

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



Universidad de El Salvador
Hacia la libertad por la cultura

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA EVALUAR EL COMPORTAMIENTO DE
DISOLUCIÓN DE DICLOFENACO SUSPENSIÓN

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR
MARIANELA VÁSQUEZ SOSA

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA

SEPTIEMBRE DE 2007

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA



©2004, DERECHOS RESERVADOS

Prohibida la reproducción total o parcial de este documento,
sin la autorización escrita de la Universidad de El Salvador

<http://virtual.ues.edu.sv/>

SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Rectora

Dra. María Isabel Rodríguez

Secretaria General

Licda. Alicia Margarita Rivas de Recinos

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACIA

Decano

Lic. Salvador Castillo Arévalo

Secretaria

MSc. Miriam del Carmen Ramos de Aguilar

COMITÉ DE TRABAJOS DE GRADUACIÓN

Coordinadora General

Licda. Maria Concepción Odette Rauda Acevedo

Asesoras de Área de Control de Calidad de Productos Farmacéuticos,
Cosméticos y Veterinarios

MSc. Rocío Ruano de Sandoval

Lic. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez

Docente Director

Licda. Consuelo Isabel Molina Recinos

AGRADECIMIENTOS

A Dios todopoderoso por haberme dado la capacidad para poder finalizar mis estudios universitarios y por haberme ayudado a no darme por vencida en los momentos más difíciles de la realización de este trabajo.

A mi familia por todo el cariño y apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida y mi formación profesional.

A la Lic. Concepción Marina Vidaurre por haberme dado la oportunidad y confianza de llevar a cabo este trabajo.

A Corporación Bonima S.A. de C.V. por haberme brindado todos los medios para poder realizar mi trabajo de graduación.

A mi docente director Lic. Consuelo Isabel Molina Recinos por su colaboración incondicional en el desarrollo de este trabajo.

A mi segundo analista Lic. Enrique Posada por haber brindado su tiempo y colaboración en este trabajo.

A los docentes y personal de laboratorio de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, así como también a mis amigos por haber sido una parte fundamental dentro de mi formación académica.

DEDICATORIA

A Dios, por darme sabiduría y fortaleza para lograr culminar con éxito mi carrera.

A mis padres Lucy y Eduardo por haberme brindado su apoyo a lo largo de mi formación académica.

A mi hermanita Celia Teresa, a quién espero este sea un ejemplo para perseverar en sus estudios y algún día se convierta en una profesional al servicio de quienes lo necesitan en cualquier área que se desempeñe.

A mi amado esposo Taher, quien ha sido una fuente de apoyo para llevar a término este trabajo, dándome ánimos para no desfallecer a pesar de las adversidades en este largo camino de la vida.

A mis compañeras pero sobretodo amigas Silvia, Lorena, Wendy, Paty, Sofia, Cristina, Rosalina por todos esos momentos de apoyo no solo académico sino también espiritual para superar los obstáculos y pruebas que nos pone la vida.

A todos los que de una manera u otra me apoyaron y estuvieron conmigo para no darme por vencida.

INDICE

Resumen

Capítulo I

1.0 Introducción xix

Capítulo II

2.0 Objetivos 23

2.1 Objetivo General 23

2.2 Objetivos Específicos 23

Capítulo III

3.0 Marco Teórico 25

3.1 Características del Diclofenaco 25

3.2 Resinas de Intercambio Iónico 32

 3.2.1 Resinas de Intercambio Iónico 32

 3.2.2 Diclofenaco Resinato 33

3.3 Aspectos Teóricos de Validación 34

 3.3.1 Validación 34

 3.3.2 Características de Desempeño Analítico 35

3.3.3 Datos Requeridos para la Validación
 de los Análisis 48

3.4 Aspectos Teóricos de la Prueba de Disolución	51
3.5 Perfiles de Disolución	64
3.6 Aspectos Teóricos de Cromatografía de Líquidos de Alta Presión	70
Capítulo IV	
4.0 Diseño Metodológico	81
4.1 Tipo de Estudio	81
4.2 Investigación Bibliográfica	81
4.3 Investigación de Campo	81
4.4 Parte Experimental	82
4.4.1 Primera Etapa de la Parte Experimental:	
Condiciones de Disolución	83
4.1.1.1 Medio de Disolución	83
4.1.1.2 Velocidad de Agitación	86
4.1.1.3 Tiempo de Disolución	87
4.1.1.4 Volumen del Medio de Disolución	87
4.4.2 Segunda Etapa de la Parte Experimental:	
Sistema Cromatográfico	88

4.4.3	Tercera Etapa de la Parte Experimental: Validación de la Metodología Analítica Propuesta	89
4.4.3.1	Metodología Analítica de Disolución Propuesta para Diclofenaco Suspensión (Diclofenaco 9 mg/5 mL)	89
4.4.3.2	Esquema de Validación	96
4.4.4	Cuarta Etapa de la Parte Experimental: Comparación de Perfiles Innovador vrs Genérico	101
 Capítulo V		
5.0	Resultados y Análisis de Resultados	103
5.1	Primera Etapa de la Parte Experimental:	
	Condiciones de Disolución	103
5.1.1	Medio de Disolución	103
5.1.2	Velocidad de Agitación	106
5.2	Segunda Etapa de la Parte Experimental:	
	Sistema Cromatográfico	108
5.3	Tercera Etapa de la Parte Experimental:	
	Validación de la Metodología Analítica Propuesta	109

5.4 Cuarta Etapa de la Parte Experimental:	
Comparación de Perfiles Innovador vrs Genérico	124
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	131
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	134
Bibliografía	
Anexos	

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

1. Tabla de Significación "r"
2. Tabla "t" de Student
3. Tabla F de Fisher
4. Tabla G de Cochran para Homogeneidad de Varianzas
5. Cálculos Linealidad
6. Cálculos Recobro
7. Cálculos Repetibilidad
8. Cálculos Reproducibilidad
9. Cálculos Comparación de Perfiles de Disolución Innovador vrs Genérico
10. Apartado <1092> Procedimiento de Disolución: Desarrollo y Validación
11. Relleno de las Columnas Usadas en Cromatografía Líquida de Alta Resolución
12. Cromatograma del Estándar de Diclofenaco Sódico
13. Cromatograma de la Muestra
14. Cromatograma Fase Móvil
15. Cromatograma Lauril Sulfato de Sodio 2%

INDICE DE CUADROS

Cuadro N° 1

1. Esquema de Validación
2. Dictamen de Validación
3. Comparación de Perfiles Innovador vrs Genérico

INDICE DE FIGURAS

Figura N°

1. Fórmula Estructural Diclofenaco Ácido
2. Fórmula Estructural Diclofenaco Sódico
3. Espectro de Absorción UV Diclofenaco Sódico
4. Espectro de Absorción Infrarrojo Diclofenaco Sódico
5. Espectro de Masas Diclofenaco Sódico
6. Perfil de pH del Diclofenaco Resinato a 273 nm y 275 nm
7. Representación Gráfica Linealidad 1
8. Representación Gráfica Linealidad 2
9. Similitud de Perfiles en la Reproducibilidad
10. Similitud de Perfiles Innovador vrs Genérico

INDICE DE TABLAS

Tabla N°

1. Datos Requeridos para Ensayos de Validación según USP
2. Datos Requeridos para Ensayos de Validación según ICH
3. Criterios de Aceptación
4. Lecturas de Absorbancias en Diversos Medios de Disolución a 273 nm
5. Lecturas de Absorbancias en Diversos Medios de Disolución a 275 nm
6. Perfil de pH del Diclofenaco Resinato a 273 y 275 nm
7. Resultados de Disolución empleando 50 RPM
8. Resultados de Disolución empleando 60 RPM y 75 RPM en Lauril Sulfato de Sodio 2%
9. Áreas del Estándar (Fase Móvil-Fase Móvil)
10. Resultados Linealidad 1
11. Áreas del Estándar (Fase Móvil-Lauril Sulfato de Sodio 2%)
12. Resultados Linealidad 2
13. Áreas de Estándares del Recobro 75 RPM
14. Áreas de Muestras del Recobro 75 RPM
15. Resultados Recobro 75 RPM
16. Áreas de Estándares del Recobro 100 RPM
17. Áreas de Muestras del Recobro 100 RPM
18. Resultados Recobro y Linealidad del Método
19. Resultados Precisión

20. Resultados Repetibilidad del Método
21. Áreas y Tiempos de Retención de Estándar 100%
22. Factor de Diferencia en la Reproducibilidad
23. Factor de Similitud en la Reproducibilidad
24. Similitud de Perfiles en la Reproducibilidad
25. Factor de Diferencia en la Comparación de Perfiles Innovador vrs Genérico
26. Factor de Similitud en la Comparación de Perfiles Innovador vrs Genérico
27. Similitud de Perfiles Innovador vrs Genérico
28. Cálculos de los Resultados de la Tabla N° 9
29. Cálculos de los Factores de Respuesta 1
30. Cálculos de los Resultados de la Tabla N° 11
31. Cálculos de los Factores de Respuesta 2
32. Cálculos Recobro 75 RPM
33. Cálculos Test de Student del Recobro 75 RPM
34. Cálculos Recobro 100 RPM
35. Cálculos Test de Student del Recobro 100 RPM
36. Cálculos de la Linealidad del Método
37. Cálculos de los Factores de Respuesta de la Linealidad de Método
38. Cálculos Factor de Similitud en la Reproducibilidad
39. Cálculos Factor de Similitud en la Comparación de Perfiles de Disolución

ABREVIATURAS

AINES	Analgésico Anti-inflamatorio Sintético no Esteroidal
AOAC	Asociación Americana de Químicos Analíticos Oficiales
°C	Grado Celsius
cm	Centímetros
CR	Grado Reactivo
DA	Diclofenaco Ácido
DR	Diclofenaco Resinato
FDA	Food and Drug Administration (Administración de Drogas y Alimentos)
FM	Fase Móvil
g/mL	Gramo por mililitro
g/mol	Gramo por mol
HCl	Ácido Clorhídrico
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
ICH	Confederación Internacional de Armonización
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
L/Kg	Litro por kilogramo
LSS 0.5%	Lauril Sulfato de Sodio al 0.5%

LSS 1%	Lauril Sulfato de Sodio al 1%
LSS 2%	Lauril Sulfato de Sodio al 2%
mg	Miligramos
mg/Kg	Miligramo por kilogramo
mg/mL	Miligramo por mililitro
mg/L	Miligramo por litro
min	Minutos
mL	Milímetros
mL/min	Mililitro por minuto
mm	milímetros
NaOH	Hidróxido de Sodio
Nm	Nanómetros
PM	Peso Molecular
RII	Resinas de Intercambio Iónico
RPM	Revoluciones por minuto
RSD	Desviación Estándar Relativa
µm	Micrómetros
µL	Microlitros
µg/L	Microgramo por litro
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Ultravioleta-Visible

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la Validación de la Metodología de Análisis de Disolución para Diclofenaco Suspensión empleándose la Cromatografía Líquida de Alta Presión como Técnica Analítica.

Fue necesario llevar a cabo esta validación ya que en la actualidad no se cuenta con una metodología analítica oficial y debido a la importancia de este producto desde el punto de vista farmacológico nos vimos en la necesidad de realizar este trabajo de investigación.

Esta Validación se desarrolló según los parámetros exigidos por la USP 29 y la ICH, Aplicándose cálculos estadísticos para comprobar la Linealidad e Intervalo, Precisión (repetibilidad, reproducibilidad) y Exactitud de la Metodología Validada Se hizo uso de diferentes fuentes bibliográficas para los límites de aceptación de cada una de las pruebas antes mencionadas.

Es de importancia mencionar que una validación no solamente lleva implícitos los análisis realizados, sino todo un protocolo y la documentación involucrada que sirve como guía para la realización de la misma, la cual además nos proporciona una evidencia de que el método funciona con todas las características para el cual ha sido diseñado. Por lo que se recomienda que toda metodología analítica nueva usada para analizar materias primas y productos terminados sea validada y así asegurar los resultados de los mismos.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

1.0 INTRODUCCIÓN

Durante años la Farmacopea Estadounidense ha apoyado a la Industria Farmacéutica con metodologías analíticas validadas las cuales están destinadas a los análisis de materias primas y productos terminados.

Todo desarrollo de un método analítico implica inversión de tiempo y material, pero sus ventajas son mayores al validarse dicha metodología ya que se disminuye el número de fallas y la probabilidad de repetir los análisis. Proporcionando además un alto grado de confianza y seguridad en el método analítico y en la calidad de los resultados que se obtengan.

El presente trabajo presenta la Validación para la Prueba de Disolución del Producto Diclofenaco Suspensión el cual está apoyado en los apartados <711> "Disolución", <1225> "Validación de Métodos Farmacopeicos" pertenecientes a la Farmacopea de los Estados Unidos en su edición 29 y en el apartado <1092> "Desarrollo y Validación de la prueba de Disolución" que aparece en el Foro Farmacopeico.

Se cuenta con Monografías Oficiales presentadas por la Farmacopea de los Estados Unidos edición 29, las cuales plantean una metodología analítica de disolución para los siguientes productos: Suspensión Oral de Ibuprofeno,

Suspensión Oral de Indometacina, Suspensión Oral de Acetato de Megestrol y Suspensión Oral de Fenitoína.

Debido a que el producto Diclofenaco Suspensión no es un producto oficial, se hizo necesario contar con una metodología debidamente validada para darle confiabilidad a los análisis de Disolución. Dejando debidamente documentadas todas las etapas para que esta investigación pueda servir de base a otros laboratorios que pudieran necesitar esta metodología analítica ó bien como una referencia para futuras investigaciones.

Como parte del desarrollo analítico se pretendió establecer dos aspectos importantes: Condiciones de disolución y Sistema Cromatográfico. Las condiciones de disolución abarcaron Revoluciones por minuto, Volumen, Medio y Tiempo de Disolución. Mientras que el Sistema Cromatográfico incluyó: Fase estacionaria, Fase móvil, Flujo, Volumen de inyección, Temperatura del horno, Tipo de detector. Para determinar aspectos importantes del Sistema Cromatográfico se tomó como base la monografía oficial para las tabletas de Diclofenaco Sódico que aparece en la Farmacopea de los Estados Unidos en su edición 29.

Para la validación se determinaron los parámetros Linealidad, Precisión, Exactitud del método analítico el cual una vez validado se aplicó un producto genérico como al innovador.

Esta investigación se realizó empleando como técnica analítica la Cromatografía Líquida de Alta Resolución debido a su sensibilidad y fácil adaptación a la determinación de parámetros cuantitativos exactos.



CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Validar un método para evaluar el comportamiento de disolución de Diclofenaco Suspensión.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Desarrollar el método de cuantificación y establecer los parámetros de disolución apropiados para Diclofenaco Suspensión.

2.2.2 Realizar la validación al método demostrando los parámetros Linealidad e Intervalo (rango), Precisión (repetibilidad, reproducibilidad) y Exactitud.

2.2.3 Aplicar el método validado tanto al producto Diclofenaco Suspensión genérico como al innovador.

2.2.4 Interpretar el comportamiento de disolución de Diclofenaco Suspensión genérico con el producto innovador mediante Perfiles de Disolución haciendo uso del factor de similitud.

CAPÍTULO III
MARCO TEÓRICO

3.0 MARCO TEORICO

A continuación se presenta la teoría base para poder realizar la presente investigación, la cual puede servir útil para estudios posteriores.

3.1 CARACTERÍSTICAS DEL DICLOFENACO ⁽¹⁰⁾

El diclofenaco sódico es un compuesto analgésico anti-inflamatorio sintético no esteroidal, derivado del ácido fenilacético.

FORMULA ESTRUCTURAL:

Diclofenaco Ácido

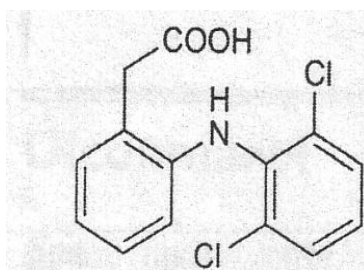


Fig. N° 1 ⁽¹⁰⁾ FÓRMULA ESTRUCTURAL DICLOFENACO ÁCIDO

Diclofenaco Sódico

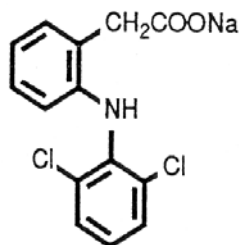


Fig. N° 2 ⁽¹⁾ FÓRMULA ESTRUCTURAL DICLOFENACO SÓDICO

NOMBRE GENÉRICO: Diclofenaco

FORMULA QUÍMICA:

Diclofenaco Ácido	$C_{14}H_{10}Cl_2NO_2$
Diclofenaco Sódico	$C_{14}H_{10}Cl_2NO_2Na$

PESO MOLECULAR:

Diclofenaco Ácido	296,2
Diclofenaco Sódico	318,1

DESCRIPCIÓN: Polvo cristalino blanco, higroscópico y sin olor.

SOLUBILIDAD: Librementemente soluble en metanol, soluble en etanol, parcialmente soluble en agua, prácticamente insoluble en cloroformo y éter.

PUNTO DE FUSIÓN:

Diclofenaco Ácido	156° a 158°
Diclofenaco Sódico	283° a 285°

ESPECTRO ULTRAVIOLETA (Fig. Nº 3): Ácido acuoso a 273 nm (A=309b); alcalino acuoso a 275 nm (A=351b).

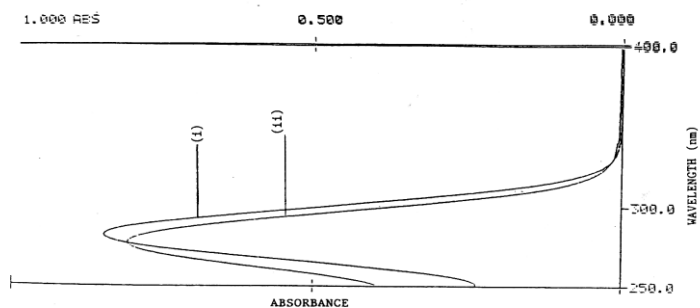


Fig. N° 3 (1) ESPECTRO DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA DEL DICLOFENACO SÓDICO EN METANOL (I), EN BUFFER FOSFATO (PH 7,2) (II) B=1 CM C= 7.86 X 10-6 M

ESPECTRO INFRAROJO (Fig. N° 4): Picos principales en las siguientes longitudes de onda 1572, 756, 1504, 775, 1286, 1308 cm^{-1} .

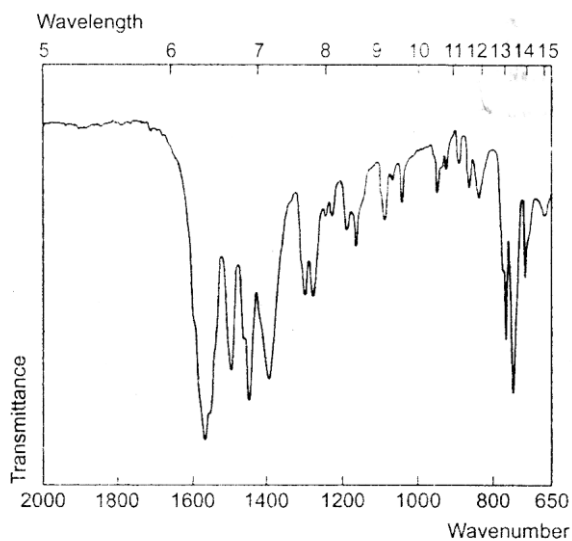


Fig. N° 4 (10) ESPECTRO INFRARROJO DICLOFENACO SÓDICO

ESPECTRO DE MASAS (Fig. Nº 5): Picos principales en m/z 214, 216, 242, 295, 215, 297, 179, 178.

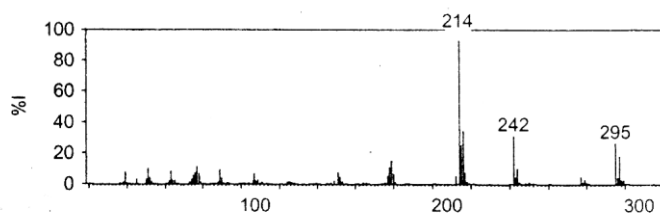


Fig. Nº 5 (10) ESPECTRO DE MASAS DICLOFENACO SÓDICO

CUANTIFICACIÓN: Cromatografía líquida de alta resolución, en plasma el límite de detección es de $3\mu\text{g/L}$ utilizando un detector UV, $6\mu\text{g/L}$ utilizando un detector fluorescente.

DISPOSICIÓN EN EL CUERPO: Es bien absorbido después de ser administrado oralmente pero sufre significativamente metabolismo de primer paso. Arriba del 70% de la dosis es excretada en la orina a los 3 días, incluyendo del 20 al 40% como glucorónido y sulfatos conjugados (4'-hidroxiclofenaco como el mayor metabolito) y arriba del 15% como conjugados de diclofenaco que no han sufrido cambio alguno.

Otros metabolitos identificados en la orina incluyen el 5-hidroxiclofenaco (cerca del 12% de la dosis), 3'-hidroxiclofenaco y 4',5-hidroxiclofenaco.

Cerca del 10 al 20% de la dosis es excretada en la bilis como 4'-hidroxiclofenaco y menos del 5% de la dosis no sufre cambio alguno.

Diclofenaco entra al fluido sinovial y sus máximas concentraciones son medidas 2 a 4 horas después que se alcanzan los niveles de concentración máxima.

Es excretado en leche materna pero en cantidades tan pequeñas que no se esperan efectos adversos en los lactantes.

CONCENTRACIÓN TERAPEUTICA: Después de la administración oral de diclofenaco sódico 50 mg 3 veces al día a 4 sujetos se reportaron concentraciones plasmáticas de 0,1 a 2,2 mg/L de diclofenaco y 0,3 a 2,0 mg/L de 4'-hidroxiciclofenaco 3 horas después de la dosis; se lograron concentraciones máximas de 0,1 a 0,6 mg/L de diclofenaco y 0,2 a 1,0 mg/L de 4'-hidroxiciclofenaco a las 3 horas en el fluido sinovial; concentraciones en el fluido sinovial sobrepasan aquellas en plasma después de las 4 horas.

Diclofenaco fue administrada como dosis oral de 150 mg a pacientes saludables (n=6) y a pacientes con hepatitis crónica (n=6) o cirrosis alcohólica (n=6). Las concentraciones plasmáticas máximas observadas en los pacientes sanos de diclofenaco, 3'-hidroxiciclofenaco, 4'-hidroxiciclofenaco y 3',4',5-metoxiciclofenaco fueron de 5,699, 0,412, 0,2613 y 0,385 mg/L las cuales se lograron a 0,63, 0,79, 0,88 y 5,8 horas respectivamente.

Los valores en pacientes con hepatitis fueron 6,574, 0,392, 2,786 y 0,306 mg/L a 0,42, 0,58, 0,50, y 4,0 horas y en pacientes con cirrosis fueron 11,59, 0,264, 2,481 y 0,191 mg/L a 0,33, 1,04, 0,75 y 7,0 horas.

En 20 sujetos sanos a los cuales se les administró una dosis oral de diclofenaco de 100 mg en 2 diferentes tabletas de liberación sostenida se alcanzaron concentraciones máximas de 1,161 y 0,799 mg/L las cuales se lograron a las 4,2 y 4,5 horas respectivamente.

TOXICIDAD: El mayor efecto de los AINES son irritación gástrica y úlcera debido a la inhibición de ciclooxigenasa. La ciclooxigenasa PGE2 tiene un efecto citoprotector en la mucosa gástrica inhibiendo la secreción gástrica y ayudando a mantener la barrera mucosa gástrica. En estudios de toxicidad de diclofenaco sódico se encontró que causa lesiones gástricas en dosis bajas (12 mg/Kg) comparadas a AINES como fenilbutazona y oxifenbutazona 620 mg/Kg.

Estudios de toxicidad crónica en períodos mayores de 26 semanas (en dosis de 5, 15, 75 mg/Kg) en mono rhesus produjeron evidencia de lesiones gástricas únicamente en la dosis máxima (75 mg/Kg).

BIODISPONIBILIDAD: Cerca del 50 al 60%.

VIDA MEDIA: Vida media en el plasma de 1 a 2 horas; Vida media en el fluido sinovial de 3 a 6 horas.

VOLUMEN DE DISTRIBUCIÓN: 0,17 L/Kg.

ELIMINACIÓN: Eliminación en el plasma cerca de 4 mL/min/Kg.

UNION A PROTEINAS PLASMÁTICAS: En plasma es mayor del 99%.

DOSIS: De 75 a 150 mg de diclofenaco sódico en dosis divididas.

3.2 RESINAS DE INTERCAMBIO IONICO ⁽¹⁶⁾

Considerando que en la formulación del producto genérico y el producto innovador el principio activo se encuentra como Diclofenaco Resinato es necesario una breve introducción sobre Resinas de Intercambio Iónico y la Resina del Diclofenaco Resinato.

3.2.1 RESINAS DE INTERCAMBIO IONICO

Las resinas de intercambio iónico (RII) han sido utilizadas en distintos campos de la tecnología farmacéutica siendo una de las aplicaciones más importantes el empleo de estas como matrices para prolongar la liberación de los fármacos de administración oral, ya que el tracto gastrointestinal enfrenta los resينات a un medio rico en iones como lo son los jugos gastrointestinales. Pudiéndose mencionar algunos fármacos que han aparecido informados en combinación con RII: Claritromicina, Clorfeniramina, Dextrometorfan Diclofenaco, Eritromicina, Ranitidina, Salbutamol y otros más.

Entre las propiedades de las resinas tenemos: son insolubles en agua, de naturaleza polimérica, contienen grupos ionizados (aniones o cationes) en forma repetitiva a lo largo de la cadena que las forman. Estos grupos tienen su carga neutralizada por iones de signo contrario (contraiones) que pueden ser intercambiados de manera estequiométrica por otros iones de igual signo al ponerse en contacto con una solución de electrólitos. Las resinas

intercambiadoras de cationes se denominan catiónicas y las de aniones, aniónicas.

Las RII se clasifican en débiles o fuertes, según la naturaleza química de los grupos ionizables. Las catiónicas débiles presentan grupos carboxílicos solo ionizables a valores altos de pH, las catiónicas fuertes presentan grupos sulfónicos ionizados incluso a bajos valores de pH. Las aniónicas débiles contienen grupos amino primarios, secundarios o terciarios de escaso poder intercambiador y las aniónicas fuertes poseen grupos de amonio cuaternario ionizados a cualquier valor de pH.

3.2.2 DICLOFENACO RESINATO

Nombre comercial: Diclofenaco Resinato

Nombre químico: [2-(2,6-dicloroanilino)fenil] acético Resinato

Fórmula: $[C_{14}H_{10}Cl_2NO_2]^-_m$ [Resina aniónica] ^+_m

Composición: No menos de 50% como diclofenaco ácido unido a un copolímero estireno divinil benceno con grupos amonio.

Familia Química: Diclorofenilaminofenilacético.

Solubilidad: Insoluble en agua y metanol.

Aspecto: polvo higroscópico color crema a amarillo.

3.3 ASPECTOS TEÓRICOS DE VALIDACIÓN ⁽¹²⁾

3.3.1 VALIDACIÓN

La validación de un método analítico es el proceso que establece mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. Las características habituales que deben considerarse en la validación de los tipos de métodos descritos más adelante son:

Exactitud

Precisión

Especificidad

Límite de detección

Límite de cuantificación

Linealidad

Intervalo

En el caso de métodos farmacopeicos, puede resultar necesaria una nueva validación en las siguientes circunstancias: presentación a la USP de un método analítico revisado o utilización de un método general establecido con un nuevo producto o materia prima.

Los documentos de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) aconsejan sobre la necesidad de realizar una nueva validación en las siguientes circunstancias: cambios en la síntesis del fármaco, cambios en la composición del producto farmacéutico y cambios en el procedimiento analítico.

3.3.2 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO

EXACTITUD

Definición – La exactitud de un método analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese método. La exactitud de un método analítico debe establecerse en todo su intervalo.

Determinación – En la valoración de un fármaco, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del método analítico con respecto a un analito de pureza conocida (por ejemplo, un Estándar de Referencia), o comparando los resultados del método con los de un segundo método bien caracterizado, cuya exactitud se haya comprobado o definido.

En la valoración de un fármaco en un producto formulado, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del método analítico a mezclas sintéticas de los componentes del producto farmacéutico al que se hayan añadido cantidades conocidas de analito dentro del intervalo del método. Sino resulta posible obtener muestras de todos los componentes del producto farmacéutico, se puede aceptar tanto el agregado de cantidades conocidas del analito al producto farmacéutico como la comparación de los resultados con los de un segundo método bien caracterizado, cuya exactitud haya sido comprobada o definida.

En el análisis cuantitativo de impurezas, la exactitud debe evaluarse en muestras (del fármaco o del producto farmacéutico) a las que se hayan agregado cantidades conocidas de impurezas. Cuando no sea posible obtener

muestras de algunas impurezas o productos de degradación, los resultados deben compararse con los obtenidos mediante un método independiente. En ausencia de otra información, puede resultar necesario calcular la cantidad de una impureza basándose en la comparación de su respuesta con la del fármaco; pero el cociente entre las respuestas de cantidades iguales de la impureza y del fármaco (factor de respuesta) debe ser utilizado siempre que se le conozca.

La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de analito añadida a la muestra, o como la diferencia entre la media de la valoración y el valor verdadero aceptado, considerando los intervalos de confianza.

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

PRECISIÓN

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

La precisión de un método analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación)

de una serie de mediciones. La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad del método analítico en condiciones normales de operación. En este contexto, la reproducibilidad se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios, como por ejemplo en un estudio de colaboración. Una precisión intermedia expresa la variación dentro de un laboratorio, por ejemplo en diferentes días, con diferentes analistas o con equipo diferente dentro del mismo laboratorio. La repetibilidad se refiere a la utilización del procedimiento analítico en un laboratorio durante un período de tiempo corto realizado por el mismo analista con el mismo equipo. En la mayoría de los casos, la repetibilidad es el criterio de mayor interés en los procedimientos analíticos de la USP, aunque la reproducibilidad entre laboratorios o la precisión intermedia puede considerarse durante la normalización de un procedimiento antes de presentarlo a la farmacopea.

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

Los documentos ICH recomiendan que se evalúe la repetibilidad utilizando un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado para el procedimiento (es decir tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración, o un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración de prueba).

ESPECIFICIDAD

Definición – Los documentos de ICH definen especificidad como la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz. La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual puede compensarse usando otros procedimientos analíticos complementarios. [Nota – Otras autoridades internacionales de reconocido prestigio como la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) y la Asociación Americana de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) han preferido el término "selectividad" conservando "especificidad" para procedimientos que resulten completamente selectivos]. Para los métodos de prueba o valoración que se indican a continuación, la definición anterior tiene las siguientes consecuencias:

PRUEBAS DE IDENTIFICACION – garantizan la identidad del analito.

PRUEBAS DE PUREZA – garantizan que todos los procedimientos analíticos efectuados permiten declarar con exactitud el contenido de impurezas de un

analito (por ejemplo, prueba de sustancias relacionadas, límite de metales pesados, límite de impurezas volátiles orgánicas).

VALORACIONES – proporcionan un resultado exacto, que permita una declaración exacta del contenido o potencia del analito en una muestra.

Determinación - En análisis cualitativos (pruebas de identificación), debe demostrarse la capacidad de distinguir compuestos de estructura estrechamente relacionada cuya presencia resulta probable. Esta capacidad debería confirmarse mediante la obtención de resultados positivos a partir de muestras que contengan el analito quizás mediante comparación con un material de referencia conocido), junto con resultados negativos de muestras que no contengan dicho analito, y mediante la confirmación de que no se obtiene una respuesta positiva de materiales con estructura similar o estrechamente relacionada a la del analito.

En un procedimiento analítico para impurezas, la especificidad puede establecerse mediante la adición al fármaco o producto farmacéutico de una cantidad conocida de impurezas en concentraciones adecuadas, y la demostración de que esas impurezas se determinan con exactitud y precisión adecuada.

En una valoración, la demostración de especificidad requiere evidencia de que el procedimiento no resulta afectado por la presencia de impurezas o excipientes. En la práctica, esto puede hacerse agregando al fármaco o

producto farmacéutico una cantidad conocida de excipientes o de impurezas en concentraciones adecuadas, y demostrando que el resultado del análisis no resulta afectado por la presencia de estos materiales extraños.

Si no se dispone de estándares de impureza o de los productos de degradación, puede demostrarse la especificidad comparando los resultados de las pruebas de muestras que contengan impurezas o productos de degradación con los de un segundo procedimiento bien caracterizado (por ejemplo, un procedimiento farmacopeico u otro procedimiento validado). Estas comparaciones deberían incluir muestras sometidas a condiciones forzadas relevantes (por ejemplo, luz, calor, humedad, hidrólisis ácida y alcalina, oxidación). En una valoración, deben compararse los resultados; en pruebas de impureza cromatográfica, deben compararse los perfiles de impurezas.

Los documentos de ICH afirman que cuando se utilizan los procedimientos cromatográficos, deberán presentarse cromatogramas representativos para demostrar el grado de selectividad y los picos deberán identificarse adecuadamente. Las pruebas de pureza de picos (por ejemplo, utilizando redes de diodos o espectrometría de masa) pueden resultar útiles para demostrar que el pico cromatográfico del analito no puede atribuirse más que un solo componente.

LIMITE DE DETECCIÓN

Definición – El límite de detección es una característica de las pruebas de límite. Es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede detectarse, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas. Las pruebas de límite simplemente comprueban que la cantidad de analito se encuentra por encima o por debajo de un nivel determinado. El límite de detección se expresa habitualmente en forma de concentración de analito (por ejemplo, porcentaje, partes por millón) en la muestra.

Determinación – Para métodos no instrumentales, el límite de detección se determina generalmente mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo el nivel mínimo del analito que puede detectarse confiablemente.

Para procedimientos instrumentales, se puede utilizar el mismo método que para los no instrumentales. En el caso de métodos presentados como candidatos a métodos farmacopeicos oficiales, casi nunca es necesario determinar el límite de detección real. Por el contrario, debe demostrarse que el límite de detección es lo suficientemente bajo para el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito superiores e inferiores al nivel de detección requerido. Por ejemplo, si se requiere detectar una impureza con una concentración del 0,1% debería demostrarse que el procedimiento detectará de modo confiable la impureza a esa concentración.

En el caso de procedimientos analíticos instrumentales que presentan ruido de fondo, los documentos de ICH describen un enfoque usual, que consiste en comparar las señales medidas a partir de muestras con bajas concentraciones de analitos con las de muestras de blanco. Se establece la concentración mínima a la que puede detectarse confiablemente un analito. Las relaciones señal-ruido habitualmente aceptables son de 2:1 ó 3:1. Otros enfoques dependen de la determinación de la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de las respuestas. Independientemente del método utilizado, el límite de detección debería validarse posteriormente mediante el análisis de un número adecuado de muestras preparadas al límite de detección o que se sabe que están cerca de dicho límite.

LIMITE DE CUANTIFICACIÓN

Definición – 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, como por ejemplo: impurezas en fármacos a granel y productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas. El límite de cuantificación se expresa habitualmente en forma de concentración de analito (por ejemplo, porcentaje, partes por millón) en la muestra.

Determinación – Para métodos no instrumentales, el límite de cuantificación se determina habitualmente mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo el nivel mínimo del analito que se puede determinar con exactitud y precisión aceptables.

Para procedimientos instrumentales, se puede utilizar el mismo método que para los no instrumentales. En el caso de métodos presentados como candidatos a métodos farmacopeicos oficiales, casi nunca resulta necesario determinar el límite de cuantificación real. Por el contrario, debe mostrarse que el límite de cuantificación es lo suficientemente bajo mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito superiores e inferiores al nivel de cuantificación requerido. Por ejemplo, si se requiere analizar un analito a una concentración de 0,1 mg por tableta, debería demostrarse que el procedimiento cuantificará de modo confiable el analito a esa concentración.

En el caso de procedimientos analíticos instrumentales que presentan ruido de fondo, los documentos ICH describen un enfoque común, que consiste en comparar las señales medidas a partir de muestras con bajas concentraciones conocidas de analito con las de muestras blanco. Se establece la concentración mínima a la que puede cuantificarse confiablemente un analito. Una relación señal-ruido habitualmente aceptable es de 10:1. Otros enfoques dependen de la determinación de la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de las respuestas. Independientemente del método utilizado, el límite de cuantificación debería validarse posteriormente mediante el análisis de un

número adecuado de muestras que se sepa que están cerca del límite de cuantificación o fueron preparadas a este límite.

LINEALIDAD E INTERVALO

Definición de Linealidad – La linealidad de un método analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado.

Definición de Intervalo – El intervalo de un método analítico es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior de analito (incluyendo esos analitos) en la cual se puede determinar el analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el método según se describe por escrito.

El intervalo se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados de la prueba (por ejemplo, porcentaje, partes por millón) obtenidos mediante el método analítico.

Determinación de Linealidad e Intervalo - La linealidad debe establecerse en el intervalo completo del procedimiento analítico. Debería establecerse inicialmente mediante examen visual de un gráfico de señales como función de concentración de analito del contenido. Si parece existir una relación lineal, los resultados de la prueba deberían establecerse mediante métodos estadísticos

adecuados (por ejemplo, mediante el cálculo de una línea de regresión por el método de los cuadrados mínimos). En algunos casos, para obtener la linealidad entre la respuesta de un analito y su concentración, puede que haya que someter los datos de la prueba a una transformación matemática. Los datos obtenidos a partir de la línea de regresión pueden ser útiles para proporcionar estimaciones matemáticas del grado de linealidad. Se deberían presentar el coeficiente de correlación, la intersección con el eje de ordenadas, la pendiente de la línea de regresión y la suma de los cuadrados residuales.

El intervalo del método se valida verificando que el método analítico proporciona precisión, exactitud y linealidad aceptables cuando se aplica a muestras que contienen el analito en los extremos del intervalo, al igual que dentro del intervalo.

La ICH recomienda que, para establecer la linealidad, se utilicen normalmente un mínimo de cinco concentraciones. También recomienda que se consideren los intervalos especificados mínimos que se indican a continuación:

VALORACION DE UN FÁRMACO (o de un producto terminado): de 80% a 120% de la concentración de prueba.

DETERMINACION DE UNA IMPUREZA: de 50% a 120% de la especificación.

PARA UNIFORMIDAD DE CONTENIDO: un mínimo de 70% a 130% de la concentración de prueba, a no ser que se justifique un intervalo más amplio o más apropiado, basándose en la naturaleza de la forma farmacéutica (por ejemplo, inhaladores de dosis fija).

PARA PRUEBAS DE DISOLUCIÓN: $\pm 20\%$ por encima del intervalo especificado (por ejemplo, si las especificaciones de un producto de liberación controlada cubren una región que varía de 20% después de 1 hora a 90% después de 24 horas, el intervalo validado sería de 0% a 110% del valor especificado en la etiqueta).

TOLERANCIA (FORTALEZA O RESISTENCIA)

Definición - La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados de las pruebas obtenidos mediante el análisis de las mismas muestras en diversas condiciones, como por ejemplo en diferentes laboratorios, con diferentes analistas, instrumentos, lotes de reactivos, tiempo transcurrido durante la valoración, temperaturas de valoración o días. La tolerancia se expresa normalmente como la carencia de influencia de las variables operativas y ambientales del método analítico sobre los resultados de las pruebas. La tolerancia es una medida de la reproducibilidad de los resultados de las pruebas sometidas a la variación de condiciones que se esperarían normalmente entre distintos laboratorios o distintos analistas.

Determinación – La tolerancia de un método analítico se determina mediante el análisis de alícuotas de lotes homogéneos en diferentes laboratorios, por diferentes analistas, utilizando condiciones operativas y ambientales que pueden ser diferentes pero que continúan encontrándose dentro de los

parámetros especificados del análisis. Esta reproducibilidad se puede comparar a la precisión de la valoración en condiciones normales para obtener una medida de la resistencia del método analítico.

ROBUSTEZ

Definición – La robustez de un método analítico es una medida de su capacidad para no resultar afectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal.

Determinación - Se recomienda variar algunos parámetros cromatográficos tales como velocidad de flujo, temperatura de la columna, volumen de inyección, detección de la longitud de onda ó fase móvil dentro de rangos realísticos, para luego determinar la influencia cuantitativa de cada una de estas variables. Si la influencia del parámetro se encuentra dentro de una tolerancia previamente especificada, se dice que el parámetro se encuentra dentro del rango de robustez del método. La obtención de estos datos nos ayudará a determinar si dicho método necesita ser revalidado cuando se cambia uno ó más parámetros. Los documentos ICH recomiendan la evaluación de la robustez del método durante la fase de desarrollo, pero no se requiere incluirse como parte de la aplicación de registro.

3.3.3 DATOS REQUERIDOS PARA LA VALIDACIÓN DE LOS ANÁLISIS

Los procedimientos de las determinaciones farmacopeicas varían desde valoraciones analíticas muy rigurosas hasta evaluaciones de atributos subjetivos. Considerando esta amplia variedad de determinaciones, es lógico que diferentes métodos de prueba requieran diferentes esquemas de validación.

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

Categoría II – Métodos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos métodos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.

Categoría III – Métodos analíticos para la determinación de las características de desempeño (por ejemplo, disolución, liberación del fármaco).

Categoría IV – Pruebas de identificación.

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

En la Tabla 1 se indican los elementos de datos que normalmente se requieren para cada una de las categorías de análisis según USP. En la Tabla 2 se presentan los parámetros de validación requeridos según la ICH.

**TABLA Nº 1: DATOS REQUERIDOS PARA ENSAYOS DE VALIDACIÓN
SEGÚN LA USP ⁽¹²⁾**

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO	ENSAYO CATEGORIA I	ENSAYO CATEGORIA II		ENSAYO CATEGORIA III	ENSAYO CATEGORIA IV
		CUANTITATIVO	CUALITATIVO		
EXACTITUD	SI	SI	*	*	NO
PRECISION	SI	SI	NO	SI	NO
ESPECIFICIDAD	SI	SI	SI	*	SI
LIMITE DE DETECCION	NO	NO	SI	*	NO
LIMITE DE CUANTIFICACION	NO	SI	NO	*	NO
LINEALIDAD	SI	SI	NO	*	NO
INTERVALO	SI	SI	*	*	NO

- Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

TABLA Nº 2: DATOS REQUERIDOS PARA ENSAYOS DE VALIDACIÓN SEGÚN ICH ⁽⁹⁾

TIPO DE PROCEDIMIENTO ANALITICO	IDENTIFICACION	PRUEBA DE IMPUREZAS		ENSAYO (DISOLUCION, CONTENIDO/POTENCIA)
		CUANTITATIVA	LIMITES	
CARACTERISTICAS				
EXACTITUD	-	+	-	+
PRECISION				
REPETIBILIDAD	-	+	-	+
PRECISION INTERMEDIA	-	+(1)	-	+(1)
ESPECIFICIDAD (2)	+	+	+	+
LIMITE DE DETECCION	-	-(3)	+	-
LIMITE DE CUANTIFICACION	-	+	-	-
LINEALIDAD	-	+	-	+
INTERVALO	-	+	-	+

- Significa que esta característica no se evalúa normalmente

+ Significa que esta característica se evalúa normalmente

(1) En casos donde la reproducibilidad (precisión entre laboratorios según la ICH) se ha llevado a cabo, por lo que la precisión intermedia no es necesaria.

(2) Deficiencia de especificidad de un procedimiento analítico el cual podría ser compensando mediante otro u otros procedimientos analíticos.

(3) Puede necesitarse en algunos casos.

3.4 ASPECTOS TEÓRICOS DE LA PRUEBA DE DISOLUCIÓN (7,11)

El procedimiento de disolución requiere un aparato, un medio de disolución y condiciones de prueba que provean un método suficientemente discriminatorio, tolerante, reproducible día a día y capaz de ser transferido entre laboratorios.

El criterio de aceptación debe estar representado por diferentes lotes con igual composición nominal y proceso de manufactura; usualmente son lotes claves usados en estudios piloto y que son representativos de los estudios de estabilidad.

El procedimiento debe ser discriminatorio, capaz de distinguir cambios sustanciales en la composición ó procedimiento de manufactura de los cuales se esperen afecten el desarrollo in vivo. Debe ser también posible para el procedimiento mostrar diferencias entre lotes donde no se observe diferencias en el desarrollo in vivo. Esta situación requiere cuidado al evaluarla cuando el procedimiento sea demasiado sensible ó apropiadamente discriminatorio. Evaluar resultados de diferentes lotes que posean variaciones típicas en la composición y parámetros de manufactura pueden ayudar en esta evaluación. Algunas veces es importante variar intencionalmente parámetros de manufactura tales como lubricación, tiempo de mezclado, fuerza de compresión, parámetros de secado, para caracterizar más a fondo el poder discriminatorio del procedimiento.

Con respecto a la estabilidad la prueba de disolución debe reflejar apropiadamente cambios relevantes en el principio activo del producto a través del tiempo los cuales son causados por la temperatura, humedad, fotosensibilidad y otras condiciones estresantes.

La alta variabilidad en los resultados puede dificultar la identificación de la tendencia o los efectos causados en los cambios de la formulación. Los resultados de disolución pueden ser considerados altamente variables si la desviación relativa estándar (RSD) es mayor del 20% a tiempos de muestreo de 10 minutos o menos y mayor de 10 % a tiempos mayores. Sin embargo la mayoría de resultados de disolución exhiben menor variabilidad que esta. Se debe investigar la fuente de la variabilidad, las dos causas más frecuentes son la formulación propia (principio activo, excipientes ó procesos de manufactura) ó artefactos asociados con el procedimiento de la prueba (adherencia de la tableta a la pared del vaso ó a la canasta). Las observaciones visuales son a menudo de gran ayuda para entender la fuente de la variabilidad cuando la disolución misma contribuya a la variabilidad. Cuando el contenido de la dosis no se disperse libremente a través del vaso de manera uniforme se pueden obtener datos aberrantes. Dependiendo del problema los remedios usuales incluyen cambio en el tipo de aparato, velocidad de agitación, eliminación de dióxido de carbono, consideración y examinación del tipo de humectador, composición del medio. La modificación del tipo de aparato puede ser de gran ayuda siempre y cuando se justifique y se valide.

Algunas causas de variabilidad pueden ser encontradas en la formulación y proceso de manufactura. Por ejemplo, pobre contenido en la uniformidad, inconsistencia en el proceso, reacciones que se llevan a cabo a lo largo de la disolución, interacciones de excipientes e interferencias. Durante las pruebas de rutina del producto, se deben investigar variaciones de producto fuera del rango desde la perspectiva analítica, de formulación y de proceso.

APARATO 1 (Aparato con canastilla)

El aparato consiste de: un vaso, con o sin tapa, de vidrio u otro material inerte y transparente; un motor, un eje propulsor metálico y una canastilla cilíndrica. El vaso está parcialmente sumergido en un baño de agua adecuado de cualquier dimensión conveniente que recibe calor de un dispositivo adecuado, como por ejemplo una camisa de calentamiento. Durante el transcurso de la prueba, el baño de agua o el dispositivo de calentamiento mantienen la temperatura en el interior del vaso a $37 \pm 0,5^\circ$ y garantizan que el fluido del baño se mantenga en movimiento suave y constante. Ninguna parte del equipo, ni el entorno en el cual está colocado, aumenta significativamente el movimiento, agitación o vibración, por encima de los producidos por el elemento de agitación que gira con suavidad. Es preferible emplear un aparato que permita observar la muestra y el elemento de agitación durante la prueba. El vaso es cilíndrico y de fondo semiesférico con las siguientes dimensiones y capacidades: para 1 L de capacidad nominal: altura entre 160 mm y 210 mm y diámetro interno entre 98

mm y 106 mm; para 2 L de capacidad nominal: altura entre 280 mm y 300 mm y diámetro interno entre 98 mm y 106 mm; y para 4 L de capacidad nominal: altura entre 280 mm y 300 mm y diámetro interno entre 145 mm y 155 mm. Las paredes del vaso cilíndrico tienen un reborde en el extremo superior. Se puede utilizar una tapa si fuera necesario para minimizar la evaporación. Colocar el eje propulsor de forma tal que su eje central guarde una distancia máxima de 2 mm con respecto a cualquier punto del eje vertical del vaso y rote suavemente sin fluctuaciones que pudieran afectar los resultados. Emplear un dispositivo para regular la velocidad con el objeto de seleccionar y mantener la velocidad de rotación del eje propulsor a la velocidad especificada en la monografía individual con una aproximación de $\pm 4\%$.

Los componentes del eje y de la canastilla del elemento de agitación son de acero inoxidable tipo 316 o de otro material inerte. Se puede emplear una canastilla con un baño de oro de aproximadamente 0,0001 pulgadas ($2.5\mu\text{m}$) de espesor. La unidad de dosificación se coloca en una canastilla seca al comienzo de cada prueba. La distancia entre el fondo interno del vaso y el fondo de la canastilla se mantiene a ± 25 mm durante la prueba.

APARATO 2 (Aparato con paleta)

Emplear el aparato 1 usando como elemento de agitación una paleta compuesta por un aspa y un eje. Colocar el eje propulsor de forma tal que su eje central guarde una distancia máxima de 2 mm con respecto a cualquier

punto del eje vertical del vaso y rote suavemente sin fluctuaciones que pudieran afectar los resultados. La línea central vertical del aspa está alineada con el eje propulsor de forma tal que el extremo inferior del aspa está nivelado con el nivel extremo inferior del eje propulsor. La hélice agitadora es una paleta de $4 \text{ mm} \pm 1 \text{ mm}$ de espesor y de $19 \text{ mm} \pm 0.5 \text{ mm}$ de alto, en forma de sección de un círculo de radio de 41.5 mm y cuerdas paralelas suspendidas de 42 mm y de 74.0 a 75.0 mm quedando la sección más pequeña hacia abajo. La distancia entre el fondo interno del vaso y el aspa se mantiene en $25 \pm 2 \text{ mm}$ durante la prueba. El aspa metálica o de otro material inerte adecuado y el eje forman una unidad. En algunos casos, se puede usar un dispositivo desmontable de dos partes, y cuando las partes permanezcan firmemente ajustadas durante la prueba. El eje y el aspa de la paleta pueden estar abiertos recubiertos con un material inerte adecuado.

MEDIO DE DISOLUCIÓN

Antes de seleccionar el medio se recomienda tener datos físicos y químicos de la sustancia a ser analizada. Dos propiedades claves de la droga son la solubilidad y el estado de la estabilidad de la droga como función del pH. Se debe evaluar la influencia de las soluciones amortiguadoras, valor de pH y surfactantes en la solubilidad y estabilidad de la droga.

Generalmente, cuando se busca un medio de disolución la meta es tener una capacidad de humectación adecuada la cual se define como el volumen de

medio requerido por lo menos de tres veces al requerido para formar una solución saturada de la droga.

Un medio que falla en proveer condiciones de humectación pueden ser aceptables si se demuestra que es discriminatorio ó bien si es debidamente justificado.

Usar una mezcla de solventes acuoso-orgánico como medio de disolución no es adecuado; sin embargo se acepta cuando se justifica apropiadamente.

El agua purificada es usado a menudo como medio de disolución pero no es el ideal por diferentes razones. Primero, la calidad del agua puede variar dependiendo de la fuente del agua y no se controla el valor de pH del agua. Segundo, el valor de pH puede variar de día a día y puede también cambiar a lo largo de la disolución dependiendo del principio activo y los excipientes. A pesar de estas limitaciones, el agua es barata, disponible rápidamente, ecológicamente aceptable y adecuado para productos con un flujo de liberación independiente del pH del medio.

Las características de disolución de una formulación oral deben evaluarse en el rango de pH fisiológico (1.2-6.8) (1.2 a 7.5 en formulaciones de liberación modificada). Durante el desarrollo del método puede ser útil medir el pH antes y después de la disolución para encontrar algún cambio de pH durante la prueba. Cuando sea posible la selección de las condiciones más apropiadas para la prueba de rutina es basada en la capacidad discriminatoria, tolerancia,

estabilidad del analito en el medio de prueba y la relevancia del desempeño in vivo.

Los medios típicos para la disolución son; Acido clorhídrico diluido, soluciones amortiguadoras en el rango fisiológico de pH (1.2-7.5), fluido gástrico simulado o fluido intestinal (con o sin enzimas), agua y surfactantes (con o sin ácidos ó buffers), sales biliares.

La molaridad de las soluciones amortiguadoras y ácidos pueden influenciar el efecto de solubilización por lo que este es un factor que puede ser evaluado.

Para compuestos pobremente solubles se pueden utilizar medios acuosos lo cuales pueden tener cierto porcentaje de surfactante como sodio lauril sulfato, polisorbato, óxido de laurildimetilamina los cuales son usados para mejorar la solubilidad de la droga o como agentes humectantes. El uso de surfactantes y su concentración debe ser justificada demostrando perfiles de diferentes concentraciones. Los surfactantes pueden ser usados como agentes humectantes ó para solubilizar el principio activo.

VOLUMEN

Normalmente el volumen es de 500 a 1000 mL, el volumen más común es de 900mL. Puede aumentarse hasta 2 ó 4 Litros usando vasos largos dependiendo de la concentración de la droga y de su capacidad de humectación.

ELIMINACIÓN DE DIÓXIDO DE CARBONO

Se debe determinar el grado de aireación del medio pues la formación de burbujas puede interferir con los resultados de la prueba, actuando como barrera a la disolución si está presente en la unidad de dosis ó en la malla de la canasta. Además las burbujas pueden causar adherencia de partículas al aparato y a las paredes del vaso. Por otra parte las burbujas sobre la unidad de dosificación pueden aumentar la turbulencia llevando al incremento del porcentaje de disolución ó a disminuir el área disponible lo cual llevaría a una disminución en el porcentaje de disolución.

Un método de eliminación de dióxido de carbono consiste en calentar el medio a 41°C con una agitación suave, inmediatamente filtrar al vacío usando un filtro que tenga una porosidad de 0.45µm

Los medios que contienen surfactantes usualmente no se les elimina el dióxido de carbono pues el proceso puede resultar con una excesiva formación de espuma.

Para determinar si la eliminación del dióxido de carbono del medio es necesario se deben comparar resultados de muestras ejecutadas en un medio al que se le ha eliminado el dióxido de carbono y a otro que no.

AGITACIÓN

Al usar el aparato 2 en cápsulas ó tabletas con una formulación de liberación inmediata se suele usar velocidades entre los 50 a 75 rpm. Otras velocidades

son aceptables con una justificación adecuada. Rangos fuera de las 25 y 150 rpm son usualmente inapropiados por la inconsistencia de la hidrodinámica debajo de las 25 rpm y por la turbulencia arriba de 150 rpm.

Rangos de agitación entre las 25 y 50 rpm son generalmente aceptables para las suspensiones. En formas de dosis que exhiben la formación de una montaña bajo la paleta a 50 rpm esta puede ser reducida incrementando la velocidad de la paleta a 75 rpm. Se pueden usar las 100 rpm en productos de liberación prolongada siempre que se justifique su uso. El incremento ó decremento de la velocidad de rotación del aparato puede ser justificada si los perfiles reflejan un mejor desarrollo in vivo y si los resultados del método discriminan sin afectar adversamente la reproducibilidad del método.

TIEMPO DE MUESTREO

Para las formas de dosificación de liberación inmediata la duración del procedimiento es típicamente entre 30 a 60 minutos. Conceptos regulatorios e industriales en la comparación y desarrollo de los productos pueden requerir tiempos de muestreo adicionales los cuales pueden ser un requerimiento en el registro y aprobación del producto. Un número suficiente de tiempos de muestreo debe ser seleccionado para caracterizar adecuadamente el aumento y las fases de mesetas en la curva de disolución. De acuerdo a Biopharmaceutics Classification System con referencia a diferentes guías dadas por la FDA, los principios activos altamente solubles ó altamente permeables

formulados con productos de fácil disolución están sujetos a perfiles de comparación. Si demuestran liberar el 85% ó más del principio activo en 15 minutos. Para este tipo de productos un punto de muestreo es suficiente. Sin embargo, la mayoría de compuestos no cabe en esta categoría. Perfiles de disolución de productos de liberación inmediata típicamente muestran un incremento gradual alcanzando el 85% a 100 en 30 a 45 minutos. Sin embargo tiempos de muestreo en el rango de 15, 20, 30, 45 y 60 minutos son usuales para la mayoría de productos de liberación inmediata.

Para productos de rápida solubilización (incluyendo suspensiones) se puede obtener información útil a partir de puntos tempranos (5-10 minutos). Mientras que en productos de difícil solubilización puntos de muestreo luego de 60 minutos pueden ser de gran ayuda.

TIPOS DE MUESTREO

Muestreo manual – Hacer uso de jeringas plásticas o de vidrio a las cuales se les puede colocar una cánula de acero inoxidable la cual es usualmente curva para permitir el muestreo adentro del vaso y un colocar un filtro al final de la cánula.

Automuestreo – Es una alternativa útil, específicamente si la prueba incluye diferentes puntos de muestreo. Algunos laboratorios desarrollan la prueba de disolución usando el muestreo manual, por lo que el automuestreo requiere

validarse con el muestreo manual. Existen diferentes marcas de automuestreadores incluyendo los sistemas semiautomáticos y el sistema completamente automatizado. Se deben desarrollar chequeos de funcionamiento y mantenimiento como se describe en el procedimiento estándar de operación así también los documentos de metrología son útiles para confiar en la operación de estos equipos.

La perturbación de la hidrodinámica causada por la sonda muestreadora en el vaso debe considerarse y desarrollarse una adecuada validación para asegurar que las sondas no están causando cambio significativo en el flujo de disolución.

FILTROS

Se hace necesaria la filtración de las muestras de disolución para prevenir que partículas sin disolverse entren a la muestra y luego se disuelvan. Además, remueve excipientes sin solubilizarse que puedan causar turbidez. La humectación previa de los filtros con el medio puede ser necesaria. Algunas veces se hace necesario humedecer el filtro con el medio con anterioridad a la toma de la muestra.

Los filtros pueden estar en línea ó al final de la sonda muestreadora o bien en ambos. El tamaño del poro varía entre 0.45 a 70 μm . Si la interferencia de los excipientes es alta, si el filtrado tiene una apariencia turbia ó si se tapa el filtro, se puede buscar una alternativa en el tipo de filtro o tamaño de poro los cuales deben ser evaluados.

Así también se debe evaluar la absorción de la droga en el filtro. Si ocurre esta absorción, la cantidad de filtrado inicial descartado podría necesitar que sea elevado. Si continúa el problema se debe buscar un filtro de material adecuado.

PROCEDIMIENTO

Colocar el volumen del medio de disolución indicado en el aparato, calentar y equilibrar el medio de disolución a una temperatura de $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Colocar una tableta, cápsula o suspensión en el aparato sin provocar burbujas de aire, operar el aparato inmediatamente a la velocidad y tiempos indicados en la monografía del producto. En el caso de utilizar el Aparato 2 la muestra se deposita en el fondo del vaso antes de iniciar la rotación de la paleta. Cuando transcurra el tiempo establecido, tomar la alícuota necesaria para la determinación, en la zona intermedia entre la superficie del medio de disolución y la parte superior de la canasta ó paleta y a no menos de 10 cm de la pared del vaso. Filtrar inmediatamente.

INTERPRETACIÓN

A menos que se especifique otra cosa en la monografía individual, el requerimiento es cumplido si la cantidad de principio activo disuelto para los ensayos unitarios resulta conforme a la tabla de aceptación (Ver Tabla 2). Continuar el ensayo a través de tres fases a menos que el resultado sea cualquiera de dos S_1 o S_2 .

La cantidad Q, es el equivalente de disolver el principio activo especificado en la monografía individual, expresado como porcentaje de la cantidad indicada: 5, 15 y 25%.

TABLA Nº 3: CRITERIOS DE ACEPTACIÓN ⁽¹²⁾

ETAPA	CANTIDAD PROBADA	CRITERIO DE ACEPTACION
S ₁	6	Ninguna unidad es menor que Q + 5%.
S ₂	6	El promedio de 12 unidades (S ₁ +S ₂) es igual o mayor que Q, y ninguna unidad es menor que Q-15%.
S ₃	12	El promedio de 24 unidades (S ₁ +S ₂ +S ₃) es igual o mayor que Q, no más de 2 unidades son menores que Q-15% y ninguna unidad es menor de Q-25%.

3.5 PERFILES DE DISOLUCIÓN⁽¹⁷⁾

La calidad de los productos farmacéuticos es un factor de suma importancia para asegurar el pronto restablecimiento de la salud de los individuos, su bienestar y calidad de vida. A fin de garantizar su seguridad y eficacia, el medicamento genérico deberá poseer, en teoría, las mismas propiedades del innovador y, al igual que los medicamentos de marca, deberá cumplir con las pruebas de control de calidad. Para demostrar que un medicamento es intercambiable, se utiliza la evaluación de los perfiles de disolución, que comprende la determinación experimental de la velocidad a la que el principio activo se disuelve, bajo condiciones experimentales controladas, a partir de la forma farmacéutica. Dicho de otra manera, los son pruebas químicas realizadas en el laboratorio con instrumentos y sustancias químicas que simulan el comportamiento del estómago; en este estudio también se hace una comparación del comportamiento entre los medicamentos de marca y el de prueba, finalmente, se realizan cálculos matemáticos para determinar si los productos son intercambiables.

Se ha considerado que la caracterización de los perfiles de disolución *in vitro* es esencial para evaluar las propiedades de una formulación, para comparar las formulaciones de referencia con otras formulaciones de estudio y, cuando exista una correlación adecuada entre los parámetros de disolución *in vitro* y la biodisponibilidad, para predecir el comportamiento *in vivo*.

Una evaluación satisfactoria del perfil de disolución permite una predicción de una buena biodisponibilidad *in vivo*, es decir, el medicamento alcanza el nivel terapéutico en el tiempo adecuado.

COMPARACIONES DE LOS PERFILES DE DISOLUCIÓN

Hasta hace poco, se han utilizado especificaciones y pruebas de disolución de punto único para evaluar los aumentos en escala y cambios posteriores a la aprobación, como (1) aumento en escala, (2) cambios en el sitio de fabricación, (3) cambios en componentes y composición, y (4) cambios en equipos y procesos. Un *producto cambiado* también puede ser una concentración menor de un producto medicinal previamente aprobado. Ante ciertos cambios menores, la prueba de disolución de punto único puede ser adecuada para asegurar que no haya cambios de calidad y rendimiento en el producto. Para cambios más importantes, se recomienda una comparación de perfiles de disolución realizada bajo condiciones idénticas para el producto antes y después del(de los) cambio(s). Los perfiles de disolución pueden considerarse similares en razón de (1) similitud global de los perfiles y (2) similitud en cada punto temporal de disolución de la muestra. Se puede realizar la comparación de perfiles de disolución utilizando un método independiente de modelo o dependiente de modelo.

A. Enfoque independiente de modelo utilizando un factor de similitud

Un enfoque independiente de modelo sencillo utiliza un factor de diferencia (f_1) y un factor de similitud (f_2) para comparar los perfiles de disolución (Moore 1996). El factor de diferencia (f_1) calcula la diferencia porcentual (%) entre las dos curvas en cada punto temporal y es una medida del error relativo entre las dos curvas:

$$f_1 = \{ \sum_{t=1}^n |R_t - T_t| / \sum_{t=1}^n R_t \} \cdot 100$$

donde n es el número de puntos temporales, R_t es el valor de disolución de la tanda de referencia (anterior al cambio) en el tiempo t , y T_t es el valor de disolución de la tanda de prueba (posterior al cambio) en el tiempo t .

El factor de similitud (f_2) es una transformación de raíz cuadrada recíproca logarítmica de la suma del error cuadrado y es una medición de la similitud en la disolución porcentual (%) entre las dos curvas.

$$f_2 = 50 \cdot \log \{ [1 + (1/n) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2]^{-0.5} \cdot 100 \}$$

A continuación hay un procedimiento específico para determinar los factores de diferencia y similitud:

1. Determinar el perfil de disolución de dos productos (12 unidades cada uno) de los productos de prueba (posteriores al cambio) y referencia (anteriores al cambio).
2. Usando los valores de disolución medios de ambas curvas en cada intervalo temporal, calcular el factor de diferencia (f_1) y el factor de similitud (f_2) usando las ecuaciones que figuran arriba.

3. Para que las curvas se consideren similares, los valores de f_1 deberán estar cerca de 0, y los valores de f_2 deberán estar cerca de 100. Por lo general, los valores de f_1 de hasta 15 (0-15) y los valores de f_2 mayores de 50 (50-100) aseguran la igualdad o equivalencia de las dos curvas y, por lo tanto, del rendimiento de los productos de prueba (posteriores al cambio) y referencia (anteriores al cambio).

Este método independiente de modelo es más conveniente para la comparación de los perfiles de disolución cuando hay tres a cuatro o más puntos temporales de disolución disponibles. También deberá considerarse las siguientes recomendaciones como sugerencias adicionales para el enfoque general:

- Las mediciones de disolución de las tandas de prueba y referencia deberán realizarse bajo exactamente las mismas condiciones. Los puntos temporales de disolución para ambos perfiles deberán ser los mismos (p.ej., 15, 30, 45, 60 minutos). La tanda de referencia utilizada deberá ser el producto fabricado más recientemente antes del cambio.
- Sólo se deberá considerar una medición después de la disolución del 85% de ambos productos.
- Para permitir el uso de datos medios, el coeficiente porcentual de variación en los puntos temporales más tempranos (p.ej., 15 minutos) no deberá ser más del 20%, y en otros puntos temporales no deberá ser más del 10%.

- Los valores de disolución medios de R_t pueden derivarse o de (1) la última tanda anterior al cambio (de referencia) o (2) las últimas dos tandas o más fabricadas consecutivamente antes del cambio.

B. Procedimiento de región de certeza multivariado independiente de modelo

En casos donde la variación dentro de la tanda es más del 15% de CV, conviene más un procedimiento independiente de modelo multivariado para la comparación de los perfiles de disolución. Se sugieren los siguientes pasos:

1. Determinar los límites de similitud en términos de la distancia estadística multivariada (MSD) en base a diferencias en disolución entre las tandas en relación a las tandas de referencia (aprobadas por patrón).
2. Calcular la MSD entre las disoluciones de prueba y referencia medias.
3. Calcular el intervalo de certeza del 90% de la verdadera MSD entre las tandas de prueba y referencia.
4. Comparar el límite superior del intervalo de certeza con el límite de similitud.

Se considera que la tanda de prueba es similar a la tanda de referencia si el límite superior del intervalo de certeza es igual a o menor al límite de similitud.

C. Enfoques dependientes de modelos

Se han descrito varios modelos matemáticos en la literatura para corresponder a los perfiles de disolución. Se sugieren los siguientes procedimientos para

permitir la aplicación de estos modelos a la comparación de los perfiles de disolución:

1. Seleccionar el modelo más apropiado para los perfiles de disolución de las tandas patrones anteriores al cambio y aprobadas. Se recomienda un modelo con no más de tres parámetros (como los modelos lineal, cuadrático, logístico, probit y Weibull).
2. Usando los datos para el perfil generado para cada unidad, aparear los datos con el modelo más apropiado.
3. Se fija una región de similitud basada en la variación de parámetros del modelo apareado con las unidades de prueba (p.ej., cápsulas o comprimidos) de las tandas aprobadas patrones.
4. Calcular la MSD en los parámetros del modelo entre las tandas de prueba y referencia.
5. Calcular la región de certeza del 90% de la verdadera diferencia entre las dos tandas.
6. Comparar los límites de la región de certeza con la región de similitud. Si la región de certeza está dentro de los límites de la región de similitud, se considera que la tanda de prueba tiene un perfil de disolución similar a la tanda de referencia.

3.6 ASPECTOS TEÓRICOS DE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA PRESIÓN ⁽¹²⁾

La cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC, por sus siglas en inglés), a veces llamada cromatografía de líquidos de alta resolución, 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.

La adsorción cromatográfica surge de las interacciones entre solutos y la superficie de la fase estacionaria sólida. Generalmente los eluentes usados son menos polares que la fase estacionaria, tales sistemas son descritos como "Fase normal".

La cromatografía por partición implica una fase estacionaria líquida que es inmisible con el eluyente y recubierta con un soporte inerte. El sistema de partición puede ser fase normal (fase estacionaria más polar que el eluyente) ó fase reversa.

La cromatografía por intercambio iónico implica una fase estacionaria con grupos aniónicos ó catiónicos en la superficie a la cual se atraen moléculas del soluto de carga opuesta.

APARATO

Un cromatógrafo de líquidos consta de un recipiente que contiene la fase móvil, una bomba para forzar el paso de la fase móvil a través del sistema a alta presión, un inyector para introducir la muestra en la fase móvil, una columna cromatográfica, un detector y un dispositivo de recolección de datos tales como por ejemplo una computadora, un integrador o un registrador. Las columnas cortas de diámetro interior pequeño que contienen un relleno denso de partículas de fase estacionaria permiten un intercambio rápido de los compuestos entre la fase móvil y la fase estacionaria. Además de recibir y reproducir las señales enviadas por el detector, las computadoras se emplean para controlar las operaciones y los parámetros cromatográficos y permiten períodos largos de operación sin necesidad de supervisión.

SISTEMAS DE BOMBEO

Los sistemas de bombeo HPLC administran cantidades exactas de fase móvil desde los recipientes hasta la columna mediante una tubería y uniones adecuadas para altas presiones. Los sistemas modernos constan de una o varias bombas reguladoras controladas por computadora que pueden programarse para variar la relación entre los componentes de la fase móvil, según se requiera para la cromatografía en gradiente, o para mezclar la fase móvil en corridas isocráticas (es decir, fases móviles que tienen una composición fija de disolventes). Sin embargo, la proporción de los ingredientes

en las fases móviles isocráticas mezcladas previamente puede ser controlada con mayor exactitud que en las suministradas por la mayoría de los sistemas de bombeo. Las presiones operativas son típicamente de hasta 5000 psi o más con velocidades de flujos de hasta 10 mL por minuto. Las bombas empleadas para el análisis cuantitativo deben construirse con materiales inertes a los componentes corrosivos de la fase móvil y ser capaces de bombear la fase móvil a una velocidad constante, con fluctuaciones mínimas, durante períodos de tiempo prolongados.

INYECTORES

Después de ser disueltos en la fase móvil u otra solución apropiada, los compuestos que se van a cromatografiar se inyectan en la fase móvil, ya sea manualmente usando jeringas o inyectores de espiral o bien automáticamente mediante el uso de inyectores automáticos. Estos últimos constan de un carrusel o una gradilla para sostener los viales de muestra cuya parte superior se encuentra tapada con un septo o un tapón perforable y un dispositivo de inyección para transferir la muestra desde los viales a un espiral conectado al cromatógrafo. Los inyectores automáticos pueden programarse para controlar el volumen de muestreo, el número de inyecciones y los ciclos de enjuague del espiral, el intervalo entre las inyecciones y otras variables operativas.

Se puede emplear una jeringa para la inyección manual de las muestras a través de un septo cuando las presiones en la parte superior de la columna

sean menores de 70 atmósferas (aproximadamente 1000 psi). Con presiones mayores, es indispensable utilizar una válvula de inyección. Algunos sistemas de válvulas poseen un espiral calibrado que se llena con una solución de muestra para transferirla a la columna en la fase móvil. En otros sistemas, la solución de muestra se transfiere a una cavidad por medio de una jeringa y luego se transfiere a la fase móvil.

COLUMNAS

Para la mayoría de los análisis farmacéuticos, la separación se logra por la partición de los compuestos presentes en la solución de prueba entre la fase móvil y la estacionaria. Los sistemas que constan de fases estacionarias polares y fases móviles no polares se describen como de fase normal, mientras que, por el contrario, cuando se emplean fases móviles polares y fases estacionarias no polares se denomina cromatografía en fase reversa. La cromatografía de partición casi siempre se emplea para compuestos solubles en hidrocarburos de peso molecular menor de 1000. La afinidad de un compuesto por la fase estacionaria, y por consiguiente su tiempo de retención en la columna, se controla mediante una fase móvil se puede variar mediante el agregado de un segundo y, a veces, un tercer o hasta un cuarto componente.

Las fases estacionarias para la moderna cromatografía de líquidos en fase reversa constan normalmente de una fase orgánica químicamente unida a sílice u otros materiales. Las partículas son generalmente de 3 μm a 10 μm de

diámetro, pero los tamaños pueden llegar hasta 50 μm o más para las columnas preparativas. Las partículas pequeñas recubiertas con una capa delgada de fase orgánica proporcionan una baja resistencia a la transferencia de masa y, por lo tanto, se obtiene una transferencia rápida de los compuestos entre la fase estacionaria y la móvil. La polaridad de la columna depende de la polaridad de los grupos funcionales unidos, que varía desde el octadecilsilano relativamente no polar a grupos nitrilo muy polares. Las fases estacionarias líquidas no unidas deben ser en gran medida inmiscibles con la fase móvil. Aún así, generalmente es necesario saturar previamente la fase móvil con fase estacionaria para impedir la redisolución de la fase estacionaria de la columna. Las fases estacionarias poliméricas recubiertas sobre el soporte son más duraderas.

Por lo general, las columnas empleadas para las separaciones analíticas tienen diámetros internos de 2 mm a 5 mm; para la cromatografía preparativa se emplean columnas de diámetros más grandes. Las columnas pueden calentarse para proporcionar separaciones más eficaces, pero rara vez se las utiliza a temperaturas por encima de los 60°, debido a la potencial degradación de la fase estacionaria o la volatilidad de la fase móvil. A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, las columnas se emplean a temperatura ambiente.

La cromatografía de intercambio iónico se emplea para separar compuestos ionizables y solubles en agua con un peso molecular menor de 1500. Las fases

estacionarias son generalmente resinas orgánicas sintéticas; las resinas de intercambio catiónico contienen sitios activos con carga negativa y se emplean para separar sustancias básicas, como por ejemplo las aminas, mientras que las resinas de intercambio aniónico tienen sitios activos con carga positiva para la separación de compuestos con grupos con carga negativa, como los grupos fosfato, sulfonato o carboxilato. Los compuestos iónicos o ionizables hidrosolubles son atraídos hacia las resinas y las diferencias en la afinidad producen la separación cromatográfica. El pH de la fase móvil, la temperatura, el tipo de ión, la concentración iónica y los modificadores orgánicos influyen en el equilibrio; estas variables pueden ajustarse para obtener el grado deseado de separación.

En la cromatografía de exclusión por tamaño, las columnas están rellenas con una fase estacionaria porosa. Las moléculas de los compuestos cromatografiados se filtran de acuerdo con el tamaño. Las que son demasiado grandes para pasar por los poros pasan a través de la columna sin ser retenidas. Las moléculas más pequeñas se introducen en los poros y se retienen más a medida que el tamaño molecular disminuye. Estas moléculas se emplean comúnmente para medir la agregación y la degradación de macromoléculas.

DETECTORES

Muchos métodos HPLC requieren el uso de detectores espectrofotométricos. Este tipo de detector consta de una celda de flujo colocada en el extremo de la columna. Un haz de radiación UV pasa a través de la celda de flujo y se introduce en el detector. A medida que los compuestos eluyen de la columna, pasan a través de la celda y absorben la radiación, lo que da lugar a cambios cuantificables en el nivel de energía.

Pueden obtenerse con facilidad detectores de onda fija, variable y múltiple. Los detectores de longitud fija operan a una sola longitud típicamente 254 nm la cual es emitida por una lámpara de mercurio de baja presión. Los detectores de longitud de onda variable contienen una fuente de luz continua tales como una lámpara de deuterio ó xenón de alta presión y un monocromador ó un filtro de interferencia para generar radiación monocromática a una longitud de onda seleccionada por el operador. Se debe controlar la exactitud de la longitud de onda de un detector de longitud de onda variable equipado con un monocromador mediante un procedimiento recomendado por el fabricante; si las longitudes de onda difieren en más de 3 nm de los valores correctos, se indica una recalibración del instrumento. Los detectores modernos de longitud de onda variable pueden programarse para cambiar la longitud de onda mientras un análisis está en curso. Los detectores de longitud de onda múltiple miden la absorbancia a dos o más longitudes de onda simultáneamente. En los detectores múltiples de conjunto de diodos, la radiación continua se hace pasar

a través de la celda, luego la radiación se resuelve en las longitudes de onda que la constituyen, que son afectadas una por una mediante el conjunto de fotodiodos. Estos detectores adquieren los datos de absorbancia a lo largo del intervalo total UV-visible y, por lo tanto, proporcionan al analista cromatogramas a múltiples longitudes de onda seleccionadas y espectros de los picos eluidos. Los detectores de conjunto de diodo tienen, por lo general, menor relación señal-ruido que los detectores de longitud de onda fija o variable y, por lo tanto, son menos aptos para el análisis de compuestos presentes a concentraciones bajas.

Los detectores de refractometría diferencial miden la diferencia entre el índice de refracción de la fase móvil sola y el de la fase móvil que contiene los compuestos cromatografiados a medida que salen de la columna. Los detectores de índice de refracción se emplean para detectar compuestos que no absorben radiación UV, pero son menos sensibles que los detectores UV. Son sensibles a pequeños cambios en la composición del disolvente, la velocidad de flujo y la temperatura; de manera que puede que sea necesaria una columna de referencia para obtener una línea base satisfactoria.

Los detectores fluorométricos son sensibles a los compuestos que son inherentemente fluorescentes o que pueden convertirse en derivados fluorescentes mediante la transformación química del compuesto o mediante el acoplamiento de reactivos fluorescentes con grupos funcionales específicos. Si se requiere derivatización, ésta puede hacerse antes de la separación

cromatográfica o, alternativamente, el reactivo puede introducirse en la fase móvil justo antes de su entrada al detector.

Los detectores electroquímicos potenciométricos, voltamétricos o polarográficos son útiles para la cuantificación de las especies que pueden oxidarse o reducirse en un electrodo de trabajo. Estos detectores son selectivos, sensibles y confiables, pero requieren que las fases móviles estén libres de oxígeno disuelto y de iones metálicos reducibles. Debe emplearse una bomba sin pulso y debe asegurarse de que el pH, la fuerza iónica y la temperatura de la fase móvil permanezcan constantes. Los electrodos de trabajo son propensos a la contaminación por productos de reacción con las consiguientes variaciones en las respuestas.

Los detectores electroquímicos con electrodos de pasta de carbono pueden emplearse ventajosamente para medir cantidades en el orden de los nanogramos de compuestos fácilmente oxidables, en particular fenoles y catecoles.

DISPOSITIVOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Las estaciones de datos modernas reciben y almacenan la señal de los detectores e imprimen el cromatograma completo con las alturas las áreas de los picos, la identificación de la muestra y las variables del método. Se emplean también para programar la cromatografía de líquidos, controlando la mayoría de

las variables y proporcionando períodos largos de operación sin necesidad de supervisión.

Los datos también pueden recolectarse para ser medidos manualmente en registradores sencillos o en integradores independientes, que varían en complejidad desde los que proporcionan una copia impresa de las áreas de los picos a los que proporcionan cromatogramas con las áreas y las alturas de los picos calculadas y almacenan datos para un posible reprocesamiento posterior.

CAPÍTULO IV
DISEÑO METODOLÓGICO

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO

El tipo de estudio realizado en este trabajo es Experimental Prospectivo el cual se hizo en el producto Diclofenaco Suspensión a través de análisis de laboratorio.

4.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA

La investigación bibliográfica utilizada fue la Biblioteca "Dr. Benjamín Orozco" de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador y la Biblioteca de la Universidad Alberto Masferrer.

Para determinar aspectos importantes del Sistema Cromatográfico se tomó como base la monografía oficial para las tabletas de Diclofenaco Sódico que aparece en la Farmacopea de los Estados Unidos en su edición 29. Así también se apoyó en cierta información proveniente del Internet.

4.3 INVESTIGACIÓN DE CAMPO

Se tomaron muestras de un lote industrial del producto Diclofenaco Suspensión genérico y muestras de Placebo.

Además se compraron seis frascos de 120 mL del producto innovador con fines de comparar los perfiles de disolución, estos frascos se obtuvieron en la farmacia San Benito ubicada en la Autopista Sur.

4.4 PARTE EXPERIMENTAL

El presente estudio se divide en cuatro etapas principales:

- La primera etapa consistió en determinar las condiciones de disolución: Medio Disolución, Velocidad de agitación (rpm), Volumen del medio de Disolución (mL) y Tiempo de Disolución (min).
- La segunda etapa consistió en determinar el Sistema Cromatográfico el cual incluye: Fase estacionaria, Fase móvil, Velocidad de Flujo (mL/min), Volumen de inyección (μL), Temperatura del horno ($^{\circ}\text{C}$), Longitud de onda del detector.
- La tercera etapa consistió en la validación del método analítico en la cual se aplicó el esquema presentado en las páginas número 20 y 21 el cual fue creado en base a lo indicado por la USP 29 y la ICH.

Para el parámetro de Reproducibilidad se hizo uso de un segundo analista el cual colaboró en esta validación.

- La cuarta etapa consistió en la comparación de Perfiles de Disolución de Diclofenaco Suspensión genérico con el producto innovador.

4.4.1 PRIMERA ETAPA DE LA PARTE EXPERIMENTAL: CONDICIONES DE DISOLUCIÓN

4.4.1.1 MEDIO DE DISOLUCIÓN

Se utilizaron diferentes medios de disolución los cuales sirvieron para: elegir el medio de disolución más apropiado, el nivel de pH en el que se solubiliza el Diclofenaco Resinato y determinar la longitud de onda de mayor absorbancia.

Las lecturas de absorbancia de las diferentes soluciones preparadas se hicieron utilizando un espectrofotómetro ultravioleta.

Se hizo uso del siguiente formato para presentar los resultados de esta prueba:

MEDIO DE DISOLUCION	ABSORBANCIA DEL ESTÁNDAR DE DICLOFENACO SÒDICO (273 y 275 nm)	ABSORBANCIA DE PRODUCTO TERMINADO (273 y 275 nm)	ABSORBANCIA DE DICLOFENACO RESINATO (273 y 275 nm)	ABSORBANCIA DEL PLACEBO (273 y 275 nm)
AGUA				
HCl 0.1 N				
BUFFER pH 2.5				
BUFFER pH 6.8				
BUFFER pH 7.2				
BUFFER pH 8.0				
NaOH 0.1 N				
LSS 0.5%				
LSS 1.0%				
LSS 1.5%				

A continuación se presenta el esquema de dilución utilizado para la preparación de la solución del Estándar de Diclofenaco Sódico, la solución de Diclofenaco Suspensión, la solución de Diclofenaco Resinato y la Solución del Placebo.

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE ESTÁNDAR

PM Diclofenaco Sódico=318.1 g/mol, PM Diclofenaco Ácido= 296.2 g/mol

1 mg Diclofenaco Ácido ——— 1.0742 mg Diclofenaco Sódico

25.2 mg Diclofenaco Ácido ——— x

x = 27.1 mg Diclofenaco Sódico

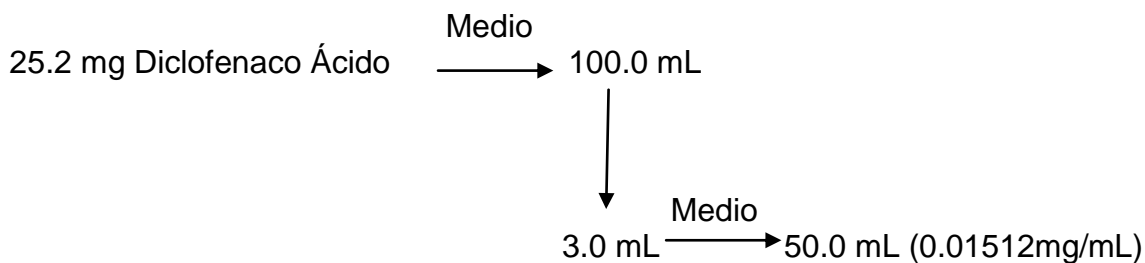
Considerando la valoración real del estándar de Diclofenaco sódico usado:

27.1 mg Diclofenaco Sódico ——— 100.0 %

x ——— 100.6 %

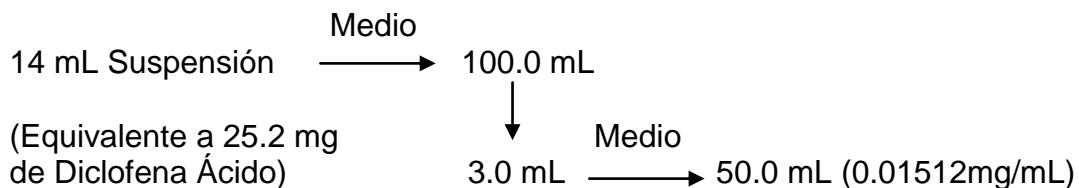
x= 26.9 mg Diclofenaco Sódico

Nota: Este cálculo se hace uso realizando una regla de tres inversa.



PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DEL DICLOFENACO SUSPENSIÓN

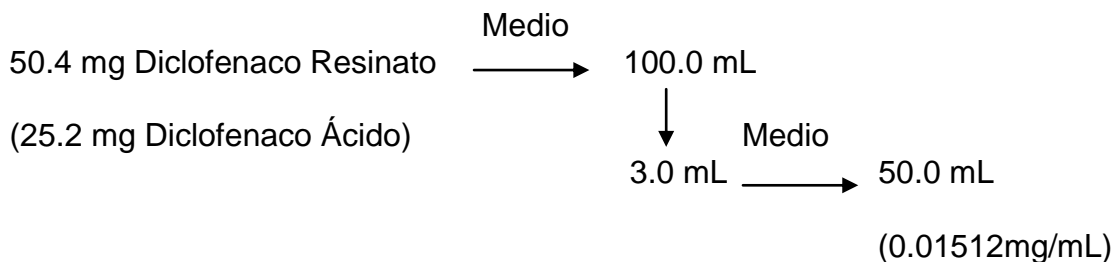
(Diclofenaco 9 mg/5 mL)



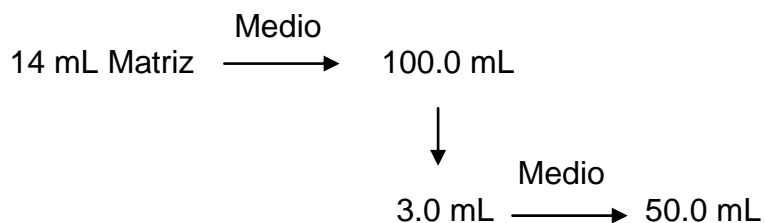
PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE DICLOFENACO RESINATO

$$\begin{array}{rcl} 1 \text{ mg Diclofenaco Resinato} & \text{---} & 0.5 \text{ mg Diclofenaco Ácido} \\ x & \text{---} & 25.2 \text{ mg Diclofenaco Ácido} \end{array}$$

$$x = 50.4 \text{ mg Diclofenaco Resinato}$$



PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DEL PLACEBO



4.4.1.2 VELOCIDAD DE AGITACIÓN

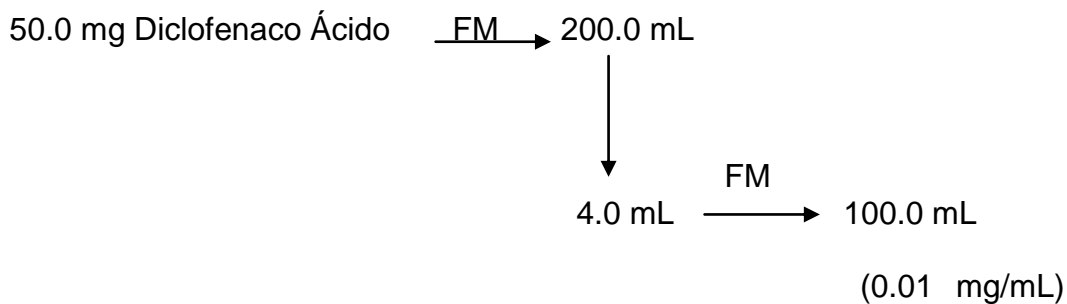
Se hicieron dos pruebas utilizando un cromatógrafo líquido de alta resolución.

En la primera prueba se montó una disolución en la cual se usó como medio de disolución el Lauril Sulfato de Sodio a diferentes concentraciones 0.5%, 1.0% y 2.0% usando una velocidad de agitación de 50 rpm.

Luego, se hizo una segunda prueba montando dos disoluciones en las cuales se usaron 60 rpm y 75 rpm empleando el Lauril Sulfato de Sodio 2.0% como medio de disolución.

A continuación se presenta el esquema de dilución utilizado para la preparación de la solución del Estándar de Diclofenaco Sódico.

PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR



4.4.2 SEGUNDA ETAPA DE LA PARTE EXPERIMENTAL: SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Los siguientes parámetros se tomaron de la monografía de Tabletas de Diclofenaco Sódico que aparece en la USP 29 específicamente de la prueba de Contenido.

TIPO DE COLUMNA:	4.6 mm x 25 cm, con una fase estacionaria de Octilsilano (L7) químicamente unida a partículas totalmente porosas de sílica, con un diámetro entre 3 a 10 μm
VOLUMEN DE INYECCION:	10 μL
FLUJO:	1 mL por minuto
FASE MOVIL:	Metanol-Buffer Fosfato pH 2.5 (70:30)

Para determinar la Temperatura del horno se estableció la misma que se determinó en el desarrollo analítico de la prueba de contenido de Diclofenaco Suspensión que es de 35°C. El detector usado es de longitud de onda variable.

4.4.3 TERCERA ETAPA DE LA PARTE EXPERIMENTAL: VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA PROPUESTA

4.4.3.1 METODOLOGÍA ANALÍTICA DE DISOLUCIÓN PROPUESTA PARA DICLOFENACO SUSPENSIÓN (Diclofenaco 9 mg/5mL)

Siguiendo los lineamientos del apartado <711> de Disolución de la USP 29.

PRECAUCIONES

METANOL: Inflamable, tóxico si se inhala o se ingiere.

ÁCIDO FOSFÓRICO: Es irritante para la piel y mucosas. Puede provocar quemaduras en la piel.

SISTEMA CROMATOGRÁFICO

EQUIPO: Cromatógrafo líquido de alta eficiencia con detector UV-VIS de longitud de onda variable.

COLUMNA: Lichrospher 100 RP-8 Endcapped (5µm), 250 x 4 mm, Cat. Merck 1.50837

LONGITUD DE ONDA: 275 nm

TEMPERATURA DE HORNO: 35°C

FLUJO: 1 mL/min

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 10 µL

FASE MÓVIL: Metanol HPLC: Buffer Fosfato pH 2.5 (70:30)
V/V

BUFFER FOSFATO pH 2.5

Disolver 0.75 g de Fosfato Monobásico de Sodio en 900 mL de agua calidad HPLC, agregar 0.5 mL de Ácido Fosfórico 85%, mezclar y diluir a 1000 mL con agua calidad HPLC. Ajustar el pH a 2.5 ± 0.2 con Ácido Fosfórico 85%. Filtrar al vacío a través de membrana de 0.45 μm .

MEDIO DE DISOLUCIÓN

LAURIL SULFATO DE SODIO 2%

Pesar 120 g de Sodio Lauril Sulfato en un beaker adecuado previamente tarado (manipularlo en cámara de extracción por ser un polvo voluminoso). Adicionar 1000 mL de agua al Sodio Lauril Sulfato y mezclar magnéticamente hasta deshacer los grumos, transferir al erlenmeyer de 6000 mL que contiene 4000 mL de agua y continuar mezclando magnéticamente.

Con otros 1000 mL de agua arrastrar el resto del Sodio Lauril Sulfato del beaker y transferirlo al erlenmeyer, mezclar magnéticamente hasta lograr una solución transparente.

VOLUMEN: 900 mL

APARATO: 2

TIEMPO: 60 minutos

TOLERANCIA: No menos del 80% de la cantidad rotulada de Diclofenaco.

MONTAJE DE LA DISOLUCIÓN

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

En el frasco que contiene a la muestra agitarla enérgicamente durante 3 minutos luego dejar reposar hasta que todo el aire atrapado haya sido eliminado (aproximadamente 30 minutos) y verter en un beaker de 100 mL.

Para cada una de las 6 muestras utilizar una jeringa de 10 mL y una cánula que se pueda conectar a ella para extender su longitud. Pesar la jeringa vacía con su respectiva cánula en un beaker y tarar.

Medir en la jeringa aproximadamente 5 mL del producto y pesar. Agregar la muestra al medio de disolución de 900 mL en un punto ubicado entre la superficie del medio y la parte superior del aspa de la paleta.

Pesar nuevamente la jeringa vacía con su respectiva cánula y determinar el peso, **Wu** en g de suspensión añadida al medio de disolución.

Wu= Peso inicial de la muestra – Peso de muestra adherida en jeringa y en cánula.

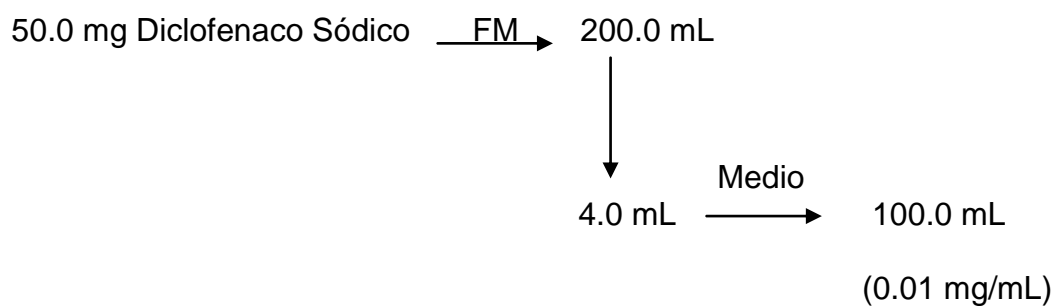
Peso de muestra adherida en jeringa y cánula= Peso jeringa y cánula después de agregar la muestra – Peso jeringa y cánula sola

Realizar la disolución y muestrear de cada vaso de disolución.

PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR

Pesar exactamente una cantidad aproximada a 50.0 mg de Diclofenaco Ácido bajo la forma de Diclofenaco Sódico, tomando en cuenta que 1 mg de

Diclofenaco Ácido equivale a 1.0742 mg de Diclofenaco Sódico (PM Diclofenaco Sódico=318.1 g/mol, PM Diclofenaco Ácido= 296.2 g/mol), en un balón volumétrico de 200.0 mL, agregar cerca de 100 mL de fase móvil y agitar mecánicamente durante 15 minutos, aforar con fase móvil. Tomar una alícuota de 4.0 mL y transferirla a un balón volumétrico de 100.0 mL, aforar con solución de Lauril Sulfato de Sodio 2% (Medio de disolución). Filtrar a través de membrana Nylon de 0.45 μ m.



Factor de dilución del estándar de Diclofenaco: 5000 mL

Concentración de Diclofenaco: 0.01 mg/mL

SOLUCIÓN DE PRUEBA

Después de realizar la disolución filtrar una porción de muestra disuelta a través de membrana Nylon de 0.45 μ m

DENSIDAD

Homogenizar 120 mL de suspensión mediante agitación energética durante 3 minutos y luego dejar reposar hasta que todo el aire atrapado haya sido eliminado. Pesar 50.0 mL de suspensión en un balón volumétrico de 50.0 mL previamente pesado (si existen restos de suspensión en las paredes del cuello del balón, arriba de la marca de aforo, con ayuda de papel toalla limpiar las paredes del cuello). Calcular la densidad de la suspensión en g/mL.

PROCEDIMIENTO

Inyectar separadamente las soluciones de preparación de estándar y muestra en el Cromatógrafo Líquido y registrar los cromatogramas durante un tiempo de 10 minutos.

PRUEBA DE ADAPTABILIDAD DEL SISTEMA

PRUEBA VISUAL: Los cromatogramas de la solución estándar y muestra deben coincidir en forma.

PRECISIÓN: La desviación estándar relativa de las áreas de los picos de inyecciones sucesivas es no mayor al 2.0% para la señal de Diclofenaco.

EFICIENCIA: La eficiencia de la columna es no menor de 3500 platos teóricos, con respecto a la señal de diclofenaco.

FACTOR DE COLA: Es no mayor de 2.0, con respecto a la señal de diclofenaco.

CÁLCULOS

Calcular la cantidad en porcentaje de diclofenaco, según la siguiente fórmula:

$$\% = \frac{C_{st}}{A_{st}} * A_{mx} * \frac{D}{P} * FD * 5 * \frac{100}{9}$$

DONDE:

%= Porcentaje de Diclofenaco disuelto

Cst= Concentración del estándar en mg/mL de diclofenaco (0.01 mg/mL)

Amx= Área de diclofenaco en la muestra

Ast= Área de diclofenaco en el estándar

D= Densidad de la suspensión en g/mL

P= Peso muestra de suspensión en g

FD= Factor de dilución de la muestra en mL

5= Factor de 5 mL de suspensión

MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS

MATERIAL

- Balones volumétricos de 100.0 mL y 200.0 mL
- Pipetas volumétricas de 4.0 mL
- Tubos de ensayo
- Filtros para disolución de 0.45 μm
- Filtros de membrana Nylon de 0.45 μm

EQUIPO

- Disolutor Vankel 7010
- Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (HPLC)

REACTIVOS

- Metanol calidad HPLC
- Agua calidad HPLC
- Fosfato monobásico de sodio CR
- Ácido fosfórico 85% CR
- Lauril Sulfato de Sodio CR
- Diclofenaco Sódico estándar de trabajo

4.4.3.2 ESQUEMA DE VALIDACIÓN

CUADRO Nº 1: ESQUEMA DE VALIDACIÓN_(9,12)

PARÁMETROS	DETERMINACIÓN		REPORTE
	Concentraciones	No. de Determinaciones	
1- Linealidad del Estándar	50% de la Concentración Teórica	2	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Coeficiente de correlación (r) ▪ Coeficiente de determinación (r^2) ▪ Coeficiente de variación de los factores de respuesta (f) ▪ Pendiente ▪ Intervalo de confianza de la pendiente ▪ Prueba t de Student de la pendiente ▪ Intervalo de confianza del intercepto (a) ▪ Rango lineal
	75% de la Concentración Teórica	2	
	100% de la Concentración Teórica	2	
	125% de la Concentración Teórica	2	
	150% de la Concentración Teórica	2	
2- Exactitud (Recobro y Linealidad del Método, Precisión)	<p>Cantidades del analito, se añaden a la matriz (al 100% de su peso establecido en el método) para obtener niveles del 50%, 100% y 150% de la concentración teórica de la sustancia, realizando la disolución con las tres concentraciones. La exactitud es expresada como un porcentaje de la cantidad recuperada. Numero de determinaciones: 9 (3 por cada nivel de concentración)</p>		<p>Recobro:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Prueba de Cochran ▪ Prueba t de Student ▪ Porcentaje de recobro <p>Linealidad del método:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Coeficiente de correlación (r) ▪ Coeficiente de determinación (r^2) ▪ Coeficiente de variación de los factores de respuesta (f) ▪ Pendiente ▪ Prueba t de Student de la pendiente ▪ Intervalo de confianza del intercepto (a) y pendiente ▪ Rango lineal <p>Precisión:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Promedio de datos ▪ Coeficiente de variación

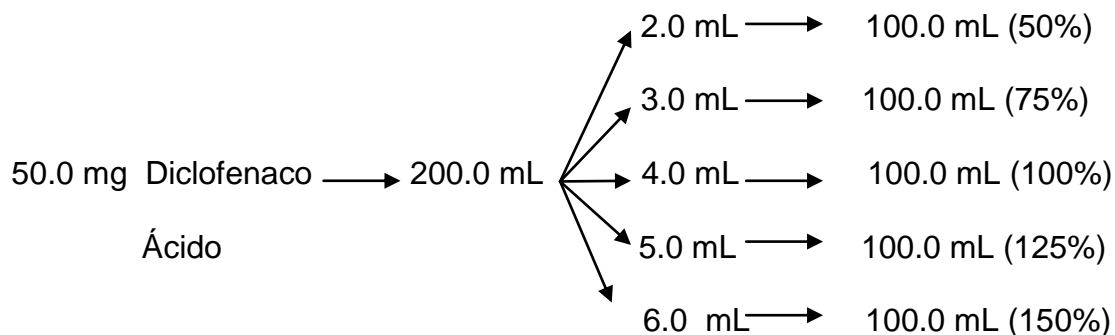
CUADRO Nº 1 continuación

PARÁMETROS	DETERMINACIÓN	REPORTE
4- Repetibilidad del Método	Evaluación de la disolución de un mínimo de 6 muestras preparadas al 100% de la concentración teórica, tomándose los datos del perfil al tiempo de 60 minutos.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Promedio de datos ▪ Coeficiente de variación ▪ Prueba F de Fisher ▪ Prueba t de Student
5- Precisión del Sistema Instrumental (HPLC)	Es determinada por la múltiple inyección de una solución al 100% de la concentración teórica de la sustancia (6 inyecciones).	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Coeficiente de variación, en cuanto al área (reproducibilidad) y tiempo de retención (constancia de flujo)
6-Reproducibilidad del método	Cada uno de dos analistas efectúa un perfil de disolución de 12 muestras del mismo lote en días diferentes usando el producto genérico.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Factor de diferencia (f_1) ▪ Factor de similitud (f_2) en cada punto temporal de muestreo

LINEALIDAD E INTERVALO (Rango)

Se preparó una solución madre de analito cuya concentración permite obtener por dilución una serie de soluciones de prueba de concentraciones: 50%, 75%, 100%, 125% y 150% de la concentración teórica del estándar. Se realizaron dos inyecciones de cada solución.

ESQUEMA PARA LA PREPARACIÓN DE LA SOLUCIONES ESTÁNDAR



PM Diclofenaco Sódico=318.1 g/mol, PM Diclofenaco Ácido= 296.2 g/mol

1 mg Diclofenaco Sódico \longrightarrow 1.0742 mg Diclofenaco Ácido

x mg Diclofenaco Sódico \longrightarrow 50 mg Diclofenaco Ácido

x = 53.71 mg Diclofenaco Sódico

Valoración real del estándar de Diclofenaco sódico usado:

53.71 mg Diclofenaco Sódico \longrightarrow 100%

x mg Diclofenaco Sódico \longrightarrow 100.6%

x = 53.4 mg Diclofenaco Sódico

EXACTITUD (Recobro, Linealidad del método, Precisión)

Se prepararon 3 soluciones estándar al 100% de la concentración teórica.

Luego, se montó la disolución en el equipo por triplicado de las soluciones de prueba siguientes:

Matriz + principio activo al 50% de la concentración teórica

Matriz + principio activo al 100% de la concentración teórica

Matriz + principio activo al 150% de la concentración teórica

Se realizó una inyección de cada solución según la secuencia:

- Estándar
- Matriz + principio activo al 50% de la concentración teórica
- Matriz + principio activo al 100% de la concentración teórica
- Matriz + principio activo al 150% de la concentración teórica

Se repitió esta secuencia 3 veces con las diferentes muestras y estándares preparados.

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE ESTÁNDAR

Ver esquema presentado en la metodología analítica propuesta página 21.

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE PRUEBA

Peso del principio activo al 50% de la concentración teórica:

$$4.5 \text{ mg DA} * \frac{100 \text{ mg DR}}{50 \text{ mg DA}} * \frac{50\% \text{ DR}}{52\% \text{ DR}} = 8.7 \text{ mg DR}$$

Peso del principio activo al 100% de la concentración teórica:

$$9 \text{ mg DA} * \frac{100 \text{ mg DR}}{50 \text{ mg DA}} * \frac{50\% \text{ DR}}{52\% \text{ DR}} = 17.3 \text{ mg DR}$$

Peso del principio activo al 150% de la concentración teórica:

$$13.5 \text{ mg DA} * \frac{100 \text{ mg DR}}{50 \text{ mg DA}} * \frac{50\% \text{ DR}}{52\% \text{ DR}} = 26.0 \text{ mg DR}$$

REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

Se prepararon 2 soluciones del estándar al 100% de la concentración teórica.

En el equipo disolutor se realizó un perfil de disolución de seis muestras preparadas al 100% y se muestrearon a los 60 minutos.

Ver esquema de la preparación de la solución de estándar, montaje de la disolución (preparación de la muestra y solución de prueba) presentado en la metodología analítica propuesta páginas 20-22.

PRECISION DEL SISTEMA INSTRUMENTAL (HPLC)

Se preparó una solución del estándar al 100% y se inyectó 6 veces. Ver esquema de la preparación de la solución de estándar presentado en la metodología analítica propuesta página 21.

REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO

Se prepararon 2 soluciones del estándar al 100% de la concentración teórica. En el equipo disolutor se realizó una disolución del producto Diclofenaco Suspensión genérico la cual debe estar al nivel del 100% de la concentración. Luego se muestrearon 10 mL de la disolución a los 30, 45, 60, 75 y 90 minutos. Ver esquema de la preparación de la solución de estándar, montaje de la disolución (preparación de la muestra y solución de prueba) presentado en la metodología analítica propuesta páginas 20-22.

Para esta prueba se necesitaron dos analistas cada uno realizó dos perfiles de disolución.

4.4.4 CUARTA ETAPA DE LA PARTE EXPERIMENTAL: COMPARACIÓN DE PERFILES INNOVADOR VRS GENÉRICO

Se preparó como se describe en la Reproducibilidad del método utilizando el producto innovador de Diclofenaco Suspensión (Cataflam Suspensión), excepto que solo es un analista quien realizó los perfiles de disolución.

CAPÍTULO V
RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 PRIMERA ETAPA DE LA PARTE EXPERIMENTAL: CONDICIONES DE DISOLUCIÓN

5.1.1 MEDIO DE DISOLUCIÓN

TABLA Nº 4: LECTURAS DE ABSORBANCIAS EN DIVERSOS MEDIOS DE DISOLUCIÓN A 273 nm

MEDIO DE DISOLUCION	ABSORBANCIA DEL ESTÁNDAR DE DICLOFENACO SÓDICO	ABSORBANCIA DE PRODUCTO TERMINADO	ABSORBANCIA DE DICLOFENACO RESINATO	ABSORBANCIA DEL PLACEBO
AGUA	0.478	0.427	0.0138	0.484
HCl 0.1 N	No se solubiliza	0.420	0.016	0.465
BUFFER pH 2.5	No se solubiliza	0.424	0.027	0.465
BUFFER pH 6.8	0.482	0.511	0.207	0.483
BUFFER pH 7.2	0.474	0.611	0.211	0.494
BUFFER pH 8.0	0.482	0.677	0.214	0.513
NaOH 0.1 N	0.519	NR	0.163	0.750
LSS 0.5%	0.348	NR	0.380	0.328
LSS 1.0%	0.346	NR	0.377	NR
LSS 2.0%	0.381	NR	0.407	0.337

TABLA N° 5: LECTURAS DE ABSORBANCIAS EN DIVERSOS MEDIOS DE DISOLUCIÓN A 275 nm

MEDIO DE DISOLUCION	ABSORBANCIA DEL ESTANDAR DE DICLOFENACO SÓDICO	ABSORBANCIA DE PRODUCTO TERMINADO	ABSORBANCIA DE DICLOFENACO RESINATO	ABSORBANCIA DEL PLACEBO
AGUA	0.482	0.365	0.0139	0.414
HCl 0.1 N	No se solubiliza	0.359	0.016	0.398
BUFFER pH 2.5	No se solubiliza	0.361	0.028	0.397
BUFFER pH 6.8	0.486	0.453	0.209	0.417
BUFFER pH 7.2	0.477	0.557	0.213	0.433
BUFFER pH 8.0	0.486	0.641	0.216	0.465
NaOH 0.1 N	0.523	NR	0.164	0.803
LSS 0.5%	0.352	NR	0.384	0.284
LSS 1.0%	0.351	NR	0.382	NR
LSS 2.0%	0.387	NR	0.414	0.296

- En las Tablas N° 4 y 5 se observa que las lecturas de absorbancia obtenidas para Diclofenaco Resinato son mayores cuando se ha utilizado el Lauril Sulfato de Sodio 2.0% como posible medio de disolución lo que nos hace deducir que el principio activo a cuantificar es más soluble en dicho medio.
- En las Tablas N° 4 y 5 se observa que hay absorbancia por parte del Placebo lo que nos hace pensar que utilizar una Técnica Espectrofotométrica esta no sería selectiva para el principio activo en este producto, por lo que se empleará una Técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

- En las Tablas N° 4 y 5 se observa que las absorbancia del Diclofenaco Resinato no es muy diferente a las longitudes de onda de 273 nm y 275 nm.

PERFILES DE pH DEL DICLOFENACO RESINATO

TABLA N° 6: PERFIL DE pH DEL DICLOFENACO RESINATO A 273 nm Y 275 nm

PH	ABSORBANCIA DICLOFENACO RESINATO (273 nm)	ABSORBANCIA DICLOFENACO RESINATO (275 nm)
1.0	0.016	0.016
2.5	0.027	0.028
6.8	0.207	0.209
7.2	0.211	0.213
8.0	0.214	0.216
13.0	0.163	0.164

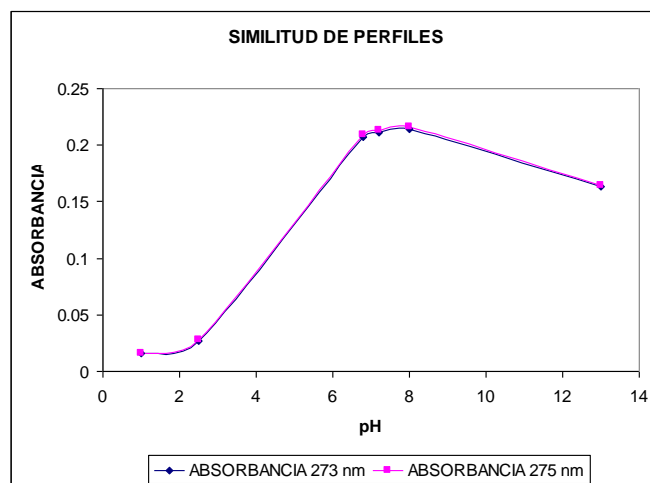


Fig. N° 6: PERFIL DE pH DEL DICLOFENACO RESINATO A 273 nm Y 275 nm

- En la Tabla N° 6 y Figura N° 6 se observa que el Diclofenaco Resinato es más soluble al hacer uso de medios de disolución con carácter alcalino en un rango de 6.8-8.0 como lo son el buffer fosfato pH 6.8, 7.2 y 8.0 siendo en este último mayor la lectura de absorbancia.
- En la Figura N° 6 se observa un perfil de pH del Diclofenaco Resinato muy similar para las longitudes de onda de 273 nm y 275 nm.

5.1.2 VELOCIDAD DE AGITACIÓN

TABLA N° 7: RESULTADOS DE DISOLUCIÓN EMPLEANDO 50 RPM

MEDIO DE DISOLUCION	PROMEDIOS DE PORCENTAJE DE DISOLUCION
LSS 0.5%	70
LSS 1.0%	79
LSS 2.0%	91

- En la Tabla N° 7 los resultados fueron obtenidos haciendo uso de un cromatografo líquido de alta resolución y se observa que el mayor porcentaje de disolución se tiene al hacer uso del Lauril Sulfato de Sodio al 2.0% cuando se emplean 50 rpm como velocidad de agitación.

TABLA N° 8: RESULTADOS DE DISOLUCIÓN EMPLEANDO 60 RPM y 75 RPM EN LAURIL SULFATO DE SODIO 2%

Nombre del producto genérico: Diclofenaco Suspensión 9 mg/5 mL			
Prueba: Disolución		Principio activo: Diclofenaco Resinato	
METODO	HPLC		HPLC
VELOCIDAD DE AGITACIÓN	60 rpm		75 rpm
	91		80
	82		89
	76		94
	89		86
	92		87
	92		91
PROMEDIO	87		88
Min (mg)	76		80
Max (mg)	92		94
SD	6.57		4.79
RSD%	7.55		5.46
VARIANZA	43.20		22.97
PROMEDIO	87	F-Test	1.88
RSD(%)	6.29	t-Test	0.25

- En la Tabla N° 8 se observa que no hay diferencia estadística significativa en los promedio del porcentaje de disolución al realizar la disolución empleando 60 rpm y 75 rpm pero sí en el coeficiente de variación ó RSD el cual es más estrecho al usar las 75 rpm.

5.2 SEGUNDA ETAPA DE LA PARTE EXPERIMENTAL: SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Se probó las condiciones del sistema cromatográfico descrito en el contenido de Tabletas de Diclofenaco Sódico de la USP 29 y se aplicó a la prueba de disolución de la Suspensión de Diclofenaco, para ver si este funcionaba adecuadamente lo cual se comprobará al realizar la adecuabilidad del sistema.

- Al probar las condiciones del sistema cromatográfico descrito en el contenido de Tabletas de Diclofenaco Sódico de la USP 29 y aplicarlas a nuestra prueba de disolución de la Suspensión de Diclofenaco, se observa que este funciona adecuadamente.

5.3 TERCERA ETAPA DE LA PARTE EXPERIMENTAL: VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA PROPUESTA

LINEALIDAD E INTERVALO (Rango)

TABLA Nº 9: ÁREAS DEL ESTÁNDAR (FASE MOVIL-FASE MÓVIL)

ESTANDAR ($\mu\text{g/mL}$)	AREA	TIEMPO DE RETENCION (Minutos)
5.0	99551	6.733
5.0	99375	6.728
7.5	148046	6.728
7.5	148859	6.727
1.0	200750	6.725
1.0	201305	6.728
12.5	249528	6.728
12.5	250729	6.729
15.0	297419	6.727
15.0	297155	6.726

TABLA Nº 10: RESULTADOS LINEALIDAD 1

Coeficiente de correlación (r)	1.00
Coeficiente de determinación (r^2)	1.00
Coeficiente de variación de los factores De respuesta (f)	1
Pendiente (b)	19893
Intervalo de confianza de la pendiente	19600.83 – 20185.17
Prueba t de Student de la pendiente	157.01 (Tablas= 2.306)
Intervalo de confianza de a	-2757.03 – 3441.03
Rango Lineal	0.005 – 0.015 mg/mL

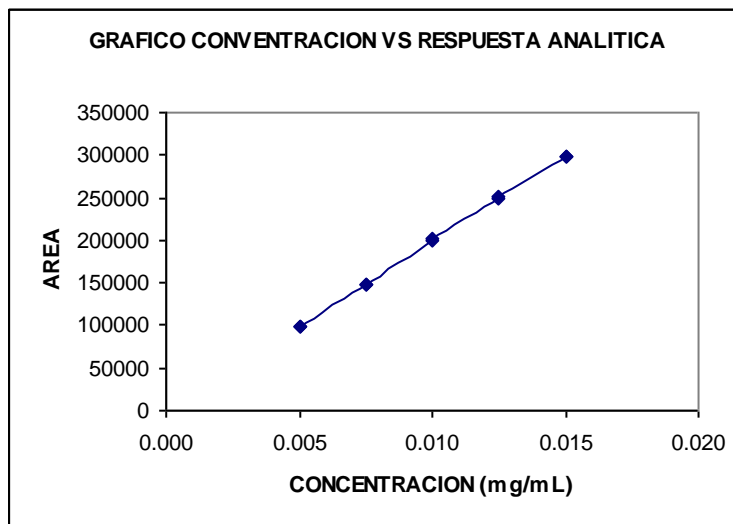


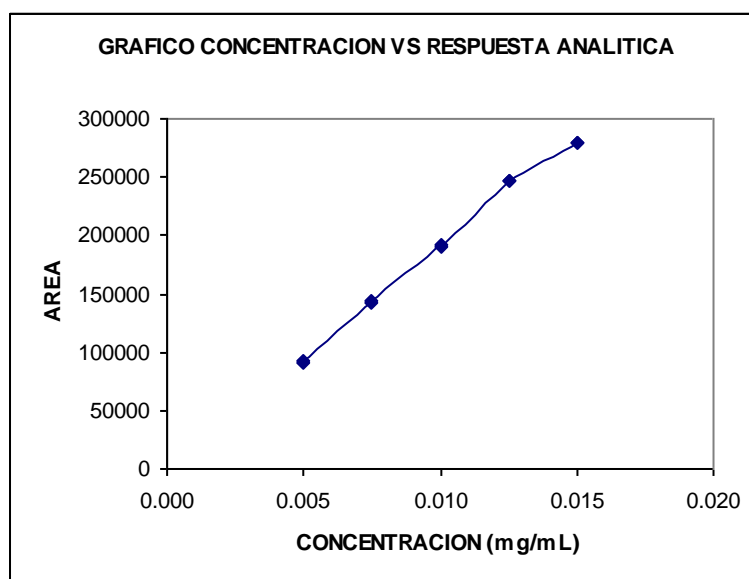
Fig. N° 7: REPRESENTACIÓN GRÁFICA LINEALIDAD 1

TABLA N° 11: ÁREAS DEL ESTÁNDAR (FASE MOVIL-LAURIL SULFATO DE SODIO 2%)

ESTANDAR ($\mu\text{g/mL}$)	AREA	TIEMPO DE RETENCION (Minutos)
5.0	91390	6.764
5.0	92375	6.768
7.5	143057	6.769
7.5	143935	6.770
1.0	191606	6.769
1.0	190819	6.771
12.5	246494	6.773
12.5	247357	6.778
15.0	279818	6.775
15.0	279319	6.776

TABLA Nº 12: RESULTADOS LINEALIDAD 2

Coeficiente de correlación (r)	1.00
Coeficiente de determinación (r^2)	0.99
Coeficiente de variación de los factores De respuesta (f)	3
Pendiente (b)	19152.06
Intervalo de confianza de la pendiente	17985.19 – 20318.81
Prueba t de Student de la pendiente	37.85 (Tablas= 2.306)
Intervalo de confianza de a	-13279.49 – 11472.29
Rango lineal	0.005 – 0.015 mg/mL

**Fig. Nº 8: REPRESENTACIÓN GRÁFICA LINEALIDAD 2**

- En las Figuras N° 7 y 8 se observa que la línea de la representación gráfica de la Linealidad 1 es más recta que la de la Linealidad 2.

- En los resultados de las Tablas N° 10 y 12 se cumplen las siguientes condiciones, para que exista Linealidad:

Primero: El valor obtenido para el coeficiente de correlación es 1, lo que indica que existe una correlación positiva (grado de relación entre la variable **x** (concentración) y **y** (respuesta)) con una probabilidad superior al 99.9% ya que $r(8, 0.001) = 0.872$.

Segundo: Un coeficiente de variación de los factores de respuesta (relación entre la lectura y la concentración) menor de 5% indica linealidad.

Tercero: Los valores de pendiente obtenidos son diferentes de **cero**. Si estos valores fueran igual a cero significaría que la recta es paralela al eje de abscisas y no habría regresión.

Cuarto: Los intervalos de confianza de la pendiente **b** no incluyen el **cero**.

Quinto: Ya que $t_{exp} > t_{tab}$ de la pendiente indica que la probabilidad de que esta sea distinta de cero es muy elevada.

Sexto: Los intervalos de confianza del término independiente **a** incluyen el **cero** lo que indica que existe una proporcionalidad adecuada entre concentración y respuesta por lo que el sesgo (error sistemático del método) es mínimo.

Ya que los resultados de linealidad cumplen para ambas formas de preparar el estándar se usará la segunda (Fase móvil-Lauril Sulfato de Sodio 2%) por tres razones principales: La primera es que de esta manera tanto el estándar como la muestra se encuentran en la misma situación, la segunda es que resulta mucho más económico pues la fase móvil lleva metanol HPLC en elevada proporción, la tercera es que se produce menor contaminación al medio ambiente.

RECOBRO

RECOBRO UTILIZANDO 75 RPM COMO VELOCIDAD DE AGITACIÓN

TABLA N° 13: ÁREAS DE ESTÁNDARES DEL RECOBRO 75 RPM

ESTANDARES	AREAS	PROMEDIO
ST1	201536	201106
	200675	
ST2	203551	203359
	203166	
ST3	200514	201605
	202696	

TABLA N° 14: ÁREAS DE MUESTRAS DEL RECOBRO 75 RPM

SERIE	MUESTRA	AREA
1	50%	94654
2		101137
3		97609
1	100 %	192509
2		186212
3		197961
1	150%	205572
2		297761
3		292046

TABLA N° 15: RESULTADOS RECOBRO 75 RPM

Prueba de Cochran	0.9798 (Tablas= 0.8709)
Prueba t de Student	5.956 (Tablas= 2.306)
Porcentaje de recobro	93.14

- En la Tabla N° 15 del Recobro en el que se usó 75 rpm como velocidad de agitación se observa que los resultados de la "G" de Cochran y "t" de Student no cumplen pues la $G_{exp} > G_{tab}$ y la $t_{exp} > t_{ab.}$, razón por la que se decidió probar el recobro usando 100 rpm como velocidad de agitación.

RECOBRO UTILIZANDO 100 RPM COMO VELOCIDAD DE AGITACIÓN

TABLA N° 16: ÁREAS DE ESTÁNDARES DEL RECOBRO 100 RPM

ESTANDARES	AREAS	PROMEDIO
ST1	227161	227840
	228519	
ST2	236628	237086
	237543	
ST3	230945	231285
	231625	

TABLA N° 17: ÁREAS DE MUESTRAS DEL RECOBRO 100 RPM

SERIE	MUESTRA	AREA
1	50%	110434
2		118174
3		121953
1	100 %	212532
2		222311
3		238742
1	150%	328975
2		324303
3		359469

TABLA N° 18: RESULTADOS RECOBRO Y LINEALIDAD DEL MÉTODO

Prueba de Cochran	0.7084 (Tablas= 0.8709)
Prueba t de Student	1.0632 (Tablas= 2.306)
Porcentaje de recobro	98.16
Coefficiente de correlación (r)	0.99
Coefficiente de determinación (r^2)	0.98
Coefficiente de variación de los factores De respuesta (f)	5
Pendiente (b)	0.95187
Intervalo de confianza de la pendiente	0.8365 – 1.0673
Prueba t de Student de la pendiente	19.51 (Tablas= 2.365)
Intervalo de confianza de a	- 10.155 – 14.873
Rango lineal	4.5 – 13.5 mg

- En la Tabla N° 18 del Recobro en el que se usó 100 rpm como velocidad de agitación se observan dos resultados importantes: $G_{exp} < G_{tab}$ para una probabilidad de 0.05 lo que significa que las varianzas de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes o dicho de otra forma el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados. Además, $t_{exp} < t_{tab}$ por lo que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100 confirmando así la buena exactitud del método.
- En la Tabla N° 18 del Recobro se observa que los resultados de la linealidad del método cumplen las siguientes condiciones:

Primero: El valor obtenido para el coeficiente de correlación es 0.99, lo que indica que existe una correlación positiva con una probabilidad superior al 99.9% ya que $r(9, 0.001) = 0.898$.

Segundo: Un coeficiente de variación de los factores de respuesta menor de 5% indica linealidad.

Tercero: Los valores de pendiente obtenidos son diferentes de **cero** por lo que si hay regresión lineal.

Cuarto: Los intervalos de confianza de la pendiente **b** no incluyen el **cero**.

Quinto: Ya que $t_{exp} > t_{tab}$ de la pendiente indica que la probabilidad de que esta sea distinta de cero es muy elevada.

Sexto: Los intervalos de confianza del término independiente **a** incluyen el **cero** lo que indica que existe una proporcionalidad adecuada entre concentración y respuesta por lo que el sesgo es mínimo.

TABLA N° 19: RESULTADOS PRECISIÓN

Número de Muestra	Porcentaje de recuperación
1	97
2	100
3	106
4	93
5	94
6	103
7	96
8	91
9	104
Promedio	98
RSD	5.4

- En la Tabla N° 20 de la Repetibilidad se cumplen dos resultados: $F_{exp} < F_{tab}$ para una probabilidad de 0.05 lo que significa que las varianzas son significativamente iguales y $t_{exp} < t_{tab}$ por lo que no existe diferencia entre las medias lo que quiere decir que no existe diferencia significativa entre las precisiones del analista.

PRECISION DEL SISTEMA HPLC

TABLA N° 21: ÁREAS Y TIEMPOS DE RETENCION DE ESTÁNDAR 100%

ESTANDAR	AREA	TIEMPO DE RETENCION (Minutos)
100%	191606	6.769
100%	190819	6.771
100%	189689	6.772
100%	189849	6.774
100%	190383	6.774
100%	191109	6.774
PROMEDIO	190575.8	6.772
RSD	0.39	0.03

- En la Tabla N° 21 de la Precisión del sistema se deduce que este funciona apropiadamente independientemente de las condiciones externas.

REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO

TABLA N° 22: FACTOR DE DIFERENCIA EN LA REPRODUCIBILIDAD

NOMBRE DEL PRODUCTO GENÉRICO: DICLOFENACO MK 9 mg/5 mL SUSPENSION						
LOTE		6040150				
ANALISTA 1		MARIANELA VÁSQUEZ				
ANALISTA 2		ENRIQUE POSADA				
	TIEMPO	1	30	TIEMPO	2	45
	ANALISTA 1	ANALISTA 2	DIFERENCIA	ANALISTA 1	ANALISTA 2	DIFERENCIA
	94	88	6.00	92	88	4.00
	99	92	7.00	98	92	6.00
	94	87	7.00	93	86	7.00
	99	92	7.00	99	91	8.00
	94	87	7.00	92	87	5.00
	99	92	7.00	97	92	5.00
	93	87	6.00	92	86	6.00
	98	91	7.00	97	90	7.00
	93	86	7.00	91	85	6.00
	98	90	8.00	97	89	8.00
	93	86	7.00	92	85	7.00
	98	92	6.00	97	91	6.00
SUMATORIA	1152.00	1070.00	82.00	1137.00	1062.00	75.00
PROMEDIO	96	89	6.83	95	89	6.25
S	2.66	2.55	MAX MIN	2.96	2.68	
RSD	2.77	2.86		3.12	3.03	
MAX	99	92		99	92	
MIN	93	86		91	85	
criterio	cumple	cumple		cumple	cumple	
FACTOR DE DIFERENCIA f_1	8	cumple	FACTOR DE DIFERENCIA f_1	7	cumple	
	TIEMPO	3	60	TIEMPO	4	75
	ANALISTA 1	ANALISTA 2	DIFERENCIA	ANALISTA 1	ANALISTA 2	DIFERENCIA
	92	86	6.00	91	86	5.00
	97	90	7.00	96	89	7.00
	92	86	6.00	96	85	11.00
	98	90	8.00	97	89	8.00
	92	87	5.00	91	85	6.00
	96	91	5.00	95	90	5.00
	91	85	6.00	91	84	7.00
	95	89	6.00	94	88	6.00
	92	85	7.00	91	83	8.00
	96	88	8.00	94	86	8.00
	92	84	8.00	91	83	8.00
	96	89	7.00	95	88	7.00
SUMATORIA	1129.00	1050.00	79.00	1122.00	1036.00	86.00
PROMEDIO	94	88	6.58	94	86	7.17
S	2.47	2.32	MAX MIN	2.35	2.42	
RSD	2.62	2.65		2.52	2.81	
MAX	98	91		97	90	
MIN	91	84		91	83	
criterio	cumple	cumple		cumple	cumple	
FACTOR DE DIFERENCIA f_1	8	cumple	FACTOR DE DIFERENCIA f_1	8	cumple	

TABLA N° 22 continuación

NOMBRE DEL PRODUCTO GENÉRICO: DICLOFENACO MK 9 mg/5 mL SUSPENSION			
LOTE		6040150	
ANALISTA 1		MARIANELA VÁSQUEZ	
ANALISTA 2		ENRIQUE POSADA	
TIEMPO	5	90	
ANALISTA 1	ANALISTA 2	DIFERENCIA	
90	84	6.00	
95	87	8.00	
91	84	7.00	
95	85	10.00	
90	85	5.00	
93	84	9.00	
89	83	6.00	
93	86	7.00	
89	82	7.00	
94	86	8.00	
89	82	7.00	
94	87	7.00	
SUMATORIA	1102.00	1015.00	87.00
PROMEDIO	92	85	7.25
S	2.41	1.73	
RSD	2.62	2.05	
MAX	95	87	
MIN	89	82	
criterio	cumple	cumple	
FACTOR DE DIFERENCIA f_1	9	cumple	

FACTOR DE DIFERENCIA LIMITE
0 - 15

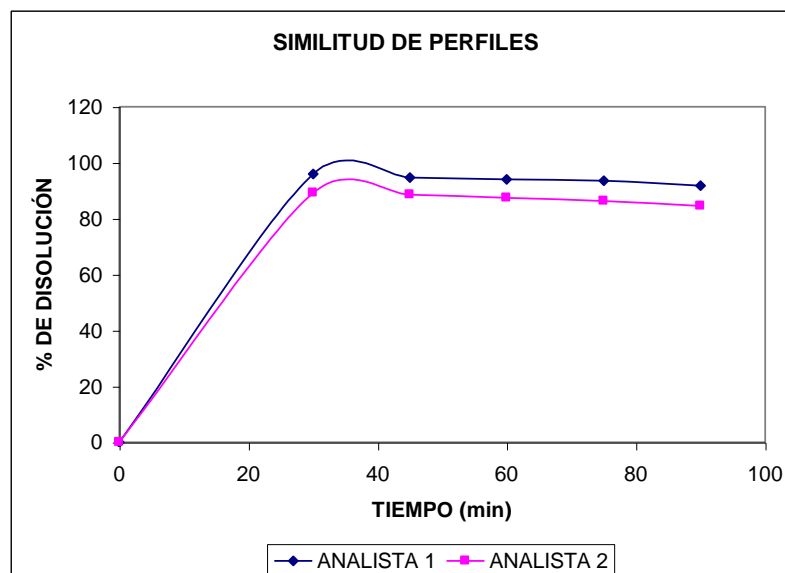
TABLA N° 23: FACTOR DE SIMILITUD EN LA REPRODUCIBILIDAD

Tiempo	30	45	60	75	90
f_2	58	59	59	58	58

Límite Factor de Similitud: 50 - 100

TABLA N° 24: SIMILITUD DE PERFILES EN LA REPRODUCIBILIDAD

TIEMPO (min)	ANALISTA 1	ANALISTA 2
0	0	0
30	96	89
45	95	89
60	94	88
75	94	86
90	92	85

**Fig. N° 9: SIMILITUD DE PERFILES EN LA REPRODUCIBILIDAD**

- En las Tablas N° 22 y 23 de la Reproducibilidad del método se observa que se cumple el Factor de Diferencia (Límite 0-15) y el Factor de Similitud (Límite 50-100) para el producto Diclofenaco Suspensión genérico de los datos obtenidos por el Analista 1 y Analista 2. Lo que indica que hay reproducibilidad en el método.
- En la Figura N° 9 de Similitud de Perfiles en la Reproducibilidad se observa gráficamente que los perfiles de disolución realizados por los Analistas 1 y 2 son similares ya que tienen un comportamiento de disolución semejante.

5.4 CUARTA ETAPA DE LA PARTE EXPERIMENTAL: COMPARACIÓN DE PERFILES INNOVADOR VRS GENÉRICO

TABLA Nº 25: FACTOR DE DIFERENCIA EN LA COMPARACIÓN DE PERFILES INNOVADOR VRS GENÉRICO

NOMBRE DEL PRODUCTO GENÉRICO:		DICLOFENACO MK 9 mg/5 mL SUSPENSIÓN			
LOTE:		06040150			
NOMBRE DEL PRODUCTO INNOVADOR:		CATAFLAM SUSPENSIÓN			
LOTE:		N0030			

	TIEMPO 1			TIEMPO 2		
	INNOVADOR	GENÉRICO	DIFERENCIA	INNOVADOR	GENÉRICO	DIFERENCIA
	89	94	5.00	91	92	1.00
	96	99	3.00	99	98	1.00
	90	94	4.00	91	93	2.00
	88	99	11.00	98	99	1.00
	94	94	0.00	92	92	0.00
	86	99	13.00	98	97	1.00
	87	93	6.00	87	92	5.00
	91	98	7.00	95	97	2.00
	87	93	6.00	95	91	4.00
	92	98	6.00	96	97	1.00
	88	93	5.00	90	92	2.00
	95	98	3.00	99	97	2.00
SUMATORIA	1083.00	1152.00	69.00	1131.00	1137.00	22.00
PROMEDIO	90	96	5.75	94	95	0.50
S	3.36	2.66	MAX	3.98	2.96	MIN
RSD	3.72	2.77		4.22	3.12	
MAX	96	99		99	99	
MIN	86	93		87	91	
criterio	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple	
FACTOR DE DIFERENCIA f₁	6	cumple	FACTOR DE DIFERENCIA f₁	2	cumple	

	TIEMPO 3			TIEMPO 4		
	INNOVADOR	GENÉRICO	DIFERENCIA	INNOVADOR	GENÉRICO	DIFERENCIA
	91	92	1.00	90	91	1.00
	98	97	1.00	97	96	1.00
	92	92	0.00	90	96	6.00
	97	98	1.00	96	97	1.00
	90	92	2.00	90	91	1.00
	98	96	2.00	97	95	2.00
	93	91	2.00	87	91	4.00
	96	95	1.00	94	94	0.00
	91	92	1.00	87	91	4.00
	95	96	1.00	93	94	1.00
	91	92	1.00	91	91	0.00
	99	96	3.00	97	95	2.00
SUMATORIA	1131.00	1129.00	16.00	1109.00	1122.00	23.00
PROMEDIO	94	94	0.17	92	94	1.08
S	3.28	2.47	MAX	3.78	2.35	MIN
RSD	3.48	2.62		4.09	2.52	
MAX	99	98		97	97	
MIN	90	91		87	91	
criterio	cumple	cumple	cumple	cumple		
FACTOR DE DIFERENCIA f₁	1	cumple	FACTOR DE DIFERENCIA f₁	2	cumple	

TABLA N° 25 continuación

NOMBRE DEL PRODUCTO GENÉRICO:		DICLOFENACO MK 9 mg/5 mL SUSPENSIÓN	
LOTE:		06040150	
NOMBRE DEL PRODUCTO INNOVADOR:		CATAFLAM SUSPENSIÓN	
LOTE:		N0030	

TIEMPO	5	90	
INNOVADOR	GENÉRICO	DIFERENCIA	
88	90	2.00	
95	95	0.00	
87	91	4.00	
94	95	1.00	
88	90	2.00	
95	93	2.00	
87	89	2.00	
92	93	1.00	
89	89	0.00	
93	94	1.00	
88	89	1.00	
94	94	0.00	
SUMATORIA	1090.00	1102.00	16.00
PROMEDIO	91	92	1.00
S	3.27	2.41	
RSD	3.60	2.62	
MAX	95	95	
MIN	87	89	
criterio	cumple	cumple	
FACTOR DE DIFERENCIA f_1	1	cumple	

FACTOR DE DIFERENCIA	LIMITE
	0 - 15

TABLA N° 26: FACTOR DE SIMILITUD EN LA COMPARACIÓN DE PERFILES INNOVADOR VRS GENÉRICO

Tiempo	30	45	60	75	90
f_2	62	69	73	75	77

Límite Factor de Similitud: 50 - 100

TABLA N° 27 SIMILITUD DE PERFILES INNOVADOR VRS GENÉRICO

TIEMPO (min)	INNOVADOR	GENÉRICO
0	0	0
30	90	96
45	94	95
60	94	94
75	92	94
90	91	92

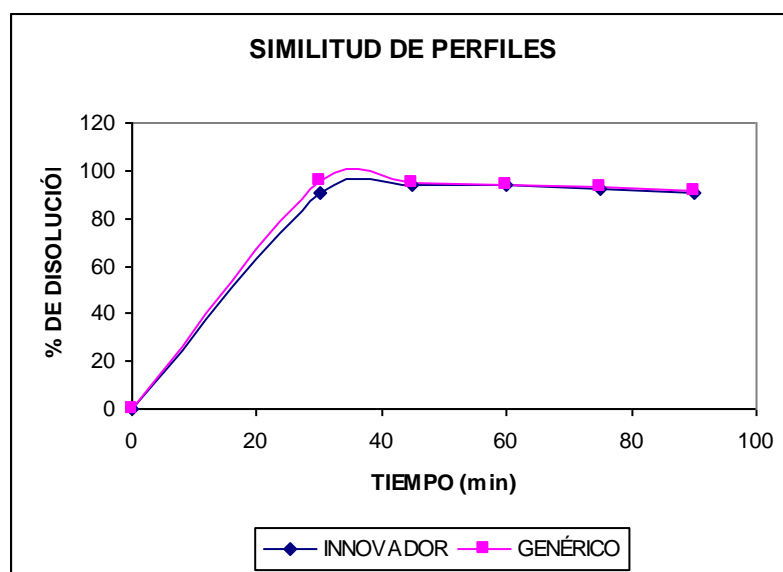


Fig. N° 10: SIMILITUD DE PERFILES INNOVADOR VRS GENÉRICO

- En las Tablas N° 25 y 26 de la Comparación de Perfiles de Disolución entre el producto innovador (Cataflam Suspensión) y el producto genérico (Diclofenaco Suspensión) se observa que se cumple el factor de diferencia y el factor de similitud de los datos obtenidos por el Analista 1.

- En la Figura N° 10 de Similitud de Perfiles Innovador vrs. Générico se observa gráficamente que los perfiles de disolución realizados por el Analista 1 son similares ya que tienen un comportamiento de disolución para ambos productos semejantes.

CUADRO Nº 2: DICTAMEN DE VALIDACIÓN

	PARÁMETRO	RESULTADO	LIMITE	CRITERIO
1-Linealidad del Sistema	Coeficiente de correlación (r)	1	≥ 0.99	Cumple
	Coeficiente de determinación (r^2)	0.99	≥ 0.98	Cumple
	Coeficiente de variación de los factores de respuesta (CV_i)	3	$\leq 5\%$	Cumple
	Pendiente (b)	19152.06	$\neq 0$	-
	Intervalo de confianza de la pendiente	17985.19 – 20318.81	No debe incluir el cero	Cumple
	Prueba t de Student de la pendiente	t exp = 37.85	t exp > t tab	Cumple
		t tab = 2.306		
	Intervalo de confianza del intercepto (a)	- 13279.49 – 11472.29	Debe incluir el cero	Cumple
Rango lineal	0.005 – 0.015 mg/mL	-	-	
2- Exactitud	Recobro			
	Prueba de Cochran	G exp = 0.7084	G exp < G tab	Cumple
		G tab = 0.8709		
	Prueba t de Student	t exp = 1.0632	t exp < t tab	Cumple
		t tab = 2.306		
	Porcentaje de recobro	98.16	98 – 102%	Cumple
	Linealidad del Método			
	Coeficiente de correlación (r)	0.99	≥ 0.99	Cumple
	Coeficiente de determinación (r^2)	0.98	≥ 0.98	Cumple
	Coeficiente de variación de los factores de respuesta (CV_i)	5	$\leq 5\%$	Cumple
	Pendiente (b)	0.95187	$\neq 0$	-
	Intervalo de confianza de la pendiente	0.8365 – 1.0673	No debe incluir el cero	Cumple
	Prueba t de Student de la pendiente	t exp = 19.51	t exp > t tab	Cumple
		t tab = 2.365		
	Intervalo de confianza del intercepto (a)	- 10.155 – 14.073	Debe incluir el cero	Cumple
Rango lineal	4.5 – 13.5 mg	-	-	
Precisión				
Promedio de datos	98	-	-	
Coeficiente de variación	5	$\leq 10\%$	Cumple	
3- Repetibilidad del método	Promedio	94.1	-	-
	Coeficiente de variación	2.62	$\leq 3\%$	Cumple
	Prueba Fisher	F exp = 1.56	F exp < F tab	Cumple
		F tab = 5.05		
Prueba t de Student	t exp = 0.57	t exp < t tab	Cumple	
	t tab = 2.23			

CUADRO N° 2 continuación

	PARÁMETRO	RESULTADO	LIMITE	CRITERIO
4- Precisión del sistema	Coeficiente de variación	Área = 0.39 (Reproducibilidad)	≤ 1.5%	Cumple
		Tiempo de retención = 0.03 (Constancia de flujo)		
5- Reproducibilidad	Factor de diferencia	8, 7, 8,8,9	0 – 15	Cumple
	Factor de similitud	58, 59, 59, 58, 58	50 – 100	Cumple

CUADRO N° 3: COMPARACIÓN DE PERFILES INNOVADOR VRS GENÉRICO

	PARÁMETRO	RESULTADO	LIMITE	CRITERIO
Comparación de Perfiles de disolución	Factor de diferencia	6, 2, 1,2,1	0 – 15	Cumple
	Factor de similitud	62, 69, 73, 75, 77	50 – 100	Cumple

CAPÍTULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. Los resultados de la primera etapa de la parte experimental condujeron a definir las condiciones de disolución de la siguiente manera:

Medio de disolución: Lauril Sulfato de Sodio al 2%. El Diclofenaco Resinato resultó ser más soluble en pHs alcalinos y efectivamente el pH de esta solución es de 9.0, por lo que este es el medio de disolución más apropiado.

Velocidad de agitación: 100 rpm. Lo cual se comprobó al realizar el recobro de disolución ya que cuando este se hizo empleando 75 rpm no se obtuvieron resultados satisfactorios en el porcentaje de recobro.

Tiempo de disolución: 60 minutos. Este parámetro se adoptó de la Metodología Analítica de disolución del Ibuprofeno Suspensión.

Longitud de onda: 275 nm. No hubo una diferencia grande entre las lecturas de absorbancias de 273 nm y 275 nm, y ya que en la Metodología Analítica del Ensayo de Diclofenaco Suspensión se emplea una longitud de onda 275 nm se optó por emplear esta misma en la prueba de Disolución

2. La técnica para desarrollar esta validación es la de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC) pues es selectiva para el Diclofenaco, no así la técnica espectrofotométrica la cual no es selectiva pues suma la señal del Placebo con la señal del Diclofenaco Resinato.

3. El método es lineal, exacto, preciso (repetible) y reproducible en el rango de concentración de 4.5-13.5 mg (50-150%). Pues se cumple con los criterios establecidos para cada una de estas pruebas.

4. De la comparación del producto Diclofenaco Suspensión genérico con el innovador podemos decir que ambos productos tienen un comportamiento de disolución similar.

5. Esta Metodología Analítica de Disolución de Diclofenaco Suspensión se Dictamina como Validada pues cumple con todos los criterios establecidos. Por lo que puede ser empleada por otros laboratorios que produzcan este producto y estén interesados en realizar esta prueba. Sin olvidar realizar la prueba de Reproducibilidad entre laboratorios haciendo uso de los resultados obtenidos en esta investigación para dicha comparación.

CAPÍTULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Validar todo método analítico que sea utilizado para el análisis rutinario en un laboratorio pues este ofrece un alto grado de confianza y seguridad en el método utilizado y en la calidad de los resultados disminuyendo los costos de los análisis pues ayuda a evitar repeticiones.
2. Tomar en cuenta las Buenas Prácticas de Laboratorio pues con ello se garantiza la seguridad de los resultados. Estas normas incluyen, entre otros, los aspectos siguientes:

Buena organización funcional, Personal suficiente y capacitado, Instalaciones adecuadas y suficientes, Equipos y aparatos apropiados, calibrados y en buen estado de funcionamiento los cuales posean toda la documentación que los avale (Registro de calibraciones efectuadas, Historial de mantenimiento, Registro de horas de funcionamiento), Utilización de reactivos apropiados, patrones y muestras de referencia correctos, Procedimientos apropiados para toma de muestras, Verificación-Supervisión de los resultados obtenidos y que los registros de los análisis sean auditables.
3. Hacer uso del apartado <1092> de la USP 30 para el desarrollo y validación de la prueba disolución pues es una buena guía que nos facilitará todo este procedimiento.

4. Cumplir a cabalidad las indicaciones dadas por la metodología analítica validada.

5. Realizar una buena investigación bibliográfica del principio activo. Partiendo de la información proveída por el fabricante, pues esta es la primera fuente donde podemos encontrar características importantes tales como solubilidad, técnica analítica usada por el proveedor y otros. Así como de otras fuentes que nos puedan simplificar el trabajo de desarrollo y validación de una nueva metodología analítica.

6. Revalidar cuando se ha introducido un cambio significativo en las condiciones originales en las que se ha realizado la validación como:
Modificaciones en la muestra problema (cambios cualitativos o cuantitativos de excipientes en el producto terminado, variación en el proceso de síntesis de la materia prima, etc), Cambio de laboratorio (cuando un método desarrollado y validado por el Departamento de Desarrollo pasa al Laboratorio de Control de Calidad), Si el método analítico lleva largo tiempo utilizándose y quiere demostrarse que el laboratorio sigue obteniendo resultados fiables.

BIBLIOGRAFIA

1. Adeyeye C. y otros, 1990, Analytical Profiles of Drug Substances, Pittsburgh, Pennsylvania, Academic Press Inc., 123-144 p.
2. American Pharmaceutical Association, 1994, Handbook of Pharmaceutical Excipients, Second edition, Washington, 448-450 p.
3. Brown C. y otros, Acceptable Analytical Practices for Dissolution Testing of Poorly Soluble Compounds (en línea), Pharmaceutical Technology, 2004. Disponible en: [www. Pharmtech.com](http://www.Pharmtech.com)
4. Breaux J. y otros, 2003, Understanding and Implementing Efficient Analytical Methods Development and Validation (en línea), Pharmaceutical Technology. Disponible en: [www. Pharmtech.com](http://www.Pharmtech.com)
5. Cohen Y., 2001, Análisis Químicos Farmacéuticos de Medicamentos, 1era Ed., México D.F., Editorial Limusa S.A. de C.V., Capítulo 5.
6. Castro M. y otros, Validación de Métodos Analíticos, Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 19-26 p., 41 p.

7. Convención Farmacopeica Inc., Farmacopea de los Estados Unidos de América 30ª Ed. y Formulario Nacional 25ª Ed., Rockville MD, United States, 2006, 638-644 p.
8. Gennaro A., Remington Farmacia, 19ª Ed., Buenos Aires, Argentina, Editorial Médica Panamericana S.A., 1998, 2323-2333 p.
9. International Conference of Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use, Validaton of Analytical procedures: Methodology, ICH-Q2B, Geneva 1996.
10. Moffat A. y otros, 2004, Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material, 3era Ed., Illinois, USA, Pharmaceutical Press, Capítulo 29 y 904-906 p.
11. Pharmacopeial Convention Inc., Pharmacopeial Forum, Vol. 31, Rockville MD, United States, Sep-Oct 2005, Apartado <1092> y 1350-1354 p.
12. The United States Pharmacopeia, 29th and NF 24, Pharmacopeial Convention Inc., Rockville MD, United Sates, 2005, Apartados <621>, <711> y <1225>, 2878-2879 p., 2912-2913 p., 3328-3331 p., 746-748 p., 1255-1257 p., 1493-1494 p., 1004-1005 p.

13. www.estio.ujaen.es/Asignaturas/Eps/esapli/TablasEstadisticas.pdf, Tablas estadísticas.
14. www.fda.gov/cder/audiences/iact/1713bp1.htm
15. Wrezel P. y otros, Validation and Implementation of In-Process Control HPLC Assays for Active Pharmaceutical Ingredients (en línea), Illinois, Regis Technologies, 2004. Disponible en: www.Chromatographyonline.com
16. Zerquera A. y otros, Septiembre-Diciembre 2000, Resinas de Intercambio Iónico para prolongar la liberación de los fármacos (en línea), Vol. 34, No. 3, La Habana, Cuba, Rev. Cubana Farm.,. Disponible en: www.scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034515200000300007&lng=es&nrm=is
17. Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos Administración de Alimentos y Drogas Centro de Evaluación e Investigación de Drogas (CDER) Guía para la industria. Pruebas de disolución de formas de dosificación oral sólidas de liberación inmediata. Agosto de 1997. Disponible en: www.fda.gov/cder/guidance.htm

ANEXOS

ANEXO N° 1

TABLA DE SIGNIFICACIÓN "r" (6)

g.l.	p			
	0.1	0.05	0.01	0.001
1	0.968	0.997	1.000	1.000
2	0.900	0.950	0.990	0.999
3	0.805	0.878	0.959	0.991
4	0.729	0.811	0.917	0.974
5	0.669	0.755	0.875	0.951
6	0.622	0.707	0.834	0.925
7	0.582	0.666	0.798	0.898
8	0.549	0.632	0.765	0.872
9	0.521	0.602	0.735	0.847
10	0.497	0.576	0.708	0.823
11	0.476	0.553	0.684	0.801
12	0.458	0.532	0.661	0.780
13	0.441	0.514	0.641	0.760
14	0.426	0.497	0.623	0.742
15	0.412	0.482	0.606	0.725
16	0.400	0.458	0.59	0.708
17	0.389	0.456	0.575	0.693
18	0.378	0.444	0.561	0.679
19	0.369	0.433	0.549	0.665
20	0.36	0.423	0.537	0.652
21	0.352	0.413	0.526	0.640
22	0.344	0.404	0.515	0.629
23	0.337	0.396	0.505	0.618
24	0.330	0.388	0.496	0.607
25	0.323	0.381	0.487	0.597
26	0.317	0.374	0.479	0.588
27	0.312	0.367	0.471	0.579
28	0.306	0.361	0.463	0.570
29	0.301	0.355	0.456	0.562
30	0.296	0.349	0.449	0.554
35	0.275	0.325	0.418	0.519
40	0.257	0.304	0.393	0.490
45	0.243	0.288	0.372	0.465
50	0.231	0.273	0.354	0.443
55	0.220	0.261	0.339	0.425
60	0.211	0.25	0.325	0.408
70	0.195	0.232	0.302	0.38
80	0.183	0.217	0.283	0.357
90	0.173	0.205	0.267	0.338
100	0.164	0.195	0.254	0.321
120	0.150	0.178	0.232	0.294
150	0.134	0.159	0.208	0.264
200	0.116	0.138	0.181	0.23

ANEXO N° 2

TABLA "t" DE STUDENT (6)

g.l.	<i>p</i>					
	0.100	0.050	0.025	0.010	0.005	0.001
1	6.31	12.71	25.452	63.657	-	-
2	2.920	4.303	6.205	9.925	14.089	31.598
3	2.353	3.182	4.176	5.841	7.453	12.941
4	2.132	2.776	3.495	4.604	5.598	8.61
5	2.015	2.571	3.163	4.032	4.773	6.859
6	1.943	2.447	2.969	3.707	4.317	5.959
7	1.895	2.365	2.841	3.499	4.029	5.405
8	1.860	2.306	2.752	3.355	3.832	5.041
9	1.833	2.262	2.685	3.250	3.690	4.781
10	1.812	2.228	2.634	3.169	3.581	4.587
11	1.796	2.201	2.593	3.106	3.497	4.437
12	1.782	2.179	2.56	3.055	3.428	4.318
13	1.771	2.160	2.533	3.012	3.372	4.221
14	1.761	2.145	2.510	2.977	3.326	4.140
15	1.753	2.131	2.490	2.947	3.286	4.073
16	1.746	2.120	2.473	2.921	3.252	4.015
17	1.740	2.110	2.458	2.898	3.222	3.965
18	1.734	2.101	2.445	2.878	3.197	3.922
19	1.729	2.093	2.433	2.861	3.174	3.883
20	1.725	2.086	2.423	2.845	3.153	3.850
21	1.721	2.080	2.414	2.831	3.135	3.819
22	1.717	2.074	2.406	2.819	3.119	3.792
23	1.714	2.069	2.398	2.807	3.104	3.767
24	1.711	2.064	2.391	2.797	3.090	3.745
25	1.708	2.060	2.385	2.787	3.078	3.725
26	1.706	2.056	2.379	2.779	3.067	3.707
27	1.703	2.052	2.373	2.771	3.056	3.690
28	1.701	2.048	2.368	2.763	3.047	3.674
29	1.699	2.045	2.364	2.756	3.038	3.659
30	1.697	2.042	2.360	2.750	3.030	3.646
35	1.690	2.030	2.342	2.724	2.996	3.591
40	1.684	2.021	2.329	2.704	2.971	3.551
45	1.679	2.014	2.319	2.690	2.952	3.520
50	1.676	2.008	2.310	2.678	2.937	3.496
55	1.673	2.004	2.304	2.669	2.925	3.476
60	1.671	2.000	2.299	2.660	2.915	3.46
70	1.667	1.994	2.290	2.648	2.889	3.435
80	1.664	1.989	2.284	2.638	2.887	3.416
90	1.662	1.986	2.279	2.631	2.878	3.402
100	1.661	1.982	2.276	2.625	2.871	3.39
120	1.658	1.98	2.27	2.617	2.860	3.373

ANEXO N° 3

TABLA "F" DE FISHER (13)

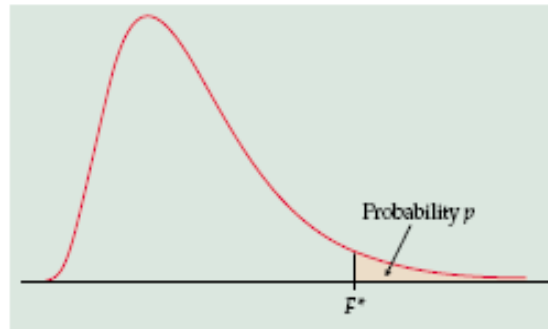


Table entry for p is the critical value F^* with probability p lying to its right.

TABLE E F critical values

		Degrees of freedom in the numerator								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Degrees of freedom in the denominator	p									
	1	.100	39.86	49.50	53.59	55.83	57.24	58.20	58.91	59.44
.050		161.45	199.50	215.71	224.58	230.16	233.99	236.77	238.88	240.54
.025		647.79	799.50	864.16	899.58	921.85	937.11	948.22	956.66	963.28
.010		4052.2	4999.5	5403.4	5624.6	5763.6	5859.0	5928.4	5981.1	6022.5
.001		405284	500000	540379	562500	576405	585937	592873	598144	602284
2	.100	8.53	9.00	9.16	9.24	9.29	9.33	9.35	9.37	9.38
	.050	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38
	.025	38.51	39.00	39.17	39.25	39.30	39.33	39.36	39.37	39.39
	.010	98.50	99.00	99.17	99.25	99.30	99.33	99.36	99.37	99.39
	.001	998.50	999.00	999.17	999.25	999.30	999.33	999.36	999.37	999.39
3	.100	5.54	5.46	5.39	5.34	5.31	5.28	5.27	5.25	5.24
	.050	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81
	.025	17.44	16.04	15.44	15.10	14.88	14.73	14.62	14.54	14.47
	.010	34.12	30.82	29.46	28.71	28.24	27.91	27.67	27.49	27.35
	.001	167.03	148.50	141.11	137.10	134.58	132.85	131.58	130.62	129.86
4	.100	4.54	4.32	4.19	4.11	4.05	4.01	3.98	3.95	3.94
	.050	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00
	.025	12.22	10.65	9.98	9.60	9.36	9.20	9.07	8.98	8.90
	.010	21.20	18.00	16.69	15.98	15.52	15.21	14.98	14.80	14.66
	.001	74.14	61.25	56.18	53.44	51.71	50.53	49.66	49.00	48.47
5	.100	4.06	3.78	3.62	3.52	3.45	3.40	3.37	3.34	3.32
	.050	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77
	.025	10.01	8.43	7.76	7.39	7.15	6.98	6.85	6.76	6.68
	.010	16.26	13.27	12.06	11.39	10.97	10.67	10.46	10.29	10.16
	.001	47.18	37.12	33.20	31.09	29.75	28.83	28.16	27.65	27.24
6	.100	3.78	3.46	3.29	3.18	3.11	3.05	3.01	2.98	2.96
	.050	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10
	.025	8.81	7.26	6.60	6.23	5.99	5.82	5.70	5.60	5.52
	.010	13.75	10.92	9.78	9.15	8.75	8.47	8.26	8.10	7.98
	.001	35.51	27.00	23.70	21.92	20.80	20.03	19.46	19.03	18.69
7	.100	3.59	3.26	3.07	2.96	2.88	2.83	2.78	2.75	2.72
	.050	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68
	.025	8.07	6.54	5.89	5.52	5.29	5.12	4.99	4.90	4.82
	.010	12.25	9.55	8.45	7.85	7.46	7.19	6.99	6.84	6.72
	.001	29.25	21.69	18.77	17.20	16.21	15.52	15.02	14.63	14.33

ANEXO N° 4

TABLA "G" DE COCHRAN PARA HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS ⁽¹³⁾

<i>k/n</i>	<i>p</i> = 0.05								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2	0.998	0.975	0.939	0.905	0.877	0.853	0.833	0.815	0.801
3	0.966	0.870	0.797	0.745	0.707	0.677	0.653	0.633	0.616
4	0.906	0.767	0.684	0.628	0.589	0.559	0.536	0.517	0.501
5	0.841	0.683	0.598	0.544	0.506	0.478	0.456	0.438	0.424
6	0.780	0.616	0.532	0.480	0.444	0.418	0.398	0.381	0.368
7	0.727	0.561	0.480	0.430	0.397	0.372	0.353	0.338	0.352
8	0.679	0.515	0.437	0.391	0.350	0.336	0.318	0.304	0.292
9	0.638	0.477	0.402	0.358	0.328	0.306	0.29	0.276	0.265
10	0.602	0.445	0.373	0.331	0.302	0.282	0.266	0.254	0.243

k = grupos

n = determinaciones por grupo

ANEXO N° 5

CÁLCULOS LINEALIDAD

LINEALIDAD USANDO FASE MÓVIL EN AMBAS DILUCIONES EN LA PREPARACIÓN DE ESTÁNDAR

TABLA N° 28: CÁLCULOS DE LOS RESULTADOS DE LA TABLA N° 9

	x (µg/mL)	y	xy (µg/mL)	x ² (µg/mL) ²	y ²
1	5.0	99551	497755	25	9910401601
2	5.0	99375	496875	25	9875390625
3	7.5	148046	1110345	56.25	21917618116
4	7.5	148859	1116442.5	56.25	22159001881
5	10.0	200750	2007500	100	40300562500
6	10.0	201305	2013050	100	40523703025
7	12.5	249528	3119100	156.25	62264222784
8	12.5	250729	3134112.5	156.25	62865031441
9	15.0	297419	4461285	225	88458061561
10	15.0	297155	4457325	225	88301094025
Sumatoria	100	1992717	22413790	1125	446575087559

$$\bar{x} = 10 \text{ } \mu\text{g / mL}$$

$$\bar{y} = 199271.70$$

CALCULO DE LA REGRESION LINEAL

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

$$b = \frac{2486620}{125}$$

$$b = 19893$$

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

$$a = 342$$

Ecuación $y = bx + a$

$$y = 19893x + 342$$

COEFICIENTE DE CORRELACION

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

$$r = \frac{2486620}{2487040.9966}$$

$$r = 0.999831$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION

$$r^2 = 0.9997$$

TEST DE LINEALIDAD

- COEFICIENTE DE VARIACION DE LOS FACTORES DE RESPUESTA (f)

TABLA N° 29: CÁLCULOS DE LOS FACTORES DE RESPUESTA 1

	x (µg/mL)	y	F (y/x) (µg/mL) ⁻¹
1	5.0	99551	19910.20
2	5.0	99375	19875.00
3	7.5	148046	19739.47
4	7.5	148859	19847.87
5	10.0	200750	20075.00
6	10.0	201305	20130.50
7	12.5	249528	19962.24
8	12.5	250729	20058.32
9	15.0	297419	19827.93
10	15.0	297155	19810.33

MEDIA (\bar{x})

$$\bar{x} = \frac{\sum x_1 + \sum x_2 + \sum x_3 + \dots + \sum x_n}{n}$$

MEDIA DE f = 19923.69

DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S)

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

DESVIACION ESTANDAR DE f = 128.8993

COEFICIENTE DE VARIACIÓN (RSD)

$$RSD = \frac{(S * 100)}{\bar{x}}$$

COEFICIENTE DE VARIACION DE f = 0.65

SIGNIFICACION ESTADISTICA DE LA VARIANZA DE LA PENDIENTE b

- VARIANZA DE LA PENDIENTE s^2_b

$$s^2_b = \frac{S^2_{y,x}}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}$$

$$s^2_b = \frac{2006734.375}{125}$$

$$s^2_b = 16053.875$$

- VARIANZA DEL ERROR EXPERIMENTAL TOTAL $s^2_{y,x}$

$$s^2_{y,x} = \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n - 2}$$

$$s^2_{y,x} = \frac{16053875}{8}$$

$$s^2_{y,x} = 2006734.375$$

- DESVIACION ESTANDAR O ERROR ESTANDAR DE LA PENDIENTE s_b

$$s_b = \sqrt{s^2_b}$$

$$s_b = \sqrt{16053.875}$$

$$s_b = 126.70$$

- DESVIACION ESTANDAR RELATIVA s_b

$$s_b rel (\%) = \frac{s_b * 100}{b}$$

$$s_b rel (\%) = \frac{126.70 * 100}{19893}$$

$$s_b rel (\%) = 0.64$$

- LIMITES DE CONFIANZA DE LA PENDIENTE

$$b \pm ts_b$$

$$t_{n-2,0.05} = 2.306$$

$$b = 19893$$

$$ts_b = 2.306 * 126.7 = 292.1702$$

$$b + ts_b = 19893 + 292.1702 = 20185.1702$$

$$b - ts_b = 19893 - 292.1702 = 19600.8298$$

- PRUEBA "t" DE STUDENT

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

$$t_{exp} = \frac{19893}{126.7}$$

$$t_{exp} = 157.01$$

$$t_{tablas} (n-2,0.05) = 2.306$$

TEST DE PROPORCIONALIDAD

- VARIANZA DEL TERMINO INDEPENDIENTE s_a^2

$$s_a^2 = s_b^2 \frac{\sum x^2}{n}$$

$$s_a^2 = 16053.875 * \frac{125}{10}$$

$$s_a^2 = 1806060.9375$$

- DESVIACION O ERROR ESTANDAR DEL TERMINO INDEPENDIENTE s_a

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

$$S_a = \sqrt{1806060.9375}$$

$$S_a = 1343.90$$

- DESVIACION ESTANDAR RELATIVA DEL TERMINO INDEPENDIENTE s_a

$$rel\%$$

$$s_a rel(\%) = \frac{S_a}{a} * 100$$

$$s_a rel(\%) = \frac{1343.90}{342} * 100$$

$$s_a rel(\%) = 392.95$$

- LIMITES DE CONFIANZA DEL TERMINO INDEPENDIENTE

$$a \pm ts_a$$

$$t_{n-2,0.05} = 2.306$$

$$a = 342$$

$$ts_a = 2.306 * 1343.90 = 3099.0334$$

$$a + ts_a = 342 + 3099.0334 = 3441.0334$$

$$a - ts_a = 342 - 3099.0334 = -2757.0334$$

▪ PRUEBA "t" DE STUDENT

$$t_{\text{exp}} = \frac{|a|}{s_a}$$

$$t_{\text{exp}} = \frac{342}{1343.90}$$

$$t_{\text{exp}} = 0.25$$

$$t_{\text{tablas}(10-2, 0.05)} = 2.306$$

LINEALIDAD USANDO FASE MÓVIL EN LA PRIMERA DILUCIÓN Y LAURIL SULFATO DE SODIO 2% EN LA SEGUNDA DILUCIÓN EN LA PREPARACIÓN DE ESTÁNDAR

TABLA N° 30: CÁLCULOS DE LOS RESULTADOS DE LA TABLA N° 11

	x (µg/mL)	y	xy (µg/mL)	x ² (µg/mL) ²	y ²
1	5.0	91390	456950	25	8352132100
2	5.0	92375	461875	25	8533140625
3	7.5	143057	1072927.5	56.25	2046530524
4	7.5	143935	1079512.5	56.25	2071728422
5	10.0	191606	1916060	100	3671285923
6	10.0	190819	1908190	100	3641189076
7	12.5	246494	3081175	156.25	6075929203
8	12.5	247357	3091962.5	156.25	6118548544
9	15.0	279818	4197270	225	7829811312
10	15.0	279319	4189785	225	7801910376
Sumatoria	100	1906170	21455707.5	1125	4094546065

$$\bar{x} = 10 \text{ (µg / mL)}$$

$$\bar{y} = 190617$$

CALCULO DE LA REGRESION LINEAL

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

$$b = \frac{23.94007.5}{125}$$

$$b = 19152.06$$

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

$$a = -\frac{9036}{10}$$

$$a = -903.6$$

Ecuación $y = bx + a$

$$y = 19152x - 903.6$$

COEFICIENTE DE CORRELACION

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

$$r = \frac{2394007.5}{2400682.18628}$$

$$r = 0.997220$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION

$$r^2 = 0.994$$

TEST DE LINEALIDAD

- COEFICIENTE DE VARIACION DE LOS FACTORES DE RESPUESTA (f)

TABLA N° 31: CÁLCULOS DE LOS FACTORES DE RESPUESTA 2

	x (µg/mL)	y	F (y/x) (µg/mL) ⁻¹
1	5.0	91390	18278.00
2	5.0	92375	18475.00
3	7.5	143057	19074.27
4	7.5	143935	19191.33
5	10.0	191606	19160.60
6	10.0	190819	19081.90
7	12.5	246494	19719.52
8	12.5	247357	19788.56
9	15.0	279818	18654.53
10	15.0	279319	18621.27

MEDIA DE f = 19004.50

DESVIACION ESTANDAR DE f = 502.62

COEFICIENTE DE VARIACION DE f = 2.64

SIGNIFICACION ESTADISTICA DE LA VARIANZA DE LA PENDIENTE b

- VARIANZA DE LA PENDIENTE s^2_b

$$s^2_b = \frac{s^2_{y,x}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

$$s^2_b = \frac{32003049.4438}{125}$$

$$s^2_b = 256024.396$$

- VARIANZA DEL ERROR EXPERIMENTAL TOTAL $s^2_{y,x}$

$$s^2_{y,x} = \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n - 2}$$

$$s^2_{y,x} = \frac{256024395.55}{8}$$

$$s^2_{y,x} = 32003049.444$$

- DESVIACION ESTANDAR O ERROR ESTANDAR DE LA PENDIENTE s_b

$$s_b = \sqrt{s^2_b}$$

$$s_b = 505.99$$

- DESVIACION ESTANDAR RELATIVA s_b

$$s_b rel(\%) = \frac{s_b}{b} * 100$$

$$s_b rel(\%) = \frac{505.99}{19152} * 100$$

$$s_b rel(\%) = 2.64$$

- LIMITES DE CONFIANZA DE LA PENDIENTE

$$b \pm ts_b$$

$$t_{n-2,0.05} = 2.306$$

$$b = 19152$$

$$ts_b = 1166.81$$

$$b + ts_b = 19152 + 1166.8129 = 20318.8129$$

$$b - ts_b = 19152 - 1166.8129 = 17985.1871$$

- PRUEBA "t" DE STUDENT

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

$$t_{exp} = \frac{19152}{505.99}$$

$$t_{exp} = 37.85$$

$$t_{tablas(10-2,0.05)} = 2.306$$

TEST DE PROPORCIONALIDAD

- VARIANZA DEL TERMINO INDEPENDIENTE

$$s_a^2 = s_b^2 \frac{\sum x^2}{n}$$

$$s_a^2 = 256024.3955 * \frac{(1125)}{10}$$

$$s_a^2 = 28802744.4938$$

- DESVIACION O ERROR ESTANDAR DEL TERMINO INDEPENDIENTE s_a

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

$$s_a = \sqrt{28802744.4938}$$

$$s_a = 5366.82$$

- DESVIACION ESTANDAR RELATIVA DEL TERMINO INDEPENDIENTE s_a

rel(%)

$$s_a rel(\%) = \frac{s_a}{a} * 100$$

$$s_a rel(\%) = \frac{5366.82}{903.6} * 100$$

$$s_a rel(\%) = 593.94$$

- LIMITES DE CONFIANZA DEL TERMINO INDEPENDIENTE

$$a \pm ts_a$$

$$t_{n-2,0.05} = 2.306$$

$$a = 903.6$$

$$ts_a = 2.306 * 5366.82 = 12375.8869$$

$$a + ts_a = -903.6 + 12375.8869 = 11472.29$$

$$a - ts_a = -903.6 - 12375.8869 = -13279.49$$

- PRUEBA "t" DE STUDENT

$$t_{\text{exp}} = \frac{|a|}{s_a}$$

$$t_{\text{exp}} = \frac{903.6}{5366.82}$$

$$t_{\text{exp}} = 0.17$$

$$t_{\text{tablas}(10-2,0.05)} = 2.306$$

ANEXO N° 6

CÁLCULOS RECOBRO

CÁLCULOS RECOBRO 75 RPM

TABLA N° 32: CÁLCULOS RECOBRO 75 RPM

% TEORICO	% RECOBRO	PROMEDIO	% MEDIA \pm s	S ² VARIANZA
Muestra 1 – 50	47.07, 49.73, 48.42	48.41	1.3333	1.7777
Muestra 2 – 100	95.73, 91.57, 98.19	95.16	3.3478	11.2079
Muestra 3 – 150	102.22, 146.41, 144.86	131.17	25.0808	629.0453

% RECOBRO MUESTRAS PREPARADAS AL 50%

201106 ——— 100%

94654 ——— **x**

x = 48.47%

203359 ——— 100%

101137 ——— **x**

x = 49.84%

201605 ——— 100%

97609 ——— **x**

x = 52.73%

TEST G DE COCHRAN

$$G_{exp} = \frac{s^2 \max}{s^2_1 + s^2_2 + s^2_3}$$

$$G_{exp} = \frac{629.0453}{1.7777 + 11.2079 + 629.0543}$$

$$G_{exp} = 0.9798$$

$$G_{tablas} (P = 0.05, K = 3, n = 3) = 0.8709$$

K= grupos

n= determinaciones por grupo

TEST DE STUDENT

TABLA N° 33: CÁLCULOS TEST DE ESTUDENT DEL RECOBRO 75 RPM

% TEORICO	RESULTADOS COMO % DE RECUPERACION		
Muestra 1 – 50	94.13	99.47	96.83
Muestra 2 – 100	95.73	91.57	98.19
Muestra 3 - 150	68.15	97.61	96.57

% DE RECUPERACION MUESTRAS PREPARADAS AL 50%

50 ——— 100%

47.07 ——— **x**

x = 94.13%

50 ——— 100%

49.73 ——— **x %**

x = 99.47%

50 ——— 100%

48.42 ——— **x**

x = 96.83%

Recuperación media (n=9) = 93.14

Desviación estándar s = 9.65513

Coefficiente de variación CV (%) = 10.366329

$$t_{\text{exp}} = \frac{|100 - R|\sqrt{n}}{CV}$$

$$t_{\text{exp}} = \frac{|100 - R|\sqrt{n}}{CV}$$

$$t_{\text{exp}} = 5.9558$$

$$t_{\text{tablas}} (P = 0.05, GL = 9 - 1 = 8) = 2.306$$

CÁLCULOS RECOBRO 100 RPM

TABLA N° 34: CÁLCULOS RECOBRO 100 RPM

% TEORICO	% RECOBRO	PROMEDIO	% MEDIA ± s	S ² VARIANZA
Muestra 1 – 50	48.47, 49.84, 52.73	50.35	2.1734	4.7235
Muestra 2 – 100	93.28, 93.77, 103.22	96.76	5.6052	31.4187
Muestra 3 – 150	144.39, 136.79, 155.42	145.53	9.3701	87.7993

% RECOBRO MUESTRAS PREPARADAS AL 50%

227840 ——— 100%

110434 ——— **x**

x = 48.47%

237086 ——— 100%

118174 ——— **x**

x = 49.84%

231285 ——— 100%

121953 ——— **x**

x = 52.73%

TEST G DE COCHRAN

$$G_{exp} = \frac{s^2 \max}{s^2_1 + s^2_2 + s^2_3}$$

$$G_{exp} = \frac{87.7993}{4.7235 + 314187 + 87.7993}$$

$$G_{exp} = 0.7084$$

$$G_{tablas} (P = 0.05, K = 3, n = 3) = 0.8709$$

K= grupos

n= determinaciones por grupo

TEST DE STUDENT

TABLA N° 35: CÁLCULOS TEST DE ESTUDENT DEL RECOBRO 100 RPM

% TEORICO	RESULTADOS COMO % DE RECUPERACION		
Muestra 1 – 50	96.94	99.68	105.46
Muestra 2 – 100	93.28	93.77	103.22
Muestra 3 - 150	96.26	91.19	103.62

% DE RECUPERACION MUESTRAS PREPARADAS AL 50%

50 ——— 100%

48.47 ——— **x**

x = 96.94%

50 ——— 100%

49.84 ——— **x**

x = 99.68%

50 ——— 100%

52.73 ——— **x**

x = 105.46%

Recuperación media (n=9) = 98.16

Desviación estándar s = 5.09578

Coeficiente de variación CV (%) = 5.191387

$$t_{\text{exp}} = \frac{|100 - R|\sqrt{n}}{CV}$$

$$t_{\text{exp}} = \frac{|100 - R|\sqrt{n}}{CV}$$

$$t_{\text{exp}} = 1.0632$$

$$t_{\text{tablas}} (P = 0.05, GL = 9 - 1 = 8) = 2.306$$

TABLA N° 36: CÁLCULOS DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO

	x (%)	y (%)	xy	X ²	y ²
1	50	48.47	2423.5	2500	2349.3409
2	50	49.84	2492.0	2500	2484.0256
3	50	52.73	2636.5	2500	2780.4529
4	100	93.28	9328.0	10000	8701.1584
5	100	93.77	9377.0	10000	8792.8129
6	100	103.22	10322.0	10000	10654.3684
7	150	144.39	21658.5	22500	20848.4721
8	150	136.79	20518.5	22500	18711.5041
9	150	155.42	23313.0	22500	24155.3764
Sumatoria	900	877.91	102069.0	105000	99477.5117

$$\bar{x} = 100\%$$

$$\bar{y} = 97.55$$

CALCULO DE LA REGRESION LINEAL

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

$$b = 0.95187$$

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

$$a = 2.3589$$

Ecuación $y = bx + a$
 $y = 0.9518520 x - 2.3586$

COEFICIENTE DE CORRELACION

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

$$r = 0.990908$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION

$$r^2 = 0.9819$$

TEST DE LINEALIDAD

- COEFICIENTE DE VARIACION DE LOS FACTORES DE RESPUESTA (f)

TABLA N° 37: CÁLCULOS DE LOS FACTORES DE RESPUESTA DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO

	X (%)	Y (%)	F (y/x) (%) ⁻¹
1	50.0	48	0.97
2	50.0	50	1.00
3	50.0	53	1.05
4	100.0	93	0.93
5	100.0	94	0.94
6	100.0	103	1.03
7	150.0	144	0.96
8	150.0	137	0.91
9	150.0	155	1.04

MEDIA DE f = 0.98

DESVIACION ESTANDAR DE f = 0.0510

COEFICIENTE DE VARIACION DE f = 5.2

SIGNIFICACION ESTADISTICA DE LA VARIANZA DE LA PENDIENTE b

- VARIANZA DE LA PENDIENTE s^2_b

$$s^2_b = \frac{s^2_{y,x}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

$$s^2_b = 0.0024$$

- VARIANZA DEL ERROR EXPERIMENTAL TOTAL $s^2_{y,x}$

$$s^2_{y,x} = \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n-2}$$

$$s^2_{y,x} = 35.7415$$

- DESVIACION ESTANDAR O ERROR ESTANDAR DE LA PENDIENTE s_b

$$s_b = \sqrt{s^2_b}$$

$$s_b = 0.0488$$

- DESVIACION ESTANDAR RELATIVA s_b

$$s_b rel(\%) = \frac{s_b}{b} * 100$$

$$s_b rel(\%) = 5.13$$

- LIMITES DE CONFIANZA DE LA PENDIENTE

$$b \pm ts_b$$

$$t_{n-2,0.05} = 2.365$$

$$b = 0.95187$$

$$b + ts_b = 0.95187 + 0.1154 = 1.0673$$

$$b - ts_b = 0.95187 - 0.1154 = 0.8365$$

- PRUEBA "t" DE STUDENT

$$t_{\text{exp}} = \frac{|b|}{s_b}$$

$$t_{\text{exp}} = 19.51$$

$$t_{\text{tablas}(9-2,0.05)} = 2.365$$

TEST DE PROPORCIONALIDAD

- VARIANZA DEL TERMINO INDEPENDIENTE s_a^2

$$s_a^2 = s_b^2 \frac{\sum x^2}{n}$$

$$s_a^2 = 28$$

- DESVIACION O ERROR ESTANDAR DEL TERMINO INDEPENDIENTE s_a

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

$$s_a = 5.2915$$

- DESVIACION ESTANDAR RELATIVA DEL TERMINO INDEPENDIENTE s_a

$rel(\%)$

$$s_a rel(\%) = \frac{s_a}{a} * 100$$

$$s_a rel(\%) = 224.32$$

- LIMITES DE CONFIANZA DEL TERMINO INDEPENDIENTE

$$a \pm ts_a$$

$$t_{n-2,0.05} = 2.365$$

$$a = 2.3589$$

$$ts_a = 12.5144$$

$$a + ts_a = 2.3589 + 12.5144 = 14.8733$$

$$a - ts_a = 2.3589 - 12.5144 = -10.1555$$

- PRUEBA "t" DE STUDENT

$$t_{\text{exp}} = \frac{|a|}{s_a}$$

$$t_{\text{exp}} = 0.45$$

$$t_{\text{tablas}(9-2,0.05)} = 2.365$$

ANEXO N° 7

CÁLCULOS REPETIBILIDAD

MEDIA (\bar{x})

$$\bar{x} = \frac{\sum x_1 + \sum x_2 + \sum x_3 + \dots + \sum X_n}{n}$$

DESVIACIÓN ESTÁNDAR (S)

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

COEFICIENTE DE VARIACIÓN (RSD)

$$RSD = \frac{S * 100}{\bar{x}}$$

VARIANZA (V)

$$V = S^2$$

VALOR CALCULADO F

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

$$F = \frac{7.90}{5.07}$$

$$F = 1.56$$

Donde S_1 es la mayor de las desviaciones estándar estimadas y S_2 es la menor.

Siendo S^2 la varianza combinada que se calcula a partir de la expresión.

$$S^2 = \frac{(n_1 - 1)\overline{S_1}^2 + (n_2 - 1)\overline{S_2}^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1)}$$

$$S^2 = \frac{(6 - 1)\overline{7.90} + (6 - 1)\overline{5.07}}{(6 - 1) + (6 - 1)}$$

$$S^2 = 6.485$$

VALOR CALCULADO "t"

$$t = \frac{|\overline{x_1} - \overline{x_2}|}{\sqrt{\frac{S^2}{n_1} + \frac{S^2}{n_2}}}$$

$$t = \frac{|94.5 - 93.7|}{\sqrt{\frac{6.485}{6} + \frac{6.485}{6}}}$$

$$t = 0.57$$

ANEXO N° 8

CÁLCULOS REPRODUCIBILIDAD

FACTOR DE DIFERENCIA

30 minutos = (Sumatoria Diferencia / Sumatoria Analista 2) * 100

$$= (83/ 1070) * 100$$

30 minutos = 8

90 minutos = (Sumatoria Diferencia / Sumatoria Analista 2) * 100

$$= (87/ 1016) * 100$$

90 minutos = 9

TABLA Nº 38: CÁLCULOS FACTOR DE SIMILITUD EN LA REPRODUCIBILIDAD

Tiempo	30	45	60	75	90
Analista 2	89	89	88	86	85
Analista 1	96	95	94	94	92
$A_1 - A_2$	- 6.83	-6.25	-6.58	-7.17	-7.25
$(A_1 - A_2)^2$	46.69	39.06	43.34	51.36	52.56
P. tiempo	1	2	3	4	5
Sum $(A_1 - A_2)^2$	46.69	85.76	129.10	180.46	233.02
	47.7	43.9	44.0	46.1	47.6
	0.14	0.15	0.15	0.15	0.14
	14.48	15.10	15.07	14.73	14.49
f_2	58	59	59	58	58

30 minutos

$$\text{Sum } (A1-A2)^2 = 47.81$$

$$1 + [(1/\text{ tiempo de muestreo correspondiente}) * \text{Sum } (A1-A2)^2]$$

$$1 + [(1/ 1) * 47.81] = 48.8$$

$$47.69^{-0.5} = 0.14$$

$$0.14 * 100 = 14.31$$

$$f_2 = 50 * \text{Log } 14.31 = 58$$

90 minutos

$$\text{Sum } (A1-A2)^2 = 234.70$$

$$1 + [(1/\text{ tiempo de muestreo correspondiente}) * \text{Sum } (A1-A2)^2]$$

$$1 + [(1/ 5) * 234.70] = 47.9$$

$$47.9^{-0.5} = 0.14$$

$$0.14 * 100 = 14.44$$

$$f_2 = 50 * \text{Log } 14.44 = 58$$

ANEXO N° 9

CÁLCULOS COMPARACIÓN DE PERFILES INNOVADOR VRS GENÉRICO

FACTOR DE DIFERENCIA

30 minutos = (Sumatoria Diferencia / Sumatoria Bonima) * 100

$$= (69 / 1152) * 100$$

30 minutos = 6

90 minutos = (Sumatoria Diferencia / Sumatoria Analista 2) * 100

$$= (22 / 1137) * 100$$

90 minutos = 2

TABLA Nº 39: CÁLCULOS FACTOR DE SIMILITUD EN LA COMPARACIÓN DE PERFILES INNOVADOR VRS GENÉRICO

Tiempo	30	45	60	75	90
Genérico	96	95	94	94	92
Innovador	90	94	94	92	91
$A_1 - A_2$	5.75	0.50	-0.17	1.08	1.00
$(A_1 - A_2)^2$	33.06	0.25	0.03	1.17	1.00
P. tiempo	1	2	3	4	5
Sum $(A_1 - A_2)^2$	33.06	33.31	33.34	34.51	35.51
	34.1	17.7	12.1	9.6	8.1
	0.17	0.24	0.29	0.32	0.35
	17.13	23.80	28.73	32.23	35.13
f_2	62	69	73	75	77

30 minutos

$$\text{Sum } (A1-A2)^2 = 33.06$$

$$1 + \left[\left(\frac{1}{\text{tiempo de muestreo correspondiente}} \right) * \text{Sum } (A1-A2)^2 \right]$$

$$1 + \left[\left(\frac{1}{1} \right) * 33.06 \right] = 34.1$$

$$65^{-0.5} = 0.17$$

$$0.17 * 100 = 17.13$$

$$f_2 = 50 * \text{Log } 17.13 = 62$$

90 minutos

$$\text{Sum } (A1-A2)^2 = 35.51$$

$$1 + \left[\left(\frac{1}{\text{tiempo de muestreo correspondiente}} \right) * \text{Sum } (A1-A2)^2 \right]$$

$$1 + \left[\left(\frac{1}{5} \right) * 35.51 \right] = 8.10$$

$$8.10^{-0.5} = 0.35$$

$$0.35 * 100 = 35.13$$

$$f_2 = 50 * \text{Log } 35.13 = 77$$

ANEXO N° 10 ⁽⁷⁾
APARTADO <1092> PROCEDIMIENTO DE DISOLUCIÓN:
DESARROLLO Y VALIDACIÓN

Disolución (711) y el patrocinador debería hacer referencia a dicho método. Los siguientes tiempos deberían utilizarse para determinar el perfil de disolución:

Tiempos: 10; 20; 30 y 45 minutos.

Para cada unidad de dosificación individual debería especificarse el porcentaje de la cantidad declarada en la etiqueta que se disuelve en cada intervalo de prueba. Debería indicarse el porcentaje promedio disuelto, el intervalo de disolución (valores máximos y mínimos) y el coeficiente de variación (desviación estándar relativa).

Prueba de Uniformidad de Contenido—La prueba de uniformidad de contenido de los lotes del producto de prueba y de referencia debería realizarse según se describe en la USP.

REQUISITOS PARA EXENCIONES

Puede concederse la exención de los requisitos de los estudios de bioequivalencia in vivo para contenidos de 200 mg de una tableta del producto genérico conforme a 21 CFR 320.22(d)(2), siempre que se cumplan las siguientes condiciones:

1. La tableta de 200 mg es proporcionalmente similar en sus ingredientes activos e inactivos a la tableta de 600 mg de la empresa, cuya equivalencia in vivo con un producto de referencia se ha demostrado;
2. La tableta de 200 mg del producto genérico cumple los requisitos de la prueba de disolución.

(1091) ETIQUETADO DE INGREDIENTES INACTIVOS

Este capítulo informativo proporciona guías para el etiquetado de ingredientes inactivos presentes en formas farmacéuticas.

En los últimos años, varias asociaciones comerciales que representan a fabricantes de productos farmacéuticos han adoptado guías voluntarias para dar a conocer los ingredientes inactivos y cómo declararlos en la etiqueta. Esta práctica resulta útil para los individuos sensibles a sustancias particulares y que desean confirmar la presencia o la ausencia de esas sustancias en productos farmacéuticos. Debido a la actividad de estas asociaciones, en la actualidad se considera una buena práctica farmacéutica a la declaración de los ingredientes terapéuticamente inactivos en las etiquetas.

Aunque los fabricantes representados por estas asociaciones producen la mayoría de los productos vendidos en los Estados Unidos, no todos los fabricantes o compañías que se dedican al reenvasado o al etiquetado, dentro o fuera de los Estados Unidos, son miembros de estas asociaciones. Además, existen algunas diferencias entre las guías de las diferentes asociaciones. Las guías presentadas aquí están diseñadas para ayudar a promover la uniformidad en el etiquetado.

En conformidad con las buenas prácticas farmacéuticas [NOTA—para los requisitos referentes a preparaciones parenterales y tópicas, ver *Advertencias Generales*] todas las formas farmacéuticas deben declarar en la etiqueta la identidad de toda sustancia agregada presente (ingredientes terapéuticamente inactivos), entre las cuales se incluyen los colorantes, pero no saborizantes y fragancias que pueden listarse bajo el término general “saborizantes” o “fragancias”. Dicha lista debe estar en orden alfabético y debe ser distinta a la declaración de identificación del ingrediente activo.

El nombre de un ingrediente activo debe tomarse de la edición vigente de una de las siguientes obras de referencia (en el siguiente orden de precedencia): (1) la *Farmacopea de los Estados Unidos* o el *Formulario Nacional*; (2) *USAN* y el *Diccionario USP de Nombres de Fármacos*; (3) el *CTFA Diccionario de Ingredientes Cosméticos*; (4) *Código de Químicos y Alimentos*. Si un ingrediente no figura en ninguna de las obras de referencia mencionadas se le debe identificar por su nombre común o usual (el nombre generalmente reconocido por los consumidores o profesionales del área de la salud) o, si ningún nombre común o usual estuviera disponible, por su nombre químico u otro nombre técnico.

Un ingrediente que puede estar presente en un producto, aunque no siempre, debe ser calificado por palabras como por ejemplo “o” o “también puede contener”.

El nombre de un ingrediente cuya identidad sea un secreto comercial puede omitirse de la lista si ésta declara: “y otros ingredientes”. A los efectos de esta norma, se considera que un ingrediente es un secreto comercial sólo si la presencia del ingrediente confiere a su fabricante una ventaja competitiva y significativa, y si su identidad no puede ser determinada mediante el empleo de tecnología analítica moderna.

No es necesario enumerar un ingrediente presente en trazas en forma incidental, si no ejerce un efecto funcional o técnico sobre el producto, a menos que se haya demostrado que causa reacciones de sensibilidad o respuestas alérgicas.

Los ingredientes inactivos deben enumerarse en la etiqueta del envase de un producto destinado para la venta sin receta, excepto si su envase es demasiado pequeño, en cuyo caso tal información puede aparecer en otra etiqueta o dentro del empaque.

(1092) PROCEDIMIENTO DE DISOLUCIÓN: DESARROLLO Y VALIDACIÓN

El procedimiento de disolución de la USP es una prueba de desempeño aplicable a muchas formas farmacéuticas. Es una de las pruebas que constituyen la especificación pública de la forma farmacéutica (pruebas, procedimientos para pruebas, criterios de aceptación). Para satisfacer la prueba de desempeño, la USP provee capítulos generales, tales como: *Desintegración (701)*, *Disolución (711)* y *Liberación de fármacos (724)*. Estos capítulos suministran información acerca de las condiciones del procedimiento. En estos capítulos se incluye información acerca de (1) medios, (2) velocidad de agitación/aparato, (3) diseño del estudio, (4) valoración y (5) criterios de aceptación referentes a la disolución. Por lo general, el procedimiento de disolución aporta datos que permiten la aceptación o rechazo con respecto a los criterios de aceptación, los que con frecuencia se basan en una decisión de la autoridad regulatoria. En este capítulo se incluyen recomendaciones sobre cómo desarrollar y validar un procedimiento de disolución.

COMENTARIOS GENERALES

El procedimiento de disolución requiere de un aparato, un medio de disolución y condiciones de prueba que provean un método discriminatorio lo suficientemente resistente y reproducible para las operaciones diarias y capaz de ser transferido entre laboratorios.

Los criterios de aceptación deben ser representativos de varios lotes con la misma composición nominal y el mismo proceso de fabricación, que usualmente incluyen los lotes de mayor relevancia usados en estudios claves, y deben también ser representativos del desempeño en estudios de estabilidad.

El procedimiento debe ser adecuadamente discriminatorio, con una capacidad para distinguir cambios significativos en la composición o en el proceso de fabricación que puede esperarse afecten el desempeño in vivo. Es también posible que el procedimiento muestre diferencias entre lotes y que no existan diferencias significativas cuando se observa in vivo. Esta situación requiere evaluar cuidadosamente si el procedimiento es demasiado sensible o adecuadamente discriminatorio. Los resultados de varios lotes que representan la variabilidad típica en los parámetros de composición y fabricación pueden ayudar en la realización en esta evaluación. A veces resulta valioso que intencionalmente se varíen los parámetros de fabricación, tales como la lubricación, el tiempo de mezcla, la fuerza de compresión o de secado para caracterizar mejor el poder discriminatorio del procedimiento.

Con respecto a la estabilidad, la prueba de disolución debe reflejar adecuadamente los cambios de mayor importancia que sufre el fármaco en el tiempo, causados por la temperatura, humedad, fotosensibilidad y otros factores de estrés.

Una prueba diseñada adecuadamente debe dar como resultado datos que no sean demasiado variables así como no deben estar asociados a problemas de estabilidad significativos de la solución analítica. La gran variabilidad de los resultados puede dificultar la identificación de tendencias o efectos referentes a los cambios de formulación. Los resultados de disolución pueden considerarse demasiado variables si la desviación estándar relativa (RSD, por sus siglas en inglés) es más de 20% a los 10 minutos o menos y más de 10% RSD a tiempos mayores.¹ Sin embargo, la mayor parte de los resultados muestran menor variabilidad. En lo posible se debe investigar la fuente de variabilidad y se debe tratar de reducir si fuera factible. Las dos causas de variabilidad más importantes se vinculan con la formulación en sí (p.ej., fármacos, excipientes o proceso de fabricación) o con artefactos asociados al procedimiento de prueba (p.ej., formación de conos, tabletas que se adhieren a la pared del vaso o a la malla de la canastilla). Con frecuencia la observación visual ayuda a comprender la fuente de variabilidad y si la misma prueba de disolución contribuye a ésta. Cuando el contenido de la forma farmacéutica no se dispersa fácilmente por todo el vaso de manera uniforme, pueden originarse resultados aberrantes. Dependiendo de cada caso, los problemas usualmente se resuelven al cambiar el tipo de aparato, la velocidad de agitación o desgasificación; la consideración y/o examen del tipo de dispositivo de sumersión; y cambios en la composición del medio. También pueden ser útiles las modificaciones que se hagan al aparato si están justificadas y validadas apropiadamente.

Muchas causas de variabilidad pueden encontrarse en la formulación y en el proceso de fabricación. Existen ejemplos que pueden ser fuentes de variabilidad e interferencias: falta de uniformidad de contenido, inconsistencias en el proceso, una reacción que ocurra a diferentes velocidades durante la disolución, interacciones o interferencias con el excipiente, el recubrimiento, el envejecimiento de la cubierta de la cápsula y el endurecimiento o ablandamiento de la forma farmacéutica en función de su estabilidad. Durante la prueba de rutina del producto, se debe investigar la variabilidad que se encuentra fuera del intervalo esperado desde la perspectiva analítica, de formulación y del procesamiento.

MEDIO

Los datos físicos y químicos para el fármaco y la unidad de dosificación deben determinarse antes de seleccionar el medio de disolución. Dos propiedades claves del producto farmacéutico son la solubilidad y la estabilidad del fármaco en solución en función del valor del pH. Cuando se selecciona la composición del medio, se debe evaluar la influencia de las soluciones amortiguadoras, el valor del pH y los surfactantes respecto a la solubilidad y la estabilidad del fármaco. Las propiedades claves de la unidad de dosificación que pueden afectar la disolución incluyen el mecanismo de liberación (inmediato, retardado o modificado) y la velocidad de desintegración afectados por la dureza, la friabilidad, la presencia de potenciadores de solubilidad y otros excipientes.

Por lo general, cuando se desarrolla un procedimiento de disolución, una meta es tener *condiciones de exceso de medio* (*sink conditions*), definido como el volumen de medio igual a por lo menos tres veces el tiempo requerido para formar una solución saturada del fármaco. Cuando la condición de exceso de medio está presente, existirán mayores probabilidades de que los resultados de disolución reflejen las propiedades de la forma farmacéutica. Un medio que no cumple con la condición de exceso de medio puede ser aceptable si el medio demuestra ser más discriminatorio o, de otro modo, se justifica adecuadamente.

No se recomienda emplear una mezcla de un disolvente orgánico y agua como medio de disolución; sin embargo, puede ser aceptable si existe una justificación apropiada para este tipo de medio.

¹ La FDA delinea el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica en *Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System*, agosto 2000; <http://www.fda.gov/cder/guidance/3618fn1.htm>, consultado el 22/6/2005.

Con frecuencia se usa agua purificada como medio de disolución, pero no es lo ideal por diferentes razones. En primer lugar, la calidad del agua puede variar dependiendo de la fuente y el valor del pH no está controlado. En segundo lugar, el valor del pH puede variar día a día y también puede cambiar durante una corrida, dependiendo de la sustancia activa y los excipientes. A pesar de estas limitaciones, se debe tener en cuenta que el agua es económica, está disponible, es de fácil eliminación, ecológicamente aceptable y apta para productos con una velocidad de liberación independiente del valor de pH del medio.

Las características de la disolución de una formulación oral deben evaluarse en el rango de pH fisiológico entre 1,2 y 6,8 (de 1,2 a 7,5 para las formulaciones de liberación modificada). Durante el desarrollo del método, podría ser de utilidad que se mida el pH antes y después de una corrida para determinar si el pH cambia durante la prueba. En lo posible la selección de las condiciones más adecuadas para las pruebas de rutina se basan en la capacidad de discriminación, la dureza, la estabilidad del analito en el medio de prueba y la relevancia en función del desempeño in vivo.

Los medios típicos para disolución pueden incluir los siguientes elementos (no se mencionan en orden de preferencia): ácido clorhídrico diluido, soluciones amortiguadoras en el rango de pH fisiológico entre 1,2 y 7,5, fluido intestinal o gástrico simulados (con o sin enzimas), agua y surfactantes (con o sin ácidos o soluciones amortiguadoras) tales como polisorbato 80, lauril sulfato de sodio y sales biliares.

La molaridad de las soluciones amortiguadoras y de los ácidos usados puede influenciar el efecto de solubilización y este factor puede ser evaluado.

La Guía de la FDA a la que se hizo referencia anteriormente puede influenciar la elección del medio y del aparato que se empleen en los compuestos de solubilidad y permeabilidad altas (según la definición del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica).¹

Para compuestos escasamente solubles, las soluciones acuosas pueden contener un porcentaje de un surfactante (p.ej., lauril sulfato de sodio, polisorbato u óxido de lauril dimetilamina) que se utiliza para mejorar la solubilidad del fármaco. La necesidad de surfactantes y las concentraciones usadas pueden justificarse mostrando los perfiles a diferentes concentraciones. Los surfactantes pueden emplearse, ya sea como agentes humectantes o para solubilizar el fármaco.

Volumen

Para aparatos con canastillas o paletas, el volumen del medio de disolución normalmente se encuentra entre 500 mL a 1000 mL, siendo 900 mL el volumen más común. Puede aumentarse el volumen entre 2 y 4 L, empleando recipientes más grandes y dependiendo de la concentración y de la condición de exceso de medio del fármaco; el empleo de este procedimiento debe justificarse.

Desgasificación

Se debe determinar la importancia de la desgasificación del medio ya que las burbujas de aire pueden interferir con los resultados de la prueba al actuar como una barrera para la disolución si las burbujas están presentes en la unidad de dosificación o en la malla de la canastilla. Más aún, las burbujas pueden causar que las partículas se adhieran a las paredes del vaso y del aparato. Por otra parte, las burbujas en la unidad de dosificación pueden aumentar la flotabilidad, lo que ocasiona el aumento de la velocidad de disolución o la disminución de la superficie específica disponible produciendo una disminución en la velocidad de la disolución. En *Disolución* (711) en la sección *Procedimiento*, se describe un método de desgasificación en una nota al pie de página. Los pasos típicos incluyen calentamiento del medio, filtración y vacío durante un corto periodo. Otros métodos de desgasificación están disponibles y la industria los utiliza en forma rutinaria. Usualmente no se desgasifican los medios que contengan surfactantes ya que el proceso genera demasiada espuma. Para determinar si es necesario desgasificar un medio, se deben comparar los resultados de las muestras de disolución corridas con un medio no desgasificado y con otro medio desgasificado.

Enzimas

El uso de enzimas en el medio de disolución está permitido según lo establece el capítulo *Disolución* (711) cuando la disolución no cumpla con los requisitos debido al entrecruzamiento en cápsulas de gelatina o productos con cubiertas de gelatina.

Correlación In Vivo-In Vitro (CIVIV)

Se puede encontrar una discusión más profunda acerca de CIVIV en *Evaluación In Vivo e In Vitro de Formas Farmacéuticas* (1088). A continuación se presenta una breve discusión.

Un *Medio biorelevante* es un medio que tiene cierta importancia en cuanto al desempeño in vivo de la unidad de dosificación. La elección de un medio biorelevante se basa en (1) un enfoque mecánico que tiene en cuenta el sitio de absorción, si fuera conocido, y (2) si el paso limitante de la velocidad del proceso de absorción es la disolución o la permeabilidad del compuesto. En algunos casos, el medio biorelevante será diferente de las condiciones de prueba elegidas para la prueba regulatoria y también lo serán los tiempos. Si el compuesto se disuelve rápidamente en el estómago y es altamente permeable, el tiempo de vaciado gástrico puede ser el paso limitante de velocidad del proceso de absorción. En este caso, la prueba de disolución debe demostrar que el fármaco se libera rápidamente bajo condiciones gástricas típicas (ácidas). Por otro lado, si la disolución ocurre primordialmente en el tracto intestinal (p. ej., un ácido débil de escasa solubilidad), un rango mayor de pH (p. ej., fluido intestinal simulado con un pH de 6,8) puede ser más adecuado. Los estados de ayuno y posprandial pueden también tener efectos importantes en la absorción o solubilidad de un compuesto. En la literatura se pueden encontrar medios cuyo composición simulan estados de ayuno y posprandial. Estos medios reflejan cambios en pH, concentraciones biliares y osmolaridad después de las comidas y, por lo tanto, tienen una composición diferente a la de los típicos medios farmacéuticos. Se usan primordialmente para establecer las correlaciones in vivo-in vitro durante el desarrollo de la formulación y para evaluar los posibles efectos de las comidas pero no se emplean en el control de calidad. Para cumplir los objetivos del control de calidad, se permite y recomienda sustituir surfactantes naturales (componentes biliares) por surfactantes sintéticos apropiados debido al costo de las sustancias naturales y al intensivo trabajo que requiere la preparación de los medios biorelevantes.

APARATO/AGITACIÓN

Aparato

La elección del aparato se basa en el conocimiento que se tenga sobre el diseño de la formulación y los aspectos prácticos del desempeño de la forma farmacéutica en el sistema de la prueba in vitro. El *Aparato 1* y el *Aparato 2* son los aparatos que se utilizan con mayor frecuencia para las formas farmacéuticas orales sólidas.

Si el *Aparato 1* ó *2* no fuesen apropiados, se puede utilizar otro aparato oficial. El *Aparato 3 (Cilindro Oscilante)* ha demostrado ser especialmente útil para formas farmacéuticas de liberación modificada tipo perlas. El *Aparato 4 (Celda de Flujo)* puede ofrecer ventajas para las formas farmacéuticas de liberación modificada que contienen ingredientes activos de solubilidad limitada. Adicionalmente, el *Aparato 3* o el *Aparato 4* pueden resultar útiles para cápsulas de gelatina blanda, perlas, supositorios o fármacos poco solubles. El *Aparato 5 (Paleta sobre Disco)* y el *Aparato 6 (Cilindro Rotatorio)* han demostrado ser útiles para evaluar y analizar las formas farmacéuticas transdérmicas. El *Aparato 7 (Soporte Oscilante)* se puede aplicar a formas farmacéuticas orales de liberación modificada que no se desintegran, al igual que a formas farmacéuticas transdérmicas.

Se pueden realizar cambios en los aparatos, por ejemplo: una canastilla de malla diferente a la típica canastilla de malla 40 (p. ej., de malla 10, 20, 80) puede utilizarse cuando se documenta eficientemente la necesidad del cambio y se cuenta con datos de apoyo. En países en los que los tamaños de malla disponibles sean diferentes a los valores que la USP especifica, se debe emplear la medida métrica más aproximada. Se debe tener cuidado de emplear canastillas que sean uniformes y cumplan con los requisitos de tamaño especificados en *Disolución* (711). Si durante la disolución de las cápsulas o tabletas se obstruyeran las mallas de las canastillas, se recomienda utilizar en su lugar el método de paleta. Para ayudar a que se logre la condición de exceso de medio en casos de fármacos de baja solubilidad, es posible aumentar el volumen típico, que normalmente es de 900 ó 1000 mL, usando vasos de 2 L ó 4 L.

Un aparato no farmacéutico puede tener alguna utilidad si cuenta con la debida justificación, calificación y documentación que demuestre su superioridad sobre el equipo estándar. Por ejemplo, un aparato de pequeño volumen con minipaletas y canastillas puede considerarse para productos de baja dosificación. También pueden utilizarse un frasco rotatorio o tubos estáticos (tubos estacionarios inmóviles encerrados dentro de una camisa de agua y equipados con un mezclador magnético) para microesferas e implantes, vasos cuyo fondo posee un pico para evitar la formación de conos y celdas de flujo modificadas para formas farmacéuticas especiales, incluidos los polvos y los stents.

Dispositivos de Sumersión

Cuando se usen dispositivos de sumersión, una detallada descripción del dispositivo debe declararse en el procedimiento escrito. Puede ser de utilidad evaluar dispositivos diferentes reconociendo que los dispositivos pueden influenciar significativamente el perfil de disolución de la unidad de dosificación. Cuando se transfiere el procedimiento, se deben duplicar los dispositivos de sumersión de la mejor forma posible en el próximo laboratorio. En el mercado existen varios tipos de dispositivos de sumersión. Un dispositivo de sumersión se puede fabricar manualmente empleando "unas cuantas vueltas de alambre" como se describe en *Aparato 2 (Aparato de Paleta)* en *Disolución* (711). El método se describe a continuación.

Materiales—Usar alambre de acero inoxidable 316 u otro material inerte, normalmente de 0,032 pulgada y calibre 20; y un cilindro de diámetro adecuado (p. ej., sacabocados para tapones). Los tamaños son los que aparecen en la tabla adjunta.

Tipo de Cápsula	Longitud del Alambre (cm)	Diámetro (cm)	Sacabocados Número
#0, oblonga	12	0,8	4
#1 y #2	10	0,7	3
#3 y #4	8	0,55	2

Procedimiento—Cortar la longitud especificada de alambre, enrollarla alrededor de un cilindro de tamaño adecuado y empleando una pinza pequeña curvar los extremos. Se debe tener cuidado ya que los extremos del alambre pueden ser ásperos y por tanto necesitarán limarse.

Si el dispositivo de sumersión está hecho a mano, debe documentarse el material utilizado y el procedimiento de construcción; si se usa un dispositivo comercial se debe reportar el número de catálogo del proveedor.

Agitación

Para cápsulas o tabletas de liberación inmediata, los aparatos de mayor uso son el *Aparato 1* (canastillas) a 100 rpm o el *Aparato 2* (paletas) a 50 ó 75 rpm. Con una justificación apropiada, se aceptan otros aparatos y otras velocidades de agitación.

Las velocidades menores de 25 o mayores de 150 rpm son usualmente inapropiadas debido a la inconsistencia de la hidrodinámica por debajo de 25 rpm y por la turbulencia por encima de 150 rpm. Las velocidades de agitación entre 25 y 50 rpm son generalmente aceptables para las suspensiones. Para formas de dosificación que presentan la formación de conos (montículos) debajo de la paleta a 50 rpm, el cono puede reducirse al aumentar la velocidad de la paleta a 75 rpm, reduciendo el artefacto y, de este modo, mejorar los datos. Si se justificara, se puede emplear una velocidad de 100 rpm, especialmente para productos de liberación prolongada. El aumentar o disminuir la velocidad de rotación del aparato puede justificarse si los perfiles reflejan mejor el desempeño in vivo y/o los resultados del método demuestran una mejor discriminación sin afectar adversamente la reproducibilidad del método.

La selección de la agitación y la de otros elementos del diseño del estudio para las formas de dosificación de liberación modificada es similar a la de los productos de liberación inmediata. Estos elementos deben cumplir con los requisitos y especificaciones expresadas en *Disolución* (711) cuando el aparato ha sido calibrado adecuadamente.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Tiempos

Para las formas farmacéuticas de liberación inmediata, la duración del procedimiento es usualmente entre 30 y 60 minutos; en la mayoría de los casos, la especificación de un solo tiempo es adecuada para fines farmacopeicos. Los conceptos industriales y regulatorios referentes a la comparabilidad y desempeño del producto pueden exigir otros tiempos y esto también puede ser requisito para el registro o aprobación del producto. Se deben seleccionar suficientes tiempos para una adecuada caracterización de la fase ascendente y de la fase de meseta de la curva de disolución. De acuerdo al Sistema de Clasificación Biofarmacéutica al cual se refiere en varias instancias la Guía de la FDA, los fármacos altamente solubles y de alta permeabilidad formulados como productos que se disuelven rápidamente no requieren estar sujetos a un perfil de comparación si demuestran una liberación de 85% o más de la sustancia activa dentro de 15 minutos. Para estos tipos de producto solamente se requiere una prueba de un solo punto. Sin embargo, la mayoría de los productos no caen dentro de esta categoría. Los perfiles de disolución de productos de liberación inmediata por lo general presentan un incremento gradual que alcanza entre 85% y 100% en un período de aproximadamente entre 30 y 45 minutos. De este modo, los tiempos de disolución en el rango de 15, 20, 30, 45 y 60 minutos son comunes para la mayor parte de los productos de liberación inmediata. Para productos de disolución rápida, entre los que se incluyen las suspensiones, se puede obtener información útil a partir de los primeros puntos, p. ej., de 5 a 10 minutos. Para productos de disolución lenta, pueden ser de utilidad los tiempos que sobrepasan los 60 minutos. Los tiempos de la prueba de disolución para las pruebas farmacopeicas generalmente se basan en una evaluación de los datos del perfil de disolución.

Los puntos llamados infinitos pueden ser útiles durante los estudios de desarrollo. Para obtener un punto infinito, se debe aumentar la velocidad de la paleta o de la canastilla al final de la corrida durante un período sostenido (normalmente entre 15 y 60 minutos); después de transcurrido ese tiempo se toma una muestra

adicional. Aunque no se tenga en el perfil un requisito para el 100% de disolución, el punto infinito puede suministrar datos que suplementarían los datos de la uniformidad de contenido y proveerían información útil acerca de las características de la formulación durante el desarrollo inicial o acerca de las desviaciones del método.

En el caso de las formas farmacéuticas de liberación prolongada, se seleccionan al menos tres tiempos para caracterizar el perfil de liberación del fármaco in vitro desde el punto de vista farmacopeico. Pueden necesitarse tiempos de muestreo adicionales para la aprobación del fármaco. Se elige un tiempo inicial, habitualmente de 1 a 2 horas, para demostrar que es poco probable que se produzca la liberación masiva. Se elige un tiempo intermedio para definir el perfil de liberación in vitro de la forma farmacéutica y se elige un tiempo final para mostrar básicamente la liberación completa del fármaco. Los tiempos y las especificaciones de la prueba generalmente se basan en una evaluación de los datos del perfil de liberación del fármaco. En el caso de productos que contengan más de un ingrediente activo, se debe determinar la liberación del fármaco para cada ingrediente activo.

Observaciones

La observación visual y los registros del comportamiento de disolución y desintegración del producto son de gran utilidad ya que los patrones de disolución y desintegración pueden ser indicativos de variaciones en la formulación o en el proceso de fabricación. Una adecuada iluminación del contenido de los vasos (con debida consideración de la fotodegradación) y una buena visibilidad en el baño son esenciales para realizar la observación visual. La documentación de las observaciones a través de dibujos, fotografías o vídeos pueden ser instructivas y útiles para quienes no pueden observar la prueba de disolución en tiempo real. Las observaciones son especialmente útiles durante el desarrollo del método y la optimización de la formulación. Ejemplos de observaciones típicas incluyen, pero no se limitan, a lo siguiente:

1. Distribución irregular de partículas por todo el vaso. Esto puede ocurrir cuando las partículas se adhieren a las paredes del vaso, cuando las mismas forman un cono o montículo directamente debajo del aparato, cuando las partículas flotan en la superficie del medio, cuando las tabletas recubiertas con película se pegan al vaso y/o cuando se forman montículos fuera del centro.
2. Burbujas de aire dentro del vaso, en el aparato o en la unidad de dosificación. El brillo en el aparato es también una señal de la presencia de burbujas de aire. Esta observación se haría típicamente al evaluar la necesidad de desgasificar el medio.
3. Movimiento errático o en giros de la unidad de dosificación o bien ésta es golpeada por la paleta.
4. Adherencia de las partículas a la paleta o al interior de la canastilla, lo que se puede observar al remover el dispositivo de agitación al final de la prueba.
5. Películas o formaciones análogas, tales como sacos transparentes o gomosos, masas hinchadas rodeando el contenido de la cápsula.
6. Presencia de grandes partículas flotantes o trozos de la unidad de dosificación.
7. Observación de la velocidad de desintegración (p.ej., la reducción del porcentaje en tamaño de la unidad de dosificación dentro de un cierto tiempo).
8. Compleja desintegración del recubrimiento de productos con cubierta entérica o modificada—por ejemplo, una apertura parcial y separación de las partes (como sería separar la concha de la almendra) o una apertura incompleta de la cubierta acompañada de la liberación de burbujas de aire y excipientes.

Muestreo

Manual—En el muestreo manual se emplean jeringas de plástico o de vidrio, una cánula de acero inoxidable que usualmente es curva para permitir el muestreo del vaso, un filtro y/o un soporte para el filtro. El sitio para el muestreo debe cumplir con las especificaciones que se estipulan en *Disolución* (711).

Muestreo automático—El muestreo automático es una alternativa útil al muestreo manual, especialmente si la prueba incluye varios tiempos. Sin embargo, dado que los laboratorios regulatorios pueden realizar las pruebas de disolución mediante un muestreo manual, se requiere validar el muestreo automático con el muestreo manual.

Existen muchas marcas comerciales de muestreadores automáticos, entre los que se incluyen sistemas totalmente automatizados y otros semi-automatizados. Los controles rutinarios de desempeño, la limpieza y el mantenimiento descritos en los correspondientes procedimientos operacionales estándares o en la documentación de metrología son de utilidad para el funcionamiento confiable de estos dispositivos.

Algunos instrumentos están equipados con muestreo a través del eje de la paleta o la canastilla. Estos casos pueden requerir una validación apropiada (p. ej., probada equivalencia en función de los resultados con el procedimiento de muestreo usual).

Se debe tener en cuenta la perturbación de la hidrodinámica del vaso ocasionada por sondas de muestreo y se debe realizar una validación adecuada para garantizar que las sondas de muestreos no causan un cambio significativo en la velocidad de disolución.

Se deben comparar los procedimientos manuales con los automatizados para evaluar la intercambialidad de los procedimientos. Esto puede lograrse al comparar los datos de diferentes corridas o, en algunos casos, mediante un muestreo que se realice de ambas maneras a partir del mismo vaso. Los resultados deben ser coherentes con los requisitos para la precisión intermedia (descritos en este capítulo en *Validación*) si se considera que los procedimientos son intercambiables.

Otros aspectos de la validación de la automatización pueden incluir el arrastre de residuos del fármaco, los efectos de mantener la sonda en el vaso en forma permanente (los muestreos simultáneos mencionados previamente pueden no ser apropiados en este caso), adsorción del fármaco y los ciclos de limpieza y/o enjuague.

Filtros

Habitualmente se requiere la filtración de las muestras de disolución para prevenir que las partículas no disueltas del fármaco entren en la muestra en análisis y luego se disuelvan. También, la filtración remueve los excipientes insolubles que de otra manera pueden causar un fondo o turbidez significativos. Puede ser necesario humedecer previamente el filtro con el medio.

Los filtros pueden estar en el extremo de la sonda de muestreo, en línea o en ambos sitios. El tamaño de poro puede variar de 0,45 a 70 μm . Los tipos comunes de filtros son filtro de profundidad, disco de filtro y filtro de flujo. Sin embargo, si la interferencia del excipiente es alta, si el filtrado tiene una apariencia turbia o si el filtro se obstruye, se debe evaluar un tipo alternativo de filtro o del tamaño de poro.

Se debe evaluar la adsorción del (los) fármaco(s) en el filtro. Si ocurre una adsorción del fármaco, puede que sea necesario aumentar la cantidad del filtrado inicial desechado. Si los resultados son todavía insatisfactorios, se puede buscar un filtro de material alternativo.

La validación del filtrado puede lograrse mediante la preparación de una solución estándar adecuada o una solución de muestra completamente disuelta (p.ej., preparada como una muestra típica en un vaso o una muestra colocada en un vaso de precipitados mezclada con un mezclador magnético durante 1 hora). Para soluciones estándar, comparar los resultados de las soluciones filtradas (después de desechar el volumen apropiado) con los resultados de soluciones sin filtrar. Para soluciones de muestra, comparar los resultados de las soluciones filtradas (después de desechar el volumen apropiado) con los resultados de soluciones sin filtrar y centrifugadas.

Centrifugación

No se recomienda la centrifugación de las muestras dado que puede que la disolución continúe y porque puede haber un gradiente de concentración en el sobrenadante. Una posible excepción podría existir para los compuestos que se adsorben en todos los filtros comunes.

VALORACIÓN

Usualmente la valoración de una muestra de disolución es una determinación espectrofotométrica o por HPLC. El método preferido de análisis es la determinación espectrofotométrica puesto que los resultados se pueden obtener rápidamente, el análisis es sencillo y se emplean menos disolventes. Los métodos HPLC se emplean cuando hay una interferencia significativa a partir de los excipientes o entre los fármacos en la formulación para mejorar la sensibilidad analítica y/o cuando el análisis puede ser automatizado. Puede ser de utilidad que se obtengan datos para el fármaco con una valoración que sea indicadora de la estabilidad (p.ej., cromatogramas HPLC) en el medio escogido aun cuando la valoración primaria se base en un método espectrofotométrico.

VALIDACIÓN

Los temas típicos referentes a la validación se describen en esta sección, aunque tal descripción no es exhaustiva. Los elementos de validación pueden variar, dependiendo de la fase de desarrollo o de la intención del uso de los datos.² Los criterios de aceptación se presentan sólo como guías y pueden diferir para algunos productos. Las empresas debe documentar los criterios de aceptación adecuados para sus productos en los procedimientos operacionales estándar (POE) pertinentes. Otras consideraciones pueden ser importantes para formas farmacéuticas especiales. El alcance de la validación depende de la fase de desarrollo del producto. La validación completa se realiza al mismo tiempo que los estudios clínicos de la Fase III. Los estudios de validación deben tratar las variaciones asociadas a los tiempos de los perfiles diferentes. En el caso de productos que contengan más de un ingrediente activo, se debe validar el método de disolución para cada ingrediente activo.

² Boudreau, S.P.; McElvain, J.S.; Martin, L.D.; Dowling, T.; Fields, S.M. Method Validation by Phase of Development, an Acceptable Analytical Practice. *Pharmaceutical Technology* 2004; 28(11):54–66.

Especificidad/Interferencia del Placebo

Es necesario para demostrar que los resultados no están indebidamente afectados por los ingredientes del placebo, otros fármacos activos o productos de degradación.

El placebo está constituido por todos los excipientes y recubrimientos (tintas, dispositivos de sumersión y cubiertas de cápsulas se incluyen también cuando corresponda) sin el ingrediente activo. La interferencia del placebo puede determinarse pesando las muestras de la mezcla del placebo y disolviéndolas o dispersándolas en el medio de disolución a las concentraciones que se puedan encontrar durante la prueba. Es preferible realizar este experimento a 37° comparándolo al 100% del estándar, por la fórmula:

$$100C(A_p/A_s)(V/L)$$

en donde C es la concentración, en mg por mL, del estándar; A_p y A_s son las absorbancias del placebo y del estándar, respectivamente; V es el volumen, en mL, del medio; y L es el valor declarado, en mg. La interferencia no debe exceder de 2%.

NOTA—Para productos de liberación prolongada, puede ser más apropiado usar una versión del placebo de la forma farmacéutica terminada que las mezclas, ya que la formulación del placebo liberará varios excipientes de cierta manera que reflejará el producto mejor que una simple mezcla de excipientes. En este caso, puede ser apropiado evaluar la interferencia potencial en puntos múltiples de muestreo en el perfil de liberación.

Si la interferencia del placebo excede de 2%, entonces puede requerirse, para evitar la interferencia, una modificación del método—tales como (1) elegir otra longitud de onda, (2) sustraer la línea de base empleando una longitud de onda mayor o (3) utilizar HPLC. Cuando están presentes otros fármacos activos o hay significativos niveles de degradación, es necesario demostrar que éstos no afectan demasiado los resultados. Un procedimiento para lograrlo es medir la matriz en presencia y ausencia del otro fármaco activo o producto de degradación: toda interferencia no debe exceder de 2%.

Linealidad e Intervalo

La linealidad y el intervalo se establecen habitualmente preparando soluciones del fármaco, pudiendo abarcar desde una concentración inferior a la más baja concentración esperada hasta una concentración mayor de la concentración más alta durante la liberación. Esto se puede lograr conjuntamente con la determinación de exactitud/recuperación. El esquema puede alterarse si se utilizan diferentes tamaños de celdas o volúmenes de inyección.

En lo posible las soluciones se hacen normalmente a partir de una solución madre común. Para la concentración mayor, la determinación no debería exceder los límites de linealidad del instrumento.

Para mejorar la solubilidad del fármaco se pueden emplear disolventes orgánicos en la preparación de las soluciones estándar; sin embargo, a menos que se valide, no se debe usar más de 5% (v/v) del solvente orgánico en la solución final.

Habitualmente la linealidad se calcula utilizando un programa de regresión de cuadrados mínimos adecuado. Típicamente, el cuadrado del coeficiente de correlación ($r^2 \geq 0,98$) demuestra linealidad. Adicionalmente, la ordenada al origen no debe ser significativamente diferente de cero.

Exactitud/Recuperación

La exactitud y la recuperación por lo general se establecen al preparar muestras múltiples que contengan el fármaco y cualquier otro ingrediente presente en la forma farmacéutica (p.ej., excipientes,

materiales de recubrimiento, cubiertas de cápsulas) con concentraciones que varían de concentraciones por debajo del rango más bajo esperado hasta por arriba de las más altas concentraciones de liberación del fármaco.

En casos de poca solubilidad del medicamento, puede que sea apropiado preparar una solución madre que consiste en la disolución del fármaco en una pequeña cantidad de disolvente orgánico (generalmente que no exceda de 5%) y su dilución a la concentración final con el medio de disolución. Se puede agregar al vaso una cantidad de solución madre equivalente a la cantidad declarada, específicamente elegida, en lugar del fármaco en polvo. De la misma manera, en el caso de concentraciones muy bajas, puede ser más apropiado preparar una solución madre que intentar pesar cantidades muy pequeñas. La medida de recuperación se encuentra normalmente entre 95% y 105% de la cantidad agregada. Cuando existen múltiples concentraciones puede ser útil emplear matrices o "bracketing".

Un caso especial para la validación es el procedimiento de la *Etapa Ácida* descrito en *Formas Farmacéuticas de Liberación Retardada en Disolución* (711). Es necesario validar el límite de no más de 10%. Si el compuesto se degrada en ácido, la validación debe tener en cuenta este factor.

Precisión

Repetibilidad—La repetibilidad se determina repitiendo las mediciones de las soluciones muestra y/o estándar. Se puede medir al calcular la RSD de inyecciones múltiples o lecturas espectrofotométricas para cada solución estándar o a partir de la exactitud o de los datos de linealidad.

Precisión Intermedia—La precisión intermedia puede evaluarse para determinar los efectos de eventos u ocurrencias aleatorias sobre la precisión del procedimiento analítico. Normalmente esta evaluación se realiza cuando el desarrollo de la forma farmacéutica se encuentra avanzado. La precisión puede establecerse en el intervalo completo de las concentraciones del producto. Las variaciones típicas a considerar en un estudio incluyen días, analistas y equipo. Para la evaluación de la precisión intermedia se recomienda el uso de un diseño experimental de matriz. En lo posible, la precisión intermedia puede evaluarse empleando un lote bien caracterizado de un producto farmacéutico con estrecha uniformidad de contenido. En los casos en que no se disponga de un producto bien caracterizado, se pueden emplear placebos e ingredientes activos para identificar la precisión intermedia.

Los perfiles de disolución de la misma muestra pueden ser realizados por lo menos por dos analistas diferentes, preparando cada uno de ellos las soluciones estándar y los medios. Por lo general, los analistas utilizan diferentes baños de disolución, equipos de espectrofotometría o HPLC (incluyendo columnas) e inyectores automáticos así como realizan el análisis en diferentes días. Puede que no sea necesario realizar este procedimiento para cada concentración; en su lugar puede hacerse sólo con las concentraciones alta y baja ("bracketing").

Un típico criterio de aceptación es que la diferencia en el valor medio entre los resultados de disolución en cualquiera de las dos condiciones que empleen la misma concentración no excede un 10% absoluto en tiempos con menos de 85% disuelto y no excede de 5% para los tiempos por encima de 85%. Los criterios de aceptación pueden referirse a un producto específico y pueden emplearse otros límites y pruebas estadísticas.

Robustez

La evaluación de la robustez, es decir el estudio del efecto de cambios pequeños y deliberados en las condiciones de disolución, por lo general se hace en las etapas finales del desarrollo del producto. El número de repeticiones (típicamente 3 ó 6) depende de la precisión intermedia.

Los parámetros sujetos a variaciones dependen del procedimiento de disolución y del tipo de análisis. Pueden incluir composición del medio (p.ej., concentración del tensoactivo o solución amortiguadora), pH, volumen, velocidad de agitación y temperatura. Para análisis de HPLC, los parámetros pueden incluir la composición de la fase móvil (porcentaje de componente orgánico, concentración de la solución amortiguadora, pH), velocidad de flujo, longitud de onda, temperatura de la columna y múltiple columnas (del mismo tipo). La longitud de onda puede variar para los análisis espectrofotométricos.

Estabilidad de la Solución Muestra y la Solución Estándar

La solución estándar se almacena bajo condiciones que aseguren la estabilidad. La estabilidad del estándar se analiza durante un periodo específico, empleando una solución estándar recién preparada a cada intervalo para realizar la comparación. El intervalo aceptable para la estabilidad de la solución estándar se encuentra generalmente entre 98% y 102%.

La solución muestra usualmente se almacena a temperatura ambiente. La muestra se analiza durante un periodo específico empleando la respuesta de la solución de muestra original para realizar la comparación. El intervalo típico aceptable para la estabilidad de la solución muestra puede encontrarse entre 98% y 102% comparado con el análisis inicial de las soluciones de muestra. Si la solución no es estable, los aspectos a considerar pueden ser la temperatura (puede requerirse refrigeración), protección de la luz y material de los vasos (plástico o vidrio).

El procedimiento puede indicar que los estándares y las muestras requieren ser analizadas dentro de un periodo durante el cual se demuestre la estabilidad aceptable de la solución de muestra y la del estándar.

Análisis Espectrofotométrico

Las muestras se pueden introducir en el espectrofotómetro en forma automática utilizando succionadores y celdas de flujo. Los controles rutinarios de desempeño, la limpieza y el mantenimiento descritos en los correspondientes procedimientos operacionales estándares o en la documentación de metrología son de utilidad para la operación confiable de estos dispositivos. Generalmente se utilizan celdas cuya longitud de paso varía entre 0,02 y 1 cm. La alineación de las celdas y las burbujas de aire pueden ser fuentes de error. La longitud de paso más pequeña de las celdas se usa para evitar la dilución de la muestra; sin embargo, se requiere demostrar la linealidad aceptable y el error estándar.

Durante el análisis, las soluciones estándar por lo general se preparan y analizan sólo a una concentración igual a 100% (o al valor Q seleccionado) de la concentración de la dosificación. Durante el análisis del perfil, pueden ser útiles otras concentraciones. Una típica muestra, un estándar y un blanco pueden analizarse en una secuencia que comprenda la muestra con los estándares y los blancos, especialmente al comienzo y al final del análisis.

En la mayoría de los casos, la absorbancia media del medio de disolución usado como blanco puede no exceder de 1% del estándar. Los valores superiores a 1% deben evaluarse caso por caso. La típica RSD para un análisis de UV es usualmente no más de 2%.

La absorbividad se calcula al dividir la absorbancia estándar media por la concentración, en mg por mL, dividida por la longitud de paso de la celda de flujo en cm. Después de acumular suficientes datos históricos, puede determinarse un intervalo aceptable de absorbividad para el analito (empleando la celda de flujo apropiada). Este valor puede ser útil para corregir datos aberrantes.

El uso de fibra óptica como método de muestreo y determinación, con validación apropiada, es una opción.

Puede ser de utilidad que se examine el espectro UV del fármaco en solución para seleccionar la longitud de onda óptima.

HPLC

La compatibilidad de los medios de disolución y la fase móvil pueden examinarse, especialmente cuando se requieren inyectores de gran volumen (por encima de 100 μ L) para el análisis HPLC. Normalmente se analizan muestras con HPLC empleando un detector espectrofotométrico y un inyector automatizado. Inyecciones únicas de cada vaso a cada tiempo con estándares intercalados a través de la corrida constituyen un diseño típico de corrida. Las pruebas de Aptitud del Sistema incluyen, como mínimo, la ventana de retención y la precisión de la inyección. Generalmente, la repetibilidad de un análisis HPLC debe ser menor o igual a 2% de RSD para cinco o seis determinaciones estándar. El nivel estándar típicamente es 100% del nivel declarado, especialmente para un análisis de un punto único.

La preparación de muestras de placebo para el análisis HPLC se realizará de la misma manera que en un análisis espectrofotométrico. Examinar el cromatograma para identificar los picos que eluyen al mismo tiempo de retención que el fármaco. Si hubiera picos extraños, inyectar la solución estándar y comparar los tiempos de retención. Si los tiempos de retención estuviesen demasiado cerca, agregar el fármaco a la solución del placebo. Los cromatogramas pueden también obtenerse durante un tiempo de corrida más largo empleando el blanco (medio de disolución), el estándar y la solución muestra para identificar picos tardíos que puedan interferir con los análisis subsiguientes.

Los documentos de validación pueden incluir cromatogramas representativos superpuestos o espectros del medio de disolución (blanco), una solución de placebo filtrada, una solución estándar y una muestra de disolución filtrada. La ausencia de picos que interfieran en el cromatograma del placebo o la falta de absorbancia del placebo a la longitud de onda del análisis demuestra la especificidad.

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Los criterios de aceptación característicos de la cantidad disuelta de ingrediente activo, expresada como un porcentaje del contenido declarado (Q) se encuentran en el intervalo de 75% a 80% disuelto. Por lo general, no se usa un valor Q que supere el 80%, ya que se deben tener en cuenta los intervalos de valoración y la uniformidad del contenido.³ Los criterios de aceptación que incluyen los tiempos de la prueba usualmente se establecen en base a una evaluación de los datos del perfil de disolución. Los criterios de aceptación deben ser coherentes con los datos históricos y se espera que los lotes aceptables (p. ej., diferencias insignificantes en el desempeño in vivo, la composición o el procedimiento de manufactura) generen resultados que encuadren dentro de los criterios de aceptación.

³ Ver la Guía de la FDA *Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms*, agosto 1997; <http://www.fda.gov/cder/guidance/1713bp1.pdf>, consultada el 22/6/2005.

ANEXO N° 11 ⁽⁷⁾
RELLENOS DE LAS COLUMNAS USADAS EN CROMATOGRFÍA
LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

R resolución entre dos picos cromatográficos,

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2}$$

$$\text{o } R = \frac{2(t_2 - t_1)}{1,70(W_{1,h/2} + W_{2,h/2})}$$

R_r factor de retardo cromatográfico igual al cociente entre la distancia desde el origen hasta el centro de una zona dividido por la distancia desde el origen hasta el frente de la fase móvil.

R_r tiempo de retención relativo

$$R_r = \frac{t_2}{t_1}$$

R_{rel} retardo relativo

$$R_{rel} = \frac{\text{distancia recorrida por la sustancia de prueba}}{\text{distancia recorrida por el estándar}}$$

R_s cociente entre las respuestas de los picos de una Preparación estándar que contiene el Estándar de Referencia y el estándar interno,

$$R_s = \frac{r_s}{r_{is}}$$

R_U cociente entre las respuestas de los picos de la Preparación de valoración que contiene el analito y el estándar interno,

$$R_U = \frac{r_U}{r_{is}}$$

S_R (%) desviación estándar relativa porcentual,

$$S_R (\%) = \frac{100}{\bar{X}} \left[\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}{N - 1} \right]^{1/2}$$

en donde X_i es una medida individual en un conjunto de N mediciones y \bar{X} es la media aritmética del conjunto.
factor de asimetría,

$$T = \frac{W_{0,05}}{2f}$$

t tiempo de retención medido desde el tiempo de inyección hasta el tiempo de elución del máximo del pico.

t_M tiempo de retención del componente no retardado, aire con detección por conductividad térmica.

W ancho del pico medido por extrapolación de los lados relativamente rectos en la línea base.

$W_{h/2}$ ancho del pico a la mitad de la altura.
 $W_{0,05}$ ancho del pico al 5% de altura.

Cambio en la redacción:

REACTIVOS CROMATOGRÁFICOS

La siguiente lista de rellenos (L), fases (G) y soportes (S) pretende ser una referencia útil para el técnico en cromatografía. [NOTA—Los tamaños de partícula que se proporcionan en esta lista son los que se pueden obtener generalmente. Cuando se requiera otro tamaño, generalmente más fino, la monografía individual especifica el tamaño de partícula deseado. Dentro de cualquier categoría de materiales de relleno o de fases que se enumeran a continuación, existe una amplia variedad de columnas disponibles. Cuando es necesario definir más específicamente las condiciones cromatográficas, la monografía individual así lo indica.]

Rellenos

L1—Octadecilsilano unido químicamente a sílice porosa o micropartículas cerámicas, de 3 µm a 10 µm de diámetro, o una varilla sílice monolítica.

L2—Octadecilsilano unido químicamente a gel de sílice de una porosidad de superficie controlada, que se ha unido a un núcleo esférico sólido, de 30 µm a 50 µm de diámetro.

L3—Partículas de sílice porosas de 5 µm a 10 µm de diámetro.

L4—Gel de sílice de una porosidad de superficie controlada que se ha unido a un núcleo esférico sólido, de 30 µm a 50 µm de diámetro.

L5—Alúmina de una porosidad de superficie controlada que se ha unido a un núcleo esférico sólido, de 30 µm a 50 µm de diámetro.

L6—Relleno de intercambio catiónico fuerte—polímero de fluorocarbono sulfonado recubierto sobre un núcleo esférico sólido, de 30 µm a 50 µm de diámetro.

L7—Octilsilano unido químicamente a partículas de sílice totalmente porosas, de 1,7 µm a 10 µm de diámetro.

L8—Capa esencialmente monomolecular de aminopropilsilano unida químicamente a un soporte de gel de sílice totalmente poroso, de 3 µm a 10 µm de diámetro.

L9—Gel de sílice totalmente poroso, irregular o esférico, unido químicamente a un recubrimiento de intercambio catiónico fuertemente ácido, de 3 µm a 10 µm de diámetro.

L10—Grupos nitrilo unidos químicamente a partículas de sílice porosas, de 3 µm a 10 µm de diámetro.

L11—Grupos fenilo unidos químicamente a partículas de sílice porosas, de 1,7 µm a 10 µm de diámetro.

L12—Relleno de intercambio aniónico fuerte obtenido uniendo químicamente un grupo amino cuaternario a un núcleo esférico de sílice sólido, de 30 µm a 50 µm de diámetro.

L13—Trimetilsilano unido químicamente a partículas de sílice porosas, de 3 µm a 10 µm de diámetro.

L14—Gel de sílice unido químicamente a un recubrimiento de intercambio aniónico, de amonio cuaternario fuertemente básico, de 5 µm a 10 µm de diámetro.

L15—Hexilsilano unido químicamente a partículas de sílice totalmente porosas, de 3 µm a 10 µm de diámetro.

L16—Dimetilsilano unido químicamente a partículas de sílice porosas, de 5 µm a 10 µm de diámetro.

L17—Resina de intercambio catiónico fuerte que consta de un copolímero sulfonado entrecruzado de estireno-divinilbenceno, en forma de hidrógeno, de 7 μm a 11 μm de diámetro.

L18—Grupos amino y ciano unidos químicamente a partículas de sílice porosas, de 3 μm a 10 μm de diámetro.

L19—Resina de intercambio catiónico fuerte que consta de un copolímero sulfonado entrecruzado de estireno-divinilbenceno, en la forma cálcica, de aproximadamente 9 μm de diámetro.

L20—Grupos dihidroxipropano químicamente unidos a partículas de sílice porosas, de 5 μm a 10 μm de diámetro.

L21—Un copolímero rígido, esférico de estireno-divinilbenceno, de 5 μm a 10 μm de diámetro.

L22—Resina de intercambio catiónico constituida por gel de poliestireno poroso con grupos ácidos sulfónicos, de un tamaño aproximado de 10 μm .

L23—Resina de intercambio aniónico constituida por gel de poliácido o polimetacrilato poroso con grupos de amonio cuaternario, de un tamaño aproximado de 10 μm .

L24—Gel hidrófilo semirígido que consta de polímeros de vinilo con numerosos grupos hidroxilo sobre la superficie de la matriz, de 32 μm a 63 μm de diámetro. [NOTA—Está disponible como YMC-Pack PVA-SIL, fabricado por YMC Co., Ltd. y distribuido por Waters Corp. (www.waters.com).]

L25—Relleno con capacidad para separar compuestos en un intervalo de peso molecular de 100 a 5000 (determinado con óxido de polietileno), aplicable a polímeros hidrosolubles neutros, aniónicos y catiónicos. Se determinó que una base de resina de polimetacrilato, entrecruzada con éter polihidroxilado (la superficie contiene algunos grupos funcionales carboxilo residuales) es adecuada.

L26—Butilsilano unido químicamente a partículas de sílice totalmente porosas, de 3 μm a 10 μm de diámetro.

L27—Partículas de sílice porosas, de 30 μm a 50 μm de diámetro.

L28—Un soporte multifuncional, que consiste en un sustrato de sílice esférico de alta pureza, de 100 Å , unido a un intercambiador aniónico, con funcionalidad amina, además de una funcionalidad en fase reversa convencional de C8.

L29—Gamma alúmina de fase reversa con bajo porcentaje, en peso, de carbono y partículas esféricas de polibutadieno con base de alúmina, de 5 μm de diámetro con un volumen de poro de 80 Å .

L30—Etilsilano unido químicamente a partículas de sílice totalmente porosas, de 3 μm a 10 μm de diámetro.

L31—Resina de intercambio aniónico fuerte, hidróxido-selectivo, unida por amina cuaternaria a partículas de látex ligadas a un núcleo de partículas macroporosas de 8,5 μm con un tamaño de poro de 2000 Å y constituidas de etilvinilbenceno entrecruzado con 55% de divinilbenceno.

L32—Relleno de intercambio con ligando quiral-complejo de L-prolina y cobre unido covalentemente a partículas de sílice irregulares de 5 μm a 10 μm de diámetro.

L33—Relleno con capacidad para separar dextranos de un tamaño molecular en un intervalo de entre 4000 y 500 000 Da. Es esférico con base de sílice y tiene un procesamiento que le proporciona estabilidad frente al pH. [NOTA—Está disponible como TSKgel G4000 SWXL que se puede obtener de Tosoh Biosep (www.tosohbiosep.com).]

L34—Resina de intercambio catiónico fuerte que consiste de un copolímero sulfonado entrecruzado de estireno-divinilbenceno en la forma de plomo, de aproximadamente 9 μm de diámetro.

L35—Relleno de sílice esférica estabilizada con zirconio con una fase unida que consta de una monocapa molecular hidrófila (tipo diol), con un tamaño de poro de 150 Å .

L36—Derivado 3,5-dinitrobenzoilo de L-fenilglicina unido covalentemente a sílice aminopropílica de 5 μm .

L37—Relleno con capacidad para separar proteínas por tamaño molecular en un intervalo de entre 2000 y 40 000 Da. Es un gel de polimetacrilato.

L38—Relleno basado en metacrilato para cromatografía de exclusión por tamaño de muestras hidrosolubles.

L39—Gel de polihidroximetacrilato hidrófilo de resina esférica totalmente porosa.

L40—Partículas de sílice porosas cubiertas con tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de celulosa, de 5 μm a 20 μm de diámetro.

L41—Glicoproteína α_1 -ácida inmovilizada sobre partículas esféricas de sílice, de 5 μm de diámetro.

L42—Grupos octilsilano y octadecilsilano unidos químicamente a partículas de sílice porosas, de 5 μm de diámetro.

L43—Grupos pentafluorofenilo unidos químicamente a partículas de sílice mediante un espaciador propilo, de 5 μm a 10 μm de diámetro.

L44—Un soporte multifuncional, que consiste en un sustrato de sílice esférico de alta pureza, 60 Å , unido a un intercambiador catiónico, con funcionalidad sulfónica ácida, además de una funcionalidad en fase reversa convencional de C8.

L45—Beta ciclodextrina unida a partículas de sílice porosas, de 5 μm a 10 μm de diámetro.

L46—Sustrato de poliestireno y divinilbenceno aglomerado con perlas de látex con funcionalidad de aminas cuaternarias, de aproximadamente 10 μm de diámetro.

L47—Sustrato microporoso de intercambio aniónico de alta capacidad, totalmente funcionalizado con grupos trimetilamino, de 8 μm de diámetro. [NOTA—Está disponible como CarboPac MA1 y lo distribuye Dionex Corp. (www.dionex.com).]

L48—Poliestireno entrecruzado sulfonado, con una capa exterior de micropérlas de intercambio aniónico porosas submicrométricas, de 15 μm de diámetro.

L49—Un relleno en fase reversa obtenido por recubrimiento con una capa fina de polibutadieno sobre partículas porosas esféricas de zirconio, de 3 μm a 10 μm de diámetro. [NOTA—Está disponible como Zirchrom PBD, fabricado por ZirChrom Separations, Inc. y distribuido por Alltech, www.Alltechweb.com.]

L50—Resina multifuncional, con retención en fase reversa y funcionalidades de intercambio de aniones fuerte. La resina consta de etilvinilbenceno, entrecruzado al 55% con copolímero de divinilbenceno, de 3 μm a 15 μm de diámetro, y una superficie de no menos de 350 m^2 por g. El sustrato está recubierto de partículas de látex con funcionalidad de amonio cuaternario que constan de estireno entrecruzado con divinilbenceno. [NOTA—Está disponible como OmniPac PAX-500 y lo distribuye Dionex Corp. (www.dionex.com).]

L51—Partículas de sílice esféricas, porosas, recubiertas con amilosa tris-3,5-dimetilfenilcarbamato, de 5 μm a 10 μm de diámetro. [NOTA—Está disponible como Chiralpak AD que se puede obtener de Chiral Technologies, Inc., (www.chiraltech.com).]

L52—Resina de intercambio catiónico fuerte de sílice porosa con grupos sulfopropilo, de 5 μm a 10 μm de diámetro. [NOTA—Está disponible como TSK IC SW Cation que se puede obtener de Tosoh Biosep (www.tosohbiosep.com).]

L53—Resina de intercambio catiónico débil que consta de etilvinilbenceno, entrecruzado al 55% con copolímero de divinilbenceno, de 3 μm a 15 μm de diámetro. El sustrato está injertado en la superficie con ácido carboxílico y/o monómeros funcionalizados de ácido fosfórico. La capacidad es de no menos de 500 μEq /columna. [NOTA—Está disponible como IonPac CS14 distribuido por Dionex Corp. (www.dionex.com).]

L54—Medio de exclusión por tamaño constituido por dextrano unido covalentemente a perlas de agarosa porosa altamente entrecruzada, de aproximadamente 13 μm de diámetro. [NOTA—Está disponible como Superdex Peptide HR 10/30 que se puede obtener de Amersham Pharmacia Biotech (www.amershambiosciences.com).]

L55—Resina de intercambio catiónico fuerte hecha de sílice porosa recubierta con copolímero de polibutadieno-ácido maleico, de aproximadamente 5 μm de diámetro. [NOTA—Está disponible como IC-Pak C M/D que se puede obtener de Waters Corp. (www.waters.com).]

L56—Propilsilano unido químicamente a partículas de sílice totalmente porosas, de 3 μm a 10 μm de diámetro. [NOTA—Está disponible como Zorbax SB-C3 que se puede obtener de Agilent Technologies. (www.agilent.com/chem).]

L57—Proteína de reconocimiento quiral, ovomucoide, unida químicamente a partículas de sílice, de aproximadamente 5 μm de diámetro, con un tamaño de poro de 120 Å . [NOTA—Está disponible como Ultron ES-OVM que se puede obtener de Agilent Technologies (www.agilent.com/chem).]

L58—Resina de intercambio catiónico fuerte, que consiste de copolímero sulfonado entrecruzado de estireno-divinilbenceno en la forma sódica, de aproximadamente 7 μm a 11 μm de diámetro. [NOTA—Está disponible como Aminex HPX-87N que se puede obtener de Bio-Rad Laboratories, (N° de catálogo 2000/01, 125-0143) www.bio-rad.com.]

L59—Relleno con capacidad para separar proteínas por peso molecular en un intervalo de entre 10 y 500 kDa. Es esférico (10 µm), con base de sílice y tiene un procesamiento que le proporciona características hidrófilas y estabilidad de pH. [NOTA—Está disponible como TSKgel G3000SW Column (columna analítica) y como TSKgel Guard (guarda columna) que se pueden obtener de Tosoh Biosep (número de pieza 05789 y 05371, respectivamente) (www.tosohbiosep.com).]

L60—Gel de sílice poroso, esférico, de 3 µm o 5 µm de diámetro, cuya superficie se ha modificado covalentemente con grupos palmitamidopropilo y se ha recubierto exhaustivamente. [NOTA—Está disponible como Supelcosil ABZ que se puede obtener de Supelco (www.sigmaaldrich.com/supelco).]

L61—Resina de intercambio aniónico fuerte hidróxido-selectiva compuesta de un núcleo altamente entrecruzado de partículas microporosas de 13 µm con un tamaño de poro de menos de 10 Å y que consiste en etilvinilbenceno entrecruzado con divinilbenceno al 55%, con un recubrimiento de látex compuesto de microperlas de 85 nm de diámetro unidas con iones alicanol amonio cuaternario (6%).

[NOTA—Está disponible como Ion Pac AS 11 y como AG 11 que se pueden obtener de Dionex (www.dionex.com).]

L62—Fase de silano C30 unida a sílice esférica, totalmente porosa, de 3 µm a 15 µm de diámetro.

Fases

- G1—Aceite de dimetilpolisiloxano.
- G2—Goma de dimetilpolisiloxano.
- G3—50% de fenilpolisiloxano y 50% de metilpolisiloxano.
- G4—Poliéster de succinato de dietilenglicol.
- G5—3-Cianopropilpolisiloxano.
- G6—Trifluoropropilmetilpolisiloxano.
- G7—50% de 3-cianopropilsilicona y 50% de fenilmetilsilicona.
- G8—80% de bis (3-cianopropil)polisiloxano y 20% de 3-cianopropilfenilpolisiloxano (los porcentajes hacen referencia a la sustitución molar).
- G9—Metilvinilpolisiloxano.
- G10—Poliamida formada por reacción de un ácido dicarboxílico de C₃₆ con 1,3-di-4-piperidilpropano y piperidina en una relación molar de 1,00:0,90:0,20.
- G11—Poliéster de sebacato de bis(2-etilhexilo).
- G12—Poliéster de succinato de fenildietanolamina.
- G13—Sorbitol.
- G14—Polietilenglicol (peso molecular promedio de 950 a 1050).
- G15—Polietilenglicol (peso molecular promedio de 3000 a 3700).
- G16—Compuesto de polietilenglicol (peso molecular promedio de aproximadamente 15 000). Un compuesto de polietilenglicol de alto peso molecular con un enlazador diepóxido. [NOTA—Está disponible comercialmente como Polyethylene Glycol Compound 20M o como Carbowax 20M, que se pueden obtener de proveedores de reactivos para cromatografía.]
- G17—75% de fenilpolisiloxano y 25% de metilpolisiloxano.
- G18—Polialquilenglicol.
- G19—25% de fenilsilicona, 25% de cianopropilsilicona y 50% de metilsilicona.
- G20—Polietilenglicol (peso molecular promedio de 380 a 420).
- G21—Succinato de neopentilglicol.
- G22—Ftalato de bis(2-etilhexilo).
- G23—Adipato de polietilenglicol.
- G24—Ftalato de disodécilo.
- G25—Compuesto de polietilenglicol y ácido tereftálico (TPA, por sus siglas en inglés). Un compuesto de alto peso molecular de un polietilenglicol y un diepóxido que se esterifica con ácido tereftálico. [NOTA—Está disponible comercialmente como Carbowax 20M-TPA que se puede obtener de proveedores de reactivos para cromatografía.]
- G26—25% de 2-cianoetilpolisiloxano y 75% de metilpolisiloxano.
- G27—5% de fenilpolisiloxano y 95% de metilpolisiloxano.
- G28—25% de fenilpolisiloxano y 75% de metilpolisiloxano.
- G29—3,3'-Tiodipropionitrilo.
- G30—Tetraetilenglicol dimetil éter.
- G31—Nonilfenoxipoli(etilenoxi)etanol (la longitud promedio de la cadena etilenoxi es 30); Nonoxinol 30.

G32—20% de fenilmetilpolisiloxano y 80% de dimetilpolisiloxano.

G33—20% de carboranosilicona y 80% de metilsilicona.

G34—Poliéster de succinato de dietilenglicol estabilizado con ácido fosfórico.

G35—Un compuesto de alto peso molecular de polietilenglicol y un diepóxido que se esterifica con ácido nitrotereftálico.

G36—1% de vinilpolisiloxano y 5% de fenilmetilpolisiloxano.

G37—Poliimida.

G38—Fase G1 que contiene un pequeño porcentaje de inhibidor de asimetría. [NOTA—Un grado adecuado está disponible comercialmente como "SP2100/0,1% Carbowax 1500" que se puede obtener de Supelco, Inc., (www.sigmaaldrich.com/supelco).]

G39—Polietilenglicol (peso molecular promedio aproximadamente 1500).

G40—Adipato de etilenglicol.

G41—Fenilmetildimetilsilicona (sustituida al 10% por fenilo).

G42—35% de fenilpolisiloxano y 65% de dimetilpolisiloxano (los porcentajes hacen referencia a la sustitución molar).

G43—6% de cianopropilfenilpolisiloxano y 94% de dimetilpolisiloxano (los porcentajes hacen referencia a la sustitución molar).

G44—2% de grasa de hidrocarburos de vaselina de bajo peso molecular y 1% de solución de hidróxido de potasio.

G45—Divinilbenceno-etilenglicol-dimetilacrilato.

G46—14% de cianopropilfenilpolisiloxano y 86% de metilpolisiloxano.

G47—Polietilenglicol (peso molecular promedio aproximadamente 8000).

G48—Cianopolisiloxano altamente polar y parcialmente entrecruzado.

Soportes

NOTA—A menos que se especifique algo diferente, se indican tamaños de malla de 80 a 100 o alternativamente de 100 a 120.

S1A—Tierra silícea para cromatografía de gases que ha sido fundida-calcinada mezclando diatomita con flujo de Na₂CO₃ y calcinada a una temperatura superior a 900°. La tierra silícea se lava con ácido, luego se lava con agua hasta lograr la neutralidad, pero no se lava con bases. La tierra silícea puede ser silanizada al tratarla con un agente como dimetildiclorosilano [NOTA—A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, se indica un soporte silanizado.] para enmascarar los grupos silanoles superficiales.

S1AB—Tierra silícea conforme a la descripción anterior pero lavada con ácido y base. [NOTA—A menos que se especifique algo diferente en la monografía individual, se indica un soporte silanizado.]

S1C—Un soporte preparado con ladrillo refractario molido y calcinado o quemado con arcilla como aglutinante, a una temperatura por encima de los 900° y lavado posteriormente con ácido. Puede estar silanizado.

S1NS—Tierra silícea no tratada.

S2—Copolímero de estireno-divinilbenceno con un área nominal de menos de 50 m² por g y un diámetro de poro promedio de 0,3 µm a 0,4 µm.

S3—Copolímero de etilvinilbenceno y divinilbenceno con un área nominal de 500 m² a 600 m² por g y un diámetro de poro promedio de 0,0075 µm.

S4—Copolímero de estireno-divinilbenceno con grupos aromáticos -O y -N con un área nominal de 400 m² a 600 m² por g y un diámetro de poro promedio de 0,0076 µm.

S5—Polímero de tetrafluoroetileno de alto peso molecular de malla 40 a 60.

S6—Copolímero de estireno-divinilbenceno con un área nominal de 250 m² a 350 m² por g y un diámetro de poro promedio de 0,0091 µm.

S7—Carbono grafitizado que tiene un área nominal de 12 m² por g.

S8—Copolímero de 4-vinil-piridina y estireno-divinilbenceno.

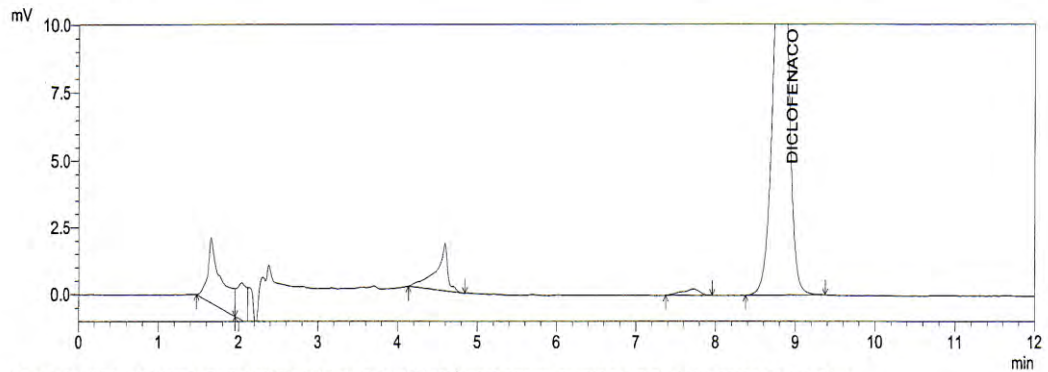
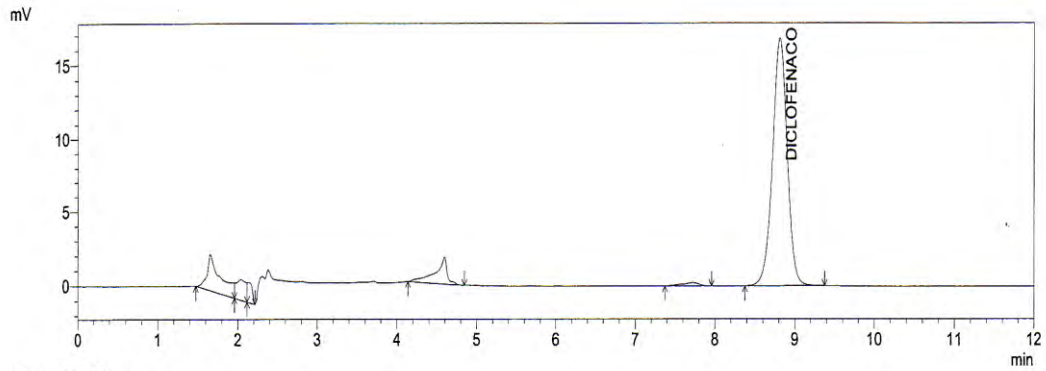
S9—Polímero poroso a base de óxido de 2,6-difenil-*p*-fenileno.

S10—Copolímero altamente polar entrecruzado con acrilonitrilo y divinilbenceno.

ANEXO N° 12

CROMATOGRAMA DEL ESTÁNDAR DE DICLOFENADO SÓDICO

Acquired by / on : Mariana Vázquez / 26/08/2006 17:56:27
 Sample Name / ID : Estándar Diclofenaco / 1-1
 Sample Amount : 1
 Dilution factor : 1
 Sample Type : Standard (Level: 1)
 Vial # / Injection Volume : 68 / 10 µl
 Method file : DICLO-SUSP Disolución.lcm
 Batch file : 003-DICLOSUSP-PERFIL DE DISOLUCION 1 Y 2 -20060826-1.lcb
 Report file : Std_noCurve_(UV).lcr
 Data Processed by / on : Mariana Vázquez / 09/12/2006 11:54:38



Detector A Ch1 255nm

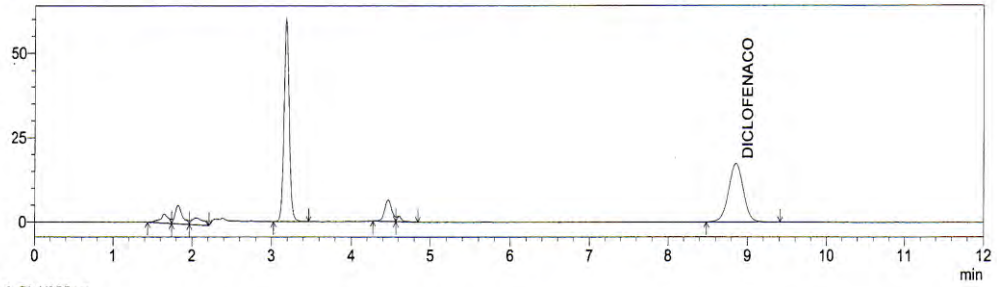
Peak #	ID#	Name	Ret. Time	Area	Mark	Area %	Height	th. Plates	HETP	Tail. Fact.	Resol.	k'
1			1.652	29122		10.26	2402	0	0.0	0.00	0.00	0.00
2			2.037	11917	V	4.20	1374	0	0.0	0.00	0.00	0.00
3			2.150	5523	V	1.95	1365	0	0.0	0.00	0.00	0.00
4			4.586	18044		6.36	1742	0	0.0	0.00	0.00	0.00
5			7.722	3410		1.20	229	0	0.0	0.00	0.00	0.00
6	1	DICLOFENACO	8.807	215780		76.03	16760	10745	23.3	1.01	0.00	4.33
Total				283795		100.00						

ANEXO N° 13

CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA

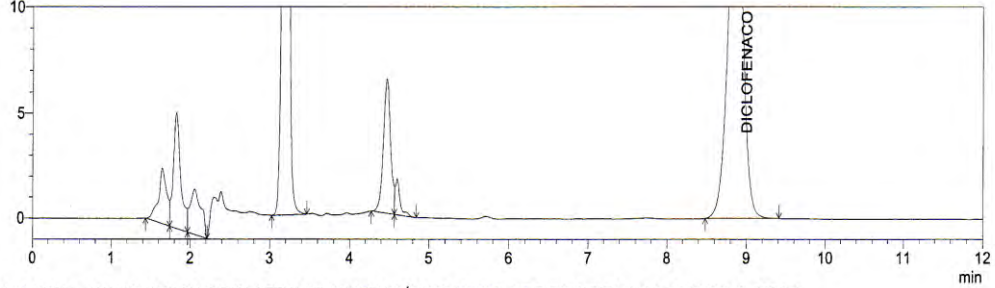
Acquired by / on : Mariana Vázquez / 26/08/2006 22:07:32
 Sample Name / ID : Diclofenaco L 06040150 Perfil 1 - 60 min / Muestra 1
 Sample Amount : 8.51455
 Dilution factor : 88000
 Sample Type : Unknown
 Vial # / Injection Volume : 20 / 10 µl
 Method file : DICLO-SUSP Disolución.lcm
 Batch file : 003-DICLOSUSP-PERFIL DE DISOLUCION 1 Y 2 -20060826-1.lcb
 Report file : Unk_Single(UV).lcr
 Data Processed by / on : Mariana Vázquez / 09/12/2006 11:57:38

@H:\IDESARROLLO\DICLOFENACO SUSPENSIÓN\003-PERFIL DE DISOLUCION 1 Y 2 -20060826-1_023.lcd
mV



1 Det.A Ch1/255nm

@H:\IDESARROLLO\DICLOFENACO SUSPENSIÓN\003-PERFIL DE DISOLUCION 1 Y 2 -20060826-1_023.lcd
mV



1 Det.A Ch1/255nm/ H:\IDESARROLLO\DICLOFENACO SUSPENSIÓN\003-PERFIL DE DISOLUCION 1 Y 2 -20060826-1_023.lcd

@H:\IDESARROLLO\DICLOFENACO SUSPENSIÓN\003-PERFIL DE DISOLUCION 1 Y 2 -20060826-1_023.lcd

Detector A Ch1 255nm

Peak #	ID#	Name	Ret. Time	Area	Mark	Area %	Height	th. Plates	HETP	Tail. Fact.	Resol.	K'
1			1.641	19837		3.19	2647	0	0.0	0.00	0.00	0.00
2			1.819	35655	V	5.73	5499	0	0.0	0.00	0.00	0.00
3			2.052	20315	V	3.26	2141	0	0.0	0.00	0.00	0.00
4			3.179	275201		44.21	60431	0	0.0	0.00	0.00	0.00
5			4.465	40852		6.56	6403	0	0.0	0.00	0.00	0.00
6			4.598	7286	V	1.17	1741	0	0.0	0.00	0.00	0.00
7	1	DICLOFENACO	8.853	223358		35.88	17329	10728	23.3	1.01	0.00	4.39
Total				622504		100.00						

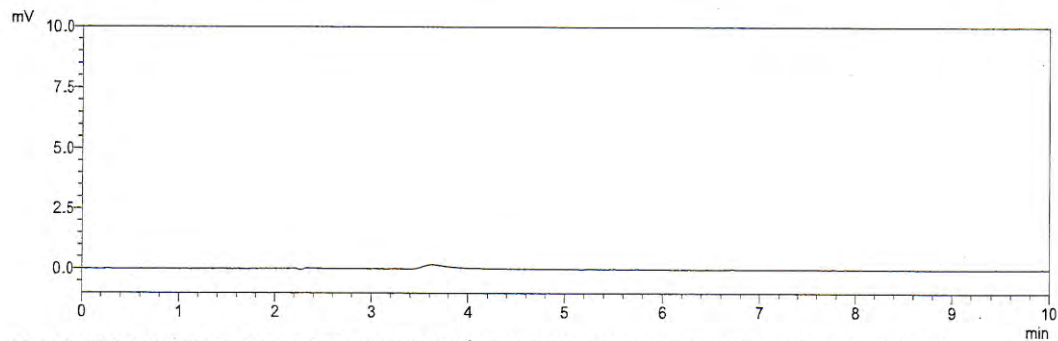
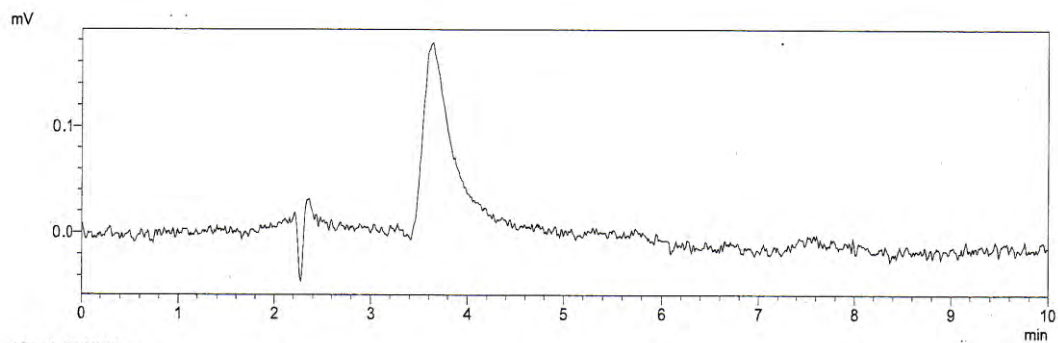
Detector A

Peak#	ID#	Name	Conc.
7	1	DICLOFENACO	106.41753

ANEXO N° 14

CROMATOGRAMA FASE MÓVIL

Acquired by / on : Enrique Posada / 09/07/2005 17:29:52
Sample Name / ID : Blank / FASE MOVIL
Sample Amount : 1
Dilution factor : 1
Sample Type : Unknown
Vial # / Injection Volume : 0 / 10 µl
Method file : DICLO-SUSP Linealidad-FSST-Disolución SH2.lcm
Batch file : 002-DICLO SUSP-20050709-Linealidad-1-FSSTEDisolucion.lcb
Report file : Unk_CarryOver(UV).lcr
Data Processed by / on : Enrique Posada / 12/07/2005 15:44:36



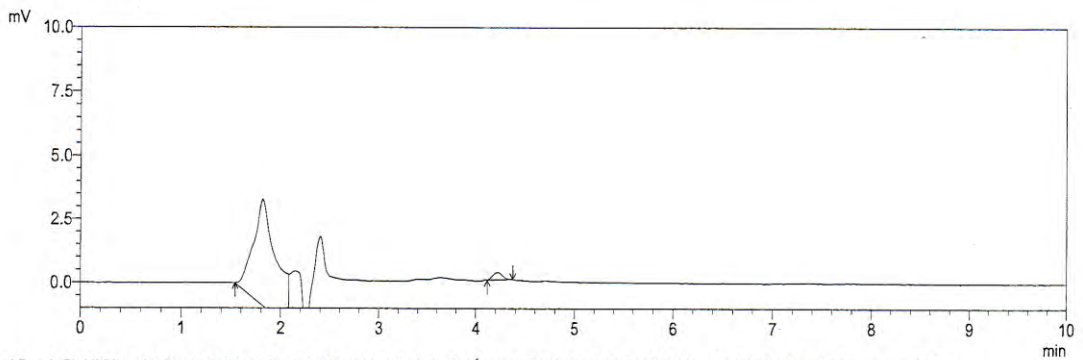
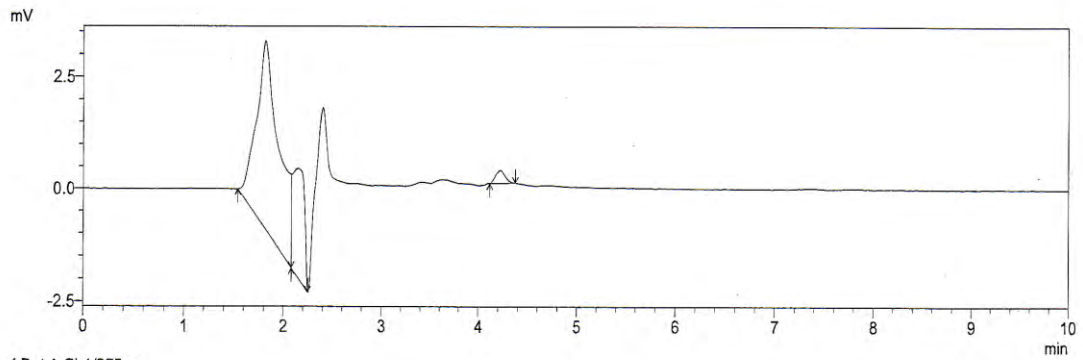
Detector A Ch1 255nm

Peak#	ID#	Name	Carry Over
1		DICLOFENACO	0.00

ANEXO N° 15

CROMATOGRAMA LAURIL SULFATO DE SODIO 2%

Acquired by / on : Enrique Posada / 09/07/2005 21:02:32
 Sample Name / ID : Blank / LSS 2%
 Sample Amount : 1
 Dilution factor : 1
 Sample Type : Unknown
 Vial # / Injection Volume : 16 / 10 µl
 Method file : DICLO-SUSP Linealidad-FSST-Disolución SH2.lcm
 Batch file : 002-DICLO SUSP-20050709-Linealidad-1-FSSTEDisolucion.lcb
 Report file : Unk_CarryOver(UV).lcr
 Data Processed by / on : Enrique Posada / 12/07/2005 15:46:46



Detector A Ch1 255nm

Peak #	ID#	Name	Ret. Time	Area	Mark	Area %	Height	th. Plates	HETP	Tail. Fact.	Resol.	k'
1			1.811	68147		76.01	4178	0	0.0	0.00	0.00	0.00
2			2.147	19538	V	21.79	2424	0	0.0	0.00	0.00	0.00
3			4.217	1966		2.19	289	0	0.0	0.00	0.00	0.00
Total				89650		100.00						

Detector A

Peak#	ID#	Name	Carry Over
1		DICLOFENACO	0.00