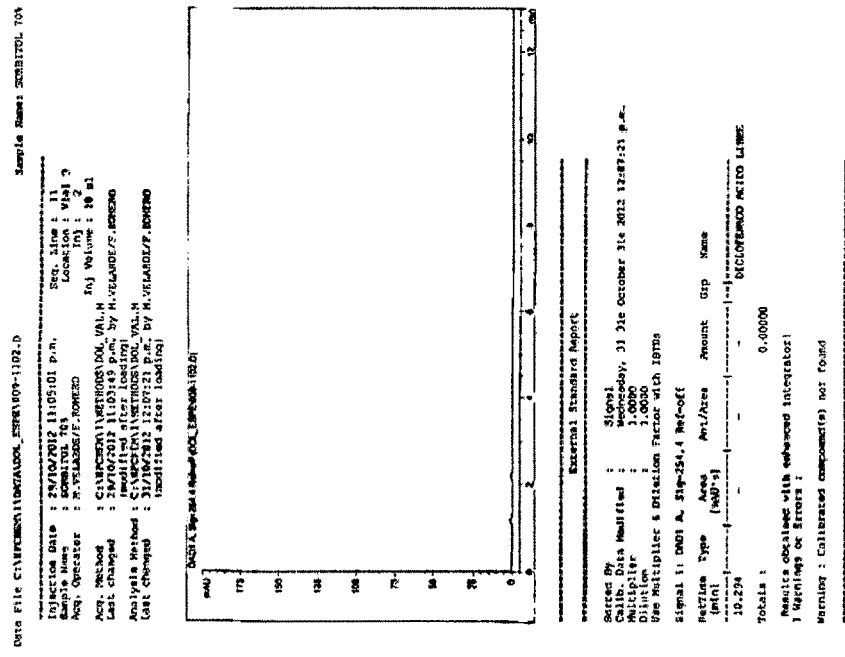
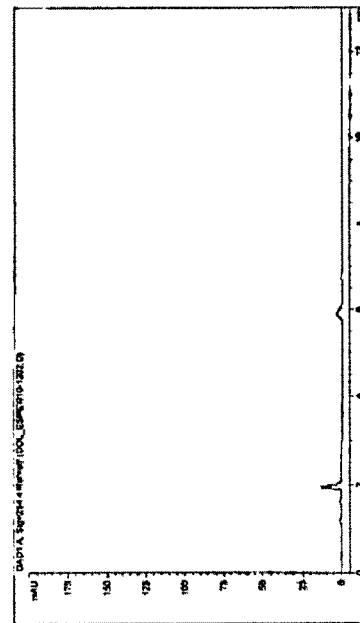


Figura 25. Cromatogramas del acesulfame potásico y sorbitol 70% (excipientes de la matriz) de la selectividad del método.

Anexo 33

Data File: C:\VEPCEM\1\DATA\1001_ESPERA10-1001-0 Sample Name: ESERCIZIA TUTTI FRUTTI

Injection Date : 27/10/2012 11:35:49 p.m. Sep. Line : 12
 Act. Operator : M.VELAZQUEZ/F.RODRIGO Location : Vial 10
 Accq. Method : C:\VEPCEM\1\VEPCEM\1001\VAL.M Inj Volume : 10 µl
 Last changed : 27/10/2012 11:34:32 p.m. By N.VELAZQUEZ/F.RODRIGO
 Analysis Method : C:\VEPCEM\1\VEPCEM\1001\VAL.M
 Last changed : 31/10/2012 12:07:21 p.m. By N.VELAZQUEZ/F.RODRIGO
 (modified after loading)
 (modified after loading)



External Standard Report

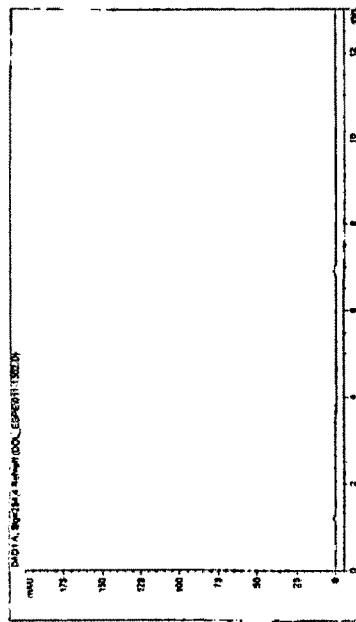
Sorted By : Signal
 Chib. Data Modified : Wednesday, 31 31e October 2012 12:07:21 p.m.
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

| Peak# | Type | Area (a.u.) | Amount | Grp | Name |
|--------|------|-------------|--------|-----|------------------------|
| 10.234 | | | | | DIOLEFINO ACIDO LUBICO |

Totals : 0.00000
 Results obtained with enhanced integrator!
 1 Warning or Error!
 Warning: Calibrated compound(s) not found

Data File: C:\VEPCEM\1\DATA\1001_ESPERA11-1302-D Sample Name: BHA

Injection Date : 30/10/2012 12:06:38 a.m. Sep. Line : 12
 Act. Operator : M.VELAZQUEZ/F.RODRIGO Location : Vial 13
 Accq. Method : C:\VEPCEM\1\VEPCEM\1001\VAL.M Inj Volume : 10 µl
 Last changed : 30/10/2012 12:06:41 a.m. By N.VELAZQUEZ/F.RODRIGO
 Analysis Method : C:\VEPCEM\1\VEPCEM\1001\VAL.M
 Last changed : 31/10/2012 12:07:21 p.m. By N.VELAZQUEZ/F.RODRIGO
 (modified after loading)
 (modified after loading)



External Standard Report

Sorted By : Signal
 Chib. Data Modified : Wednesday, 31 31e October 2012 12:07:21 p.m.
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

| Peak# | Type | Area (a.u.) | Amount | Grp | Name |
|--------|------|-------------|--------|-----|------------------------|
| 10.234 | | | | | DIOLEFINO ACIDO LUBICO |

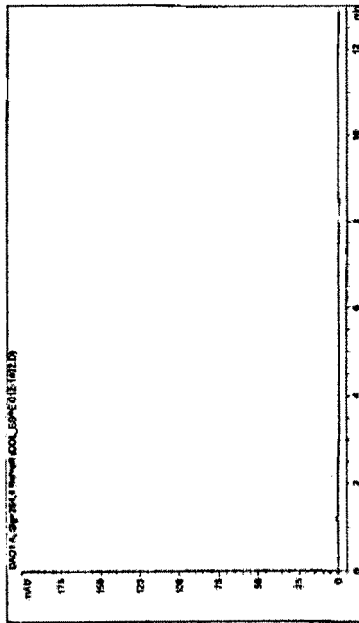
Totals : 0.00000
 Results obtained with enhanced integrator!
 1 Warning or Error!
 Warning: Calibrated compound(s) not found

Figura 26. Cromatogramas de la esencia de tutti frutti y butilhidroxianisol (BHA) (excipientes de la matriz) de la selectividad del método.

Anexo 34

Data File: C:\VPCHEM\1\METHODS\GENE\1012-1402.D Sample Name: PROFILGICOL

Injection Date : 30/10/2012 12:17:20 p.m. Seq. Line : 14
 Sample Name : PROFILGICOL Injection Vol : 10 µl
 Acq. Operator : M.VELAZQUEZ/P.ROMERO Inj Volume : 10 µl
 Acq. Method : C:\VPCHEM\1\METHODS\GENE\VAL.M By M.VELAZQUEZ/P.ROMERO
 Last changed : 31/10/2012 12:07:23 p.m. Modified after loading
 Analysis Method : C:\VPCHEM\1\METHODS\GENE\VAL.M
 Last changed : 31/10/2012 12:07:23 p.m. Modified after loading



External Standard Report

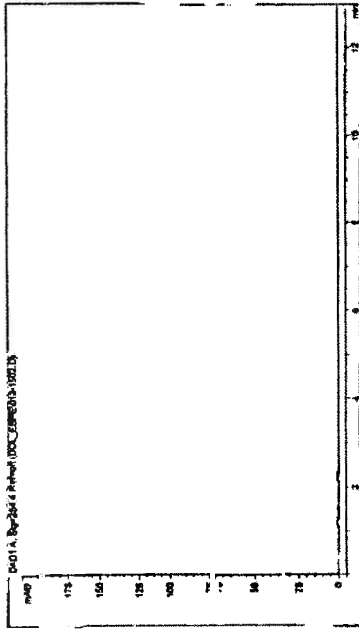
Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : Wednesday, 31 Oct 2012 12:07:21 p.m.
 Multiplier : 1.0000
 Dilution Factor : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
 Signal: 1: 1003 A, Signal=294.4 Ret=off
 RetTime Type Area Amt/Area Amount Grp Name
 (min) (µg/µl) (µg/µl) (µg) (µg/µl)

 10.278 10.278 0.00000
 Totals : 0.00000

Results obtained with enhanced integrator!
 Warning: Calibrated compound(s) not found

Data File: C:\VPCHEM\1\METHODS\GENE\1012-1507.D Sample Name: SIMETICONA 30% E D4

Injection Date : 30/10/2012 01:09:02 p.m. Seq. Line : 15
 Sample Name : SIMETICONA 30% E D4 Injection Vol : 10 µl
 Acq. Operator : M.VELAZQUEZ/P.ROMERO Inj Volume : 10 µl
 Acq. Method : C:\VPCHEM\1\METHODS\GENE\VAL.M By M.VELAZQUEZ/P.ROMERO
 Last changed : 31/10/2012 12:07:23 p.m. Modified after loading
 Analysis Method : C:\VPCHEM\1\METHODS\GENE\VAL.M
 Last changed : 31/10/2012 12:07:23 p.m. Modified after loading



External Standard Report

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : Wednesday, 31 Oct 2012 12:07:23 p.m.
 Multiplier : 1.0000
 Dilution Factor : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
 Signal: 1: 1003 A, Signal=294.4 Ret=off
 RetTime Type Area Amt/Area Amount Grp Name
 (min) (µg/µl) (µg/µl) (µg) (µg/µl)

 10.294 10.294 0.00000
 Totals : 0.00000

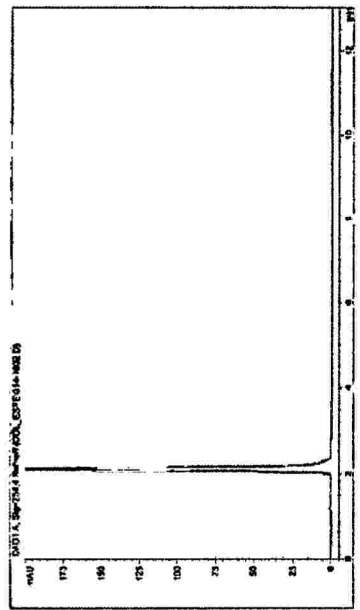
Results obtained with enhanced integrator!
 Warning: Calibrated compound(s) not found

Figura 27. Cromatogramas del proflenglicol y simeticona al 30% (excipientes de la matriz) de la selectividad del método.

Anexo 35

Data File C:\MSDCHEM\1\DATA\NDOL_ESPEV015-1402.D Sample Name: METILPARABENO

Injection Date : 30/10/2012 01:28:43 a.m. Req. Date : 15
 Sample Name : METILPARABENO Location : 9131 J4
 Acq. Operator : M. VELAZQUEZ/F. JORNEO Inj Volume : 10 µl
 Acq. Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\VAL.M
 Last changed : (modified after loading) by M. VELAZQUEZ/F. JORNEO
 Analysis Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\VAL.M
 Last changed : 31/10/2012 12:07:21 p.m. by M. VELAZQUEZ/F. JORNEO
 (modified after loading)



External Standard Report

Sorted By : Signal
 Date Modified : Wednesday, 31 Oct 2012 12:07:21 p.m.
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with INTDS

Signal 1: DMSI A, 510x234.4 Ret-off

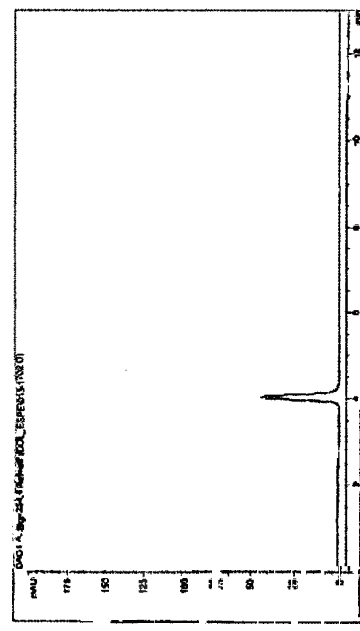
| Retention Time [min] | Area | Amc/Area | Amount | Conc | Name |
|----------------------|------|----------|--------|------|-------------------------|
| 10.29 | - | - | - | - | DICLOFENACO ACIDO LIBRE |

Totals : 0.00000

Results obtained with enhanced integrator!
 Warning : Calibrator compound(s) not found

Data File C:\MSDCHEM\1\DATA\NDOL_ESPEV015-1702.D Sample Name: PROPILOPARABENO

Injection Date : 30/10/2012 01:09:23 a.m. Req. Date : 17
 Sample Name : PROPILOPARABENO Location : 9131 J3
 Acq. Operator : M. VELAZQUEZ/F. JORNEO Inj Volume : 10 µl
 Acq. Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\VAL.M
 Last changed : 30/10/2012 01:09:16 a.m. by M. VELAZQUEZ/F. JORNEO
 Analysis Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\VAL.M
 Last changed : 31/10/2012 12:07:21 p.m. by M. VELAZQUEZ/F. JORNEO
 (modified after loading)



External Standard Report

Sorted By : Signal
 Date Modified : Wednesday, 31 Oct 2012 12:07:21 p.m.
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with INTDS

Signal 1: DMSI A, 510x234.4 Ret-off

| Retention Time [min] | Area | Amc/Area | Amount | Conc | Name |
|----------------------|------|----------|--------|------|-------------------------|
| 10.29 | - | - | - | - | DICLOFENACO ACIDO LIBRE |

Totals : 0.00000

Results obtained with enhanced integrator!
 Warning : Calibrator compound(s) not found

Figura 28. Cromatogramas del metilparabeno y propilparabeno (excipientes de la matriz) de la selectividad del método.

Anexo 36

Data File C:\MSDCHEM\1\DATA\DOLO_ESPE\002-0102.D

Sample Name: MI_2-1105122

Injection Date : 29/10/2012 07:29:37 p.m. Seq. Line : 4
Sample Name : MI_2-1105122 Location : Vial 2
Acq. Operator : M.VELARDE/F.RONERO Inj : 2
Inj Volume : 10 µl
Acq. Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\DOLO_VAL.M
Last changed : 29/10/2012 07:28:49 p.m. by M.VELARDE/F.RONERO
modified after loading)
Analysis Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\DOLO_VAL.M
Last changed : 31/10/2012 12:07:21 p.m. by M.VELARDE/F.RONERO
modified after loading)

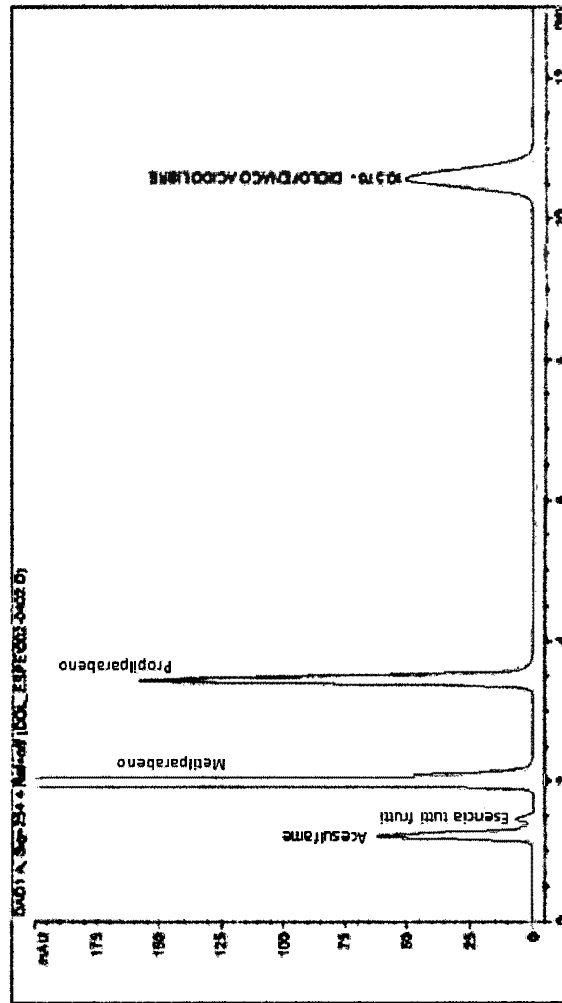


Figura 29. Identificación de picos cromatograficos, en el cromatograma de la muestra de Dolifenex® 9mg/5ml.

Tabla 16. Matriz de consistencia

| TITULO | PROBLEMA | OBJETIVOS | MARCO TEÓRICO | HIPÓTESIS | VARIABLES E INDICADORES | METODOLOGÍA |
|---|--|--|--|--|--|--|
| Validación de un método analítico para la cuantificación de Ácido Libre en Dolifenex® 9mg/5ml Suspensión Oral por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC). Lima - 2012 | ¿Se podrá validar el método analítico para la cuantificación de diclofenaco ácido libre en Dolifenex® 9mg/5ml suspensión oral por cromatografía líquida de alta performance (HPLC). Lima - 2012? | OBJETIVO GENERAL Validar el método analítico por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para la cuantificación de diclofenaco ácido libre en Dolifenex® 9mg/5ml suspensión oral. OBJETIVO ESPECÍFICO Determinar que el método analítico cumple con los parámetros de validación propuestos (linealidad, exactitud, precisión, robustez y selectividad), en las condiciones descritas y así obtener pruebas documentales para la cuantificación de diclofenaco ácido libre en una suspensión oral. | 1. Validación de técnicas analíticas a. Validación de tipos de validación • Prospectiva • Retrospectiva • Revalidación c. Documentación de la validación 2. Cromatografía líquida de alta performance. 3. Diclofenaco ácido libre a. Propiedades fisicoquímicas b. Propiedades farmacológicas | El método analítico para la cuantificación de diclofenaco ácido libre en Dolifenex® 9mg/5ml suspensión oral por cromatografía líquida de alta performance (HPLC), cumple con los parámetros de validación, por lo que proporciona datos precisos, reproducibles y confiables | VARIABLE INDEPENDIENTE Método analítico de Dolifenex® 9mg/5ml suspensión oral. VARIABLE DEPENDIENTE Validación del método analítico para la cuantificación de diclofenaco ácido libre por cromatografía líquida de alta performance (HPLC). | POBLACIÓN Pílotos de Dolifenex® 9mg/5ml suspensión oral (diclofenaco ácido libre) desarrollados en el área de investigación y desarrollo del Instituto Quimioterápico S.A. (IQFARMA). MUESTRA Pílotos de Dolifenex® 9mg/5ml suspensión oral (diclofenaco ácido libre) desarrollado en el área de investigación y desarrollo del Instituto Quimioterápico S.A. (IQFARMA) correspondiente al lote P-1105122. MUESTREO Libre por conveniencia TIPO DE INVESTIGACIÓN Descriptivo ANÁLISIS ESTADÍSTICO Se realizará la aplicación de la prueba t - student, análisis de varianza ANOVA. Con un nivel de confianza de 95%. |

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE DICLOFENACO ÁCIDO LIBRE EN DOLFENEX® 9mg/5ml SUSPENSIÓN ORAL POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC). LIMA-2012.

Melinna Sindy Velarde Galindo¹, Edgar Cárdenas Landeo¹, Jonh Huaman Ccopa²

¹Farmacia y Bioquímica: UNSCH; ²Instituto Quimioterápico S.A. (IQFARMA)

RESUMEN

El presente trabajo valida el método analítico por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para la cuantificación de diclofenaco ácido libre en Dolfenex® 9mg/5ml suspensión oral. El presente estudio descriptivo se realizó en el área de investigación y desarrollo del Instituto Quimioterápico S.A. (IQFARMA), entre los meses de agosto a diciembre de 2012. Se realizaron las corridas cromatográficas en una columna Purospher STAR® 100 RP-8 (5µm) (150mm x 4,6mm), la fase móvil fue una mezcla de metanol: Buffer fosfato pH 2,5 (70:30), a una velocidad de flujo de 1,2 ml/min, y una longitud de onda de 254nm. Se estableció los parámetros de validación de acuerdo a lo planteado en la farmacopea de los Estados Unidos (USP 35 – NF 30) para la categoría 1, siguiendo la metodología propuesta por la international conference on harmonization (ICH). Se determinó la linealidad del sistema en el intervalo de 50% a 150%, obteniendo la siguiente ecuación: $y = 8\,465,849x + 43,923$ y un coeficiente de determinación ($r^2 = 0,997$); para la exactitud se obtuvo un porcentaje de recuperación (100,219%) que no presentó diferencia significativa con el 100%; en la precisión se obtuvo un coeficiente de variación (CV = 0,235%) que evidencia resultados repetitivos y en la precisión intermedia se obtuvo coeficiente de variación (CV = 0,247%); para dos analistas diferentes, el método es robusto porque presentó un coeficiente de variación (CV = 0,239%), frente a la modificación del flujo a la mitad (0,6 ml/min); y finalmente el método es selectivo porque permite el análisis del principio activo sin la interferencia de los excipientes de la formulación. Se concluye que el método analítico para la cuantificación de diclofenaco ácido libre en Dolfenex® 9mg/5ml suspensión oral está validado por cumplir con los parámetros de validación propuestos por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 35 – NF 30).

Palabras Claves: Validación, Cromatografía, Diclofenaco.

SUMMARY

In present work we validated an analytic method for High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for the quantifying of diclofenac free acid in Dolfenex® 9mg/5ml oral suspension. This descriptive study was done at Research and Development area of the Instituto Quimioterápico S.A (IQFARMA) from August to December 2012. The chromatographic separation was carried out in a Purospher STAR® 100 RP-8 (5µm) (150mm x 4,6mm) column, the mobile phase was a mixture of methanol and phosphate buffer pH 2, 5 (70:30), at a flow rate of 1,2ml/min, and wavelength of 254nm. The validation parameters were set up according to the United States Pharmacopeia (USP35 – NF 30) for the category 1, tracking the methodology proposed by the International Conference on Harmonization (ICH). It was possible to determine the linearity on an interval of 50% to 150%, obtaining the following equation: $Y = 8\,465,849x + 43,923$ and a coefficient of determination ($r^2 = 0,997$); the accuracy got a recovery percentage (100,219%), which didn't show significant difference than 100%; the precision got a Relative Standard Deviation (RSD = 0.235%), in the intermediate precision got a Relative Standard Deviation (RSD = 0.247%), these results were obtained with two different analysts. The method is robust because showed a Relative Standard Deviation (RSD = 0,239%), front to the modification of the half flow (0,6 ml/min); and finally the method is selective because it permits us to analyze the active ingredient without interference of the formulation excipients. As a conclude, the analytic method for the quantifying of diclofenac free acid in Dolfenex® 9mg/5ml oral suspension is valid to accomplish the validation parameters that were proposed by the United States Pharmacopeia (USP 35 – NF 30).

Keywords: Validation, Chromatography, Diclofenac.

INTRODUCCIÓN

El fin de la industria farmacéutica siempre ha sido producir medicamentos de calidad y con total garantía, y es en el avance para conseguir un total dominio de la calidad cuando surge el concepto de validación.

La validación, busca obtener evidencia documentada de que un procedimiento conducirá con un alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de especificaciones de calidad establecidas. Además en el mercado farmacéutico existen varios medicamentos cuyas métodos analíticos, no se encuentran publicados en obras oficiales como la farmacopea de los Estados Unidos (USP) o farmacopea Británica (BP), lo cual hace necesario el desarrollo y validación de estos métodos.

Por otra parte, la validación de métodos analíticos se realiza para cumplir las exigencias de la Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas (DIGEMID) contemplada en el artículo 176° del manual de buenas prácticas de manufactura de productos farmacéuticos (BPM), el cual a su vez se rige a reglamentaciones internacionales dadas por la Food and Drug Administration (FDA), Organización Mundial de la Salud (OMS), International Conference on Harmonization (ICH).

En el presente trabajo se valida el método analítico para la cuantificación de diclofenaco ácido libre en Dolfenex® 9mg/5ml suspensión oral siguiendo los lineamientos propuestos por la farmacopea de los Estados Unidos (USP 35 – NF 30) y la International Conference on Harmonization (ICH Q2(R1)), usando la cromatografía líquida de alta performance por ser una técnica muy sensible, de fácil adaptación a determinaciones cuantitativas exactas, y presenta idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo por su gran aplicabilidad a sustancias que son de interés en la industria.¹

La validación del método se realizó en el área de investigación y desarrollo del Instituto Quimioterápico S.A. (IQFARMA), entre los meses de agosto – diciembre de 2012; desarrollando los siguientes parámetros de validación: linealidad; exactitud; precisión; robustez y selectividad.

La presente investigación, busca dejar evidencia documentada y a su vez aportar conocimiento que puede ser aplicado en las áreas de control de calidad de los diferentes laboratorios farmacéuticos.

El presente trabajo plantea: Validar el método analítico por cromatografía líquida de alta

performance (HPLC) para la cuantificación de diclofenacoácido libre en Dolfenex® 9mg/5ml suspensión oral. El objetivo específico planteado fue:

➤ Determinar que el método analítico cumpla con los parámetros de validación propuestos (linealidad, exactitud, precisión, robustez y selectividad), en las condiciones descritas y así obtener pruebas documentales para la cuantificación de diclofenacoácido libre en una suspensión oral.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población.- Pilotos de Dolfenex 9mg/5ml® suspensión oral (diclofenaco ácido libre) desarrollados en el área de investigación y desarrollo del Instituto Quimioterápico S.A. (IQFARMA).

Muestra.- Piloto de Dolfenex® 9mg/5ml suspensión oral (diclofenaco ácido libre) desarrollado en el área de investigación y desarrollo del Instituto Quimioterápico S.A. (IQFARMA) correspondiente al lote P-1105122.

Diseño metodológico

Sistema de muestreo.- Libre por conveniencia.²

Alcance de investigación.- Descriptivo.²

Recolección de datos.- Los datos fueron recolectados de las corridas cromatográficas de los diferentes parámetros de validación.

Análisis de datos.- Los datos fueron procesados utilizando el programa Microsoft Excel® 2010

Procedimiento experimental

Condiciones cromatográficas

| | |
|-----------------------|--|
| Columna | : purospher STAR® 100 RP-8 (5µm); 150mm x 4,6mm. |
| Fase móvil | : metanol: Buffer fosfato pH 2,5 (70:30) |
| Longitud de onda | : 254 nm |
| Flujo | : 1,2 ml/min |
| Volumen de Inyección: | 10 µl |

Preparación de la fase móvil

• **Preparación del buffer fosfato pH 2,5**

Se mezcló volúmenes iguales de ácido fosfórico 0,01M y fosfato de sodio monobásico 0,01 M, se llevó a pH 2,5 ± 0,2 con ácido fosfórico o hidróxido de sodio.

- **Fase móvil**

Se preparó una mezcla de metanol y buffer fosfato pH 2,5 (70:30). Se filtró por membrana de nylon 0,2 µm de porosidad y se dejó al vacío por tres minutos para desgasificar.

Desarrollo de los parámetros de validación

a. Linealidad

Se partió de la solución madre de la cual se realizó cinco diluciones para obtener soluciones en el siguiente intervalo: 50%, 75%, 100%, 125% y 150% que establecieron la recta de calibración, las cuales fueron analizadas por duplicado.

b. Exactitud

Se empleó el método del placebo cargado, que consiste en adicionar una cantidad de analito sobre el placebo equivalente al volumen de la muestra en este caso 5 ml. La adición de los estándares se realizó a tres niveles de concentración: 80%, 100% y 120%, y se realizaron tres determinaciones de cada concentración.

c. Precisión

- *Repetibilidad*

Se evaluaron seis muestras a una concentración de 0,09 mg/ml. Las muestras fueron tratadas según indica la técnica analítica por un mismo analista, y fueron inyectadas al sistema cromatográfico por duplicado y contrastado frente a un estándar.

- *Precisión intermedia*

Se realizó la preparación del estándar y seis muestras a la concentración de 0,09 mg/ml. Por dos analistas diferentes y en diferentes sesiones, siguiendo el procedimiento citado en el ensayo de repetibilidad.

d. Selectividad

Se contrastaron los cromatogramas del estándar, muestra, placebo y excipientes de la formulación, para establecer la selectividad del método.

e. Robustez

La evaluación de este parámetro se dio a partir del estándar y dos muestras a una concentración de 0,09 mg/ml las cuales se inyectaron al cromatografo, variando el flujo de 1,2 ml/min a 0,6 ml/min.

RESULTADOS

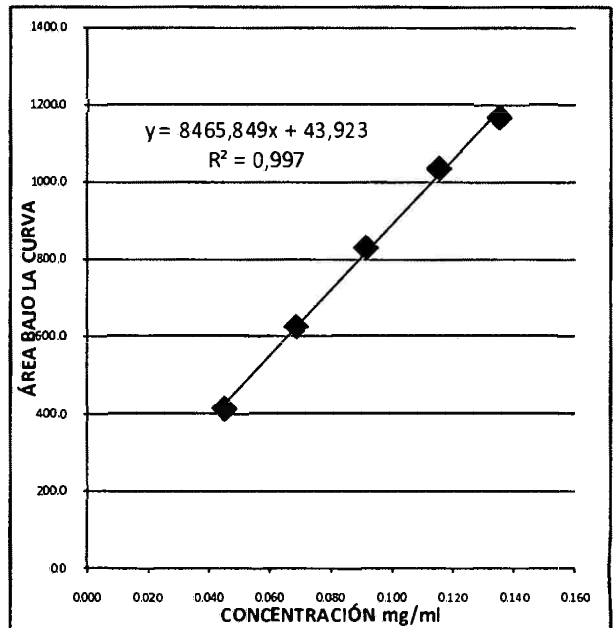


Figura 01. Recta de regresión lineal concentración versus área bajo la curva de las soluciones estándar de diclofenaco ácido libre. Lima - 2012.

Tabla 01. Porcentaje de recuperación de diclofenaco ácido libre en función de la cantidad agregada. Lima - 2012.

| Muestra (%) | Cantidad agregada (mg) | Porcentaje de muestra recuperada (%) | Porcentaje de recuperación (%) |
|---|------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| | 7,21 | 80,086 | 99,941 |
| 80% | 7,22 | 80,248 | 100,019 |
| | 7,21 | 80,052 | 99,940 |
| | 9,06 | 101,612 | 100,906 |
| 100% | 9,06 | 101,873 | 101,187 |
| | 9,11 | 101,682 | 100,013 |
| | 10,81 | 120,020 | 99,971 |
| 120% | 10,83 | 120,319 | 100,015 |
| | 10,82 | 120,185 | 99,978 |
| Promedio | | | 100,219 |
| Desviación Estándar | | | 0,475 |
| Coefficiente de Variación | | | 0,474 |
| Número de Datos (n) | | | 9 |
| Grados de Libertad | | | 8 |
| t _{tablas} | | | 2,306 |
| t _{exp} | | | 1,384 |
| Criterio de aceptación t _{exp} < t _{tablas} | | | CUMPLE |

Tabla 02. Test estadístico de Cochran en función al porcentaje de muestra recuperada.

| Muestra | Porcentaje de muestra recuperada (%) | Promedio (%) | Desviación estándar | Varianza |
|---|--------------------------------------|--------------|---------------------|----------|
| | 8,008,589 | | | |
| 80% | 8,024,844 | 80,129 | 0,105 | 0,011 |
| | 8,005,200 | | | |
| | 10,161,233 | | | |
| 100% | 10,187,256 | 101,584 | 0,303 | 0,092 |
| | 10,126,828 | | | |
| | 12,002,017 | | | |
| 120% | 12,031,861 | 120,175 | 0,150 | 0,022 |
| | 12,018,494 | | | |
| G_{exp} | | | | 0,734 |
| Número de Grupos (K) | | | | 3 |
| Número de Determinaciones (n) | | | | 3 |
| G_{tabla} | | | | 0,798 |
| Criterio de aceptación $G_{exp} < G_{tablas}$ | | | | CUMPLE |

Tabla 03. Porcentaje de recuperación de diclofenaco ácido libre en Dolfenex® 9mg/5ml. Lima - 2012.

| Nº | Peso muestra (g) | Concentración por muestra (mg/5ml) | Porcentaje de recuperación (%) |
|--|------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| 1 | 5,2168 | 9,026 | 100,293 |
| 2 | 5,2370 | 9,018 | 100,196 |
| 3 | 5,2399 | 9,043 | 100,474 |
| 4 | 5,2359 | 9,043 | 100,476 |
| 5 | 5,2350 | 9,031 | 100,340 |
| 6 | 5,2678 | 9,078 | 100,869 |
| Promedio | | | 100,441 |
| Desviación Estándar | | | 0,236 |
| Coficiente de Variación (%) | | | 0,235 |
| Número de análisis (n) | | | 6 |
| t_{tablas} | | | 2,571 |
| Límite de confianza inferior para la media | | | 98,957 |
| Límite de confianza superior para la media | | | 101,925 |
| Criterio de aceptación $CV \leq 2\%$ | | | CUMPLE |

Tabla 04. Recuperación de diclofenaco ácido libre en Dolfenex® 9mg/5ml por dos analistas diferentes. Lima - 2012.

| Nº | Día 1 | | Día 2 | |
|--------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | Peso muestra analista 1 (g) | Recuperación analista 1 (%) | Peso muestra analista 2 (g) | Recuperación analista 2 (%) |
| 1 | 5,2357 | 100,224 | 5,2168 | 100,293 |
| 2 | 5,2373 | 100,597 | 5,2370 | 100,196 |
| 3 | 5,2350 | 100,167 | 5,2399 | 100,474 |
| 4 | 5,2385 | 100,671 | 5,2359 | 100,476 |
| 5 | 5,2389 | 100,879 | 5,2350 | 100,340 |
| 6 | 5,2377 | 100,619 | 5,2678 | 100,869 |
| Promedio | | 100,526 | | 100,441 |
| Desviación Estándar | | 0,275 | | 0,236 |
| CV% | | 0,274 | | 0,235 |
| CV% precisión intermedia | | | | 0,247 |
| Criterio de aceptación $CV \leq 2\%$ | | | | CUMPLE |

Tabla 05. Porcentaje de recuperación de diclofenaco ácido libre en Dolfenex® 9mg/5ml disminuyendo el flujo a 0,6 ml/min. Lima - 2012.

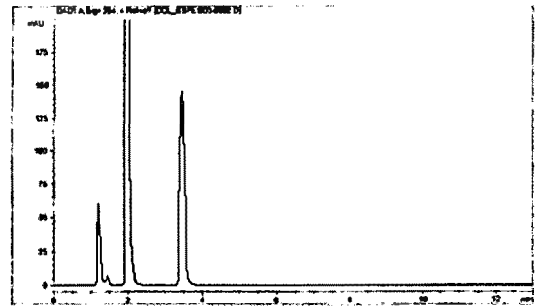
| Nº | Peso (g) | Tiempo de retención (min) | Concentración (mg/5ml) | Recuperación (%) |
|--------------------------------------|----------|---------------------------|------------------------|------------------|
| 1 | 5,543 | 11,783 | 9,046 | 100,541 |
| | | 11,783 | 9,052 | |
| 2 | 5,2522 | 11,786 | 9,000 | 100,201 |
| | | 11,789 | 9,036 | |
| Promedio | | | | 100,371 |
| Desviación Estándar | | | | 0,240 |
| Coficiente de Variación (%) | | | | 0,239 |
| Criterio de aceptación $CV \leq 2\%$ | | | | CUMPLE |

Tabla 06. Selectividad del método según tiempo de retención del diclofenaco ácido libre en Dolfenex® 9mg/5ml. Lima - 2012.

| Nº | Muestra | Tiempo de retención (min) |
|----|--------------------------|---------------------------|
| 1 | Estándar | 10,294 |
| 2 | Muestra P-1105122 | 10,576 |
| 3 | Placebo | - |
| 4 | Goma xantan | - |
| 5 | Avicel RC-591 | - |
| 6 | Sodio fosfato dibásico | - |
| 7 | Ácido cítrico anhidro | - |
| 8 | Acesulfame potásico | - |
| 9 | Sorbitol 70% | - |
| 10 | Esencia de tuttifrutti | - |
| 11 | Butilhidroxianisól (BHA) | - |
| 12 | Propilenglicol | - |
| 13 | Metilparabeno | - |
| 14 | Propilparabeno | - |
| 15 | Simeticona 30% emulsión | - |

Criterio de aceptación: Ninguno de los excipientes debe eluir en el mismo tiempo de retención del estándar **CUMPLE**

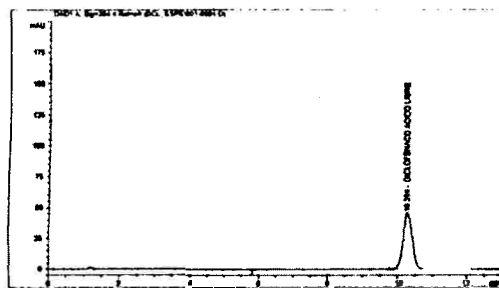
Data File: C:\RPGM\11\DATA\01_ESP\103-6502.D Sample Name: PLACEBO
 Injection Date: 29/10/2012 08:00:12 p.m. Seq. Line: 5
 Sample Name: PLACEBO Location: Vial 2
 Acq. Operator: H.VELAZQUEZ.PONCE Inj Volume: 10 µl
 Acq. Method: C:\RPGM\11\METHODS\VAL.M
 Last changed: 29/10/2012 07:59:31 p.m. by H.VELAZQUEZ.PONCE
 Modified after loading!
 Analysis Method: C:\RPGM\11\METHODS\VAL.M
 Last changed: 31/10/2012 12:07:23 p.m. by H.VELAZQUEZ.PONCE
 Modified after loading!



External Standard Report
 Sorted by: Signal
 Calc. Date Modified: Wednesday, 31 October 2012 12:07:23 p.m.
 Multiplier: 1.0000
 Division: 1.0000
 Use Multiplier & Division Factor with ISTDs
 Signal: DAD A, Sig=754, 4 Ref=off
 RetTime Type Area Amt/Area Amount Crp Name
 (min) (µM²) (µg) (µg/g)
 10.576 - - - - DICLOFENACO ACIDO LIBRE
 Totals: 0.0000
 Results obtained with enhanced integration!
 1 Warning or Errors:
 Warnings: Calibrated compound(s) not found

Figura 03. Cromatograma del placebo de Dolfenex® 9mg/5ml suspensión oral de la selectividad del método.

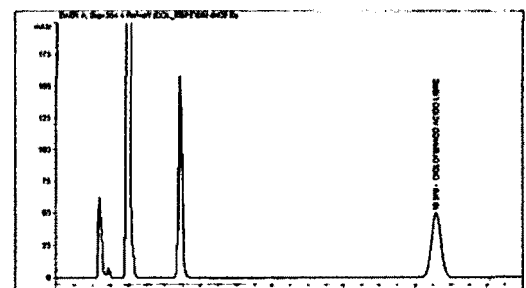
Data File: C:\RPGM\11\DATA\01_ESP\103-6501.D Sample Name: ST_DICLOFENACO A
 Injection Date: 29/10/2012 06:59:13 p.m. Seq. Line: 2
 Sample Name: ST_DICLOFENACO A Location: Vial 1
 Acq. Operator: H.VELAZQUEZ.PONCE Inj Volume: 10 µl
 Acq. Method: C:\RPGM\11\METHODS\VAL.M
 Last changed: 29/10/2012 06:58:04 p.m. by H.VELAZQUEZ.PONCE
 Modified after loading!
 Analysis Method: C:\RPGM\11\METHODS\VAL.M
 Last changed: 31/10/2012 12:07:23 p.m. by H.VELAZQUEZ.PONCE
 Modified after loading!



External Standard Report
 Sorted by: Signal
 Calc. Date Modified: 31/10/2012 12:07:24 p.m.
 Multiplier: 1.0000
 Division: 1.0000
 Use Multiplier & Division Factor with ISTDs
 Signal: DAD A, Sig=754, 4 Ref=off
 RetTime Type Area Amt/Area Amount Crp Name
 (min) (µM²) (µg) (µg/g)
 10.294 854.06370 1.1786 4e-3 2.00000 DICLOFENACO ACIDO LIBRE
 Totals: 1.00000
 Results obtained with enhanced integration!
 *** End of Report ***

Figura 02. Cromatograma del estándar de diclofenaco ácido libre de la selectividad del método.

Data File: C:\RPGM\11\DATA\01_ESP\103-6492.D Sample Name: M1_P-1105122
 Injection Date: 29/10/2012 07:29:57 p.m. Seq. Line: 4
 Sample Name: M1_P-1105122 Location: Vial 2
 Acq. Operator: H.VELAZQUEZ.PONCE Inj Volume: 10 µl
 Acq. Method: C:\RPGM\11\METHODS\VAL.M
 Last changed: 29/10/2012 07:28:49 p.m. by H.VELAZQUEZ.PONCE
 Modified after loading!
 Analysis Method: C:\RPGM\11\METHODS\VAL.M
 Last changed: 31/10/2012 12:07:23 p.m. by H.VELAZQUEZ.PONCE
 Modified after loading!



External Standard Report
 Sorted by: Signal
 Calc. Date Modified: Wednesday, 31 October 2012 12:07:24 p.m.
 Multiplier: 1.0000
 Division: 1.0000
 Use Multiplier & Division Factor with ISTDs
 Signal: DAD A, Sig=754, 4 Ref=off
 RetTime Type Area Amt/Area Amount Crp Name
 (min) (µM²) (µg) (µg/g)
 10.576 854.06370 1.1786 4e-3 2.00000 DICLOFENACO ACIDO LIBRE
 Totals: 1.00000
 Results obtained with enhanced integration!
 *** End of Report ***

Figura 04. Cromatograma de la muestras de Dolfenex® 9mg/5ml (lote: P-1105122) de la selectividad del método.

($\alpha=0,05$), con lo cual se corrobora la existencia de correlación lineal entre variables, con un 99,70% de probabilidad. Así mismo, se realizó la determinación de la varianza de la pendiente "b", donde debe cumplirse: $t_{exp} > t_{tabla}$; obteniéndose t_{exp} (80,041) $> t_{tabla}$ (2,101), con lo que se demuestra la existencia de una relación lineal significativa, por lo tanto la pendiente es significativamente diferente de cero, y los límites de confianza inferior y superior son 8243,629 y 8688,070 respectivamente los cuales no incluyen al cero. En la evaluación de la linealidad a partir de los coeficientes de variación de los factores respuesta se obtuvo un coeficiente de variación (CV = 2,287%), lo cual expresa que existe relación entre la concentración y áreas bajo la curva; ya que los valores superiores al 5% indicarían una falta de linealidad. Finalmente se aplica un test de proporcionalidad del intercepto "a", donde se debe cumplir: $t_{exp} > t_{tabla}$; obteniéndose t_{exp} (4,299) $> t_{tabla}$ (2,101), lo cual indica la proporcionalidad entre variables, quedando estadísticamente demostrada la linealidad del sistema.

Estos resultados son refrendados por Flores,⁸ quien realizó la linealidad tanto para el estándar como para las muestras donde obtuvo t_{exp} (137,703) $> t_{tabla}$ (2,093) para el estándar y t_{exp} (137,703) $> t_{tabla}$ (2,093) para la muestra con lo que demuestra que existe correlación lineal significativa entre "x" e "y", así mismo obtuvo un RSD de 1,59% para el estándar y 1,40% para la muestra esto para los factores respuesta siendo el valor máximo permisible 5%, en la evaluación de la varianza de la pendiente "b" obtuvo t_{exp} (73,681) $> t_{tabla}$ (2,093) para el estándar y un t_{exp} (63,291) $> t_{tabla}$ (2,093) para la muestra, además los límites de confianza para la pendiente "b" son significativamente mayores que cero, con lo cual confirma estadísticamente la linealidad del sistema.

En la Tabla 01 se evidencia los resultados del porcentaje de recuperación en función de la cantidad agregada de diclofenaco ácido libre para la determinación de la exactitud del método, obteniéndose un promedio de recuperación de 100,219%, el cual se encuentra dentro de los límites establecidos (98% - 102%) propuestos por la Food and Drug Administration (FDA)⁷ además se obtuvo un coeficiente de variación de 0,475% siendo el valor máximo aceptado 2%. Pero para demostrar que no existe diferencia entre la cantidad recuperada y el 100% se aplicó el test estadístico t-student, donde debe cumplirse: el valor de $t_{exp} < t_{tabla}$, para n-1 grados de libertad y una probabilidad de cometer error de 95% ($\alpha= 0,05$), obteniéndose t_{exp} (1,384) $< t_{tabla}$ (2,306) para 8 grados de libertad y con ($\alpha= 0,05$) probabilidad de cometer error, y un nivel de significancia de 95%, con lo cual se corrobora que el método es exacto y que no existe

diferencia significativa entre el porcentaje de recuperación hallado y el 100%. Lo cual también podemos evidenciar en el trabajo de Flores,⁸ en el cual concluye que su técnica es exacta y que no existe diferencia entre el valor medio hallado y el valor agregado (100%), obteniendo una recuperación media de 99,85% y tras la aplicación de un test de t - student obtuvo para t_{exp} (1,72) $< t_{tabla}$ (2,15), con un 95% de significancia y una probabilidad de cometer error de ($\alpha=0,05$) para n-1 grados de libertad.

Así como también Prado,⁹ validó un método para la cuantificación de dexametasona y ciprofloxacino en una suspensión oftálmica por HPLC, en donde determinó que el porcentaje de recuperación para ciprofloxacino es de 100,53% y para la dexametasona es 100,27%, los cuales se encuentran dentro de los límites establecidos; además obtuvo un t_{exp} (1,555) $< t_{tabla}$ (2,776) para dexametasona y un t_{exp} (1,773) $< t_{tabla}$ (2,776) para el ciprofloxacino, concluyendo que la cantidad agregada de analito y la cantidad recuperada no son estadísticamente diferentes; por lo tanto la exactitud es correcta.

Pero como para la determinación de la exactitud se trabajó con tres niveles concentración (80%; 100% y 120%), en la tabla 02 se observa la aplicación del test de igualdad de varianzas (test estadístico de Cochran), para determinar si el factor concentración tiene alguna influencia en los resultados, donde debe cumplirse $G_{exp} < G_{tabla}$, para "k" grupos; "n" número de determinaciones por grupo y una probabilidad de cometer error de 95% ($\alpha=0,05$), obteniéndose lo siguiente G_{exp} (0,734) $< G_{tabla}$ (0,798), lo cual significa que las varianzas entre las tres concentraciones son equivalentes, es decir el factor concentración no influye en los resultados. Este resultado es refrendado por Velandia,¹⁰ en su trabajo de validación del método analítico para cuantificación de bacitracina, donde obtiene el valor de $G_{exp} = 0,682$ para bacitracina zinc y $G_{exp} = 0,790$ para bacitracinametilendisalicilato, los cuales son inferiores al $G_{tabla} = 0,871$ (para tres grupos con dos determinaciones y $\alpha=0,05\%$), concluyendo que no existe diferencia significativa entre las varianzas, por lo tanto se puede afirmar que nuestro método es exacto en base a los resultados obtenidos y corroborado frente a los investigadores mencionados.

En las Tablas 03 y 04, se aprecian los resultados para la determinación de la precisión del método. En la Tabla 03, se evidencia que el método tiene una buena repetibilidad, debido a que se obtuvo un promedio de recuperación de 100,441% (equivalente a 9,04mg/5ml), y un coeficiente de variación de 0,235%, siendo el valor máximo aceptado 2%, adicionalmente se estableció límites inferiores y superiores a partir de la recuperación

promedio y el valor de t_{tabla} (2,571), siendo los límites 98,957% y 101,925% respectivamente. Por lo tanto el método analítico es repetible.

En la Tabla 04, se observa los resultados de la precisión intermedia del método, donde se evidencia que el método es preciso, debido a que se obtuvieron los siguientes promedios de recuperación; 100,526% y 100,441% y un coeficiente de variación de 0,247%, siendo el valor máximo aceptado 2%. Por lo tanto podemos afirmar que el sistema es preciso por tener buena repetibilidad y que la técnica es precisa por ser reproducible frente al ensayo con dos analistas en diferentes días. Estos resultados son refrendados por Morales,¹¹ quien en su estudio determinó la precisión del sistema obteniendo una desviación estándar relativa de 0,58%, siendo el valor máximo 3,9%, demostrando la repetibilidad de los resultados; así como también determinó la precisión del método, obteniendo una desviación estándar relativa de 0,88% siendo el valor máximo 5,5% demostrando así la reproducibilidad de los resultados. Flores,⁸ en su trabajo de investigación reportó una desviación estándar relativa de 0,778% para el ensayo de repetibilidad con un criterio de aceptación no mayor al 2%, y una desviación estándar relativa de 0,622% para la reproducibilidad con un criterio de aceptación no mayor al 4% demostrando así que el método es reproducible y repetible. Así mismo Medina y Berrocal,¹² determinaron los valores de desviación estándar relativa de 0,17% para repetibilidad y 0,16% para la precisión intermedia, demostrando así la precisión del método analítico.

En la Tabla 05, podemos ver los resultados que se presentan al variar el flujo al 50% (0,6 ml/min) del valor de las condiciones cromatográficas normales para determinar la robustez del método, obteniéndose un coeficiente de variación de 0,239%, siendo el valor máximo permitido 2%, con lo cual se determinó que nuestro método es robusto frente a variaciones deliberadas como el flujo. Pero también se observó que cuando el flujo se disminuye a la mitad, el tiempo de retención se duplica, ya que al disminuir el flujo de la fase móvil, el analito es retenido con mayor facilidad dentro de la columna, debido a que se disminuye el paso de la fase móvil por el sistema y por consiguiente aumenta la interacción entre el analito y la capa de sílice que recubre la columna, aumentando así el tiempo de elución del analito.¹³

Velastegui,¹⁴ en su investigación donde valida el método analítico para la valoración de amoxicilina en polvo para suspensión oral, prueba la robustez del método aumentando el flujo en un 10% obteniendo una desviación estándar relativa del 1,5%, estableciendo como valor máximo permitido

3,69%. La Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI),⁵ menciona que la International Conference on Harmonization (ICH) y la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) definen la robustez junto con los parámetros de validación de un método analítico, aunque este parámetro no es considerado todavía un requisito necesario, sino que surgió con el fin de resolver los problemas que se plantean en la transferencia de métodos analíticos entre laboratorios.

En la Tabla 06, se muestra los resultados de la selectividad del método en el cual se compara los tiempos de retención para el estándar, la muestra, el placebo y los excipientes de la formulación, donde podemos evidenciar que el estándar tiene un tiempo de elución de 10,299 min y la muestra tiene un tiempo de elución de 10,576 min (figuras 02 y 04); pero para el caso del placebo y los excipientes no muestran señales en este tiempo de retención, cumpliendo el criterio de aceptación que menciona que ninguno de los excipientes debe eluir en el mismo tiempo de retención del estándar. Pero si observamos las figuras 03 y 04, de las corridas cromatográficas del placebo y la muestra se observan picos cromatográficos que tienen tiempos de elución en el rango de 1 - 4 minutos, las cuales corresponden al acesulfame potásico, esencia de tuttifrutí, metilparabeno y propilparabeno respectivamente (figura 05). Por tanto, podemos afirmar que el método es específico porque identifica los picos del estándar y el activo en tiempos de retención similares y es selectivo porque ninguno de los excipientes interfiere con el pico del activo. Este resultado puede ser refrendado por estudios como el de Medina y Berrocal,¹² donde se determina que el método estudiado es selectivo porque permite obtener picos cromatográficos de naproxeno sódico con tiempos de retención similares entre el estándar y la muestra, además el análisis cromatográfico del placebo demuestra que ninguno de los excipientes interfiere con el pico del principio activo.

Morales,¹¹ en su trabajo de investigación determinó que el método analítico estudiado es selectivo, porque los excipientes de la formulación no interfieren en la determinación del principio activo, así mismo muestra tiempos de retenciones similares para el estándar y la muestra (6,3 min).

Basándonos en los análisis estadísticos realizados a los diferentes parámetros podemos afirmar que el método analítico cumple con los parámetros de validación establecidos por la farmacopea vigente (USP 35 – NF 30), por ser un método lineal, exacto, preciso, selectivo y robusto, con lo cual establecemos evidencia documentada que permiten asegurar que el método analítico es confiable y se encuentra validado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Skoog D, Holle F, Nieman T. Principios de análisis instrumental. 5ª ed. España: McGraw – Hill Interamericana; 2001.
2. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación. 4ª ed. México: McGraw - Hill interamericana; 2006.
3. Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos de América. Farmacopea de los estados Unidos. Trigésima Quinta Revisión. Estados Unidos de America: United Book Press; 2012. P. 282-283; 967- 972. (USP 35 – NF 30; vol 1).
4. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Humans Use (ICH). Validation of analytical procedures text and methodology Q2(R1). [Internet]. 2005. [fecha de acceso 25 de julio de 2012] Disponible en:http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf
5. Aguirre L, García J, García T, Illera M, Juncadella M, Juncadella M, Lizondo M, Lluch A, Martín M, Mateos B, Ochoa C, Pujol M, Reig M, Torres M. Validación de métodos analíticos. A.E.F.I., Sección Catalana. Madrid; 2001.
6. Bellido N. Validación de método analítico por cromatografía líquida de alta resolución para determinación cuantitativa de ambroxol clorhidrato en jarabe [Tesis pregrado]. Ayacucho, Perú: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2007.
7. FDA. Guidance for industry process validation: general principles and practice. [Internet]. United States: department of health and human services FDA; January 2011, [fecha de acceso 21 de Julio de 2012]. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070336.pdf>
8. Flores Y. Desarrollo y validación de la técnica analítica por cromatografía líquida de alta eficiencia (H.P.L.C.) para la determinación de contenido de vitamina D₃colecalciferol en suspensión oral [Tesis pregrado]. Ayacucho, Perú: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2011.
9. Prado C. Desarrollo y validación de la técnica analítica por cromatografía líquida de alta eficiencia (H.P.L.C.) para la determinación de contenido de Ciprofloxacino 3mg/ml y Dexametasona 1mg/ml, en suspensión oftálmica. Lima [Tesis pregrado]. Ayacucho, Perú: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2008.
10. Velandia J. Validación del método analítico para la cuantificación de Bacitracina en el laboratorio de control de calidad de una industria farmacéutica veterinaria. [Tesis pregrado]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2008.
11. Morales C. Desarrollo y validación prospectiva de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta Performance HPLC para enalapril 10 mg tabletas recubiertas. [Tesis pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2004.
12. Medina J, Berrocal J. Validación de método analítico de valoración de naproxeno sódico 550mg tabletas por cromatografía líquida de alta Performance [Tesis pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2008.
13. Barquero M. Mecanismos y aplicaciones de la cromatografía líquida de alto desempeño. Costa Rica: Editorial de la universidad de Costa Rica; 2004.
14. Velastegui J. Validación del método analítico de valoración de Amoxicilina en polvo para suspensión oral producido por Betapharma S.A, mediante HPLC. [Tesis pregrado]. Riobamba – Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2011.