

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC), PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CLORHIDRATO DE CLORHEXIDINA + BENZOCAÍNA + ENOXOLONA EN COMPRIMIDOS ORALES

Tesis presentada por la bachiller:

Choque Cerón Lilian Jesús

Para optar el Título Profesional de:

Químico Farmacéutico

Asesor: Q.F. Ramírez Orellana Juan

AREQUIPA – PERU

2017

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Expediente N°. 20170000020451

N° Trámite en Fac. 1707-2017

Fecha 26-04-2017

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

DE: **CHOQUE CERON, Lilian Jesus**

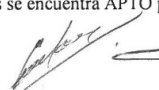
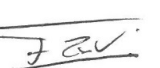
TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"VALIDACION DE UNA TECNICA ANALITICA POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC), PARA LA CUANTIFICACION DE CLORHIDRATO DE CLORHEXIDINA+BENZOCAINA+ENOXOLONA Y LA DETECCION DE IMPUREZAS EN COMPRIMIDOS ORALES"

DICTAMINADORES: 1) **Dr. Jaime Cárdenas García** 2) **Q. F. Fernando Torres Vela**

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, como Dictaminadores del Plan de Tesis presentado por las recurrentes, se ha procedido a la revisión del mismo, sugiriendo se cambie el título a: **"VALIDACION DE UNA TECNICA ANALITICA POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC), PARA LA CUANTIFICACION DE CLORHIDRATO DE CLORHEXIDINA – BENZOCAINA – ENOXOLONA EN COMPRIMIDOS ORALES"**, y después de realizadas las correcciones y sugerencias correspondientes, consideramos se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

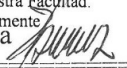
Atentamente

Firmas :   (Devolver antes de 8 días hábiles) Fecha

ASESOR: Q. F. Juan Ramírez Orellana

DICTAMEN DE ASESOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación se ha asesorado el presente Trabajo de Investigación y después de efectuadas las observaciones, considero que el título debe cambiar a: **"VALIDACION DE UNA TECNICA ANALITICA POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC), PARA LA CUANTIFICACION DE CLORHIDRATO DE CLORHEXIDINA+BENZOCAINA+ENOXOLONA EN COMPRIMIDOS ORALES"** y luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes considero se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Atentamente

Firma 

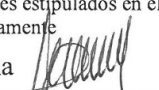
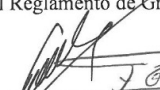
Fecha 17/11/17

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Dr. José Villanueva Salas**
- 2) **Dr. Jaime Cárdenas García**
- 3) **Q. F. Fernando Torres Vela**

DICTAMEN DE BORRADOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por los recurrentes, y luego de haber verificado el cumplimiento de los objetivos, la redacción del informe, de los resultados, discusión y conclusiones correspondientes, consideramos se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

Firma   (Devolver antes de 15 días hábiles) Fecha 20-12-2017

JURADOS: Presidente
Vocal
Secretario

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha: 28/12/17 Hora: 12:00 Local: C- 402 (SUM)

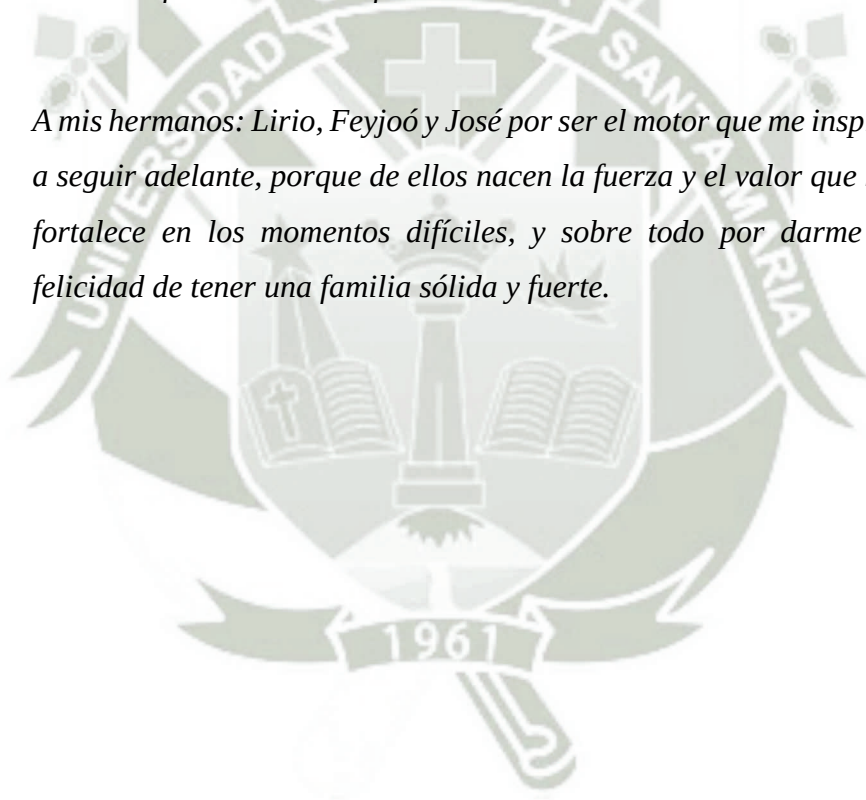

DECANO

DEDICATORIA

A Dios por haberme dado salud e integridad para llegar hasta este punto y así poder lograr mis metas.

A mi madre Doña Baselisa por su apoyo incondicional, su fuerza, sus valores, porque me ha proporcionado todo cuanto he necesitado, por su amor y sobre todo por el ejemplo que me brinda con su lucha constante frente a los desafíos de la vida.

A mis hermanos: Lirio, Feyjoó y José por ser el motor que me inspira a seguir adelante, porque de ellos nacen la fuerza y el valor que me fortalece en los momentos difíciles, y sobre todo por darme la felicidad de tener una familia sólida y fuerte.



AGRADECIMIENTOS

A la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica por la formación profesional recibida

A mi asesor el Q.F. Juan Ramirez Orellana, por brindarme sus consejos, su apoyo y su tiempo cada vez que fue necesario para la realización del presente trabajo

A la doctora Q.F. Gladis Elena Sosa Tananta, por su apoyo incondicional y la confianza depositada en mi persona.

A mis amigos Deysi, Evelin, Lizzet y Lucio por sus palabras de apoyo, sus consejos y compañía en todas las etapas de nuestro desarrollo profesional.

A Ronald porque el apoyo y el cariño brindado ha sido sumamente importante en los momentos más difíciles durante todo este proceso.

ÍNDICE

RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	VI
INTRODUCCIÓN	VIII
HIPÓTESIS	X
OBJETIVOS.....	XI
 CAPÍTULO I.....	 1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Validación de una técnica analítica.....	1
1.1.1. Tipos de validación	2
1.1.2. ¿Con qué frecuencia se realiza una validación?	3
1.1.3. ¿Por qué validar?.....	3
1.1.4. Parámetros de validación de métodos analíticos.	5
1.1.5. Aspectos que se deben tener en cuenta en la validación de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC)	8
1.2. Calificación de instrumentos analíticos	10
1.3. Términos relacionados a la validación de técnicas analíticas.	13
1.4. Procedimiento analítico.....	17
1.5. Cromatografía líquida de alta performance (HPLC).....	18
1.5.1. Fase estacionaria	19
1.5.2. Columna cromatográfica.....	19
1.5.3. Fase móvil.....	19
1.5.4. Aparato.....	20
1.6. Parámetros cromatográficos para técnicas propias.	23
1.7. Clorhidrato de clorhexidina.....	24
1.8. Benzocaína	25
1.9. Enoxolona	26

1.10. Asociación de Clorhexidina HCl + Benzocaína + Enoxolona comprimidos orales.....	28
--	----

CAPÍTULO II 29

MATERIALES Y MÉTODOS..... 29

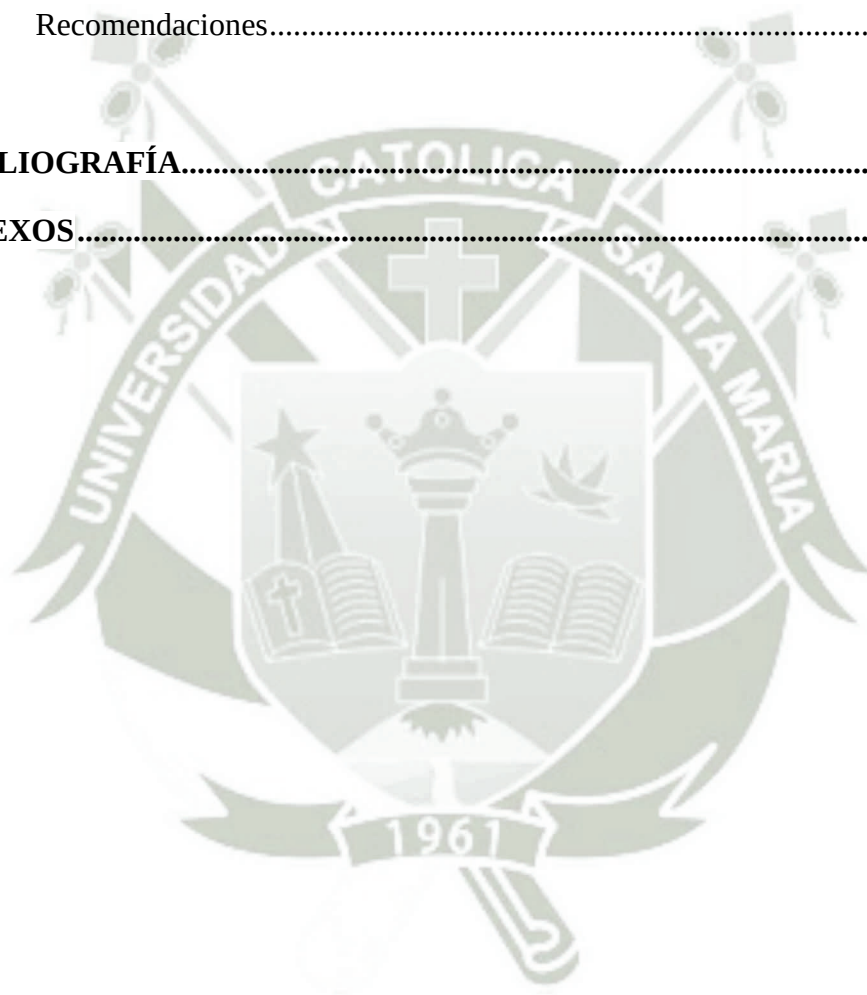
2.1. Descripción del método analítico.....	29
2.2. Equipos, materiales y reactivos.....	29
2.3. Muestra	31
2.4. Procedimiento analítico.....	32
2.4.1. Método	32
2.4.2. Sistema cromatográfico	32
2.4.3. Preparación de la fase móvil.....	32
2.4.4. Preparación de la solución estándar.....	32
2.4.5. Preparación de la solución muestra.....	33
2.5. Cálculos para determinar la concentración de los analitos de interés.....	33
2.6. Desarrollo de los parámetros de validación	34
2.6.1. Aptitud del sistema	35
2.6.2. Selectividad	36
2.6.3. Linealidad	38
2.6.4. Exactitud	45
2.6.5. Precisión	46
2.6.6. Estabilidad de muestra preparada.	47
2.7. Criterios de aceptación de los parámetros de validación	48

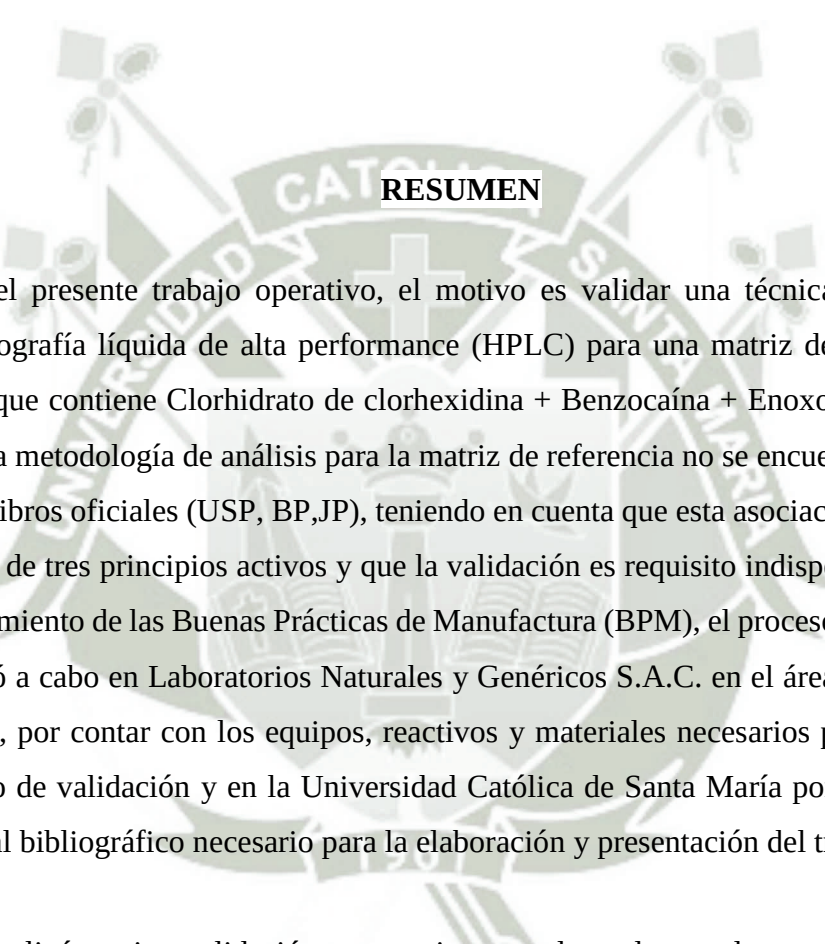
CAPÍTULO III..... 51

RESULTADOS..... 51

3.1. Aptitud de sistema.....	51
3.2. Selectividad	53
3.3. Linealidad	55
3.4. Exactitud	71

3.5. Precisión	75
3.6. Estabilidad de la muestra preparada.....	79
3.7. Resumen de resultados.....	83
 CAPÍTULO IV	86
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	86
4.1. Conclusiones	86
4.2. Recomendaciones.....	88
 BIBLIOGRAFÍA.....	89
ANEXOS.....	95





RESUMEN

En el presente trabajo operativo, el motivo es validar una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para una matriz de comprimidos orales que contiene Clorhidrato de clorhexidina + Benzocaína + Enoxolona, debido a que una metodología de análisis para la matriz de referencia no se encuentra registrada en los libros oficiales (USP, BP,JP), teniendo en cuenta que esta asociación contiene la mezcla de tres principios activos y que la validación es requisito indispensable para el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), el proceso de validación se llevó a cabo en Laboratorios Naturales y Genéricos S.A.C. en el área de control de calidad, por contar con los equipos, reactivos y materiales necesarios para realizar el proceso de validación y en la Universidad Católica de Santa María por contar con el material bibliográfico necesario para la elaboración y presentación del trabajo de tesis.

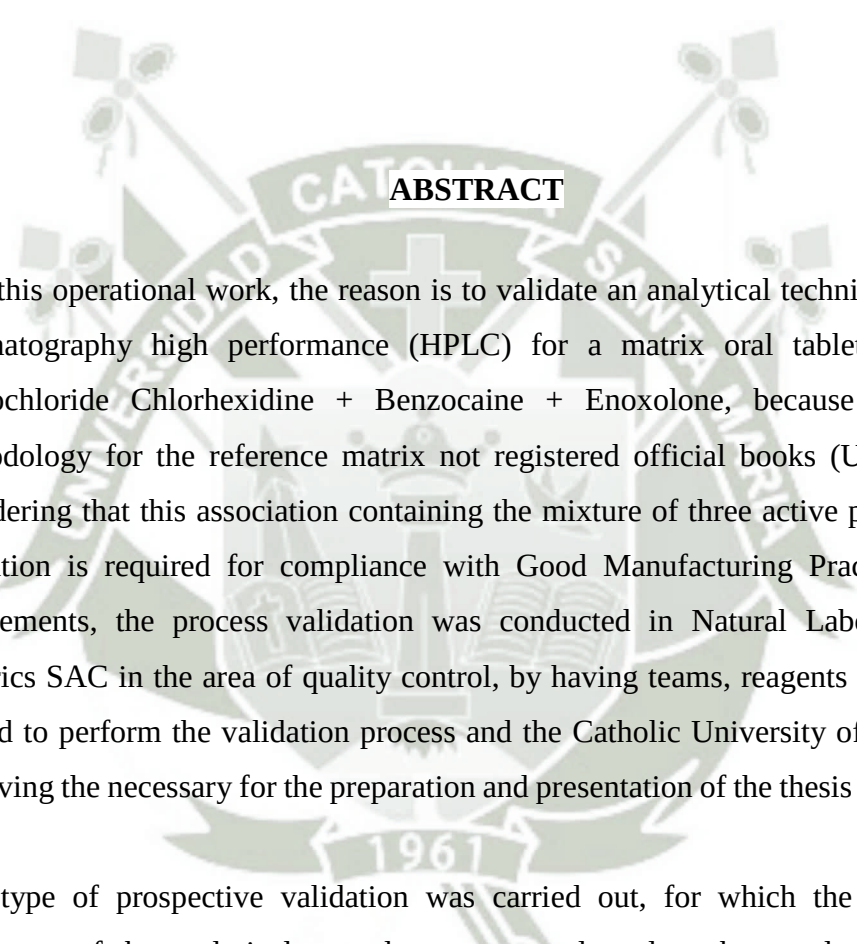
Se realizó un tipo validación prospectiva, para la cual se evaluaron los parámetros de desempeño de los procedimientos analíticos como son: aptitud de sistema selectividad, linealidad, exactitud y precisión, además se realizó una prueba adicional de estabilidad de muestra preparada. Las condiciones cromatográficas se establecieron con un sistema isocrático, a una longitud de onda de 254 nm con una velocidad de flujo de 1.5 mL/minuto a 40°C, se utilizó una columna Luna Phenyl Hexyl 250 mm x 4.6 mm (5 µm) y una fase móvil compuesta por de 2 g de Octanosulfonato de sodio disuelto en 252 mL de agua, 528 mL de acetonitrilo, 190 mL de metanol y 30 mL de ácido

acético glacial para obtener un volumen final de 1 L de fase móvil; el volumen de inyección fue de 15 μ L, el tiempo de retención fue de 2.52 minutos para Benzocaína; 3.88 minutos para Clorhexidina HCl y 9.87 minutos para Enoxolona por lo que se estableció un tiempo de corrida de 15 minutos por inyección aproximadamente.

Los resultados, luego de llevar a cabo los parámetros de validación fueron: Selectividad (no se evidencia coelución, con una interferencia de placebo de 0.0% para los 3 principios activos). Linealidad (se obtiene un coeficiente de correlación $r_{\text{Benzocaína}} = 0.99937$, $r_{\text{Clorhexidina HCl}} = 0.99935$ y $r_{\text{Enoxolona}} = 0.99904$). Precisión (para la repetibilidad se obtiene una C.V. $\text{Benzocaína} = 0.40\%$, C.V. $\text{Clorhexidina HCl} = 1.25\%$ y un C.V. $\text{Enoxolona} = 0.85\%$). Exactitud (se obtiene un porcentaje de recuperación de Benzocaína = 99.41%, Clorhexidina HCl = 100.42 % y Enoxolona = 99.30 %). Además se realizó pruebas de estabilidad de muestra preparada, obteniendo un sesgo de Clorhexidina HCl = 0.33, sesgo de Benzocaína = 1.49 y sesgo de Enoxolona = 1.68; a los tiempos de análisis de 0, 12 y 24 horas. Estos resultados se obtuvieron una vez que fueron definidas las condiciones de los parámetros de desempeño los cuales demostraron la aplicabilidad del procedimiento analítico propuesto con lo cual se establece evidencia documentada de que el método analítico es selectivo, lineal, preciso y exacto, se debe mencionar que para llevar a cabo ésta validación se tuvo en cuenta la calificación de cada elemento importante, como la calibración de instrumentos, calificación operacional, equipos, instalaciones y diseño del producto.

El procedimiento se llevó a cabo cumpliendo los parámetros de validación establecidos en las ICH, por lo que se pudo comprobar la validez del método analítico, y que éste puede ofrecer confiabilidad para ser empleado en los laboratorios de control de calidad, esto contribuye con el desarrollo del profesional químico farmacéutico en el área de tecnología farmacéutica para hallar nuevas alternativas al formular productos con dos o más constituyentes, en donde es preciso no solo la solución de una posible incompatibilidad tecnológica sino garantizar seguridad y eficacia farmacológica.

Palabras clave: Validación, HPLC, Benzocaína, Clorhexidina Clorhidrato, Enoxolona



ABSTRACT

In this operational work, the reason is to validate an analytical technique by liquid chromatography high performance (HPLC) for a matrix oral tablets containing Hydrochloride Chlorhexidine + Benzocaine + Enoxolone, because an analysis methodology for the reference matrix not registered official books (USP, BP, JP), considering that this association containing the mixture of three active principles and validation is required for compliance with Good Manufacturing Practices (GMP) requirements, the process validation was conducted in Natural Laboratories and Generics SAC in the area of quality control, by having teams, reagents and materials needed to perform the validation process and the Catholic University of Santa Maria for having the necessary for the preparation and presentation of the thesis bibliography.

A type of prospective validation was carried out, for which the performance parameters of the analytical procedures were evaluated, such as: selectivity system aptitude, linearity, accuracy and precision, as well as an additional sample stability test prepared. Chromatographic conditions were established with an isocratic system at a wavelength of 254 nm with a flow rate of 1.5 mL / minute at 40 ° C, a moon Phenyl Hexyl 250 mm x 4.6 mm (5 um) column was used and a mobile phase composed of 2g octanesulfonate sodium dissolved in 252 mL water, 528 mL acetonitrile, 190 mL of methanol and 30 mL of glacial acetic acid to a final volume of 1 L of mobile phase; the injection volume was 15 uL, the retention time was 2.52 minutes for Benzocaine; 3.88

minutes for Chlorhexidine HCl and 9.87 minutes for Enoxolone for which a running time of 15 minutes was established by injection..

The results after carrying out the validation parameters were: selectivity (coelution not evident with placebo interference 0.0% to 3 active ingredients); Linearity (correlation coefficient $r_{\text{Benzocaine}} = 0.99937$, $r_{\text{Chlorhexidine HCl}} = 0.99935$ and $r_{\text{Enoxolone}} = 0.99904$ is obtained); Precision (repeatability for one C.V. $\text{Benzocaine} = 0.40\%$, C.V. $\text{Chlorhexidine HCl} = 1.25\%$ and C.V. $\text{Enoxolone} = 0.85\%$ obtained); Accuracy (recovery percentage $\text{Benzocaine} = 99.41\%$, 100.42% $\text{Chlorhexidine HCl} = 99.30\%$ and $\text{Enoxolone} =$ is obtained). In addition, stability tests of the prepared sample were performed, obtaining a $\text{Chlorhexidine HCl} = 0.33$, bias of $\text{Benzocaine} = 1.49$ and bias of $\text{Enoxolone} = 1.68$; at the analysis times of 0, 12 and 24 hours. These results were obtained once the conditions of the performance parameters were defined which demonstrated the applicability of the proposed analytical procedure, which establishes documented evidence that the analytical method is selective, linear, precise and exact, it should be mentioned that To carry out this validation, the qualification of each important element was taken into account, such as instrument calibration, operational qualification, equipment, facilities and product design.

The procedure was carried out in compliance with the validation parameters established in the ICH, so that the validity of the analytical method could be verified, and that it can offer reliability to be used in quality control laboratories, this contributes to the development of the pharmaceutical chemistry professional in the area of pharmaceutical technology to find new alternatives when formulating products with two or more constituents, where it is necessary not only the solution of a possible technological incompatibility but to guarantee safety and pharmacological efficacy.

Keywords: Validation, HPLC, Benzocaine, Chlorhexidine Hydrochloride, Enoxolone

INTRODUCCIÓN

La validación de un método analítico es el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas, mediante estudios sistemáticos de laboratorio y demostrativos, de que una técnica analítica es lo suficientemente fiable y reproducible para producir el resultado previsto dentro de los intervalos definidos. El proceso de validación permite el conocimiento de las características de funcionamiento del método y proporciona un alto grado de confianza en el mismo y en los resultados obtenidos al aplicarlo. En todo caso, la industria farmacéutica, consiente de su responsabilidad, actúa siempre buscando mejorar la calidad del medicamento a lo largo del proceso de fabricación. El objetivo claramente es conseguir que el medicamento sea seguro, estable y eficaz, y la validación constituye un instrumento importante para lograr dicho fin.

Se debe tener en cuenta que los métodos analíticos que vayan a ser usados con fines de identificación, cuantificación, detección y determinación de características de desempeño, deben validarse para cumplir con las exigencias contempladas en la dirección general de medicamentos insumos y drogas (DIGEMID), según el artículo 176° del Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de productos farmacéuticos (BPM), que se rige a su vez en las reglamentaciones dadas por las Farmacopeas USP, BP y el Consejo Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos de los Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH) por sus siglas en ingles.

Las exigencias legales definen como método analítico a la adaptación específica de una técnica analítica para un propósito de medición seleccionado por lo que la validación de un procedimiento analítico es el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.

Por el momento los libros oficiales solo mencionan métodos analíticos para el análisis cuantitativo de formulaciones que contienen Clorhidrato de clorhexidina, Benzocaína y Enoxolona de forma individual y en diferentes formas farmacéuticas, pero ninguna menciona un método analítico para el análisis fisicoquímico de los principios activos combinados en una sola presentación farmacéutica, por ello es importante realizar una validación para demostrar que el método analítico es apto para el control de calidad de la forma farmacéutica a investigar. Para el desarrollo químico – farmacéutico de un nuevo medicamento es imprescindible la utilización de un método analítico que permita cuantificar el analito en forma de materia prima o como ingrediente activo de una formulación. Para asegurar la confiabilidad, los métodos analíticos se someten a un proceso de validación, ya sea de carácter prospectivo, retrospectivo o de revalidación, se comprueba si el método es lo suficientemente confiable y si los resultados previstos se obtienen dentro de las condiciones fijadas. La validación de los métodos analíticos se fundamenta en la determinación de diversos parámetros, que se aplican de acuerdo con la categoría a la que pertenezcan.

En el trabajo presentado se ha validado una técnica analítica desarrollada por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para cuantificar una matriz que contiene una asociación de Clorhidrato de clorhexidina 5 mg + Benzocaína 4 mg + Enoxolona 3 mg/comprimido en la cual se han desarrollado los parámetros de desempeño analítico de selectividad, linealidad, precisión, precisión intermedia, exactitud y estabilidad de la muestra por lo que en conjunto, la validación de éste método analítico proporciona un alto grado de confianza y seguridad en los resultados obtenidos.

HIPÓTESIS

Dado que no existen métodos analíticos estandarizados por organismos internacionales como la USP, BP y JP para cuantificar Clorhexidina Clorhidrato + Benzocaína + Enoxolona en asociación dentro de una misma matriz, es probable que se pueda validar una técnica analítica al desarrollar los parámetros mínimos exigidos por las BPM para que esta pueda utilizarse para el análisis y control de calidad de la matriz mencionada.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Validar una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para una matriz compuesta por una asociación de Clorhidrato de clorhexidina + Benzocaína + Enoxolona en comprimidos orales, con fines analíticos de cuantificación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar las condiciones cromatográficas (número de platos teóricos, factor de asimetría y coeficiente de variación) para el cumplimiento de la aptitud de sistema del método analítico desarrollado por HPLC.
- Determinar los parámetros de desempeño mínimos que se requieren para el proceso de validación de una técnica analítica.
- Demostrar que las muestras preparadas siguiendo la técnica analítica propuesta, se mantienen estables después de un tiempo de almacenamiento de 12 a 24 horas en condiciones de temperatura de 2 a 8 °C.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1.VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA ANALÍTICA

La validación de una técnica analítica es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, que cumple con las características de desempeño del procedimiento, los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas y con las características de desempeño analítico habituales que deben considerarse en una validación. Es el establecimiento de evidencia documentada de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos. La importancia de validar una técnica analítica consiste en demostrar que dicha técnica es adecuada para el uso al cual está destinada.¹

Los estudios de validación constituyen una parte esencial de las BPM, deben efectuarse conforme a protocolos definidos de antemano. Debe prepararse y archivers un reporte escrito que resuma los resultados y las conclusiones registrados. Deben establecerse procesos y procedimientos sobre la base de un estudio de validación los cuales se sometan periódicamente a una revalidación para asegurar que con ellos se pueden seguir obteniendo los resultados deseados. Se debe prestar especial atención a

la validación de procesos, limpieza y de los métodos analíticos.

En términos generales; validación es la acción que demuestra, en forma documentada, que un proceso, equipo, material, actividad o sistema conduce a los resultados previstos.^{2,3}

1.1.1. TIPOS DE VALIDACIÓN

Los laboratorios deben validar los métodos no normalizados que corresponden a métodos desarrollados por ellos, métodos nuevos o bien métodos que tradicionalmente se han utilizado pero que no están normalizados.⁴⁷, es por ello que se pueden dar distintos tipos de validación, los cuales se describen a continuación.

a) Validación prospectiva

Este tipo de validación se realiza cuando la verificación del cumplimiento de las condiciones establecidas para un proceso o método analítico, se llevan a cabo antes de la comercialización del producto. Este tipo de validación se aplica cuando se elabora un nuevo método analítico, es típico en los laboratorios de investigación y desarrollo, se realiza de acuerdo con un protocolo perfectamente planificado y comprende el estudio de todos los criterios necesarios para demostrar el buen funcionamiento del método.⁴ Para llevar a cabo este proceso de validación se tiene un diagrama el cual se observa en la figura 1.1.

b) Validación retrospectiva

Se realiza cuando la idoneidad del proceso o método analítico, se basa en la garantía constatada a través de los datos analíticos del producto ya comercializado. Se aplica a métodos no validados previamente y de los que se tiene una amplia historia de resultados. Este tipo de validación se aplica para métodos por: cromatografía líquida, Métodos espectrofotométricos y métodos volumétricos.⁵

c) Revalidación

La introducción de un cambio que pueda afectar la idoneidad del método

analítico establecido por la validación, podrá exigir una nueva validación, es decir una revalidación total o parcial de dicho método analítico. Los criterios a estudiar se deciden en función del tipo de cambio efectuado. Entre los motivos que exigen una nueva validación tenemos: ⁵

- Cambios importantes en la matriz del producto.
- Cambios importantes en el método analítico.
- Cambios en las especificaciones.

1.1.2. ¿CON QUÉ FRECUENCIA SE REALIZA UNA VALIDACIÓN?³

- Cuando se implemente un nuevo método analítico
- Cuando haya una transferencia de métodos analíticos.
- Cuando se incorpore un equipo nuevo con diferentes características.
- Cuando se cambia el alcance de un método normalizado.
- Cuando se aplique el control de cambio que lo mande.

1.1.3. ¿POR QUÉ VALIDAR?

La Validación de un método analítico, garantiza la calidad del medicamento, así mismo es necesaria porque: ⁴

- Proporciona un alto grado de confianza, seguridad en el método analítico y en la calidad de los resultados.
- Permite un conocimiento profundo del método, así como de sus características de funcionamiento. Este conocimiento y seguridad en los métodos analíticos que han sido validados, se traduce en la disminución del número de fallas y repeticiones, con el consiguiente ahorro de los costos asociados y consecuentemente cumplir con los plazos previstos de análisis.
- Trabajar con métodos validados permite cumplir con las exigencias legales tanto del registro de especialidades farmacéuticas como las buenas prácticas de laboratorio con el fin de asegurar la calidad y la eficacia del producto.

- Contribuye con la optimización del proceso de producción de un medicamento al mejorar, dentro de lo posible, los aspectos de calidad del producto.

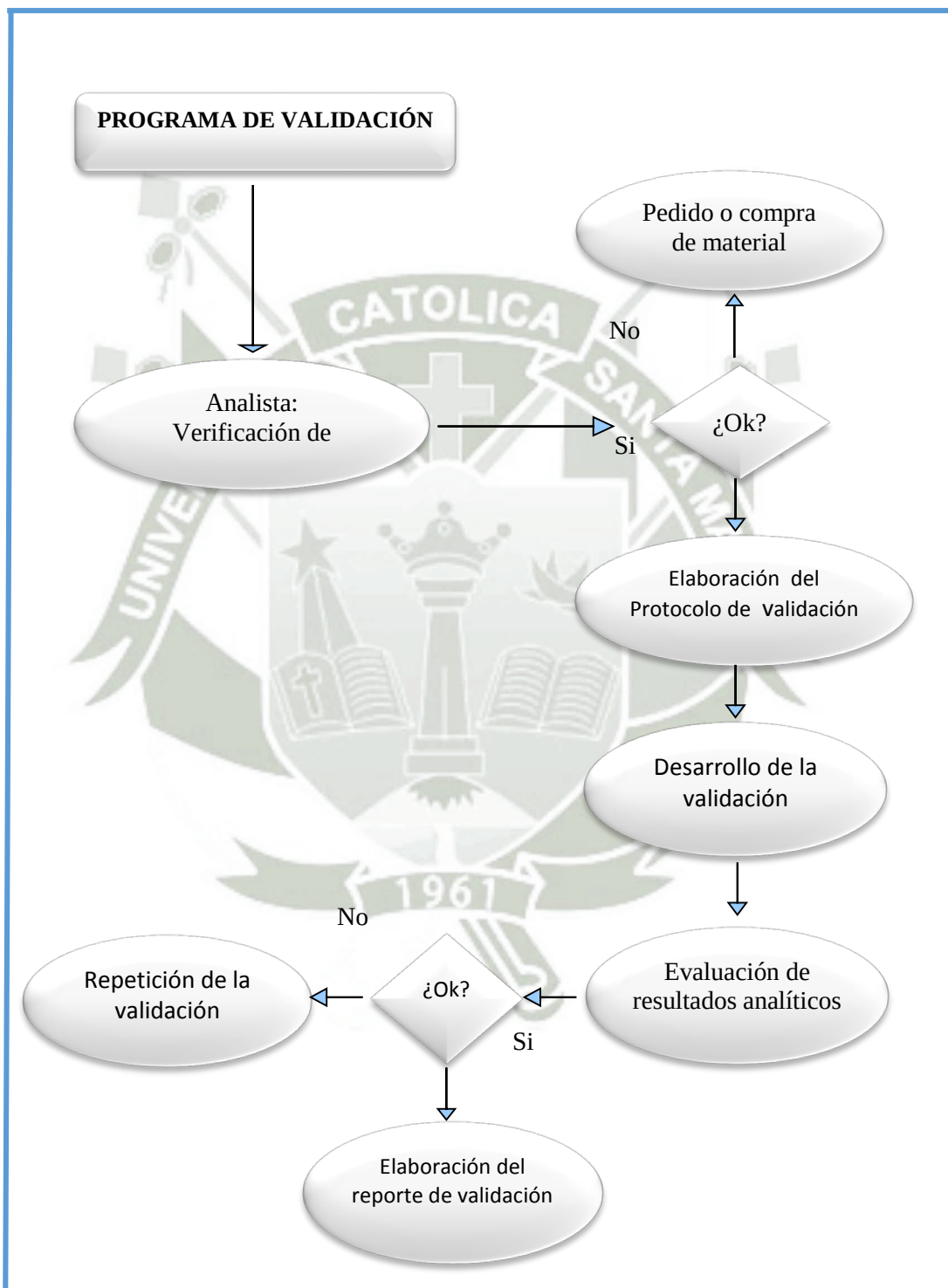


Figura N° 1.1 Diagrama del proceso de validación de método analítico

1.1.4. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

a) Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero. La exactitud de un procedimiento analítico debe establecerse en todo su intervalo. 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 procedimiento independiente.⁶

La exactitud o bien podríamos llamarla “inexactitud”, debe ser tan pequeña como sea posible para que el valor medio se aproxime al de referencia. Dicho de otro modo, la recuperación del analito debe acercarse al 100 %.⁴¹

b) Precisión

La precisión de un procedimiento analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. La precisión de un procedimiento analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad del procedimiento analítico en condiciones normales de operación.⁶

- Repetibilidad

Refleja la precisión de un método, cuando se desarrolla bajo las mismas condiciones, utilizando la misma muestra, analizada por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos y durante una misma sesión de trabajo en un periodo corto.

El parámetro estadístico que caracteriza este estudio es la desviación estándar o coeficiente de variación (en área y tiempo de retención), éste parámetro permite evaluar la incertidumbre en la estimación de la media, es decir, el error aleatorio que se corresponde con la dispersión de datos alrededor de la media.⁶

- **Reproducibilidad**

Es la medida de la precisión de los resultados de ensayos realizados sobre la misma muestra homogénea, pero ejecutados en días diferentes y se expresa con los mismos parámetros matemáticos que la repetibilidad. El coeficiente de variación en el estudio de la reproducibilidad debe ser igual o mayor que el obtenido en el estudio de repetibilidad para la misma cantidad o concentración debido a la mayor fuente de error que existe en la reproducibilidad.⁶

- **Precisión intermedia**

La precisión intermedia (también conocida como tolerancia o fortaleza) expresa la variación dentro de un laboratorio, por ejemplo en diferentes días, con diferentes analistas o con equipos diferentes dentro del mismo laboratorio.⁶

c) **Selectividad o especificidad**

Se define como la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz. La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual puede compensarse usando otros procedimientos analíticos complementarios.⁶

Para las pruebas que se indican a continuación, la definición anterior tiene las siguientes implicancias: Pruebas de identificación que garantizan la identidad del analito, pruebas de pureza que 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, impurezas orgánicas volátiles). Valoraciones que proporcionan un resultado exacto, que permite una declaración exacta del contenido o potencia del analito en una muestra. La importancia de éste requisito de validación es demostrar la ausencia de interferencia con referencia al estándar y/o interferencia menor al 2%.¹⁹

d) Límite de detección

Es la cantidad mínima de analito que puede detectarse en una muestra, 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 como concentración de analito en la muestra.⁶

e) Límite de cuantificación

El límite de cuantificación es una característica de las valoraciones cuantitativas de compuestos que se encuentran en baja concentración en la matriz de una muestra, tales como: impurezas 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 como concentración de analito en la muestra.⁶

f) Linealidad

La linealidad de un procedimiento 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 dentro de un intervalo dado. En esta sección, la "linealidad" se refiere a la linealidad de la relación entre la concentración y la medida de valoración. En algunos casos, para lograr la linealidad, puede ser necesario transformar la concentración y/o la medida. (Notar que los factores de corrección usados en el análisis de regresión pueden cambiar cuando se

aplica la transformación.) Las transformaciones posibles pueden incluir el logaritmo o la raíz cuadrada. Si no se puede lograr la linealidad, se puede utilizar un modelo no lineal. El objetivo es obtener un modelo que describa con precisión la relación de concentración en función de la respuesta, ya sea lineal o no lineal.^{6,7}

Llevar a cabo éste parámetro dentro de una validación es importante porque nos proporciona la capacidad de generar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito, dentro de un rango determinado y se evalúa mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos en el análisis del principio activo a diferentes cantidades o concentraciones. La selección del rango y número de puntos experimentales está estrictamente relacionada con la aplicación del método.⁸

1.1.5. ASPECTOS QUE SE DEBEN TENER EN CUENTA EN LA VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)

a) Curva de calibración

Es la representación gráfica bidimensional, que demuestra la variación de la señal analítica con la concentración del analito. Ésta última se obtienen al graficar el valor obtenido de la señal analítica (valor absoluto, altura, área, etc.) versus las concentraciones de los estándares de referencia respectivos.⁹

b) Sensibilidad

Es la propiedad analítica que se define como la capacidad de un método para discriminar entre concentraciones (cantidades) semejantes de analito. La sensibilidad de un método analítico corresponde a la pendiente de la curva de calibración, algunas veces se expresa informando la razón entre el valor de la señal obtenida a una concentración dada de estándar.⁹

c) Intervalo

El intervalo de un procedimiento analítico es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el procedimiento según se describe por escrito, se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados de la prueba (porcentaje, partes por millón) obtenidos mediante el procedimiento analítico.⁹

d) Especificación

Se entiende como una lista de requisitos detallados (criterios de aceptación para los procedimientos de ensayo establecidos) con los que sustancia o producto farmacéutico tiene que cumplir para asegurar una calidad adecuada.²⁹ Los criterios de aceptación tienen límites numéricos, rangos u otros criterios para los ensayos descritos. La Digemid establece que el conjunto de criterios con los cuales los ingredientes farmacéuticos activos (IFAS), excipientes, producto terminado y material de empaque deben tener conformidad para ser considerado aceptable para su uso previsto. Son estándares de calidad que son propuestas justificadas por el fabricante y aprobadas por la Autoridad Nacional de Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios.³²

e) Aptitud del sistema

También conocida como idoneidad del sistema, si las mediciones son susceptibles a variaciones en las condiciones analíticas, éstas deben controlarse adecuadamente o debe incluirse una advertencia en el procedimiento. Una consecuencia de la evaluación de la tolerancia y la robustez debería ser que se establezca una serie de parámetros de aptitud del sistema para asegurar que la validez del procedimiento analítico se mantiene cada vez que se usa. Variaciones típicas son la estabilidad de soluciones analíticas, diferentes equipos y diferentes analistas.⁹

En la cromatografía de líquidos, las variaciones habituales son el pH de la fase móvil, la composición de la fase móvil, diferentes lotes o proveedores de

columnas, la temperatura y la velocidad de flujo. En el caso de cromatografía de gases, son variaciones típicas los diferentes lotes o proveedores de columnas, la temperatura y la velocidad de flujo. Las pruebas de aptitud del sistema se basan en el concepto de que el equipo, el sistema electrónico, las operaciones analíticas y las muestras a analizar constituyen un sistema integral que puede evaluarse como tal. Los parámetros de prueba de la aptitud del sistema que deben establecerse para un procedimiento específico, dependen del tipo de procedimiento que se está evaluando y son especialmente importantes en el caso de procedimientos cromatográficos.¹⁰

1.2. CALIFICACIÓN DE INSTRUMENTOS ANALÍTICOS (AIQ, POR SUS SIGLAS EN INGLÉS)

La AIQ es la colección de pruebas documentadas de que un instrumento se desempeña adecuadamente para su uso previsto. El uso de un instrumento calificado en los análisis contribuye a la confianza en la validez de los datos generados.^{11, 28}

En la industria farmacéutica se usa una gran variedad de equipos, instrumentos de laboratorio y sistemas analíticos computarizados; la calificación es una premisa necesaria para poder validar. Es la comprobación formal, sistemática y documentada de que el equipo es el más adecuado para los fines previstos.

Para llevar a cabo la misma se procede a la calibración del equipo y a la comprobación de métodos y sistemas para la verificación del rendimiento del instrumento elegido para una técnica analítica en particular.¹¹ En la figura 1.2 podemos observar cuales son los componentes de la calidad de datos necesarios para una validación.

La calificación de instrumentos no es un proceso único, sino el resultado de varias actividades diferenciadas, se pueden agrupar en cuatro fases.^{11,28}



Figura N° 1.2 Componentes de la calidad de los datos

Fuente: Farmacopea de los Estados Unidos de América. USP 40

a) Calificación de instalación (IQ)

Es la verificación documentada de que todos los aspectos claves de la instalación están de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y corresponden a las especificaciones aprobadas en el diseño. Las cuales pueden ser:²⁶

- Nombre del equipo.
- Nombre del fabricante.
- Modelo o tipo.
- Número de serie.
- Fecha en la que fue recibido.
- Condiciones en las que fue recibido (nuevo o usado).
- Aspectos verificados para su aceptación de recepción.
- Fecha en la que el equipo fue puesto en servicio por el laboratorio.
- Localización del equipo en el laboratorio.
- Instructivo de operación y mantenimiento.

b) Calificación operacional (OQ)

Es la verificación de que los equipos funcionan en la forma esperada y son capaces de operar satisfactoriamente, sobre todo en el rango de los parámetros operacionales para los que han sido diseñados. Es realizado por un personal técnico calificado.¹³

c) Calificación de performance (PQ)

Se realiza para demostrar la efectividad y reproducibilidad del proceso, bajo condiciones normales de operación, y bajo condiciones límites de operación. Es verificado por el usuario, trabajando con estándares certificados.¹³

d) Calibración de equipos

Los instrumentos de medida deben aportar datos fiables, la calibración de los instrumentos de control se establece frente a estándares oficiales o de carácter privado de solvencia reconocida. Los datos de calibración deben reflejar la precisión y exactitud del aparato de medida, incluyendo además los factores de corrección adecuados.¹³

e) Calificación del equipo HPLC

Para la verificación del equipo HPLC se debe evaluar cada módulo que compone el aparato, los parámetros a evaluar en un sistema HPLC se encuentran detallados en la tabla. 1.1, sin embargo se debe tener en cuenta que también se deben verificar los demás componentes del equipo HPLC como, el reservorio de la fase móvil, las tuberías y uniones deben funcionar de manera adecuada, cada equipo HPLC, debe pasar por un proceso de verificación para certificar el buen estado de dichos componentes.³¹

El objetivo es verificar que el equipo cumple con las especificaciones del fabricante, por lo que es adecuado su uso para realizar análisis de metodologías en los laboratorios de control de calidad.⁵³

Tabla N° 1.1 Parámetros a Evaluar en un Sistema HPLC.

Módulo	Parámetro	Importante para
Bomba	Reproducibilidad de flujo	Reproducibilidad Transferencia del método.
Inyector	Reproducibilidad Residuo de muestra	Precisión de resultados Exactitud de precisión de resultados
Horno	Reproducibilidad de T°	Forma de pico
Detector	Ruido Energía de lámpara Relación señal/ruido Precisión de longitud de onda Linealidad	Sensibilidad Sensibilidad Sensibilidad Sensibilidad, Transferencia de datos Precisión de resultados
Columna	Forma de pico, Asimetría de pico, TR, resolución, platos teóricos	Proceso de datos, identificación, reproducibilidad.

Fuente: Morales de la Cruz (2004), Desarrollo y validación prospectiva de una técnica analítica por HPLC.²⁵

1.3. TÉRMINOS RELACIONADOS A LA VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS.

Es importante mencionar que los laboratorios farmacéuticos deben contar con sistemas que garanticen la calidad de los productos que fabrican, algunas de estas medidas y términos relacionados a ellas se describen a continuación.

a) Sistema de calidad

Se entiende por sistema de calidad el conjunto de actividades del laboratorio dirigidas a la producción de un trabajo de precisión y productos de alta calidad. Un laboratorio de análisis debe tener como uno de sus propósitos principales la producción de datos analíticos de alta calidad por medio del uso de mediciones analíticas que sean precisas, confiables y adecuadas para tal fin. Este propósito

puede alcanzarse de una manera eficaz si se cuenta con un sistema planificado y documentado de la calidad de las actividades, la gerencia del laboratorio debe asegurar que sus políticas, sistemas, programas, procedimientos e instrucciones se describan con la extensión necesaria para que permita al laboratorio garantizar la calidad de los resultados que genera.³⁰

Para alcanzar este nivel de distinción (que el laboratorio necesita para poder acreditarse y así obtener contratos de análisis) el laboratorio necesitará operar bajo un sistema de garantía de calidad que incluya una extensa documentación de sus actividades.¹⁴

b) Garantía de la calidad:

Es el conjunto de medidas que se adoptan para asegurar que los productos farmacéuticos sean de la calidad requerida para el uso al que están destinados. Por lo tanto la garantía de calidad incorpora las BPM y otros conceptos, incluyendo aquellos que van más allá del alcance de estos lineamientos, tales como el diseño y el desarrollo del producto. El sistema de garantía de la calidad apropiado para la fabricación de productos farmacéuticos debe asegurar.^{2,17}

- Que los productos farmacéuticos estén diseñados y elaborados de tal forma que se tengan en cuenta los requisitos de las BPM y otros códigos relacionados, tales como la Buena Práctica de laboratorio (BPL) y la buena práctica clínica (BPC), incluyendo el diseño y el desarrollo del producto.
- Que las operaciones de producción y control estén claramente especificadas por escrito, y que se adapten a los requisitos de las BPM.
- Que las responsabilidades administrativas estén claramente especificadas en las descripciones de trabajo.
- Que se tomen las medidas necesarias para la fabricación, suministro y uso de materias primas y materiales de empaque adecuados.

- Que se efectúen todos los controles necesarios de las materias primas, productos intermedios, productos a granel y otros controles, calibraciones y comprobaciones durante el proceso.
- Que el producto terminado sea procesado y controlado correctamente y de acuerdo con los procedimientos definidos.
- Que los productos farmacéuticos no sean vendidos ni suministrados antes de que las personas autorizadas hubieren certificado que cada lote de producción ha sido fabricado y controlado en concordancia con los requisitos establecidos en la normativa sobre otorgamiento del registro sanitario u otra regulación relativa a la producción, control y liberación de los productos farmacéuticos.
- Que se hubieren tomado medidas adecuadas para asegurar, en todo lo posible, que los productos farmacéuticos sean almacenados, distribuidos y manejados de tal forma que la calidad se mantenga durante todo el período de validez de dichos productos.
- Que se establezca un procedimiento de autoinspección y/o de auditoría de calidad, que permita evaluar regularmente la eficacia y aplicabilidad del sistema de garantía de la calidad.

c) **Calibración**

Conjunto de operaciones que establece, bajo condiciones específicas, la relación entre los valores indicados por un instrumento o sistema de medición (especialmente pesada), registro y control, o los valores representados por una medición del material, y los correspondientes valores conocidos de un patrón de referencia. Es preciso establecer los límites de aceptación de los resultados de las mediciones.²

d) **Matriz:**

Entendida como todo aquello que acompaña al analito de interés.³

e) Control de calidad

Conjunto de procedimientos, técnicos y actividades operativas, destinados a medir, confrontar y verificar que un producto cumpla con las características y especificaciones planificadas. El control de calidad es parte de las BPM y comprende el muestreo, especificaciones y ensayos como también a los procedimientos de organización, documentación y autorización que aseguren que los ensayos necesarios y pertinentes realmente se efectúen, y que no se permita liberación de materiales, ni se autorice la venta o suministro de los productos, hasta que su calidad haya sido aprobada como satisfactoria, el control de calidad no se limita a las operaciones de laboratorio, sino que debe estar presente en todas las decisiones concernientes a la calidad del producto.²

f) Buenas prácticas de manufactura (BPM)

Son en general, un conjunto de normas que cada laboratorio farmacéutico debe poner en práctica con el fin de asegurar la calidad de los productos que fabrique, debiendo para ello tomar todas las medidas oportunas para garantizar que los medicamentos posean la calidad necesaria según el uso al que se destine.²

Este conjunto de medidas es muy amplio, abarcando las normas que deben afectar al personal, locales, maquinarias, instalaciones, materias primas, producto terminado, fabricación, control de calidad, documentación y expedición de las especialidades, la normativa establece que todas las operaciones, proceso, métodos o técnicas, deben estar reguladas o escritas y deben ser cumplidas y supervisadas.⁵

Las buenas prácticas de manufactura constituyen el factor que asegura que los productos se fabriquen en forma uniforme y controlada, de acuerdo con las normas de calidad adecuadas al uso que se pretende dar a los productos, y conforme los requerimientos del registro sanitario.²

g) Buenas prácticas de documentación.

La documentación puede considerarse como la base de todos los sistemas de calidad debido a que para todas las operaciones y procedimientos es esencial

contar con registros claros, completos y exactos. Todos los datos deben registrarse de forma permanente, directa y legible al momento de realizar la actividad, los documentos deben incluir, pero no limitarse a la siguiente información: registros de laboratorio, documentos relacionados con el equipo, desviaciones e investigaciones, registros de partida, certificado de análisis, protocolos e informes, procedimientos analíticos, documentación sobre capacitación y retención de documentos ²⁷

1.4. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

Es la forma de realizar el análisis, donde se describe los pasos detallados necesarios para realizar cada prueba. Dicho procedimiento debe estar completo, conteniendo los parámetros a evaluar, límites y valores obtenidos en cada caso, debe estar actualizado de forma tal que pueda ser reproducible. Los procedimientos analíticos se clasifican de la siguiente manera. ⁹

a) Categoría I

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

b) Categoría II

Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos procedimientos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.

c) Categoría III

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

d) Categoría IV

Pruebas de Identificación, el único parámetro exigido en ésta categoría es que el método sea específico al analito que se desee identificar.

Para cada categoría, se requiere diferente información analítica. En la tabla 1.2, se indican los datos que normalmente se requieren para cada una de estas categorías.¹⁰

Tabla N° 1.2 Parámetros Requeridos para la Validación

Características de desempeño analítico	CATEGORÍA I	CATEGORÍA II		CATEGORÍA III	CATEGORÍA IV
		Prueba de límite cuantitativa	Prueba de límite cualitativa		
Exactitud	SI	SI	*	*	NO
Precisión	SI	SI	NO	SI	NO
Especificidad	SI	SI	SI	*	SI
Límite de detección	NO	NO	SI	*	NO
Límite de cuantificación	NO	SI	NO	*	NO
Linealidad	SI	SI	NO	*	NO
Intervalo	SI	SI	*	*	NO

* No aplica

Fuente: Farmacopea de los Estados Unidos de América; USP 40 – 2017

1.5. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)

El término cromatografía deriva de las palabras griegas “Chroma” (color) y “Graphein” (escribir), aludiendo a que los pigmentos vegetales separados originalmente aparecieron como bandas coloreadas. No obstante se descubrió que también podían separarse sustancias incoloras por el mismo procedimiento. Sin duda la cromatografía es uno de los métodos de separación más poderosos que se hayan descubierto. La I.U.P.A.C la define como: un método utilizado inicialmente para la separación de los componentes de una muestra en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras que la otra se mueve.^{9, 10}

Las técnicas de separación cromatográfica son métodos de separación de múltiples tipos de sustancias las cuales se logran por procesos de partición, adsorción o

intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada, éstas están contenidas en columnas cromatográficas que pueden tener distintas características como longitud, diámetro y material del relleno.^{9,10}, Entre los componentes del sistema cromatográfico se pueden mencionar.

1.5.1. Fase estacionaria

Las fases estacionarias más comúnmente usadas son la sílice modificada o las microperlas de polímero. Las microperlas se modifican agregando hidrocarburos de cadena larga.

El tipo de relleno específico necesario para completar un análisis se indica mediante la designación “L” en la monografía individual de la sustancia a analizar. A menudo, el tamaño de las microperlas también se describe en la monografía.⁹

1.5.2. Columna cromatográfica

La columna es el elemento fundamental de un cromatógrafo de líquido, puesto que es en ella donde tiene lugar la separación; por lo tanto, resulta fundamental una correcta elección de la columna adecuada para cada separación, ya que con una columna inadecuada o de mala calidad, no se obtendrán resultados aunque se disponga del mejor instrumental.¹⁵

El término *columna* incluye columnas de acero inoxidable con recubrimiento interno y poliméricas, rellenas con una fase estacionaria. La longitud y el diámetro interno de la columna afectan la separación y, por lo tanto, las dimensiones típicas de la columna se incluyen en la monografía individual de cada sustancia.^{9,15}

1.5.3. Fase móvil

La fase móvil es un disolvente o mezcla de disolventes, según se defina en la monografía individual de cada sustancia, los componentes de la fase móvil se filtran generalmente para eliminar partículas mayores de 0,45 μm . Las fases móviles de componentes múltiples se preparan midiendo y mezclando los

volúmenes requeridos de los componentes individuales, los disolventes se desgasifican normalmente antes de bombear burbujeando con helio, sonicación o utilizando módulos de membrana al vacío para evitar la creación de burbujas de gas en la celda del detector.¹⁰

1.5.4. Aparato

Un cromatógrafo de líquidos o equipo HPLC consta de una serie de partes instrumentales necesarias para su funcionamiento, según se observa en la figura 1.3. que son necesarias para obtener los resultados de un análisis de identificación, detección y cuantificación según se requiera.

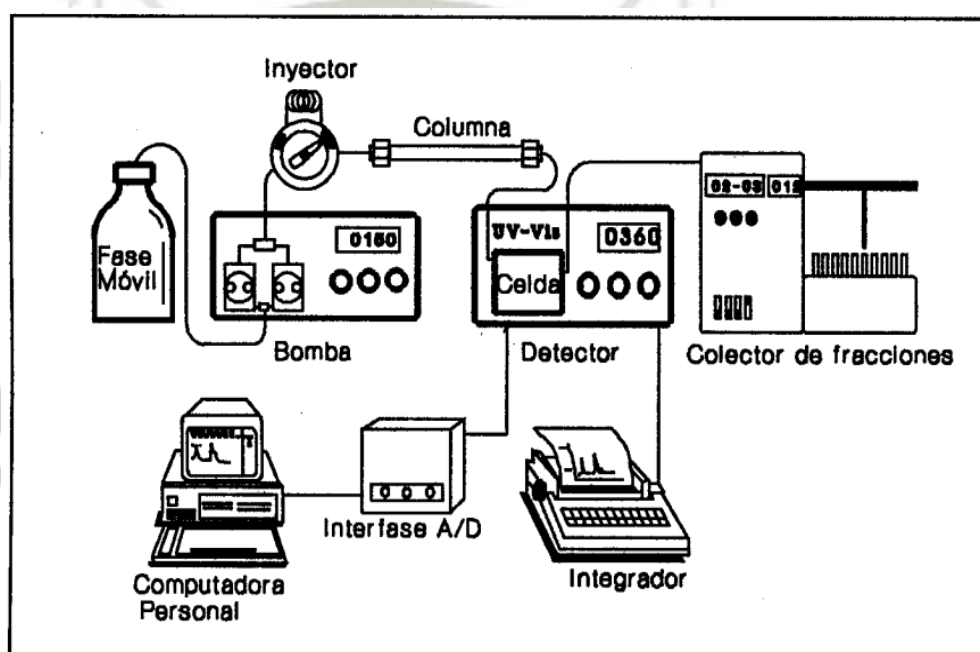


Figura N° 1.3 Esquema de un cromatógrafo de líquidos

Fuente: Introducción a la HPLC, Quattrocchi - 1992¹⁵

Si bien es cierto que para realizar una cromatografía líquida tan solo es necesario disponer de las dos fases implicadas en el proceso y de la columna, la moderna cromatografía de líquidos de alta eficacia, debido al pequeño diámetro de las partículas de fase estacionaria que se utilizan, requiere de la utilización de unos dispositivos que constituyen el cromatógrafo. Los componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos son:

a) Dispositivo de suministro de eluyentes (bomba)

Los sistemas de bombeo son necesarios para suministrar la fase móvil a un caudal controlado. Las fluctuaciones de presión han de minimizarse pasando el disolvente presurizado a través de un dispositivo de amortiguación de pulso. La tubería y conexión deben ser capaces de soportar las presiones desarrolladas por el sistema de bombeo y pueden estar equipadas con una instalación para expulsar el sistema de burbujas de aire atrapadas, los sistemas de bombeo controlados por microprocesador son capaces de entregar con precisión una fase móvil de una elución constante (elución isocrática) o variante (gradiente de elución), de acuerdo con un programa definido.¹⁵

b) Dispositivo de inyección

La solución de muestra se introduce en la fase móvil u otra solución apropiada fluida, en o cerca de la cabeza de la columna usando un sistema de inyección manual o mediante inyectoros automáticos que constan de un carrusel o una gradilla para sostener los viales de muestra cuya parte superior se encuentra tapada con un septo o un perforable y un dispositivo de inyección para transferir las muestras desde los viales a un espiral conectado al cromatógrafo, los inyectoros automáticos pueden programarse para controlar el volumen de muestra, el número de inyecciones, y los ciclos de enjuague del espiral, el intervalo entre las inyecciones y otras variables operativas.^{9, 15}

c) Conducciones y conexiones

En particular, todas las conducciones y conexiones entre inyector y columna, y entre columna y detector son de máxima importancia, debido a que la presencia de volúmenes muertos es uno de los grandes problemas de los equipos de cromatografía de líquidos, ya que estos dan origen a pérdidas en la eficacia del sistema y, por lo tanto, en la capacidad de separación, por lo que el tubo de conducción puede considerarse como un volumen muerto del sistema y, es de vital importancia la utilización de tubos capilares en los que el diámetro interno sea pequeño y de pequeñas longitudes. Las conexiones tienen la misma importancia que el tubo, porque en ellas es

también necesario eliminar la presencia de volúmenes muertos.^{9, 15}

d) **Detector y registrador**

Un detector para cromatografía es un dispositivo que permite medir, a la salida de la columna, una propiedad física del eluyente, que deberá depender de la composición de éste.^{9,15}

Los detectores más utilizados son los espectrofotómetros ultravioleta/visible (UV/Vis), incluidos los detectores de diodos. Se pueden utilizar espectrofotómetros de fluorescencia, refractómetros diferenciales (RI), detectores electroquímicos (ECD), detectores de dispersión de luz, detectores de aerosoles cargados (CAD), espectrómetros de masas (MS), detectores de radiactividad u otros detectores especiales.⁹

e) **Sistemas de toma y procesamiento de datos**

Las estaciones de datos modernas reciben y almacenan la señal de los detectores e imprimen el cromatograma completo con las alturas y las áreas de los picos, la identificación de la muestra y las variables del método, el resultado del ensayo cromatográfico es la obtención de fracciones separadas de un gráfico o cromatograma de cuya interpretación pueden extraerse conclusiones cualitativas y cuantitativas de un gráfico o cromatograma. El registro y la eventual manipulación se obtienen a partir de la señal proveniente del detector por medio de un sistema de toma y procesamiento de datos, entre lo que podemos citar.⁹

- **Registrador gráfico:** Convierte la señal en un gráfico del tipo X-Y.
- **Integrador:** Permite no solo obtener un registro gráfico (cromatograma) sino también su tratamiento para el cálculo de concentraciones.
- **Computadora:** Básicamente el integrador es una computadora de uso muy específico. Como las computadoras necesitan señales

digitalizadas, se necesita una interfase analógica digital que convierta la señal analógica entregada por el detector.^{16,17}

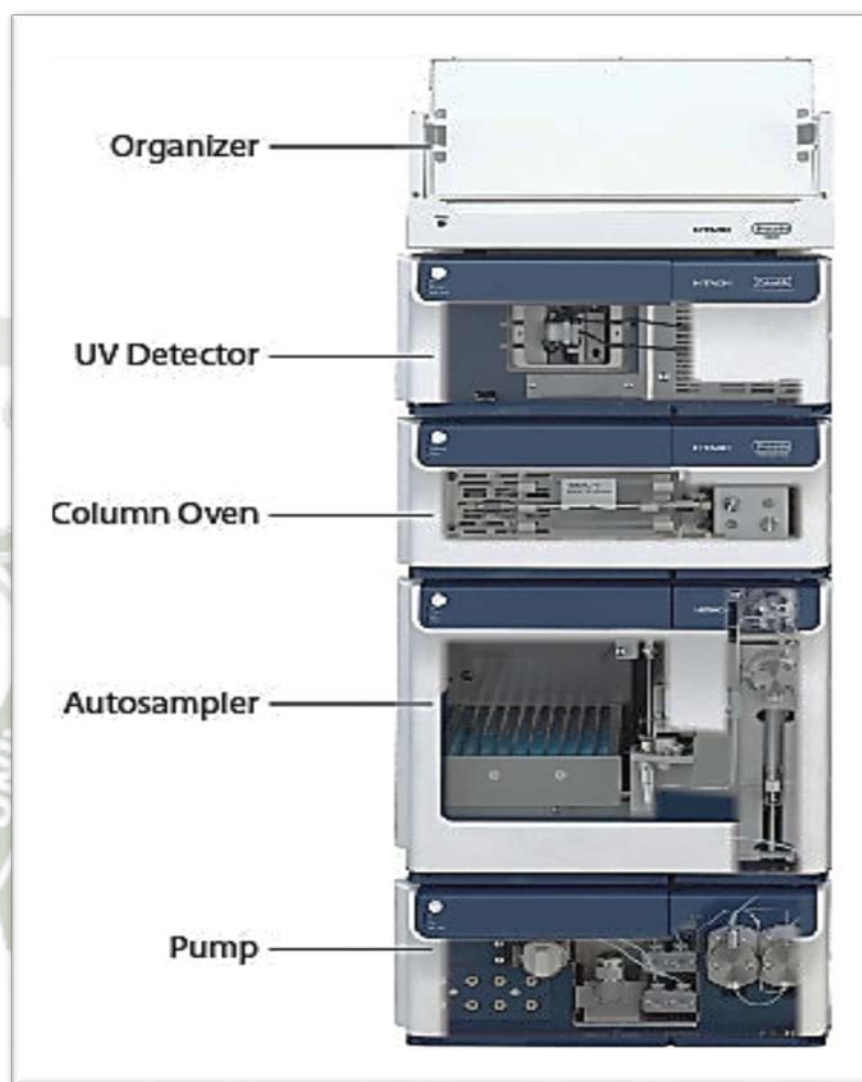


Figura N° 1.4 Partes de un cromatógrafo de líquidos

Fuente: Catálogo de Hitachi-Hightech.³³

1.6. PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS PARA TÉCNICAS PROPIAS.

Un método preliminar debe optimizarse para mejorar al máximo la separación cromatográfica. La calidad de un cromatograma puede ser juzgada de manera visual, sin embargo, la evaluación cuantitativa de la calidad de separación es indudablemente menos subjetiva y permite aplicar evaluaciones globales y diseños de optimización.⁴⁰

a) Coeficiente de variación (CV)

El coeficiente de variación es la desviación estándar dividida por la media. También es conocida como desviación estándar relativa (RSD). El coeficiente de variación se expresa en porcentaje.⁴

b) Número de platos teóricos (N)

Es una medida de la eficacia del sistema cromatográfico, que expresa el número de picos que pueden aparecer en el cromatograma por unidad de tiempo, mide la capacidad del sistema de proporcionar bandas de elución estrechas.⁹

c) Factor de asimetría o Cola (T)

Es una medida de la asimetría de la señal generada por el analito, las señales simétricas son preferibles porque minimizan las imprecisiones en la detección del inicio y el final del pico por parte de los sistemas de integración. Por lo tanto, permiten una mejor y más precisa cuantificación del área bajo la curva.⁹

1.7. CLORHIDRATO DE CLORHEXIDINA

El Clorhidrato de Clorhexidina contiene no menos de 98,0 % y no más de 102,0% de Clorhidrato de Clorhexidina, calculado con respecto a la sustancia seca. (USP 40 – 2017), La estructura química se puede observar en la figura 1.5.

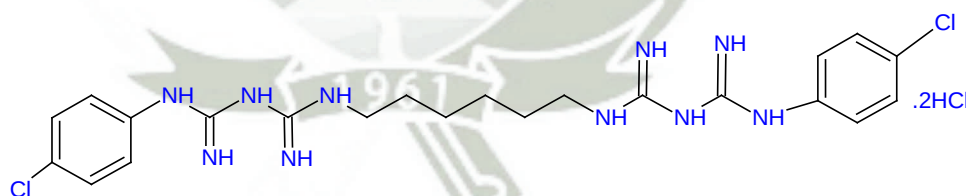


Figura N° 1.5 Estructura química de Clorhidrato de Clorhexidina

Fórmula química : $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2HCl$
 Peso molecular : 578.37 g/mol
 Sinónimos : 2,4,11 - 3 - Tetraazatetradecanodiimidamida, N, N "-bis (4 -clorofenil) -3, 12-diimino-, dihidro cloruro.¹⁸

Acción y uso : Antiséptico.²⁰

a) Propiedades fisicoquímicas

Apariencia : Polvo cristalino blanco o casi blanco.¹⁸

Solubilidad : Ligeramente soluble en agua y en propilenglicol, muy soluble en etanol (96 %).¹⁸

Pérdida por secado : No más de 1.0 % (a 105 °C)¹⁹

b) Acción farmacológica:

Se usa en el tratamiento de infecciones de la mucosa orofaríngea de úlceras aftosas y de infecciones periodontales.²¹ Es un antiséptico y desinfectante biguanídico efectivo contra un amplio rango de bacterias Gram positivas y negativas.³⁷

c) Mecanismo de acción

Actúa alterando la permeabilidad de la membrana citoplasmática y precipita las proteínas y ácidos nucleicos.²¹

1.8. BENZOCAÍNA

La Benzocaína, contiene no menos de 98,0 % y no más de 102,0 % de benzocaína. (USP 40 – 2017). La estructura química se puede observar en la figura 1.6.

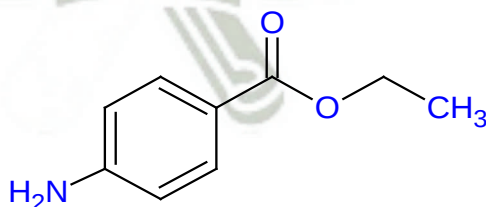


Figura N° 1.6 Estructura química de Benzocaína

Fórmula química : $C_9H_{11}NO_2$ ¹⁸

Peso molecular : 165.19 g/mol¹⁸

- Sinónimos : Ácido benzoico, éster 4 - amino - etílico; P-aminobenzoato de etilo.¹⁸
- Acción y uso : Anestésico local.¹⁹

a) **Propiedades fisicoquímicas**

- Apariencia : Polvo cristalino blanco o casi blanco, o cristales incoloros.¹⁸
- Solubilidad : Muy poco soluble en agua, soluble en etanol (96 %). Muestra polimorfismo.¹⁸
- Pérdida por secado : No más de 1.0 % (secado sobre pentóxido de fósforo)¹⁹

b) **Acción farmacológica**

Es un anestésico local tipo éster, que actúa bloqueando los receptores sensoriales de las membranas mucosas a nivel local, utilizado a menudo en combinación con otras sustancias como analgésicos, antisépticos, antibacterianos, anti fúngicos y antipruríticos, se emplea para el tratamiento de dolor de extracciones dentales, dentición, afecciones gingivales, de la mucosa oral, de garganta y de oído, hemorroides y prurito anal y vaginal.^{34, 35}

c) **Mecanismo de acción**

Se basa en evitar la generación y conducción del impulso nervioso. Bloquea la conducción disminuyendo o evitando que se produzca el incremento transiente de la permeabilidad del Na^+ en las membranas excitables, lo que se produce por una despolarización ligera. La acción se debe a la interacción directa con los canales de Na^+ .^{35, 36}

1.9. ENOXOLONA

La Enoxolona contiene no menos de 98,0 % y no más de 101,0% de enoxolona con respecto a la sustancia seca. (BP – 2017). La estructura química se observa en la figura 1.7.

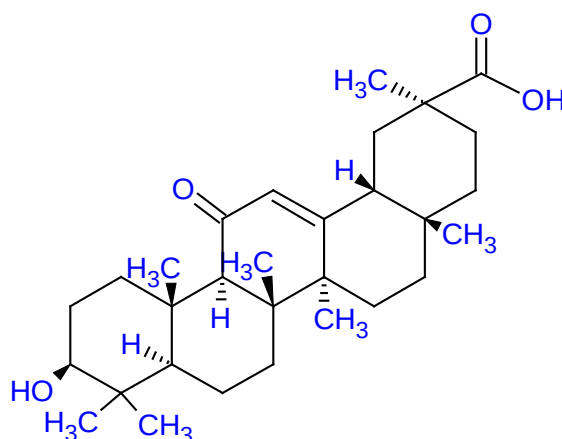


Figura N° 1.7 Estructura química de Enoxolona

Fórmula química	: $C_{30}H_{46}O_4$ ¹⁸
Peso molecular	: 470.69g/mol ¹⁸
Sinónimos	: Ácido(20β)-3β-Hidroxi-11-oxo-olean-12-en-29-oico. ¹⁸
Acción y uso	: Tratamiento de la úlcera péptica benigna. ²⁰

a) Propiedades fisicoquímicas

Apariencia	: Polvo cristalino blanco o casi blanco. ¹⁸
Solubilidad	: Prácticamente insoluble en agua, soluble en etanol, escasamente soluble en cloruro de metileno. ¹⁸
Pérdida por secado	: No más de 0.5 % determinado en 1 g de muestra a 105 °C ²⁰

b) Acción farmacológica

Se utiliza en forma local en preparados para el tratamiento de trastornos inflamatorios no infecciosos de la piel, boca, garganta, y recto. Además se ha visto que puede potenciar la acción de la hidrocortisona. ²²

c) Mecanismo de acción

El ácido glicirretínico inhibe las enzimas que metabolizan el prostaglandinas PGE-2 y PGF-2a a sus respectivos 15-ceto-13,14-dihidro metabolitos que son inactivos. Esto provoca un aumento del nivel de prostaglandinas en el sistema digestivo. ²³

1.10. ASOCIACIÓN DE CLORHEXIDINA CL + BENZOCAÍNA + ENOXOLONA COMPRIMIDOS ORALES

Este medicamento pertenece a un grupo farmacoterapéutico, el cual está dado por un código ATC que es el código de clasificación anatómica – terapéutica – química asignado por el Collaborating Center for Drug Statistics Methodology de la OMS.

Preparados para la garganta. Código: ATC: R02AA ^{24,43}

R : Sistema Respiratorio
R02 : Preparaciones para la garganta.
R02A : Preparaciones para la garganta, (infecciones menores)
R02AA : Antisépticos

a) Indicaciones Terapéuticas

Tratamiento sintomático local de los procesos infecciosos e inflamatorios leves de boca y garganta que cursan con dolor y sin fiebre.⁴² La asociación de los tres principios activos se usa en el tratamiento farmacológico de gingivitis y faringitis aguda³⁹

b) Acción Farmacológica

Los principios activos de este medicamento actúan complementando la acción antiséptica de la Clorhexidina Cl, con la acción antiinflamatoria de la Enoxolona en la mucosa bucofaríngea, y la acción anestésica local de la Benzocaína, suprimiendo de esto modo las molestias típicas producidas por la irritación local de la garganta.⁴²

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Se procede tal cual se indica en la técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) desarrollada para la determinación cuantitativa del producto Clorhexidina Clorhidrato 5 mg + Benzocaína 4 mg + Enoxolona 3 mg Comprimidos orales, el proceso de validación se llevó a cabo en el área de control de calidad de Laboratorios Naturales y Genéricos S.A.C.

2.2. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

a) Equipos

	Marca	Modelo	Serie
- Balanza analítica	Mettler Toledo	XP105DR	B015024435
- Balanza analítica	Mettler Toledo	XPE105	B435980154
- Balanza analítica	Mettler Toledo	ML-204T	B620492054
- HPLC	Lacrom Elite	Lacrom Elite	17E19.043
- HPLC	Lacrom Elite	Chromaster	1524-074
- Ultrasonido	Branson	3515	EMC0609643736

b) Materiales

- Fiolas de 100 mL
- Fiolas de 50 mL
- Fiolas de 1000 mL
- Pipetas volumétricas de 5 mL
- Pipetas graduadas de 5 mL
- Probetas de 50 mL
- Probetas de 250 mL
- Probetas de 1000 mL
- Mortero
- Columna: Luna Phenyl Hexyl 250mm x 4.0mm (5um)
- Filtro de membrana de fluoruro de polivinilideno de tamaño de poro 0.45 µm

c) Reactivos

- Octanosulfonato de Sodio Para Cromatografía
- Acetonitrilo grado HPLC
- Ácido acético glacial 100 % Para Análisis
- Metanol grado HPLC
- Agua ultrapura grado HPLC
- Hidróxido de Sodio 0.1 N
- Ácido Clorhídrico 0.1 N
- Peróxido de Hidrógeno

d) Estándares de referencia secundarios

Se utilizaron Clorhexidina Cl, Benzocaína y Enoxolona (materias primas), como estándares secundarios, los cuales fueron trazados con el estándar primario de cada uno de ellos, según la OMS, es porque la sustancia de referencia primaria, podría no estar disponible en cantidades suficientes para satisfacer las necesidades locales.³⁸

- **Nombre del estándar :** **Clorhidrato de Clorhexidina**
 - Lote : SAAMART/QC/CHH/2015/010
 - Fecha de expiración : 2018-08-31
 - Potencia : 98.43 %
 - Almacenamiento : Conservar en envases impermeables protegidos de la luz

- **Nombre del estándar :** **Benzocaína**
 - Lote : C5831508007
 - Fecha de expiración : 2017-07-28
 - Potencia : 100.01 %
 - Almacenamiento : Conservar en envases impermeables protegidos de la luz

- **Nombre del estándar :** **Enoxolona**
 - Lote : 14051003
 - Fecha de expiración : 2018-05-11
 - Potencia : 100.76 %
 - Almacenamiento : Conservar en envases impermeables protegidos de la luz

2.3. MUESTRA

Especificaciones del producto

- a) Aspecto : Comprimido circular plano, de color blanco
- b) Peso promedio : 1.200 g/comprimido
- c) Variación de Peso : 1.140 g/comprimido. – 1.260 g/comprimido.
- d) Lote : P-III 107066

- e) Especificación del contenido
 - Clorhexidina Cl : 4.50 mg/comp. – 5.50 mg/comp. (90.00 % – 110.00 %).
 - Benzocaína : 3.60 mg/comp. – 4.40 mg/comp. (90.00 % – 110.00 %)
 - Enoxolona : 2.70 mg/comp. – 3.30 mg/comp. (90.00 % – 110.00 %)

2.4. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

2.4.1. Método

Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC)

2.4.2. Sistema Cromatográfico

- Equipo : Cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC)
- Sistema : Isocrático
- Detector : UV
- Longitud de onda : 254 nm
- Columna : Luna Phenyl Hexyl 250 mm x 4.6 mm (5 µm)
- Volumen de Inyección : 15.0 µL
- Velocidad de Flujo : 1.5 mL/minuto
- Temperatura : 40.0 °C
- Tiempo de retención : Clorhexidina HCl: 3.83 minutos aproximadamente
Benzocaína : 2.52 minutos aproximadamente
Enoxolona : 9.85 minutos aproximadamente
- Tiempo de corrida : 15 minutos aproximadamente.
- Coeficiente de variación : No más de 2.0 % para los picos principales.

Se debe acondicionar la columna por 30 minutos como mínimo.

2.4.3. Preparación de la fase móvil

Disolver 2.0 g de Octanosulfonato de Sodio en 252 mL de agua. Solución (A), a continuación preparar una mezcla filtrada y desgasificada de la Solución A, Acetonitrilo, Metanol y Ácido acético glacial (252:528:190:30).

2.4.4. Preparación de la solución estándar

Se debe preparar la solución de tal forma que la concentración aproximada sea: Clorhexidina HCl = 25 ug/mL, Benzocaína = 20 ug/mL y Enoxolona = 15 ug/mL)

Muestra: Pesar aproximadamente 50 mg de Clorhexidina Clorhidrato, 40 mg de Benzocaína y 30 mg de Enoxolona estándares de referencia.

Transferir la muestra a una fiola de 100 mL, agregar 70 mL de metanol y someter a ultrasonido por 5 minutos en un baño de agua a 50°C, enfriar a temperatura ambiente, llevar a volumen con metanol y homogenizar.

Tomar una alícuota de 5 mL de la solución anterior y transferir a una fiola de 100 mL, llevar a volumen con metanol y homogenizar, a continuación, filtrar a través de un filtro de membrana de cloruro de polivinilideno (PVDF) con tamaño de poro de 0.45 µm, colocar el líquido filtrado en viales de HPLC.

2.4.5. Preparación de la solución muestra

Se debe preparar la solución de tal forma que la concentración aproximada sea: Clorhexidina HCl = 25 ug/mL, Benzocaína = 20 ug/mL y Enoxolona = 15 ug/mL)

Muestra: Pesar por separado 20 comprimidos y determinar el peso promedio, triturar hasta obtener un polvo fino a partir del cual pesar aproximadamente 600 mg.

Transferir a una fiola de 100 mL y agregar 70mL de metanol, someter a ultrasonido por 15 minutos en un baño de agua a 50°C y enfriar a temperatura ambiente, llevar a volumen con metanol y homogenizar, a continuación, filtrar a través de un filtro de membrana de cloruro de polivinilideno (PVDF) con tamaño de poro de 0.45 µm, colocar el líquido filtrado en viales de HPLC.

2.5. CÁLCULOS PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE LOS ANALITOS DE INTERÉS

Se debe ingresar las variables de cálculo al método para obtener resultados directamente por generación del programa. Se realizarán 5 inyecciones del estándar y

2 inyecciones de la muestra de las cuales se determinará el promedio para expresar los resultados.

Formula general para la determinación cuantitativa.

mg/comp. Clorhexidina HCl, Benzocaína y Enoxolona

$$\frac{Amp}{Ast} \times \frac{Pst}{100} \times \frac{5}{100} \times \frac{Pot\ St}{100} \times \frac{100}{Pmp} \times PP$$

Dónde:

- Amp : Área del pico del principio activo de interés obtenido a partir de la solución muestra.
- Ast : Área del pico del principio activo de interés obtenido a partir de la solución estándar
- Pst : Peso del estándar de referencia del principio activo de interés expresado en miligramos.
- Pot St : Potencia del estándar de referencia del principio activo de interés expresado en porcentaje.
- Pmp : Peso de la muestra expresada en miligramos.
- PP : Peso promedio de las tabletas expresado en miligramos.

2.6. DESARROLLO DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

El resultado de una prueba es *“El valor de una característica que se obtiene al llevar a cabo un método de prueba específico. El método de prueba debería especificar que debe realizarse una o varias mediciones individuales, y que su promedio, u otra función apropiada (tal como la mediana o la desviación estándar), debe informarse como el resultado de la prueba. Asimismo, puede requerir que se apliquen correcciones estándar tales como corrección de volúmenes de gas a temperatura y presión estándar. Por consiguiente, un resultado de una prueba puede ser un resultado calculado a partir*

de diversos valores observados. En el caso más simple, el resultado de una prueba puede ser en sí el valor observado.” (ISO 5725-1 y 3534-1),

2.6.1. APTITUD DEL SISTEMA: USP 40 “Validación de Procedimientos”

Se prepara la solución estándar según se indica en el punto 2.4.4. a partir de la cual se realizaron 5 inyecciones para un criterio de Coeficiente de Variación menor o igual al 2%.

Para determinar la aptitud del sistema se debe tener en cuenta la eficiencia de la columna (N), el factor de asimetría de los picos y el control del coeficiente de variación (CV); para realizar el cálculo de estos parámetros se muestran las fórmulas a continuación:

- Número de platos teóricos (N): Es una medida de eficiencia de la columna y se calcula por:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (\text{Ec 2.1})$$

Donde t_R es el tiempo de retención de la sustancia y W es el ancho del pico en su base que se obtiene extrapolando los lados relativamente rectos del pico hasta la línea base.

- Factor de Asimetría o cola (T)

$$AS = \frac{W_{0.05}}{2f} \quad (\text{Ec 2.2})$$

Donde $W_{0.05}$ es el ancho del pico al 5% de la altura y f es la distancia del máximo de pico hasta el borde inicial del pico, midiendo la distancia en un punto ubicado al 5% de la altura base.

- Coeficiente de variación (C.V.)

$$CV = \frac{s_f}{\bar{x}} * 100 \quad (\text{Ec 2.3})$$

Donde S_f es la desviación estándar de los factores de respuesta se calcula con la ecuación (Ec. 2.6) y $\bar{x}$ (Ec. 2.5) es el valor medio de los mismos, los factores de respuesta obtenidos de todos los puntos analizados se calculan con la ecuación (Ec. 2.4).

- Fórmula para hallar el factor de respuesta.

$$f = \frac{y}{x} \quad (\text{Ec 2.4})$$

Donde y es el área y $\bar{x}$ es la concentración en mg/mL de cada analito.

- Media aritmética: es el estimador de la media poblacional.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (\text{Ec 2.5})$$

Dónde n es el número de medidas y x_i es la sumatoria de los valores medidos en el ensayo

- La desviación estándar se halla con:

$$S_f = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (\text{Ec 2.6})$$

Dónde n es el número de medidas, x es el valor medido en el ensayo y $\bar{x}$ es el valor estimado de la media aritmética.

2.6.2. SELECTIVIDAD: ICH "Validation of Analytical Procedures"

Se desarrolla para evaluar la capacidad del método de producir una señal medible debida solo a la presencia de los analitos presentes en la matriz, otras señales podrían deberse a productos de degradación, de síntesis o a excipientes del producto terminado.

Se sometió el estándar y muestra a un proceso de degradación artificial por medio de estrés fisicoquímico, los procedimientos para lograr dicha degradación fueron:

- **Hidrólisis:**

Transferir la muestra a una fiola de 100 mL, añadir 20 mL de agua ultrapura y colocar a ebullición con reflujo durante una hora; dejar enfriar y seguir el procedimiento como en la preparación de la solución estándar tal cual se indica en el punto 2.4.4. para selectividad de sistema y preparación de la solución muestra según el punto 2.4.5. para la selectividad de método.

- **Hidrólisis alcalina:**

Transferir la muestra a una fiola de 100 mL, añadir 20 mL de Hidróxido de Sodio 0.1 N. Colocar a ebullición con reflujo durante una hora; dejar enfriar y añadir 20 mL de ácido clorhídrico 0.1 N; luego seguir el procedimiento como en la preparación de la solución estándar tal cual se indica en el punto 2.4.4. para selectividad de sistema y preparación de la solución muestra según el punto 2.4.5. para la selectividad de método.

- **Hidrólisis ácida:**

Transferir la muestra a una fiola de 100 mL, añadir 20 mL de Ácido Clorhídrico 0.1N. Colocar a ebullición con reflujo durante una hora; dejar enfriar y añadir 20 mL de hidróxido de Sodio 0.1 N; luego seguir el procedimiento como en la preparación de la solución estándar tal cual se indica en el punto 2.4.4. para selectividad de sistema y preparación de la solución muestra según el punto 2.4.5. para la selectividad de método.

- **Fotólisis:**

Someter la muestra a la acción de la luz Ultravioleta (254 nm) durante 1 hora, luego seguir el procedimiento como en la preparación de la solución estándar tal cual se indica en el punto 2.4.4. para selectividad de sistema y preparación de la solución muestra según el punto 2.4.5. para la selectividad de método.

- **Termólisis:**

Someter la muestra a una temperatura de 105°C durante 1 hora, luego seguir el procedimiento como en la preparación de la solución estándar tal cual se indica en el punto 2.4.4. para selectividad de sistema y preparación de la solución muestra según el punto 2.4.5. para la selectividad de método.

- **Oxidación:**

Transferir la muestra a una fiola de 100 mL, añadir 20 mL de agua ultrapura y 20 gotas de peróxido de hidrógeno. Colocar en baño maría (60 °C) durante 1 hora. Dejar enfriar y seguir el procedimiento como en la preparación de la solución estándar tal cual se indica en el punto 2.4.4. para selectividad de sistema; y preparación de la solución muestra según el punto 2.4.5. para la selectividad de método.

Para la selectividad de sistema se inyectó además un blanco compuesto por fase móvil y para la selectividad de método se inyectó un blanco compuesto por placebo, el cual fue sometido a los mismos procesos de degradación artificial que la muestra.

Para determinar la selectividad del método, se debe observar la posible coelución de compuestos de degradación, o, si se generan factores de respuesta ajenos a los analitos presentes en las muestras sometidas a estrés. Se espera ausencia de interferencia y/o interferencia menor al 2 % por parte de componentes de degradación en la matriz.

2.6.3. LINEALIDAD: ICH “Validation of Analytical Procedures”

Con este ensayo se demuestra la habilidad del procedimiento analítico de obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra.

2.6.3.1. Linealidad de sistema

Se determinó empleando estándares en las concentraciones de 50%, 75 %, 100 %, 125 % y 150 %, siendo el 100% una concentración que corresponde a la concentración final de la muestra en el producto terminado, las cantidades a pesar según el porcentaje de preparación están detalladas en la tabla 2.1 donde además se puede observar la concentración en ug/mL de cada concentración.

Tabla 2.1 Pesos de estándares según la concentración para 5 puntos de análisis

Concentración Cc %	Clorhexidina HCl		Benzocaína		Enoxolona	
	Peso mg	Cc ug/mL	Peso mg	Cc ug/mL	Peso mg	Cc ug/mL
50 %	25.0	12.5	20.0	10.0	15.0	7.5
75 %	37.5	18.75	30.0	15.0	22.5	11.25
100 %	50.0	25.0	40.0	20.0	30.0	15.0
125 %	62.5	31.25	50.0	25.0	37.5	18.75
150 %	75.0	37.5	60.0	30.0	45.0	22.5

Después de pesar las cantidades indicadas de estándar, se procedió según la preparación de la solución estándar descrita en el punto 2.4.4. Se prepararon 3 muestras por cada concentración las cuales a su vez serán evaluadas por triplicado para determinar la curva de calibración, que relaciona respuesta del área con la concentración del analito.

2.6.3.2. Linealidad de método

Se determinó al preparar 3 muestras placebo con 75 %, 100 % y 125 % de la concentración final, siendo el 100% una concentración que corresponde a la concentración final de la muestra en el producto

terminado. La tabla 2.2 muestra la cantidad de principio activo necesario para la preparación de las soluciones correspondientes.

Tabla 2.2 Pesos de estándar según la concentración para 3 puntos de análisis

Concentración Cc %	Clorhexidina HCl		Benzocaína		Enoxolona	
	Peso mg	Cc ug/mL	Peso mg	Cc ug/mL	Peso mg	Cc ug/mL
75 %	18.75	18.75	15.00	15	11.25	11.25
100 %	25.00	25.0	20.00	20	15.00	15.0
125 %	31.25	31.25	25.00	25	18.75	18.75

A continuación transferir los 3 estándares de referencia pesados (por cada concentración) a una fiola de 50 mL y diluir con metanol, someter a ultrasonido por 5 minutos en un baño de agua a 50 °C y enfriar a temperatura ambiente, llevar a volumen con metanol y homogenizar (solución A).

Transferir una alícuota de 5 mL de la (solución A) a una fiola de 100 mL conteniendo placebo, diluir con 70 mL de metanol, someter a ultrasonido por 15 minutos en un baño de agua a 50°C y enfriar a temperatura ambiente, llevar a volumen con metanol y homogenizar. Llevar a agitación con ayuda de magnetos por 15 minutos y filtrar a través de un filtro de membrana de cloruro de polivinilideno con tamaño de poro de 0.45µm y colocar el líquido filtrado en viales de HPLC.

Para la interpretación estadística de la regresión lineal, Se debe realizar un proceso estadístico para determinar los siguientes parámetros:

a) Cálculo del coeficiente de correlación (r).

Se debe determinar la curva de regresión lineal sobre los puntos individuales para obtener la gráfica de la curva de calibración a partir de las siguientes ecuaciones.

$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n} \quad (\text{Ec 2.7})$$

$$b = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \quad (\text{Ec 2.8})$$

$$Y = bx + a \quad (\text{Ec 2.9})$$

Donde a es el intercepto (Prueba que la recta pasa por el origen y que cualquier desviación se debe a un error aleatorio), b es el valor de la pendiente (indica sensibilidad del método), x es la concentración de analito (Variable independiente), Y es la respuesta (Variable dependiente) y n es el número de muestras

Para comprobar la existencia de una curva perfectamente lineal, se debe calcular el valor de “r”, el cual refleja el grado de relación entre las concentraciones (x) y su respuesta (y) y cuya ecuación para calcular se valor se presenta a continuación:

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}} = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{\left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right) \left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right)}} \quad (\text{Ec 2.10})$$

El valor $r = 1$ indica una recta perfectamente lineal, $r = -1$ indica una recta perfectamente lineal negativa y $r = 0$ indica que no hay correlación entre x e y. Sus valores deben ser mayores a 0.999 y se debe realizar un test estadístico en el cual se calcula un valor de t_r con $n-2$ grados de libertad y se compara con el valor t tabulado para el nivel de confianza requerido.

En este caso la hipótesis nula (H_0) es la no correlación entre x e y ($r = 0$), si el valor observado de t_r es mayor que t_{tabla} , se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna (H_1) donde r no debe ser significativamente diferente

de uno ($r \neq 0$), siendo la correlación lineal significativa en x e y , para calcular la probabilidad se usan las siguientes ecuaciones:

Fórmula para hallar $t_{\text{regresión}}$

$$t_{\text{regresión}} = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (\text{Ec 2.11})$$

Donde $|r|$ es el valor absoluto de r , n es el número de muestras analizadas y r^2 es el coeficiente de determinación que indica el grado de ajuste de la ecuación.

b) Límite de confianza del intercepto “a” (Test de proporcionalidad)

Este valor se calcula en función de la varianza (S_a^2), utilizando la ecuación (Ec 2.12) que se muestra a continuación.

$$s_a^2 = \frac{S_{y,x}^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \quad (\text{Ec 2.12})$$

Donde x es la concentración y $S_{y,x}^2$ es la varianza residual la cual se calcula a partir de:

$$S_{y,x}^2 = \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n-2} = \frac{\sum (y - \bar{y})^2}{n-2} (1-r^2) = \frac{\sum (y_i - \hat{y})^2}{n-2} = \frac{\sum e_i^2}{n-2} \quad (\text{Ec 2.13})$$

Donde e_i es el valor residual $e_i = \hat{y}_i - y_i$, e i son los grupos,

Para determinar la desviación estándar del intercepto “a” (S_a) se muestra la ecuación:

$$S_a = \sqrt{S_a^2} \quad (\text{Ec 2.14})$$

Fórmula para hallar la desviación estándar relativa de la pendiente

$$S_{a\text{rel}} = \frac{S_a \times 100}{a} \quad (\text{Ec 2.15})$$

La determinación del test estadístico del intercepto "a", se realiza estableciendo una comparación entre $t_{\text{experimental}}$ y t_{tabla} , para hallar el valor de $t_{\text{experimental}}$ se usa la ecuación 2.16

$$t_{\text{exp}} = \frac{|a|}{S_a} \quad (\text{Ec 2.16})$$

Donde $|a|$ es el valor absoluto del intercepto; debe cumplirse que $t_{\text{experimental}} < t_{\text{tablas}}$; para $n-2$ grados libertad y un grado de significación α igual a 0,05.

Fórmula para hallar los Límites de Confianza

$$a = a \pm t_{\text{tabla}} \times S_a \quad (\text{Ec 2.17})$$

Donde t_{tabla} es el valor obtenido en la tabla de distribución de student, con $n-2$ grados de libertad y p de 0.05, es decir un grado de confianza de 95 %, debe cumplirse que $t_{\text{experimental}} < t_{\text{tabla}}$ para comprobar que el valor a es aceptable para una correlación lineal significativa.

c) Límite de confianza de la pendiente (b)

Este valor se calcula en función de la varianza (S^2_a), utilizando la ecuación (Ec. 2.18) que se muestra a continuación.

$$S_b^2 = \frac{S_{y,x}^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \quad (\text{Ec 2.18})$$

Donde $S_{y,x}^2$ es la varianza residual, y x es la concentración del analito, se calcula con la ecuación (Ec. 2.19)

$$S_{y,x}^2 = \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n-2} = \frac{\sum (y - \bar{y})^2}{n-2} (1-r^2) = \frac{\sum (y_i - \hat{y})^2}{n-2} = \frac{\sum e_i^2}{n-2} \quad (\text{Ec 2.19})$$

Para hallar la desviación estándar de la pendiente “b” (S_b), esta debe ser calculada en función de su varianza.

$$S_b = \sqrt{S_b^2} \quad (Ec\ 2.20)$$

La determinación del test estadístico de la pendiente “b”, se realiza estableciendo una comparación entre $t_{\text{experimental}}$ y el t_{tabla} , se debe usar la ecuación (Ec. 2.21) para hallar el valor de $t_{\text{experimental}}$.

$$t_{\text{exp}} = \frac{|b|}{S_b} \quad (Ec\ 2.21)$$

Donde $|b|$ es el valor absoluto de la pendiente

Fórmula para hallar los límites de confianza de la pendiente “b”.

$$b = b \pm t_{\text{tabla}} \times S_b \quad (Ec\ 2.22)$$

Donde t_{tabla} es el valor obtenido en la tabla de distribución de student, con $n-2$ grados de libertad y p de 0.05, es decir un grado de confianza de 95 %

En este caso la hipótesis nula (H_0) sostiene que $b = 0$, y la hipótesis alterna (H_1) señala que ($b \neq 0$), por lo tanto se espera un valor de $t_{\text{experimental}} > t_{\text{tabla}}$, lo cual indicaría la existencia de correlación lineal significativa al acepta la hipótesis alterna donde b es diferente de 0.

d) Cálculo del coeficiente de variación (C.V.) de los factores de respuesta (f)

Se debe calcular los factores de respuesta f según la ecuación (Ec. 2.4) para cada concentración, determinar la media aritmética $\bar{x}$ según la ecuación (Ec. 2.5) y la desviación estándar S_f de los factores respuesta según la ecuación (Ec. 2.6).

El coeficiente de variación se calcula en función de la (Ec. 2.3), el criterio de aceptación para la linealidad de sistema es un valor $< 5\ %$.

2.6.4. EXACTITUD: ICH “Validation of Analytical Procedures”

Este ensayo sirve para expresar la cercanía entre el valor que es aceptado y el valor encontrado obtenido al aplicar el procedimiento de análisis un cierto número de veces. Los documentos ICH recomiendan que se evalúe la exactitud utilizando un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración, es decir tres concentraciones y tres determinaciones repetidas por concentración.

La **Directiva Sanitaria N°001-MINSA/DIGEMID V.01 “Criterios de evaluación de un Dossier de Especialidades Farmacéuticas”**, establece que la exactitud se puede determinar a partir de la linealidad con tres concentraciones dentro del rango de trabajo por triplicado, por este motivo, se considera que los datos que se obtengan en la linealidad de método serán válidos para reportar la exactitud.

Para la evaluación estadística de la exactitud, se deben determinar los siguientes parámetros.

- a) Cálculo del porcentaje de recuperación de cada concentración.

$$\text{Porcentaje de Recuperación (R)} = \frac{X_m \times 100}{\mu} \quad (\text{Ec 2.23})$$

Donde X_m es el valor medio hallado de los valores medidos y μ es el valor aceptado como verdadero

- b) Cálculo de la desviación estándar (S), y coeficiente de variación (CV) deben ser hallados con la ecuación (Ec 2.6) y (Ec. 2.3) respectivamente y se realizan en función de los porcentajes de recuperación
- c) Cálculo del t de Student: Para confirmar que el valor no difiere significativamente del aceptado como referencia, calcular el $t_{\text{experimental}}$ y

compararlo con el t_{tabla} para $n-1$ grados de libertad y un nivel de significación del 95 % ($p=0.05$).

Fórmula para hallar el “ t ” experimental ($t_{\text{experimental}}$) Test de t-Student:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|100 - R| \times \sqrt{n}}{CV} \quad (\text{Ec 2.24})$$

Donde R es el porcentaje de recuperación, CV es el coeficiente de variación de los porcentajes de recuperación y n es el número de determinaciones.

Este análisis estadístico indica que si $t_{\text{experimental}}$ es menor que t_{tabla} , entonces no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100 % por lo que la exactitud es apropiada.

2.6.5. PRECISIÓN: ICH “Validation of Analytical Procedures”

Se realiza para expresar el grado de dispersión o concordancia entre los resultados individuales cuando el método analítico se aplica repetidamente a diferentes muestras, se realizó en 2 niveles: Repetibilidad y Precisión intermedia

2.6.5.1. Repetibilidad

La repetibilidad se realizó en condiciones repetitivas (mismo analista, mismo día, mismo instrumento) del método se evaluó sobre:

- **Repetibilidad del sistema:** Se procedió según la preparación de la solución estándar tal cual se indica en el punto 2.4.4.
- **Repetibilidad del método:** Se procedió según la preparación de la solución muestra tal cual se indica en el punto 2.4.5.

Se realizó mediante la preparación de 5 muestras estándar homogéneas

para determinar la repetibilidad de sistema y 6 muestras homogéneas del producto para determinar la repetibilidad de método; Todas las preparaciones se encontraban en concentración al 100%.

Para determinar la conformidad de este parámetro se debe usar la ecuación (Ec. 2.3) para calcular el coeficiente de variación (C.V.) de los resultados obtenidos, el cual no debe ser mayor de 2 %.

2.6.5.2. Precisión intermedia (PI)

La precisión intermedia se realizó en condiciones reproducibles, esto quiere decir (diferente día, diferente Equipo HPLC), para ello se procedió según la preparación de la solución muestra tal cual se indica en el punto 2.4.5.

Se prepararon 6 muestras homogéneas del producto a una concentración del 100%, las cuales se evaluaron por duplicado.

Para determinar la conformidad de este parámetro se debe usar la ecuación (Ec. 2.3) para calcular el coeficiente de variación (C.V.) de los resultados obtenidos el mismo día y los resultados obtenidos entre el día 1 y el día 2, el cual no debe ser mayor al 2 %.

2.6.6. ESTABILIDAD DE MUESTRA PREPARADA: Según procedimiento analítico desarrollado.

Además de los parámetros de validación ya desarrollados, se realizó el ensayo de estabilidad para ver si la muestra conservó su integridad fisicoquímica y la concentración del analito de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas. Las cuales son entre 2° y 8°C.

- **A cero Horas:** Las muestras se inyectaron en el HPLC el mismo día de preparación de la muestra. Para ello se tomaron las muestras preparadas en la prueba de precisión intermedia.

- **A 12 horas:** Las muestras se inyectaron en el HPLC después de transcurrir 12 horas de haber preparado la muestra; se prepararon nuevamente los estándares.
- **A 24 Horas:** Las muestras se inyectaron en el HPLC después de haber transcurrido 24 horas de haber preparado la muestra; Se prepararon nuevamente los estándares.

Las muestras analizadas, se filtraron por triplicado y se dividieron en tres grupos distintos, el primer grupo (tiempo “0” horas) será considerado grupo 1; el segundo y tercer grupo se almacenaran en el refrigerador para ser inyectados en el sistema HPLC al tiempo de “12” horas el cual será considerado grupo 2 y al tiempo “24” horas el cual será considerado grupo 3. Se evalúa cada muestra por duplicado.

Fórmula para hallar el sesgo o error determinado:

$$e[\%] = \frac{\bar{b}}{\text{valor de referencia}} \times 100 \quad (\text{Ec 2.25})$$

Donde $\bar{b}$ es el promedio del valor absoluto de los sesgos obtenido en cada grupo (2 y 3) y el valor de referencia es el promedio del valor obtenido en el grupo 1

Para determinar la validez de éste ensayo, se debe calcular el coeficiente de variación (C.V.) de los resultados obtenidos entre los grupos 1, 2 y 3 el cual no debe ser mayor a 2 %. Mientras que el sesgo no debe tener un valor mayor al 3 %.

2.7. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

Son las características que se van a evaluar y van a depender del tipo de ensayo.²⁵

a) **Aptitud de sistema:** El coeficiente de variación (CV) debe ser $\leq 2\%$.

b) **Selectividad:** Interferencia menor al 2.0%.

c) **Linealidad del sistema:** Por observación visual del gráfico y métodos estadísticos.

- Coeficiente de Correlación : Mayor o igual que 0.999

- Coeficiente de Determinación : Mayor o igual que 0.998

- Test estadístico para “r” : $t_{\text{tabla}} = 2.160$

$p = 0.05$; y n-2 grados de libertad $t_{\text{regresión}} > t_{\text{tabla}}$

- Coeficiente de Variación : Menor a 5.0 %

- Test de Proporcionalidad del Intercepto : $t_{\text{experimental}} = 2.160$

$t_{\text{experimental}} < t_{\text{tabla}}$

$p = 0.05$; y n-2 grados de libertad

- Prueba de Linealidad de la Pendiente : $t_{\text{experimental}} = 2.160$

$p = 0.05$; y n-2 grados de libertad $t_{\text{experimental}} > t_{\text{tabla}}$

d) **Linealidad de método:** Por observación visual del gráfico y métodos estadísticos.

- Coeficiente de Correlación : Mayor o igual que 0.999

- Coeficiente de Determinación : Mayor o igual que 0.998

- Test estadístico para “r” : $t_{\text{tabla}} = 2.365$

$p = 0.05$; y n-2 grados de libertad $t_{\text{regresión}} > t_{\text{tabla}}$

- Coeficiente de Variación : Menor a 5.0 %
- Test de Proporcionalidad del Intercepto : $t_{\text{experimental}} = 2.365$
 $p = 0.05$; y $n-2$ grados de libertad $t_{\text{experimental}} < t_{\text{tabla}}$
- Prueba de Linealidad de la Pendiente : $t_{\text{experimental}} = 2.365$
 $p = 0.05$; y $n-2$ grados de libertad $t_{\text{experimental}} > t_{\text{tabla}}$

e) Exactitud:

- El % de recuperación promedio : 98 - 102 %
- Test de recuperación media : $t_{\text{experimental}} = 2.306$
 $p = 0.05$; y $n - 1 = \text{Grados de libertad}$ $t_{\text{experimental}} < t_{\text{tabla}}$

f) Precisión:

- Repetibilidad : El coeficiente de variación (C.V.) o desviación estándar relativa (R.S.D.) debe ser ≤ 2.0
- Precisión intermedia : El coeficiente de variación (C.V.) o desviación estándar relativa (R.S.D.) debe ser ≤ 2.0

g) Estabilidad de Muestra Preparada

- Coeficiente de variación : ≤ 2.0 %
- Sesgo : < 3 %

CAPÍTULO III

RESULTADOS

Todo trabajo de investigación con fines analíticos debe tener resultados, interpretación y discusión, con el propósito de explicar los fundamentos de un procedimiento analítico, posterior a la ejecución de los parámetros mínimos requeridos en un proceso de validación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se procesaron los datos obtenidos, lo que permite presentar los resultados de cada ensayo a continuación.

3.1. APTITUD DE SISTEMA

Se debe tener en cuenta que; ningún análisis de muestras es aceptable a menos que cumpla los requisitos de aptitud de sistema, de manera que los análisis de muestras obtenidos cuando el sistema no cumple con la condición de aptitud son inaceptables.

Para realizar la prueba de aptitud de sistema, se emplearon los datos de cinco inyecciones repetidas cuyos resultados se observan en la tabla 3.1. Los tiempos de retención relativos son informativos y tienen la función de facilitar la identificación de los picos, el cálculo del coeficiente de variación fue hecho a partir de la ecuación (Ec. 2.3), nótese que el valor del coeficiente de variación en ningún caso sobrepasa el criterio de

aceptación mayor al 2 %,

Tabla N° 3.1 Valores Obtenidos en la aptitud del sistema

N° de Inyección	Benzocaína		Clorhexidina HCl		Enoxolona	
	Área	Tiempo de retención	Área	Tiempo de retención	Área	Tiempo de retención
1	917525	2.52	2862945	3.90	761457	9.87
2	908358	2.51	2851188	3.88	766463	9.90
3	913827	2.52	2859583	3.89	768133	9.88
4	906348	2.51	2840966	3.87	767072	9.86
5	906609	2.51	2853437	3.87	767665	9.86
Promedio	910533	2.52	2853624	3.88	766158	9.87
S	4934.09	0.01	8493.89	0.01	2701.83	0.02
C.V. (%)	0.542	0.22	0.298	0.37	0.353	0.15

Para que la aptitud de sistema sea conforme, se establecieron parámetros de aptitud cuyos resultados se observan en la tabla 3.2 los cuales se encuentran dentro del criterio de aceptación correspondiente, podemos apreciar el cromatograma con la elución de picos de los tres principios activos en la figura 3.1.

Tabla N° 3.2 Resultados de los parámetros de aptitud de sistema

Parámetros cromatográficos	Criterio de Aceptación	RESULTADOS		
		Clorhexidina HCl	Benzocaína	Enoxolona
Coeficiente de Variación (C.V.)	No más de 2.0 %	0.298	0.542	0.353
Factor de Asimetría (T)	No más de 2.0	1.177	1.53	1.097
Número de Platos Teóricos (N)	No menos de 1000	3630	5315	9272

El cálculo de los parámetros de aptitud se obtuvieron por software del HPLC, pero las fórmulas también están disponibles en la USP, según se observan en las ecuaciones (Ec. 2.1), (Ec. 2.2) y (Ec. 2.3), dichos parámetros evidencian un cromatograma con picos simétricos, bien definidos, y separados completamente uno del otro.

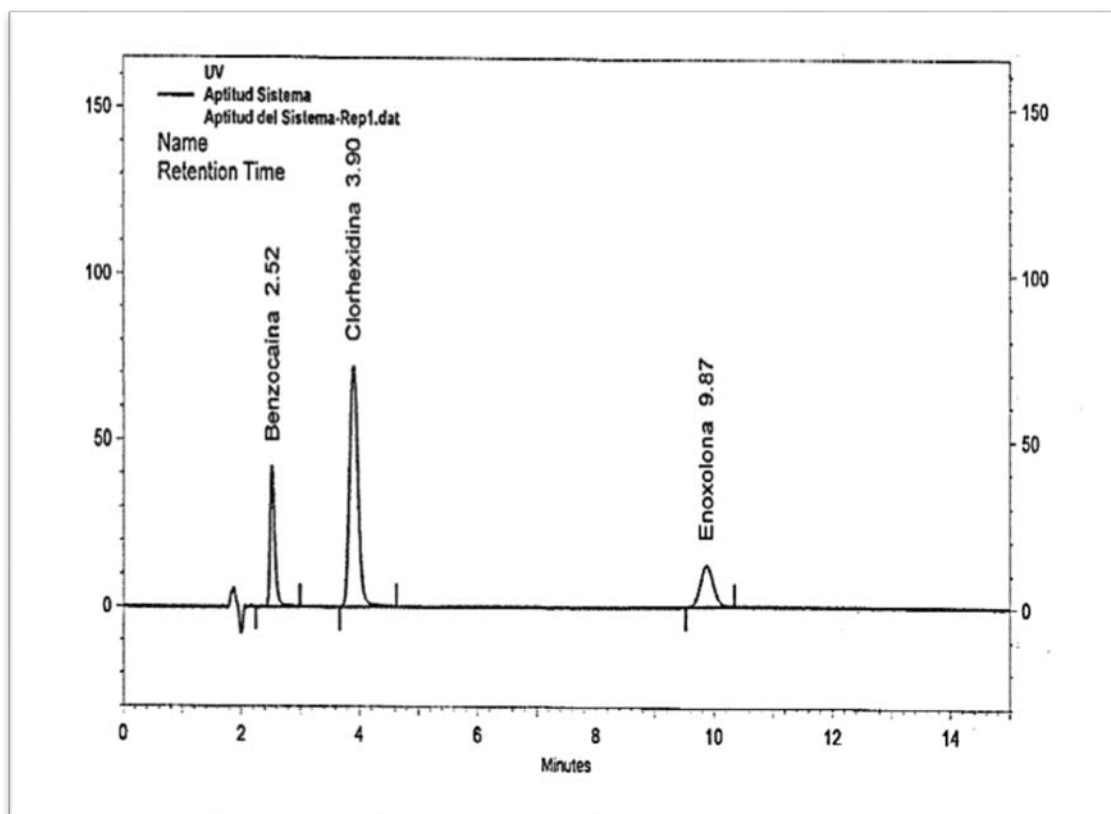


Figura N° 3.1. Cromatograma de aptitud de sistema

La USP considera como no aceptable cualquier análisis por HPLC que no cumpla con una prueba de aptitud del sistema y debido a que los parámetros de aptitud se encuentran dentro de los criterios de aceptación correspondientes, se considera conforme, a pesar de que no es un parámetro de validación.

3.2. SELECTIVIDAD

3.2.1. Selectividad de sistema por degradación de muestra (Estrés fisicoquímico)

En la tabla n° 3.3 se expresan los promedios de los datos obtenidos a partir de 2 muestras por cada proceso de estrés de estándares, las cuales fueron analizadas por duplicado.

Se observa que no existe coelución entre algún posible compuesto de degradación y las soluciones estándar, además la lectura del blanco (correspondiente a la fase móvil) es de 0.0 %.

Tabla N° 3.3. Resultados obtenidos en el ensayo de selectividad de sistema

Condiciones de estrés	Área de muestra			% de Recuperación		
	C	B	E	C	B	E
C. Normales	3781576	1294231	929022	98.75	100.17	100.60
Hidrólisis	3819064	1295104	936036	99.73	100.24	101.36
Hidrólisis alcalina	4031798	1033152	980750	105.28	81.86	106.20
Hidrólisis ácida	3818750	1292335	926756	99.72	100.02	100.36
Termólisis	3816506	1300637	936670	99.66	100.67	101.43
Fotólisis	3589940	1262486	905351	93.75	97.72	98.04
Oxidación	3746604	1258275	923376	97.84	97.39	99.99
Blanco	0.00000	0.00000	0.00000	0.00	0.00	0.00

C = Clorhexidina Clorhidrato; B = Benzocaína; E = Enoxolona

3.2.2. Selectividad de método por degradación de muestra (Estrés fisicoquímico)

En la tabla n° 3.4 se expresan los promedios de los datos obtenidos a partir de 2 muestras por cada proceso de estrés de estándares, las cuales fueron analizadas por duplicado.

Tabla N° 3.4 Resultados obtenidos en el ensayo de selectividad de método

Condiciones de estrés	Área de muestra			% de Recuperación		
	C	B	E	C	B	E
C. Normales	3959801	1278099	933925	103.50	101.31	102.42
Hidrolisis	3967822	1314487	949999	103.75	104.19	104.17
Hidrolisis alcalina	3604888	1022976	950123	94.100	81.05	104.08
Hidrolisis ácida	4009813	1416708	976273	104.75	112.25	107.00
Termólisis	3991120	1119302	929206	104.30	88.69	101.92
Fotólisis	3793216	1215939	878699	99.15	96.50	96.33
Oxidación	3870483	1292779	955839	101.15	102.50	104.75
Placebo	0.0000	0.0000	0.0000	0.00	0.00	0.00

C = Clorhexidina Clorhidrato; B = Benzocaína; E = Enoxolona

Se observa que no existe coelución entre algún posible compuesto de degradación y las soluciones estándar, además la lectura del blanco (correspondiente al placebo) es de 0.0 %.

Estos resultados concuerdan con otro estudio de validación de Clorhexidina HCl en comprimidos (*Guineo García – 2010*) que muestra la no existencia de compuestos de degradación relacionados a Clorhexidina HCl, La *Revista Cubana Farmacéutica* muestra en uno de sus estudios que en el caso de Benzocaína, tampoco existe interferencias a una absorbancia de 280 nm, por último la BP indica que cualquier interferencia que genere un factor de respuesta menos al 0.05 % de del factor de respuesta de Enoxolona, debe ser despreciado.

3.3. LINEALIDAD

3.3.1. Linealidad de sistema

Se tabularon los resultados obtenidos en las tablas n° 3.5, 3.6 y 3.7, y se realizó el tratamiento estadístico para Clorhexidina HCl, Benzocaína y Enoxolona respectivamente, a fin de evaluar la linealidad y la proporcionalidad entre las concentraciones de 50 %, 75 %, 100 %, 125 % y 150 %. Para el cálculo de la regresión lineal se usó la ecuación (*Ec. 2.9*), las curva de calibración de cada analito, se observan en las figura n° 3.2, 3.3 y 3.4 sobre los puntos individuales sin promediar.

Para calcular el coeficiente de correlación (r), que refleja el grado de relación entre las concentraciones (X) y su respuesta (Y), se usó la ecuación (*Ec. 2.10*), cuyos resultados fueron $r_{\text{Clorhexidina HCl}} = 0.99935$, $r_{\text{Benzocaína}} = 0.99937$ y $r_{\text{Enoxolona}} = 0.99904$, los cuales se aproximan a 1 (valor que representa una recta perfectamente lineal). Además se determinaron los coeficientes de determinación (r^2) que es un indicador del grado de ajuste de la ecuación y se obtuvieron valores de $r^2_{\text{Clorhexidina HCl}} = 0.99870$, $r^2_{\text{Benzocaína}} = 0.99875$ y un $r^2_{\text{Enoxolona}} = 0.99808$, estos valores quieren decir que el 99.87 %, 99.88% y 99.81% respectivamente, de las variaciones se deben a la influencia de la variable “ x ” (concentración inyectada).

Tabla N° 3.5 Resultados obtenidos en el ensayo de linealidad de sistema de Clorhexidina clorhidrato.

CC Teórica	Peso (mg)	mg/mL xi	Área	Área Promedio yi	xi ²	yi ²	xi * yi	Factor Respuesta yi / xi	C.V. %
50%	25.42	0.012710	1724625	1719373	1.62E-04	2.96E+12	2.19E+04	1.35E+08	1.25
			1708969						
			1724525						
50%	25.41	0.012705	1679505	1681815	1.61E-04	2.83E+12	2.14E+04	1.32E+08	1.25
			1681956						
			1683983						
50%	25.40	0.012700	1718121	1718051	1.61E-04	2.95E+12	2.18E+04	1.35E+08	1.25
			1716958						
			1719073						
75%	38.15	0.019075	2622043	2630228	3.64E-04	6.92E+12	5.02E+04	1.38E+08	0.88
			2634945						
			2633696						
75%	38.16	0.019080	2594421	2599238	3.64E-04	6.76E+12	4.96E+04	1.36E+08	0.88
			2596577						
			2606716						
75%	38.16	0.019080	2618946	2644097	3.64E-04	6.99E+12	5.04E+04	1.39E+08	0.88
			2632082						
			2681263						
100%	50.80	0.025400	3484117	3486738	6.45E-04	1.22E+13	8.86E+04	1.37E+08	1.39
			3483245						
			3492853						
100%	50.82	0.025410	3562069	3558173	6.46E-04	1.27E+13	9.04E+04	1.40E+08	1.39
			3557080						
			3555370						
100%	50.83	0.025415	3463004	3464998	6.46E-04	1.20E+13	8.81E+04	1.36E+08	1.39
			3464909						
			3467080						
125%	63.53	0.031765	4342820	4328720	1.01E-03	1.87E+13	1.38E+05	1.36E+08	1.25
			4308655						
			4334686						
125%	63.54	0.031770	4301897	4306786	1.01E-03	1.85E+13	1.37E+05	1.36E+08	1.25
			4311858						
			4306602						
125%	63.50	0.031750	4382011	4407427	1.01E-03	1.94E+13	1.40E+05	1.39E+08	1.25
			4406453						
			4433816						
150%	76.23	0.038115	5356264	5367804	1.45E-03	2.88E+13	2.05E+05	1.41E+08	1.34
			5364144						
			5383003						
150%	76.22	0.038110	5220427	5228667	1.45E-03	2.73E+13	1.99E+05	1.37E+08	1.34
			5233855						
			5231720						
150%	76.24	0.038120	5321026	5325569	1.45E-03	2.84E+13	2.03E+05	1.40E+08	1.34
			5338587						
			5317094						
Suma	762.41	0.3812	157403049	52467683	1.09E-02	2.07E+14	1.50E+06	2.06E+09	6.10
Promedio								100228.45	137177050
S								66551.57	2209923.44
C.V.%								66.40	1.611

Tabla N° 3.6. Resultados obtenidos en el ensayo de linealidad de sistema de Benzocaína

Cc Teórica	Peso (mg)	mg/mL	Área	Área Promedio				Factor Respuesta	C. V. %
		xi	yi	yi	xi ²	yi ²	xi * yi	yi / xi	
50%	20.00	0.010000	531659	529965	1.00E-04	2.81E+11	5.30E+03	5.30E+07	0.42
			524271						
			533964						
50%	19.99	0.009995	525262	527119	9.99E-05	2.78E+11	5.27E+03	5.27E+07	
			528274						
			527822						
50%	20.05	0.010025	535080	533172	1.01E-04	2.84E+11	5.35E+03	5.32E+07	
			532143						
			532292						
75%	30.12	0.015060	803915	799681	2.27E-04	6.39E+11	1.20E+04	5.31E+07	
			798062						
			797066						
75%	30.02	0.015010	790820	791704	2.25E-04	6.27E+11	1.19E+04	5.27E+07	
			792929						
			791362						
75%	30.01	0.015005	799175	800078	2.25E-04	6.40E+11	1.20E+04	5.33E+07	
			803108						
			797952						
100%	40.05	0.020025	1054162	1056096	4.01E-04	1.12E+12	2.11E+04	5.27E+07	
			1059625						
			1054501						
100%	40.05	0.020025	1077014	1087601	4.01E-04	1.18E+12	2.18E+04	5.43E+07	
			1104274						
			1081514						
100%	40.10	0.020050	1051603	1053367	4.02E-04	1.11E+12	2.11E+04	5.25E+07	
			1056916						
			1051583						
125%	50.16	0.025080	1311020	1306349	6.29E-04	1.71E+12	3.28E+04	5.21E+07	
			1304969						
			1303058						
125%	50.17	0.025085	1296630	1297740	6.29E-04	1.68E+12	3.26E+04	5.17E+07	
			1296747						
			1299842						
125%	49.99	0.024995	1302064	1304919	6.25E-04	1.70E+12	3.26E+04	5.22E+07	
			1304874						
			1307819						
150%	60.12	0.030060	1576265	1577622	9.04E-04	2.49E+12	4.74E+04	5.25E+07	
			1580095						
			1576505						
150%	60.13	0.030065	1572377	1571077	9.04E-04	2.47E+12	4.72E+04	5.23E+07	
			1569779						
			1571075						
150%	60.14	0.030070	1611400	1604676	9.04E-04	2.57E+12	4.83E+04	5.34E+07	
			1600501						
			1602126						
Suma	601.10	0.3006	47523494	15841164.7	6.78E-03	1.88E+13	3.57E+05	7.92E+08	4.38
						Promedio	23782.43	52786922	
						S	15592.49	633751.72	
						D.S.R%	65.56	1.201	

Tabla N° 3.7. Resultados obtenidos en el ensayo de linealidad de sistema de Enoxolona

Cc Teórica	Peso (mg)	mg/mL	Área	Área promedio				Factor Respuesta	C.V. %
		xi		yi	xi ²	yi ²	xi * yi	yi / xi	
50%	15.07	0.007535	434369	432825	5.68E-05	1.87E+11	3.26E+03	5.74E+07	0.87
			429474						
			434632						
50%	15.05	0.007525	430137	430827	5.66E-05	1.86E+11	3.24E+03	5.73E+07	
			430513						
			431832						
50%	15.06	0.007530	437968	438271	5.67E-05	1.92E+11	3.30E+03	5.82E+07	
			437798						
			439048						
75%	22.49	0.011245	663129	663021	1.26E-04	4.40E+11	7.46E+03	5.90E+07	0.92
			663355						
			662579						
75%	22.52	0.011260	653421	653874	1.27E-04	4.28E+11	7.36E+03	5.81E+07	
			654417						
			653785						
75%	22.53	0.011265	664919	665132	1.27E-04	4.42E+11	7.49E+03	5.90E+07	
			666209						
			664269						
100%	30.03	0.015015	883513	886045	2.25E-04	7.85E+11	1.33E+04	5.90E+07	1.50
			882933						
			891689						
100%	30.03	0.015015	892098	890720	2.25E-04	7.93E+11	1.34E+04	5.93E+07	
			889783						
			890279						
100%	30.02	0.015010	863576	865502	2.25E-04	7.49E+11	1.30E+04	5.77E+07	
			866686						
			866244						
125%	37.56	0.018780	1090400	1087066	3.53E-04	1.18E+12	2.04E+04	5.79E+07	0.68
			1084221						
			1086577						
125%	37.50	0.018750	1081096	1087809	3.52E-04	1.18E+12	2.04E+04	5.80E+07	
			1093840						
			1088491						
125%	37.50	0.018750	1097265	1099193	3.52E-04	1.21E+12	2.06E+04	5.86E+07	
			1096201						
			1104112						
150%	45.00	0.022500	1369239	1366298	5.06E-04	1.87E+12	3.07E+04	6.07E+07	1.90
			1361481						
			1368175						
150%	45.00	0.022500	1321946	1315338	5.06E-04	1.73E+12	2.96E+04	5.85E+07	
			1314810						
			1309258						
150%	45.01	0.022505	1334965	1341407	5.06E-04	1.80E+12	3.02E+04	5.96E+07	
			1350406						
			1338849						
Suma	450.37	0.2252	39669987	13223329	3.80E-03	1.32E+13	2.24E+05	8.78E+08	5.88
						Promedio	14915.36	58552104	
						D.S.	9911.78	920142.54	
						C.V.%	66.45	1.571	

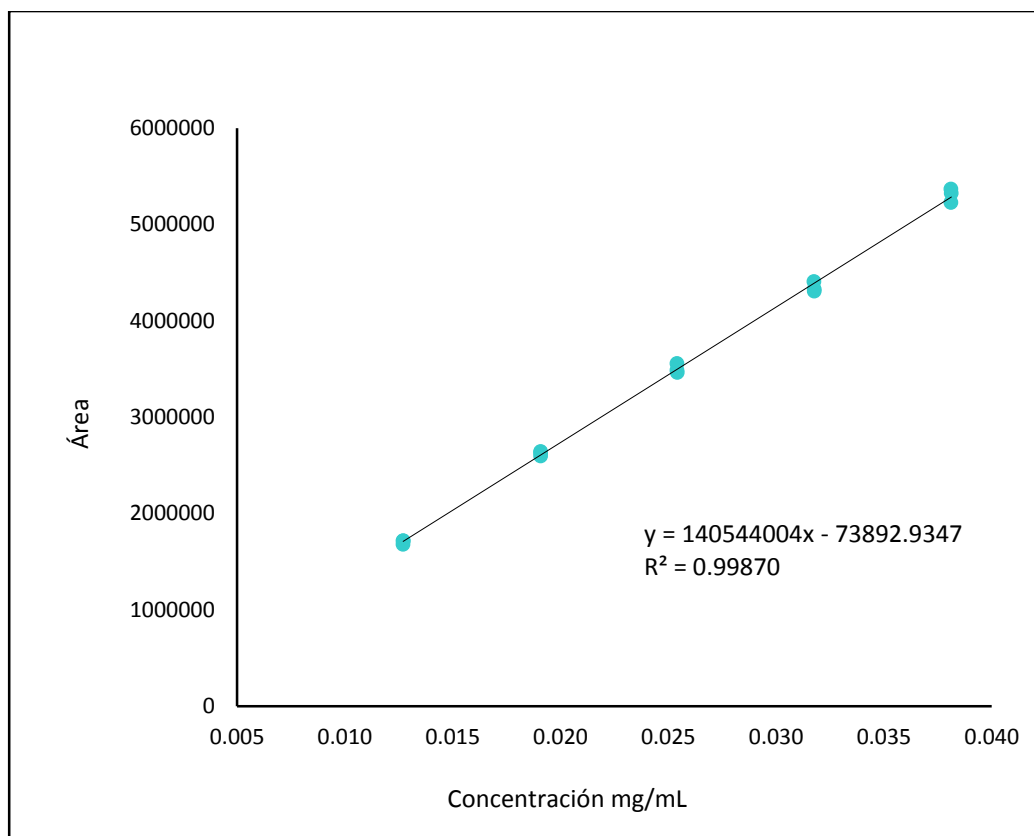


Figura N° 3.2 Curva de calibración de Clorhexidina HCl. (L.Sistema)

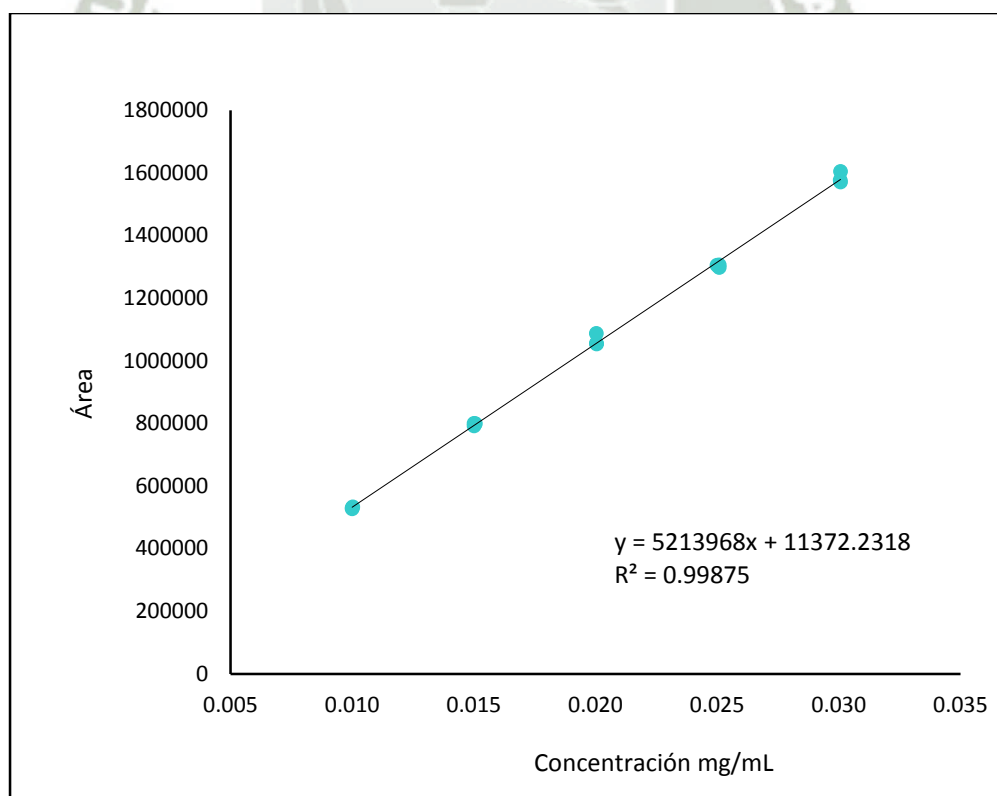


Figura N° 3.3 Curva de calibración de Benzocaína. (L.Sistema)

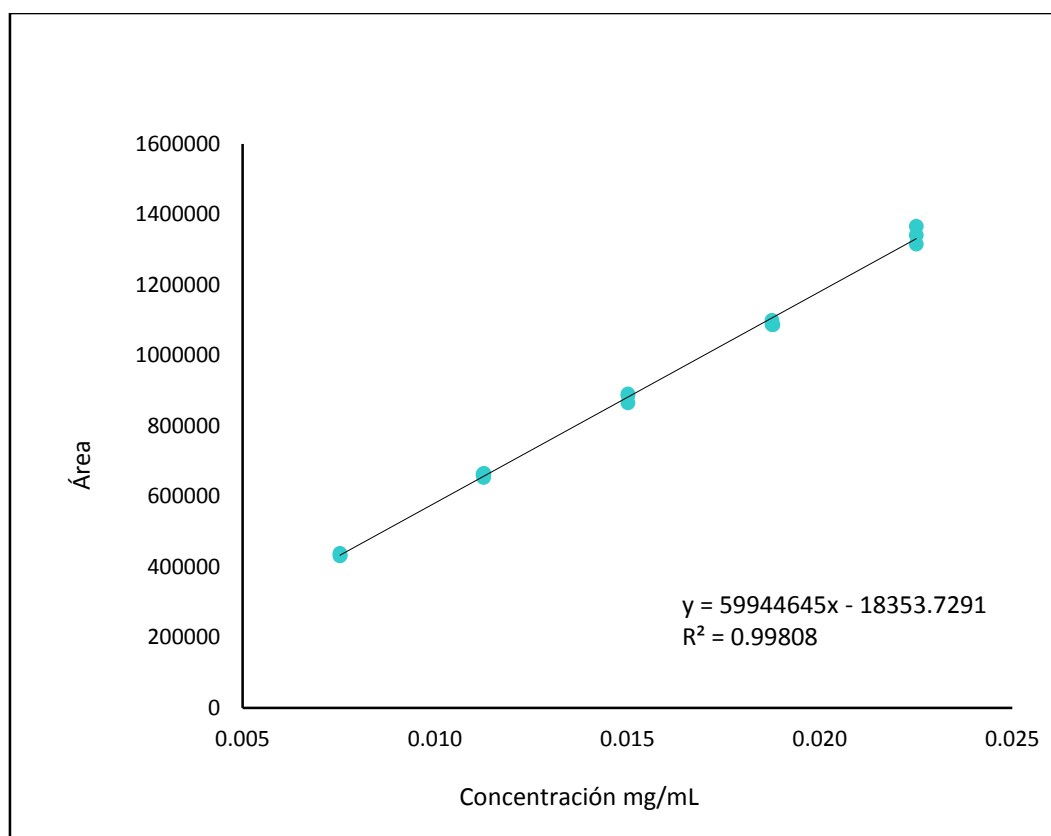


Figura N° 3.4 Curva de calibración de Enoxolona. (L.Sistema)

- a) Para un mejor indicativo del modelo lineal, se realizó un test estadístico que consiste en comparar el valor de $t_{\text{regresión}}$ (Ec. 2.11) con el t_{tabla} , con $n-2$ grados de libertad y un intervalo de confianza de $(p = 1-\alpha)$, donde $(\alpha = 0.05)$ es la probabilidad de cometer error, esto quiere decir que $p = 1 - 0.05$, que nos da un valor de confianza del 95 %, los resultados obtenidos fueron:

t_{tabla} para 15 – 2 grados de libertad y $p = 0.05$	:	2.160
$t_{\text{regresión}}$ de Clorhexidina Cl	:	99.935
$t_{\text{regresión}}$ de Benzocaína	:	101.916
$t_{\text{regresión}}$ de Enoxolona	:	82.206

En todos los casos se determina que $t_{\text{regresión}} > t_{\text{tabla}}$, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna que sostiene que $(r \neq 0)$ y demuestra que existe una correlación lineal significativa entre x e y .

- b) El cálculo del límite de confianza del intercepto “a” se realizó con la ecuación (Ec.2.17) y el cálculo del $t_{\text{experimental}}$ se realizó con la ecuación (Ec. 2.16), se obtuvieron los siguientes resultados con un grado de confianza de 95 %.

t_{tabla} para 15 – 2 grados de libertad y $p = 0.05$: 2.160

Clorhexidina HCl

Varianza del intercepto (a) (Ec. 2.12) : 1429148841.25529

S del intercepto (a) (Ec. 2.14) : 37804.084981061

$t_{\text{experimental}}$: 1.955

Intervalo de confianza: - 155549.75825 – 7763.889

Benzocaína

Varianza del intercepto (a) (Ec. 2.12) : 118304566.27706

S del intercepto (a) (Ec. 2.14) : 10876.790256186

$t_{\text{experimental}}$: 1.046

Intervalo de confianza: - 12121.63514 – 34866.099

Enoxolona

Varianza del intercepto (a) (Ec. 2.12) : 135052656.47688

S del intercepto (a) (Ec. 2.14) : 11621.2157916839

$t_{\text{experimental}}$: 1.579

Intervalo de confianza: - 43455.55520 – 6748.097

En todos los casos, se cumple que: $t_{\text{experimental}} < t_{\text{tabla}}$, entonces el valor de a es aceptable y comprueba que existe una correlación lineal significativa.

- c) El cálculo del límite de confianza de la pendiente “b”, se realizó con la ecuación (Ec.2.12) y el cálculo del $t_{\text{experimental}}$ se realizó con la ecuación (Ec. 2.21), se obtuvieron los siguientes resultados con un grado de confianza de 95 %.

t_{tabla} para 15 – 2 grados de libertad y $p = 0.05$: 2.160

Clorhexidina HCl.

Varianza de la pendiente (b) (Ec. 2.18) : 1967148072351.67

S de la pendiente (b) (Ec. 2.20) : 1402550.56

$t_{\text{experimental}}$: 100.21

Intervalo de confianza: 137514494.7 – 143573513.1

Benzocaína

Varianza de la pendiente (b) (Ec. 2.18) : 261875413674.645

S de la pendiente (b) (Ec. 2.20) : 511736.64

$t_{\text{experimental}}$: 101.89

Intervalo de confianza: 51034327.91 – 53245034.52

Enoxolona

Varianza de la pendiente (b) (Ec. 2.18) : 5329301498885.316

S de la pendiente (b) (Ec. 2.20) : 730020.65

$t_{\text{experimental}}$: 82.11

Intervalo de confianza: 58367800.63 – 61521489.84

En los tres casos, se cumple que: $t_{\text{experimental}} > t_{\text{tabla}}$, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula, y se acepta la hipótesis alterna que sostiene que b es significativamente diferente de 0 ($b \neq 0$) y comprueba que si existe una correlación lineal significativa.

- d)** El cálculo del coeficiente de variación (C.V.) se realizó en función de los factores (f) de cada punto individual y se utilizó la ecuación (Ec. 2.3) obteniendo los siguientes resultados:

Clorhexidina HCl : 1.611

Benzocaína : 1.201

Enoxolona : 1.571

Los coeficientes de variación obtenidos, para Clorhexidina HCl, Benzocaína y Enoxolona, cumplen con el criterio de aceptación.

Se determinó la linealidad de sistema de Clorhexidina HCl, Benzocaína y Enoxolona por medio de pruebas estadística como son: test estadístico para coeficiente de correlación, test de linealidad, test de proporcionalidad y el cálculo del coeficiente de variación (C.V.) para cada analito; con lo que se resuelve que existe correlación lineal significativa entre la concentración del analito (X) y el área (Y), por lo que se comprueba que las variaciones en las respuestas (áreas), son directamente proporcionales a la concentración del analito (mg/ml) presente en los porcentajes (50 %, 75 %, 100 %, 125 % y 150 %) de muestra analizada.

3.3.2. Linealidad de método

Se tabularon los resultados obtenidos en las tablas n° 3.8, 3.9 y 3.10, y se realizó el tratamiento estadístico para Clorhexidina HCl, Benzocaína y Enoxolona respectivamente, a fin de evaluar la linealidad y la proporcionalidad entre las concentraciones de 75%, 100% y 125%.

Para el cálculo de la regresión lineal se usó la ecuación (Ec. 2.9), las curvas de calibración de cada analito, se observan en las figura n° 3.5, 3.6 y 3.7 sobre los puntos individuales sin promediar.

Para calcular el coeficiente de correlación (r), que refleja el grado de relación entre las concentraciones (X) y su respuesta (Y), se usó la ecuación (Ec. 2.10), cuyos resultados fueron $r_{\text{Clorhexidina HCl}} = 0.99907$, $r_{\text{Benzocaína}} = 0.99915$ y $r_{\text{Enoxolona}} = 0.99913$, los cuales se aproximan a 1 (valor que representa una recta perfectamente lineal).

Además se determinaron los coeficientes de determinación (r^2) que es un indicador del grado de ajuste de la ecuación y se obtuvieron valores de r^2 Clorhexidina HCl = 0.99814, r^2 Benzocaína = 0.99831 y un r^2 Enoxolona = 0.99825, estos valores quieren decir que el 99.81 %, 99.83 % y 99.83 % de las variaciones para Clorhexidina HCl, Benzocaína y Enoxolona respectivamente, se deben a la influencia de la variable “x” (concentración inyectada).

Tabla N° 3.8 Resultados obtenidos en el ensayo de linealidad de método de Clorhexidina Clorhidrato

Cc Teórica %	Peso (mg)	mg/mL	Área	Área Promedio				Factor Respuesta	C.V. %
		xi		yi	xi ²	yi ²	xi * yi	yi / xi	
75%	18.813	0.01881	2576450	2570524	3.54E-04	6.61E+12	4.84E+04	1.37E+08	1.11
			2542926						
			2592195						
75%	18.773	0.01877	2583758	2572135	3.52E-04	6.62E+12	4.83E+04	1.37E+08	1.11
			2566708						
			2565940						
75%	18.754	0.01875	2556030	2517201	3.52E-04	6.34E+12	4.72E+04	1.34E+08	1.44
			2505789						
			2489785						
100%	25.020	0.02502	3445360	3431453	6.26E-04	1.18E+13	8.59E+04	1.37E+08	1.44
			3419297						
			3429703						
100%	25.000	0.02500	3333851	3345984	6.25E-04	1.12E+13	8.36E+04	1.34E+08	1.44
			3362293						
			3341807						
100%	25.020	0.02502	3336533	3345688	6.26E-04	1.12E+13	8.37E+04	1.34E+08	1.44
			3355995						
			3344537						
125%	31.280	0.03128	4220436	4226766	9.78E-04	1.79E+13	1.32E+05	1.35E+08	0.59
			4245913						
			4213948						
125%	31.280	0.03128	4182335	4184677	9.78E-04	1.75E+13	1.31E+05	1.34E+08	0.59
			4185895						
			4185802						
125%	31.280	0.03128	4233693	4228767	9.78E-04	1.79E+13	1.32E+05	1.35E+08	0.59
			4225147						
			4227462						
Suma	225.22	0.2252	91269588	30423196	5.87E-03	1.07E+14	7.92E+05	1.22E+09	3.15
Promedio							88050.3342	135186356	
S							36417.30	1421052.48	
C.V.%							41.36	1.051	

Tabla N° 3.9 Resultados obtenidos en el ensayo de linealidad de método de Benzocaína

Cc teórica	Peso (mg)	mg/mL	Área	Área promedio				Factor Respuesta	C.V. %
		xi		yi	xi ²	yi ²	xi * yi	yi / xi	
75%	15.192	0.015192	780288	770772	2.31E-04	5.94E+11	1.17E+04	5.07E+07	0.71
			765802						
			766226						
75%	15.212	0.015212	777927	782571	2.31E-04	6.12E+11	1.19E+04	5.14E+07	
			784231						
			785554						
75%	15.020	0.015020	767489	769243	2.26E-04	5.92E+11	1.16E+04	5.12E+07	
			770775						
			769465						
100%	20.080	0.020080	1008951	1010972	4.03E-04	1.02E+12	2.03E+04	5.03E+07	0.92
			1007145						
			1016821						
100%	19.950	0.019950	988491	989462	3.98E-04	9.79E+11	1.97E+04	4.96E+07	
			989278						
			990616						
100%	19.950	0.019950	987791	987759	3.98E-04	9.76E+11	1.97E+04	4.95E+07	
			989306						
			986181						
125%	24.950	0.024950	1234863	1238138	6.23E-04	1.53E+12	3.09E+04	4.96E+07	0.61
			1240947						
			1238603						
125%	24.950	0.024950	1240360	1240080	6.23E-04	1.54E+12	3.09E+04	4.97E+07	
			1243985						
			1235894						
125%	24.990	0.024990	1253233	1254101	6.25E-04	1.57E+12	3.13E+04	5.02E+07	
			1256264						
			1252805						
Suma	180.29	0.1803	27129291	9043097	3.76E-03	9.42E+12	1.88E+05	4.52E+08	2.24
						Promedio	20898.3827	50262418	
						S	8407.50	730298.49	
						C.V. %	40.23	1.453	

Tabla N° 3.10 Resultados obtenidos en el ensayo de linealidad de método de Enoxolona

Cc teórica	Peso (mg)	mg/mL	Área	Área promedio				Factor Respuesta	C.V. %
		xi		yi	xi ²	yi ²	xi * yi	yi / xi	
75%	11.327	0.011327	651285	652216	1.28E-04	4.25E+11	7.39E+03	5.76E+07	1.13
			645599						
			659763						
75%	11.307	0.011307	654562	655124	1.28E-04	4.29E+11	7.41E+03	5.79E+07	
			658018						
			652793						
75%	11.150	0.011150	632583	632003	1.24E-04	3.99E+11	7.05E+03	5.67E+07	
			628224						
			635202						
100%	15.150	0.015150	884349	876165	2.30E-04	7.68E+11	1.33E+04	5.78E+07	1.33
			867992						
			876154						
100%	15.000	0.015000	842780	849387	2.25E-04	7.21E+11	1.27E+04	5.66E+07	
			858522						
			846858						
100%	14.960	0.014960	850398	844378	2.24E-04	7.13E+11	1.26E+04	5.64E+07	
			839193						
			843542						
125%	18.760	0.018760	1066214	1067848	3.52E-04	1.14E+12	2.00E+04	5.69E+07	0.56
			1069600						
			1067731						
125%	18.660	0.018660	1062890	1061823	3.48E-04	1.13E+12	1.98E+04	5.69E+07	
			1063323						
			1059255						
125%	18.680	0.018680	1075138	1073518	3.49E-04	1.15E+12	2.01E+04	5.75E+07	
			1072947						
			1072469						
Suma	134.99	0.1350	23137384	7712461	2.11E-03	6.88E+12	1.20E+05	5.14E+08	3.02
						Promedio	13376.480	57155233	
						S	5509.68	557236.28	
						C.V. %	41.19	0.975	

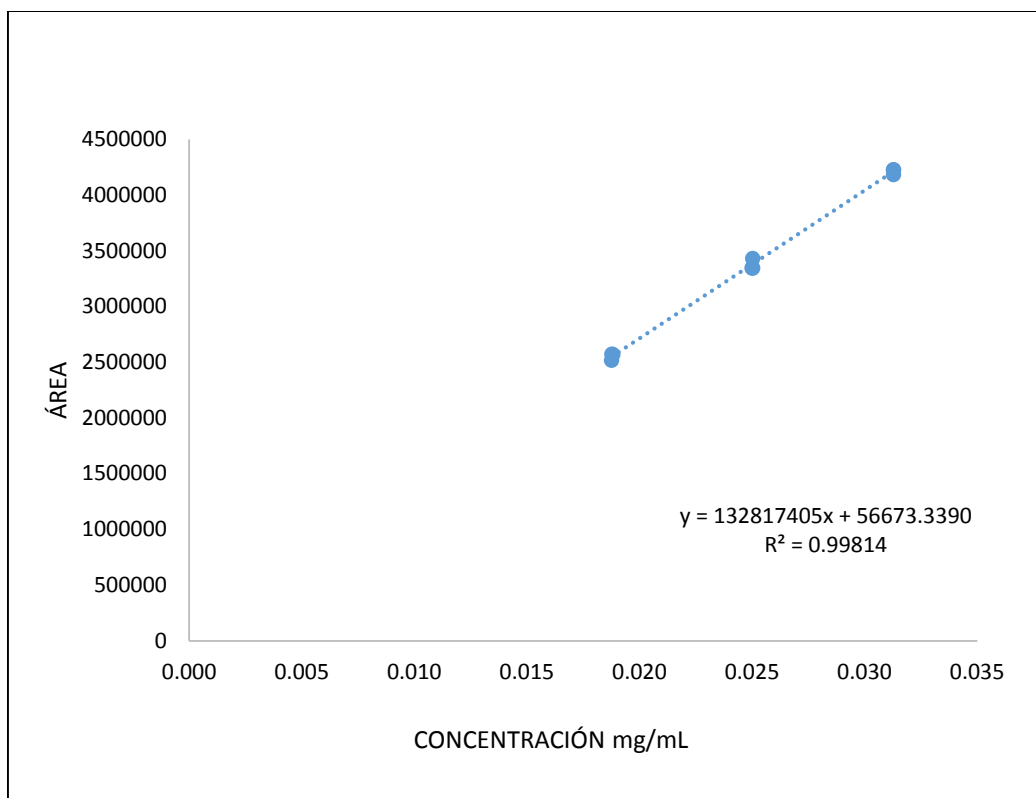


Figura N° 3.5 Curva de calibración de Clorhexidina HCl. (L. Método)

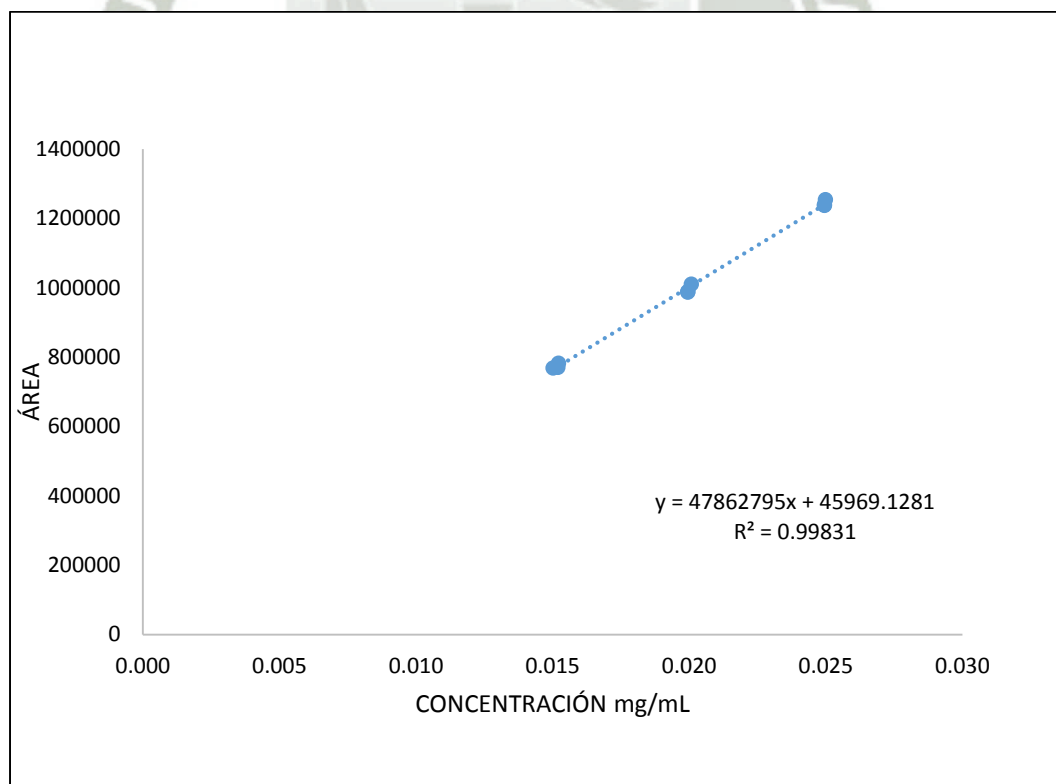


Figura N° 3.6 Curva de calibración de Benzocaína. (L. Método)

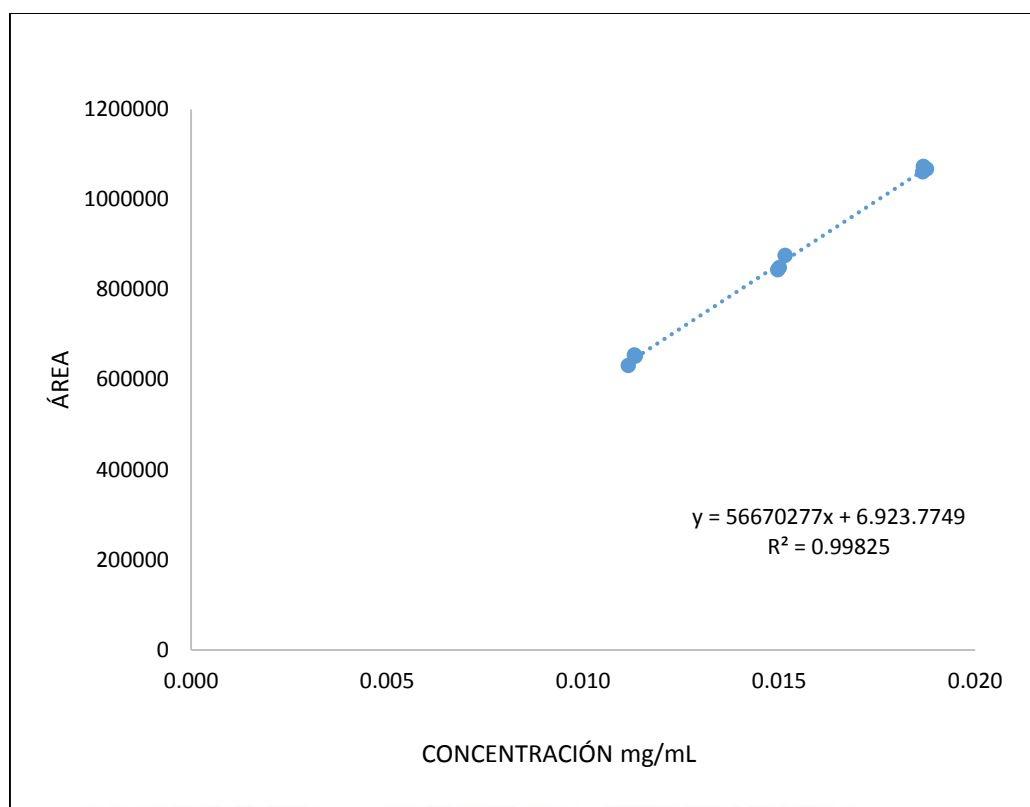


Figura N° 3.7 Curva de calibración de Enoxolona. (L. Método)

- a) Para un mejor indicativo del modelo lineal, se realizó un test estadístico que consiste en comparar el valor de $t_{\text{regresión}}$ (Ec. 2.11) con el t_{tabla} , con $n-2$ grados de libertad y un intervalo de confianza de $(p = 1-\alpha)$, donde $(\alpha = 0.05)$ es la probabilidad de cometer error, esto quiere decir que $p = 1 - 0.05$, que nos da un valor de confianza del 95 %, los resultados obtenidos fueron:

t_{tabla} para 15 – 2 grados de libertad y $p = 0.05$	:	2.365
$t_{\text{regresión}}$ de Clorhexidina Cl	:	61.290
$t_{\text{regresión}}$ de Benzocaína	:	64.304
$t_{\text{regresión}}$ de Enoxolona	:	63.191

En todos los casos se determina que $t_{\text{regresión}} > t_{\text{tabla}}$, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna que sostiene que $(r \neq 0)$ y demuestra que existe una correlación lineal significativa entre x e y

- b) El cálculo del límite de confianza del intercepto “a” se realizó con la ecuación (Ec.2.17) y el cálculo del $t_{\text{experimental}}$ se realizó con la ecuación (Ec. 2.16), se obtuvieron los siguientes resultados con un grado de confianza de 95 %

t_{tabla} para 15 – 2 grados de libertad y $p = 0.05$: 2.365

Clorhexidina HCl

Varianza del intercepto (a) (Ec. 2.12) : 3058542705.338140

S del intercepto (a) (Ec. 2.14) : 55304.093

$t_{\text{experimental}}$: 1.025

Intervalo de confianza: -7233396824 – 7233510171

Benzocaína

Varianza del intercepto (a) (Ec. 2.12) : 231326163.6358530

S del intercepto (a) (Ec. 2.14) : 15209.410

$t_{\text{experimental}}$: 2.022

Intervalo de confianza: -778366571.4 – 778458509.6

Enoxolona

Varianza del intercepto (a) (Ec. 2.12) : 188066539.155341

S del intercepto (a) (Ec. 2.14) : 13712.735

$t_{\text{experimental}}$: 0.505

Intervalo de confianza: - 25509.2 – 39356.759

En los tres casos, se cumple que: $t_{\text{experimental}} < t_{\text{tabla}}$, entonces el valor de “a” es aceptable y comprueba que existe una correlación lineal significativa.

- c) El cálculo del límite de confianza de la pendiente “b”, se realizó con la ecuación (Ec.2.12) y el cálculo del $t_{\text{experimental}}$ se realizó con la ecuación (Ec. 2.21), se obtuvieron los siguientes resultados con un grado de confianza de 95 %

t_{tabla} para 15 – 2 grados de libertad y $p = 0.05$: 2.365

Clorhexidina HCl

Varianza de la pendiente (b) (Ec. 2.18) : 4689112155441.25

S de la pendiente (b) (Ec. 2.20) : 2165435.789

$t_{\text{experimental}}$: 61.335

Intervalo de confianza: 127696149.3 – 137938660.6

Benzocaína

Varianza de la pendiente (b) (Ec. 2.18) : 554219380909.489

S de la pendiente (b) (Ec. 2.20) : 744459.12

$t_{\text{experimental}}$: 64.292

Intervalo de confianza: -1760645.818 – 49623441.29

Enoxolona

Varianza de la pendiente (b) (Ec. 2.18) : 802989627386.11

S de la pendiente (b) (Ec. 2.20) : 896096.885

$t_{\text{experimental}}$: 63.241

Intervalo de confianza: 54551007 – 58789546.03

En los tres casos, se cumple que: $t_{\text{experimental}} > t_{\text{tabla}}$, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula, y se acepta la hipótesis alterna que sostiene que b es significativamente diferente de 0 ($b \neq 0$) y comprueba que si existe una correlación lineal significativa.

- d) El Cálculo del coeficiente de variación (C.V.) se realizó en función de los factores (f) de cada punto individual y se utilizó la ecuación (Ec. 2.3) obteniendo los siguientes resultados:

Clorhexidina HCl : 1.051

Benzocaína : 1.453

Enoxolona : 0.975

Los coeficientes de variación obtenidos, para Clorhexidina HCl, Benzocaína y Enoxolona, cumplen con el criterio de aceptación.

Se determinó la linealidad de método Clorhexidina HCl, Benzocaína y Enoxolona por medio de pruebas estadística como son: test estadístico para coeficiente de correlación, test de linealidad, test de proporcionalidad y el cálculo del coeficiente de variación (C.V.) para cada analito; con lo que se resuelve que existe correlación lineal significativa entre la concentración del analito (X) y el área (Y), por lo que se comprueba que las variaciones en las respuestas (áreas), son directamente proporcionales a la concentración del analito (mg/ml) presente en los porcentajes (75 %, 100 %, 125 %) de muestra analizada.

Los resultados obtenidos en el ensayo de linealidad de Clorhexidina HCl fueron similares a los obtenidos en otra validación del principio activo en comprimidos (*Guineo García – 2010*), se encontró que el tratamiento estadístico realizado es el mismo que se usó en dicha tesis lo cual respalda que el tratamiento estadístico utilizado, es el adecuado.

Existen múltiples técnicas de validación de Benzocaína en otro tipo de preparaciones, e incluso la (*USP 40 – 2017*) contempla una monografía para el análisis cuali – cuantitativo de Benzocaína en tabletas de disolución bucal (sin asociación a otros principios activo), dicha monografía indica que el pico de Benzocaína debería encontrarse en un intervalo entre 200 nm y 400 nm, en el presente trabajo de validación, la longitud de onda a la que se detecta la Benzocaína es de 254 nm que cumple con el rango establecido por la USP.

La Enoxolona es un analito que normalmente se cuantifica por titulación potenciométrica, (*BP – 2017*), el haber determinado la linealidad de sistema y de método en la presente validación, es indicativo de que dicho analito, también se puede cuantificar por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC).

3.4. EXACTITUD

Se determinó empleando preparaciones placebo adicionando principio activo en las concentraciones de 75 %, 100 % y 125 %, siendo 100 % la concentración final de la muestra en el producto terminado, los resultados se muestran en la

tablas n° 3.11, 3.12 y 3.13 a partir de las cuales se puede determinar la exactitud del método. El porcentaje de recuperación se calculó con la ecuación (Ec. 2.23).

**Tabla N° 3.11 Porcentaje de recuperación de Clorhexidina
Clorhidrato**

% Teórico	Área	Analito en la muestra (mg)	Analito hallado (mg)	% De recuperación	Promedio (%)
75%	2576450	3.704	3.77	101.79	101.52
	2542926		3.72	100.44	
	2592195		3.79	102.33	
75%	2583758	3.696	3.78	102.28	101.92
	2566708		3.76	101.74	
	2565940		3.76	101.74	
75%	2496030	3.696	3.65	98.76	98.85
	2505789		3.67	99.30	
	2489785		3.64	98.49	
100%	3445360	4.925	5.04	102.33	101.99
	3419297		5.01	101.72	
	3429703		5.02	101.92	
100%	3333851	4.922	4.88	99.16	99.50
	3362293		4.92	99.97	
	3341807		4.89	99.36	
100%	3336533	4.925	4.88	99.08	99.42
	3355995		4.91	99.69	
	3344537		4.90	99.48	
125%	4220436	6.158	6.18	100.36	100.52
	4245913		6.22	101.01	
	4213948		6.17	100.20	
125%	4182335	6.158	6.12	99.39	99.49
	4185895		6.13	99.55	
	4185802		6.13	99.55	
125%	4233693	6.158	6.20	100.69	100.52
	4225147		6.18	100.36	
	4227462		6.19	100.52	
			Promedio	100.42 %	
			S	1.193	
			C.V.(%)	1.189	

Tabla N° 3.12 Porcentaje de recuperación de Benzocaína

% Teórico	Área	Analito en la muestra (mg)	Analito hallado (mg)	% de recuperación	Promedio (%)
75%	780288	3.039	3.09	101.69	100.37
	765802		3.03	99.71	
	766226		3.03	99.71	
75%	777927	3.043	3.08	101.23	101.77
	784231		3.10	101.88	
	785554		3.11	102.21	
75%	767489	3.004	3.04	101.19	101.30
	770775		3.05	101.52	
	769465		3.04	101.19	
100%	1008951	4.016	3.99	99.34	99.51
	1007145		3.98	99.09	
	1016821		4.02	100.09	
100%	988491	3.990	3.91	97.99	98.07
	989278		3.91	97.99	
	990616		3.92	98.24	
100%	987791	3.990	3.91	97.99	97.90
	989306		3.91	97.99	
	986181		3.90	97.73	
125%	1234863	4.990	4.88	97.79	98.12
	1240947		4.91	98.39	
	1238603		4.90	98.19	
125%	1240360	4.990	4.91	98.39	98.32
	1243985		4.92	98.59	
	1235894		4.89	97.99	
125%	1253233	4.998	4.96	99.23	99.30
	1256264		4.97	99.43	
	1252805		4.96	99.23	
			Promedio	99.41 %	
			S	1.458	
			C.V.(%)	1.467	

Tabla N° 3.13 Porcentaje de recuperación de Enoxolona

% Teórico	Área	Analito en la muestra (mg)	Analito hallado (mg)	% de recuperación	Promedio (%)
75 %	651285	2.283	2.28	99.89	100.03
	645599		2.26	99.01	
	659763		2.31	101.20	
75 %	654562	2.279	2.29	100.50	100.65
	658018		2.30	100.94	
	652793		2.29	100.50	
75 %	632583	2.247	2.21	98.36	98.36
	628224		2.20	97.91	
	635202		2.22	98.80	
100 %	884349	3.053	3.10	101.54	100.56
	867992		3.04	99.57	
	876154		3.07	100.56	
100 %	842780	3.023	2.95	97.59	98.47
	858522		3.01	99.58	
	846858		2.97	98.25	
100 %	850398	3.015	2.98	98.85	98.07
	839193		2.94	97.52	
	843542		2.95	97.85	
125 %	1066214	3.781	3.73	98.66	98.84
	1069600		3.74	98.93	
	1067731		3.74	98.93	
125 %	1062890	3.760	3.72	98.93	98.84
	1063323		3.72	98.93	
	1059255		3.71	98.66	
125 %	1075138	3.764	3.76	99.88	99.88
	1072947		3.76	99.88	
	1072469		3.76	99.88	
			Promedio	99.30 %	
			S	1.097	
			C.V.(%)	1.105	

El criterio de aceptación se expresa en función del porcentaje de recuperación (98 – 102 %), los valores obtenidos en esta prueba cumplen con dicho requisito al obtenerse 100.42 %, 99.41 % y 99.30 % de analito recuperado de Clorhexidina HCl, Benzocaína y Enoxolona respectivamente.

Se realizó en el “t” de student para confirmar que los valores obtenidos no difieren significativamente del aceptado como referencia, para ello se calculó el $t_{\text{experimental}}$ con la ecuación (Ec. 2.24), que fue comparado con el t_{tabla} , se obtuvieron los siguientes resultados con un grado de confianza del 95 %

t_{tabla} para 9-1 = 8 grados de libertad y $p = 0.05$: 2.306

$t_{\text{experimental}}$ de Clorhexidina Clorhidrato : 1.059

$t_{\text{experimental}}$ de Benzocaína : 1.207

$t_{\text{experimental}}$ de Enoxolona : 1.900

Se cumple que el $t_{\text{experimental}} < t_{\text{tabla}}$. Esto comprueba que NO existe diferencia significativa entre los valores de recuperación media y el 100 % (Valor esperado), por lo que la exactitud es apropiada.

El criterio de aceptación de 98 % al 102 % del porcentaje de recuperación fue establecido por normas oficiales (USP 40 – 2017), Aunque dicho criterio puede depender de la forma farmacéutica del producto analizado, así lo demuestra un estudio de validación de Benzocaína por espectrofotometría, donde dicho parámetro está comprendido entre el 96 % - 104 % de recuperación del analito. (Suarez Perez, García Pulpeiro, Ahmed Al-Sufi - 2001) existe una relación significativa entre la recuperación media y el 100 %, se concluye que la exactitud es correcta.

3.5. PRECISIÓN

Se expresa matemáticamente, calculando la dispersión de los datos respecto a la media. Se determinó a realizar el ensayo de repetibilidad y precisión intermedia.

3.5.1. Repetibilidad de sistema

Se realizó mediante la inyección de 5 muestras estándar homogéneas, que se encontraban en concentración al 100% y cuyos resultados se muestran en la tabla 3.14.

Tabla N° 3.14 Resultados obtenidos en el ensayo de repetibilidad de sistema

N° de Inyección	Clorhexidina HCl	Benzocaína	Enoxolona
	Área	Área	Área
1	2840539	905670	769063
2	2869825	914627	765826
3	2865411	926652	775218
4	2849639	911401	769814
5	2868098	911112	771124
Promedio	2858702	913892	770209
C.V.	0.45	0.86	0.44

El coeficiente de variación (C.V.) fue calculado con la ecuación (Ec.2.3), y cuyo criterio de aceptación es no mayor al 2 %, se observa que se obtuvieron valores de 0.45, 0.86 y 0.44 para Clorhexidina HCl, Benzocaína y Enoxolona respectivamente, dichos resultados se encuentran dentro del criterio de aceptación y con ello queda demostrada la cercanía de coincidencia (grado de dispersión) entre los resultados obtenidos de las muestras estándar homogéneas bajo las condiciones establecidas por la aptitud del sistema.

3.5.2. Repetibilidad de método

Se realizó mediante la preparación de 6 muestras homogéneas de la matriz en estudio las cuales se encontraban en concentración al 100%, los resultados se muestran en la tabla 3.15, también se observan los porcentajes de recuperación obtenidos en este ensayo.

Tabla N° 3.15 Datos obtenidos en el Ensayo de repetibilidad de método

	N° Muestra	Área 1	Área 2	Área Promedio	Porcentaje (%)		
CLORHEXIDINA HCL	M1	2885008	2916763	2900886	103.00		
	M2	2919240	2896739	2907990	103.04		
	M3	2875498	2856983	2866241	102.00		
	M4	2966999	2968089	2967544	105.60	Promedio	103.41
	M5	2892774	2873107	2882941	102.60	S	1.29
	M6	2929369	2924984	2927177	104.20	C.V. (%)	1.25
BENZOCAÍNA	M1	831854	832361	832108	99.75		
	M2	834090	836976	835533	100.25		
	M3	833976	827771	830874	99.25		
	M4	835768	843456	839612	100.25	Promedio	99.96
	M5	836488	839149	837819	100.25	S	0.40
	M6	839663	844539	842101	100.00	C.V. (%)	0.40
ENOXOLONA	M1	705251	703135	704193	102.33		
	M2	704494	710007	707251	102.67		
	M3	697907	697263	697585	101.00		
	M4	713160	714926	714043	103.67	Promedio	102.33
	M5	702837	707987	705412	102.33	S	0.87
	M6	701897	704894	703396	102.00	C.V. (%)	0.85

El coeficiente de variación (C.V.) fue calculado con la ecuación (Ec.2.3), cuyo criterio de aceptación es no mayor al 2 %, se observa que se obtuvieron valores de 1.25, 0.40 y 0.85 para Clorhexidina HCl, Benzocaína y Enoxolona respectivamente, dichos resultados se encuentran dentro del criterio de aceptación con lo que queda demostrado el grado de dispersión. Este parámetro de validación también podría llevarse a cabo con un mínimo de 9 determinaciones que cubran el intervalo especificado para el procedimiento, de esta manera se trabajó en la validación de un método analítico por espectrofotometría para cuantificar Benzocaína (Suarez Perez, García Pulpeiro, Ahmed Al-Sufi – 2001), ambos procedimientos son válidos según recomendación de los documentos ICH.

3.5.3. Precisión Intermedia

Se analizaron 6 muestras que fueron evaluadas por duplicado en dos días diferentes y dos instrumentos distintos; los resultados se muestran en tabla 3.16.

Tabla N° 3.16 Resultados obtenidos en el ensayo de precisión intermedia

CLORHEXIDINA HCL		N° Muestras	Área 1	Área 2	Área Promedio	Porcentaje (%)
	Día 1	M1	2885008	2916763	2900886	103.00
		M2	2919240	2896739	2907990	103.04
		M3	2875498	2856983	2866241	102.00
		M4	2966999	2968089	2967544	105.60
		M5	2892774	2873107	2882941	102.60
		M6	2929369	2924984	2927177	104.20
	Día 2	M1	3186485	3178925	3182705	99.99
		M2	3206336	3208199	3207268	100.60
		M3	3255317	3228719	3242018	101.80
		M4	3248866	3267136	3258001	102.30
		M5	3283574	3281111	3282343	103.00
		M6	3266365	3271074	3268720	102.60
	Promedio					102.56
	C.V. (%)					1.44
BENZOCAÍNA		N° Muestras	Área 1	Área 2	Área Promedio	Porcentaje (%)
	Día 1	M1	831854	832361	832108	99.75
		M2	834090	836976	835533	100.25
		M3	833976	827771	830874	99.25
		M4	835768	843456	839612	100.25
		M5	836488	839149	837819	100.25
		M6	839663	844539	842101	100.00
	Día 2	M1	1338650	1327558	1333104	100.75
		M2	1323150	1327918	1325534	100.00
		M3	1325460	1321835	1323648	100.13
		M4	1329987	1331283	1330635	100.00
		M5	1318762	1324421	1321592	99.75
		M6	1332743	1332888	1332816	100.50
	Promedio					100.08
	C.V. (%)					0.39
ENOXOLONA		N° Muestras	Área 1	Área 2	Área Promedio	Porcentaje (%)
	Día 1	M1	705251	703135	704193	102.33
		M2	704494	710007	707251	102.67
		M3	697907	697263	697585	101.00
		M4	713160	714926	714043	103.67
		M5	702837	707987	705412	102.33
		M6	701897	704894	703396	102.00
	Día 2	M1	898337	896766	897552	102.17
		M2	890764	894286	892525	101.50
		M3	891998	892410	892204	101.70
		M4	899634	898901	899268	102.30
		M5	891122	897996	894559	101.81
		M6	898150	899357	898754	102.33
	Promedio					102.15
	C.V. (%)					0.65

Para determinar el resultado de éste parámetro, se utilizó la ecuación (Ec. 2.3) para determinar el coeficiente de variación (C.V.) entre los resultados obtenidos cada día por separado, luego se calculó el coeficiente de variación (C.V.) entre el día 1 y el día 2, éste no debe ser mayor de 2 %. Se encontró que en los tres analitos el coeficiente de variación entre el día 1 y el día 2, es 1.44, 0.39 y 0.65 para Clorhexidina HCl, Benzocaína y Enoxolona respectivamente, dichos valores son menores el 2 % con lo que queda demostrada la cercanía de coincidencia (grado de dispersión), que indica que el método es reproducible.

La (USP 40 – 2017), nos dice que *“La precisión intermedia (también conocida como tolerancia o fortaleza) expresa la variación dentro de un laboratorio, por ejemplo en diferentes días, con diferentes analistas “o” con equipos diferentes dentro del mismo laboratorio”*, es por ello que en el presente trabajo operativo de validación se tomó como pauta la diferencia entre los días de ejecución y la diferencia entre los equipos utilizados, mas no la diferencia entre analistas.

En consulta con otros trabajos de validación (Coripuna Luque – 2013), se podría decir que este parámetro no es necesario para todos los tipos de validación, sin embargo se considera que si se debe llevar a cabo debido a que es requisito indispensable al momento de presentar un Dossier de especialidades farmacéuticas ante la Digemid (Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas).

3.6. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PREPARADA

Las 6 muestras analizadas al tiempo “0” horas será considerado grupo 1; al tiempo “12” horas será considerado grupo 2 y al tiempo “24” horas será considerado grupo 3, los resultados se muestran en las tablas 3.17, 3.19 y 3.21 para Clorhexidina Cl, Benzocaína y Enoxolona respectivamente. Del mismo modo los resultados del cálculo del sesgo se realizaron en función a la ecuación (Ec. 2.25), cuyos valores se muestran en las tablas 3.18, 3.20 y 3.22.

Tabla N° 3.1.7. Resultados del coeficiente de variación en el ensayo de estabilidad de muestra preparada de Clorhexidina HCl

Tiempo		M1	M2	M3	M4	M5	M6	
"0" horas	Área 1	3186485	3206336	3255317	3248866	3283574	3266365	
	Área 2	3178925	3208199	3228719	3267136	3281111	3271074	
	Promedio	3182705	3207268	3242018	3258001	3282343	3268720	3240176
	C.V. (%)	0.17	0.04	0.58	0.40	0.05	0.10	1.16
"12" horas	Área 1	3367248	3237242	3239951	3394337	3313247	3345286	
	Área 2	3362749	3241135	3238419	3392893	3297868	3349298	
	Promedio	3364999	3239189	3239185	3393615	3305558	3347292	3314973
	C.V. (%)	0.09	0.08	0.03	0.03	0.33	0.08	1.88
"24" horas	Área 1	3601239	3659211	3588883	3599138	3573087	3755409	
	Área 2	3619127	3686382	3575667	3587778	3587431	3762811	
	Promedio	3610183	3672797	3582275	3593458	3580259	3759110	3633014
	C.V. (%)	0.35	0.52	0.26	0.22	115.80	0.14	1.87
Promedio entre grupos 1, 2 y 3								3396053.97
C.V. (%) entre grupos 1, 2 y 3								1.42

Tabla N° 3.18. Resultados del % de recuperación para calcular de sesgo de estabilidad de muestra preparada de Clorhexidina HCl

Tiempo	Resultado (%)						Promedio	Sesgo
(h)	M1	M2	M3	M4	M5	M6	(%)	(b)
"0"	99.99	100.60	101.80	102.30	103.00	102.60	101.72	--
"12"	102.13	100.25	100.38	102.50	100.25	102.50	101.33	0.38
"24"	101.88	102.75	101.25	101.00	99.68	105.46	102.00	0.29
Promedio de sesgo								0.33
e (%)								0.33

Tabla N° 3.19. Resultados del coeficiente de variación en el ensayo de estabilidad de muestra preparada de Benzocaína

Tiempo		M1	M2	M3	M4	M5	M6	
"0" horas	Área 1	1338650	1323150	1325460	1329987	1318762	1332743	
	Área 2	1327558	1327918	1321835	1331283	1324421	1332888	
	Promedio	1333104	1325534	1323648	1330635	1321592	1332816	1327888
	C.V. (%)	0.59	0.25	0.19	0.07	0.30	0.01	0.37
"12" horas	Área 1	1349026	1323279	1326353	1356221	1325898	1352181	
	Área 2	1347067	1321580	1324429	1352333	1321332	1350243	
	Promedio	1348047	1322430	1325391	1354277	1323615	1351212	1337495
	C.V. (%)	0.10	0.09	0.10	0.20	0.24	0.10	1.09
"24" horas	Área 1	1141753	1150801	1134272	1130533	1117435	1180026	
	Área 2	1141194	1150898	1133054	1127095	1115248	1181900	
	Promedio	1141474	1150850	1133663	1128814	1116342	1180963	1142017
	C.V. (%)	0.03	0.01	0.08	0.22	0.14	0.11	1.87
Promedio entre grupos 1, 2 y 3								1269133.5
C.V. (%) entre grupos 1, 2 y 3								1.48

Tabla N° 3.20 Resultados del % de recuperación para calcular de sesgo de estabilidad de muestra preparada de Benzocaína

Tiempo	(resultado) (%)						Promedio	Sesgo
(h)	M1	M2	M3	M4	M5	M6	(%)	(b)
"0"	100.75	100.00	100.13	100.00	99.75	100.50	100.19	--
"12"	102.13	100.25	100.38	102.50	100.25	102.50	101.33	1.15
"24"	101.88	102.75	101.25	101.00	99.75	105.50	102.02	1.83
Promedio de sesgo								1.49
e (%)								1.49

Tabla N° 3.21. Coeficiente de variación en el ensayo de estabilidad de muestra preparada de Enoxolona

TIEMPO		M1	M2	M3	M4	M5	M6	
"0" horas	Área 1	898337	890764	892410	898901	897996	899357	
	Área 2	896766	894286	892204	899268	894559	898754	
	Promedio	897552	892525	892307	899085	896278	899056	896134
	C.V. (%)	0.12	0.28	0.02	0.03	0.27	0.05	0.34
"12" horas	Área 1	904915	887459	889233	912728	893638	908595	
	Área 2	905163	887279	889144	911689	892517	907956	
	Promedio	905039	887369	889189	912209	893078	908276	899193
	C.V. (%)	0.02	0.01	0.01	0.08	0.09	0.05	1.13
"24" horas	Área 1	845843	854469	843535	842070	834832	883527	
	Área 2	848952	856407	842376	840920	831892	882655	
	Promedio	847398	855438	842956	841495	833362	883091	850623
	C.V. (%)	0.26	0.16	0.10	0.10	0.25	0.07	1.96
Promedio entre grupos 1, 2 y 3								881983
C.V. (%) entre grupos 1, 2 y 3								1.31

Tabla N°

3.22. Resultados del % de recuperación para calcular de sesgo de estabilidad de muestra preparada de Enoxoloma

Tiempo	(resultado) (%)						Promedio	Sesgo
(h)	M1	M2	M3	M4	M5	M6	(%)	(b)
"0"	102.17	101.50	101.70	102.30	101.81	102.33	101.97	--
"12"	104.00	101.67	102.00	104.67	102.47	104.33	103.19	1.22
"24"	104.33	105.33	103.67	103.67	102.67	105.33	104.17	2.20
Promedio de sesgo								1.71
e (%)								1.68

El criterio de aceptación, establece que el coeficiente de variación (C.V.) de los resultados obtenidos entre los grupos 1, 2 y 3 no debe ser mayor al 2 %. Mientras que el sesgo no debe ser mayor a 3 %.

Para determinar el coeficiente de variación (C.V.), se utilizó la ecuación (Ec. 2.3), el procedimiento para calcular dicho valor consistió en determinar el (C.V.) de cada grupo de análisis (1, 2 y 3) por separado para luego calcular un nuevo (C.V.) entre los resultados obtenidos en los tres grupos.

Los valores calculados fueron de 1.42 %, 1.48 % y 1.31 % para Clorhexidina HCl, Benzocaína y Enoxolona respectivamente, dichos valores se encuentran dentro del criterio de aceptación.

El valor de sesgo calculado fue de 0.33 %, 1.49 % y 1.68 % para Clorhexidina HCl, Benzocaína y Enoxolona respectivamente por lo que a partir de ello se demuestra que no hay error significativo entre los tres grupos evaluados, esto respalda la teoría de que la muestra preparada se mantiene estable hasta 24 horas después de haber sido preparada.

3.7. RESUMEN DE RESULTADOS.

Se muestran en las tablas 3.23, además es preciso mencionar las características del método las cuáles fueron:

- o **Procedimiento analítico:** Categoría I
- o **Parámetros:** Exactitud, Precisión, Selectividad y Linealidad, además se agregó un ensayo de estabilidad de muestra preparada.
- o **Preparación farmacéutica:** Clorhexidina Clorhidrato 5 mg + Benzocaína 4 mg + Enoxolona 3 mg Comprimidos orales.
- o **Tipo de validación:** Prospectiva

Tabla N° 3.23 Resumen de resultados de la validación de Clorhexidina Clorhidrato + Benzocaína + Enoxolona

ENSAYOS	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADOS		
		CLORHEXIDINA HCl	BENZOCAÍNA	ENOXOLONA
1. SELECTIVIDAD				
Del Sistema	Ausencia de interferencia	Conforme	Conforme	Conforme
Del Método	Ausencia de interferencia	Conforme	Conforme	Conforme
Interferencia del Placebo	< al 2.0%	0.0 %	0.0 %	0.0 %
2. LINEALIDAD DEL SISTEMA				
Coeficiente de Correlación	≥ a 0.999	0.99935	0.99937	0.99904
Coeficiente de Determinación	≥ a 0.998	0.99870	0.99875	0.99808
Test estadístico para “r” p = 0.05; y n-2 grados de libertad	t tabla = 2.160 t regresión > t tabla	T regresión = 99.935	T regresión = 101.916	T regresión = 82.206
Coeficiente de Variación (C.V.)	> a 5.0 %	1.611	1.201	1.571
Test de Proporcionalidad del Intercepto p = 0.05; y n-2 grados de libertad	t tabla = 2.160 t experimental < t tabla	t experimental = 1.955	1.046	1.579
Prueba de Linealidad de la Pendiente p = 0.05; y n-2 grados de libertad	t tabla = 2,160 t experimental > t tabla	t experimental = 100.21	101.89	82.11

Continúa ...

3. LINEALIDAD DEL MÉTODO				
Coeficiente de Correlación	$\geq a\ 0.999$	0.99907	0.99915	0.99913
Coeficiente de Determinación	$\geq a\ 0.998$	0.99814	0.99831	0.99825
Test estadístico para “r” p = 0.05; y n-2 grados de libertad	$t_{\text{tabla}} = 2.365$ $t_{\text{regresión}} > t_{\text{tabla}}$	t regresión = 61.290	T regresión = 64.304	T regresión = 63.191
Coeficiente de Variación (C.V.)	$< 5.0\ \%$	1.051	1.453	0.975
Test de Proporcionalidad del Intercepto p = 0.05; y n-2 grados de libertad	$t_{\text{tabla}} = 2.365$ $t_{\text{experimental}} < t_{\text{tabla}}$	t experimental = 1.025	t experimental = 2.022	t experimental = 0.505
Prueba de Linealidad de la Pendiente p = 0.05; y n-2 grados de libertad	$t_{\text{tabla}} = 2.365$ $t_{\text{experimental}} > t_{\text{tabla}}$	t experimental = 61.335	t experimental = 64.292	t experimental = 63.241
4. PRECISIÓN				
Repetibilidad	$C.V. \leq 2.0$	1.25	0.40	0.85
Precisión Intermedia	$C.V. \leq 2.0$	1.44	0.39	0.65
6. EXACTITUD				
El % de recuperación promedio	98 % – 102 %	100.42 %	99.41 %	99.30 %
Test de recuperación media P = 0.05; y n – 1 = Grados de libertad	$t_{\text{tabla}} = 2.306$ $t_{\text{experimental}} < t_{\text{tabla}}$	t experimental = 1.059	t experimental = 1.207	t experimental = 1.900
7. ESTABILIDAD DE MUESTRA PREPARADA				
Coeficiente de variación (C.V.)	$\leq 2.0\ \%$	1.42	1.48	1.31
Sesgo	$< 3\ \%$	0.33	1.49	1.68

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

Primero:

Se concluye que los resultados obtenidos en las pruebas realizadas, en relaciones con los criterios de aceptación, son aceptables, por lo que el método analítico queda validado y apto para su uso en el control de calidad cuantitativo de la matriz en análisis.

Segundo:

Se desarrolló la validación de una técnica analítica por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para cuantificar Clorhexidina Clorhidrato 5 mg + Benzocaína 4 mg + Enoxolona 3 mg en Comprimidos orales, y se demostró con el cumplimiento de la aptitud de sistema, que las condiciones cromatográficas son adecuadas utilizando un fase móvil compuesta por Octanosulfonato de Sodio (2g : 252mL): Acetonitrilo (528 mL): Metanol (190 mL): y Ácido Acético Glacial (30 mL), con lo que se pudo comprobar la idoneidad de los parámetros de validación según los criterios establecidos por las normas de BPM.

Tercero:

Se determinó el cumplimiento de los parámetros de validación encontrándose que el método analítico es:

- Selectivo por la ausencia de elución de compuestos de degradación ajenos a los analitos estudiados, lo cual es indicativo de que el método analítico es específico para la determinación cuantitativa de la matriz en estudio.
- Lineal porque en el intervalo de concentración de (50%, 75%, 100%, 125%, 150%) usado en la linealidad de sistema, se obtuvieron coeficientes de correlación de $r_{\text{Benzocaína}} = 0.99937$, $r_{\text{Clorhexidina HCl}} = 0.99935$ y $r_{\text{Enoxolona}} = 0.99904$, mientras que en el intervalo de concentración de (75%, 100%, 125%) usado en la linealidad método se obtuvieron coeficientes de correlación de $r_{\text{Benzocaína}} = 0.99875$, $r_{\text{Clorhexidina HCl}} = 0.99814$ y $r_{\text{Enoxolona}} = 0.99825$.
- Preciso porque los coeficientes de variación obtenidos en la prueba de Repetibilidad fueron de 1.25%, 0.40% y 0.85% para Clorhexidina HCl, Benzocaína y Enoxolona respectivamente, mientras que en la Precisión Intermedia fueron de 1.44%, 0.39% y 0.65% para Clorhexidina HCl, Benzocaína y Enoxolona respectivamente, lo que demuestra que el método puede ser reproducible.
- Exacto porque los porcentajes de recuperación obtenidos fueron de 100.42%, 99.41% y 99.30% para Clorhexidina HCl, Benzocaína y Enoxolona respectivamente, dichos valores son cercanos al valor esperado (100%) y demuestran que el método tiene un alto grado de exactitud.

Cuarto:

Se demostró con los ensayos de estabilidad de muestra preparada, que las concentraciones de los analitos en la matriz compuesta por Clorhexidina HCl 5 mg + Benzocaína 4 mg + Enoxolona 3 mg en comprimidos orales, se conserva después de 12 y 24 horas, siempre y cuando estas hayan sido conservadas bajo condiciones de temperatura de 2° a 8°C. Dicha afirmación se respalda al haber

obtenido valores de sesgo de 0.33%, 1.49% y 1.68% entre los grupos 1, 2 y 3, para Clorhexidina HCl, Benzocaína y Enoxolona respectivamente.

4.2. RECOMENDACIONES

- En la realización de toda validación es recomendable que todos los equipos y materiales utilizados cuenten con la verificación y/o calibración necesaria para garantizar la confiabilidad de los resultados que se presentan.
- Es conveniente complementar el ensayo de selectividad con un estudio de pureza de pico utilizando un método alternativo.
- Es necesario que el personal que realiza la validación y cualquier análisis fisicoquímico cuente con la instrucción adecuada por medio de capacitaciones e instrucción acerca del manejo de equipos, materiales y reactivos para el cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio.
- Se recomienda continuar con el estudio para detectar posibles sustancias de degradación o disolventes residuales.

BIBLIOGRAFÍA

1. *Harmonised Tripartite Guideline. ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Vol. Q2 (R1). 2005.*
2. *Ministerio de salud. Digemid Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Farmacéuticos. pág. 20-21. Perú 1999.*
3. *Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. A.E.F.I. Validación de Métodos Analíticos. España 2001.*
4. *Castro M., Gascón S., Pujol M. Validación de métodos analíticos. Sección catalana. Madrid – España. 1996*
5. *Benites E. La gestión Técnica en la Fabricación de Medicamentos. Centro de estudios superiores de la industria Farmacéutica. Madrid – España 1996*
6. *Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 39. Validación de Procedimientos Farmacopéicos <1225>. EEUU. 2016*
7. *Camacho MA, Torres AI, Gil ME, Obregón MM, Ruz V. Validation protocol of analytical methods for finished pharmaceutical products. ATP Pharma Practique. 1993.*
8. *Rampazoo P. (1990). Standardization and Validation of Analytical Methods in the Pharmaceutical industry. 1990*
9. *Farmacopea de los Estados Unidos de América; USP 40. Cromatografía <621>. EEUU 2017*
10. *European pharmacopoeia (Ph. Eur). Liquid Chromatography – method 2.2.29 Europe 2016*

11. *Farmacopea de los Estados Unidos de América. (USP 40). Calificación de Instrumentos Analíticos <1058>. EEUU – 2017.*
12. *Directiva Sanitaria n°001 - Minsa/Digemid v.01. Criterios Técnicos para la Evaluación de Dossier de las Especialidades Farmacéuticas. Perú – 2014.*
13. *Contenido del Certificado de Material de Referencia Simposio de metrología, IV simposio de metrología en el Perú, disponible en: http://www.inacal.gob.pe/inacal/files/metrologia/EVENTOS/SIMPOSIOS/2013/Galia_Ticona.pdf, visitado en Julio – 2017.*
14. *Alonso J., Blanco J., Bustamante P., et al. Tecnología farmacéutica. Vol 2: Formas farmacéuticas. Madrid - España 1997*
15. *Quattrocchi, O.; Abelaira,S; Laba, R. Introducción a la HPLC, Aplicación y Práctica. (Pág. 40), Argentina – 1992*
16. *Barcelli V. Curso de Entrenamiento de Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) Lachrom Merck; Lima. Abril – 2009.*
17. *Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods. CDER, EPA, USA; 1994.-SWARTZ, M., Krull, I. Validation of Chromatographic Methods. Pharm. Technol 22 (Mar.): 104-118, 1998.*
18. *Parámetros de certificados de Autenticidad (COA) de Mek, disponible en: http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COFAInfo/SigmaSAPQM/SPEC/E1/E1501/E1501-BULK_SIGMA.pdf, visitada en Abril del 2017.*
19. *Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 40) Monografías oficiales, pág. 3371. EEUU – 2017.*
20. *British Pharmacopoeia (BP). Monographs: Medicinal and Pharmaceutical Substance: Enoxolone. Europe – 2017.*

21. Velázquez. *Farmacología Básica y Clínica*. 17ª Edición; Fármacos anestésicos Locales; Ed médica panamericana 2004, pág. 875, 189
22. Fichas de información Técnica de Medicamentos, disponible en: http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/6431-f90a66e4e5dbf051db6b2c29015a53ab6b22c7/main/files/cido_glicirretico_18_B_Enoxolona.pdf, visitada en Abril del 2017
23. Sustancias Súper Nutritivas, disponible en: <http://www.binipatia.com/acido-glicirretinico>. Visitada en Abril del 2017
24. Minsa/Digemid. *Catálogo Estándar de Productos Farmacéuticos*. Pág. 90. Perú - 2015
25. Cesar Morales de la Cruz. *Desarrollo y Validación Prospectiva de una Técnica Analítica por HPLC para Enalapril 10 mg Tabletas Cubiertas*. Tesis para optar Título profesional de Químico Farmacéutico. UNMSM. Perú – 2004.
26. Directiva sanitaria N° 001-Minsa//Digemid V.01. *Criterios Técnicos de Evaluación de un Dossier de Especialidades Farmacéuticas – Parámetros para Técnicas Propias*. Perú – 2014.
27. *Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 39)*. 2do Suplemento <1029> *Guía de Buenas prácticas de Documentación*. EEUU – 2016.
28. Comité de expertos de la OMS. *Especificaciones para las Preparaciones Farmacéuticas 34º Informe – Anexo 6*. Ginebra – 1996.
29. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. *Forty-first report*. Geneva, World Health Organization, 2007, Annex 3 (WHO Technical Report Series, No. 943).
30. *Buenas Prácticas de la OMS para Laboratorios de Control de Calidad de Productos Farmacéuticos*, *Guía de Autoevaluación de BPL*, disponible en:

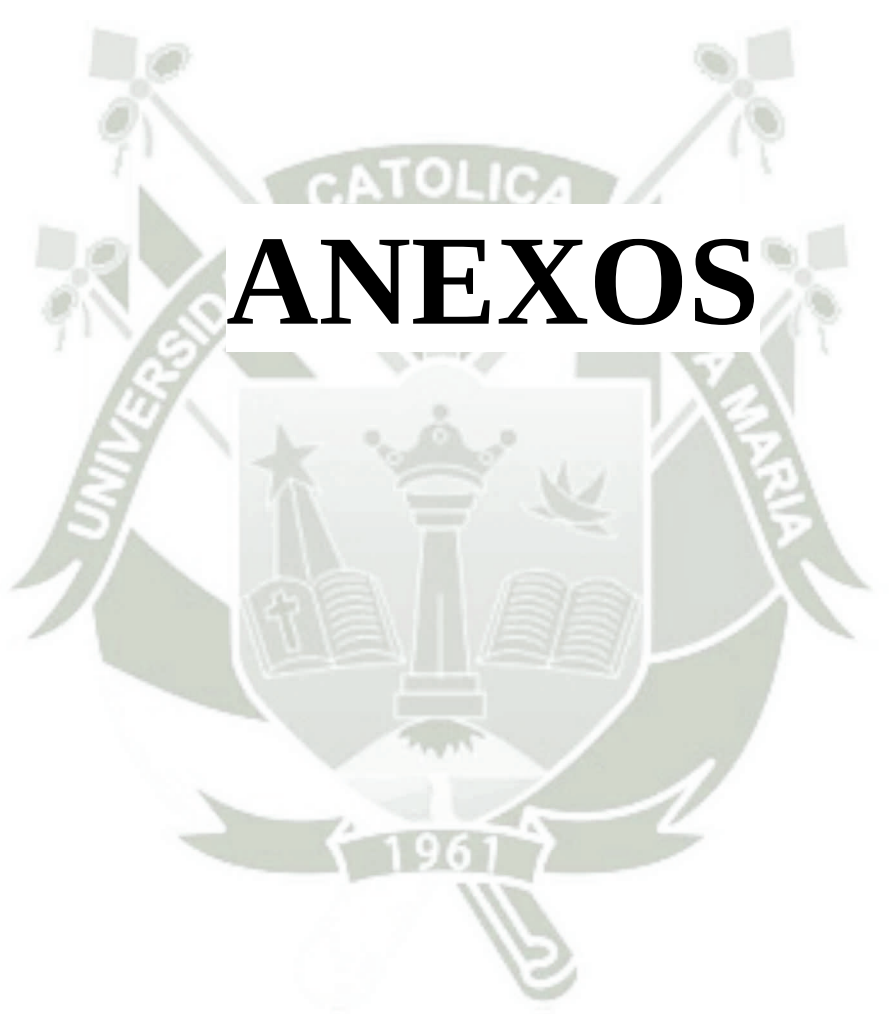
<http://www.paho.org/hq/dmdocuments/2011/Espanol-control-calidad-laboratorios-farmaceuticos.pdf>, visitada en diciembre del 2017.

31. Quattrocchi, O.; Abelaira,S; Laba, R. “Introducción a la HPLC, Aplicación y Práctica”, capítulo 2 – Instrumental (Pag. 9), Argentina – 1992.
32. Minsa/Digemid, artículo 8° de la ley N° 27657, “Manual de Buenas Prácticas de Laboratorio para el control de calidad de productos farmacéuticos. Perú – 2013.
33. Modelo de HPLC, disponible en: http://www.hitachi-hightech.com/us/product_detail/?pn=ana-primaide, visitada en diciembre del 2017
34. Goodman & Gilman.. Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 4ª Edición, Editorial Interamericana, México - 1974
35. Price, J. 1970, Remington, 14ª Edición, Editorial Mack Publishing Eaton, EUA.
36. Remington G. Farmacia Práctica, Editorial Panamericana, Buenos aires, Argentina – 1987.
37. Martindale. The Complete Drug Reference. 34th Edition. Pharmaceutical Press. Págs. 1173, 1174. USA – 2005.
38. Comité de expertos de la OMS en especificaciones para las Preparaciones Farmacéuticas; 35° Informe, Ginebra – 1999
39. The Pharmaceutical Letter. Tratamiento de la Faringitis y la Laringitis: Lib. V; n° 17. Barcelona – 2003.
40. Quattrocchi, O.; Abelaira,S; Laba, R. Introducción a la HPLC, Aplicación y Práctica, capítulo 12 – Validación de Métodos (Pag. 9, 287)), Argentina – 1992.
41. JP XVII; “Validation of Analytical Procedures” pag. 2416

42. Horwitz, *Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs*. 54 (1), 67A, 1982
43. Ministerio de Sanidad Política Social e igualdad de Madrid - España, disponible en: https://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/80113/80113_ft.pdf, visitada en diciembre del 2017
44. Clasificación ATC disponible en: <https://www.vademecum.es/atc>, visitada en diciembre del 2017
45. Ficha técnica de Clorhexidina/Benzocaína/Enoxolona disponible en: <https://prvademecum.es/app/prescriptions/view/707392/clorhexidina-benzocaina-enoxolona-sandoz-care-comprimidos-para-chupar-sabor-miel-limon>, visitada en diciembre del 2017
46. Manual de Procedimiento- Comisión del Codex Alimentarius- 19º Edición- OMS/FAO. Roma – 2015.
47. Norma ISO 17025, Requisitos Generales para la competencia de los Laboratorios de Ensayos y Calibración; disponible en: http://www.mpfm.gob.pe/escuela/contenido/actividades/docs/3255_norma_iso_17025_minpub.pdf, visitada en diciembre del 2017.
48. Guineo García. Validación de un método analítico por HPLC para la valoración de Clorhexidina Clorhidrato en comprimidos masticables, Chile 2010.
49. Caraballo L, Fernández A, Holgado MA, Vela M, Rabasco AM. Rapid HPLC method for the quantification of tyothricin, menthol and benzocaine in pharmaceutical formulation. *J Pharm Sci* 1994.
50. Suarez Pérez, García Pulpeiro, Ahmed Al-Sufi, Diseño y Validación de un Método Espectrofotométrico para el Estudio de Estabilidad de Benzocaína en un Nuevo Ungüento Rectal, *Rev Cubana Farm* – 2001.

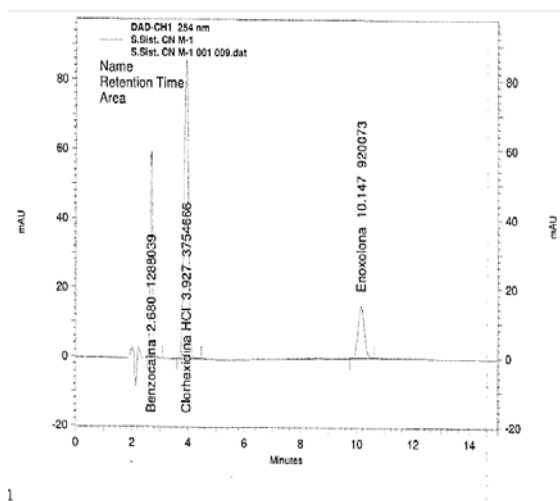
51. *Acosta N., Nina F. Validación de un Técnica Analítica por HPLC y el Cálculo de la Incertidumbre para los Ensayos de Ambroxol Clorhidrato y Clenbuterol Clorhidrato en un Jarabe. Tesis para Optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Perú – 2013.*
52. *Vázquez Ortiz, Calificación de equipos HPLC y Validación de Metodologías Analíticas, pág. 13. Santiago chile 2006*



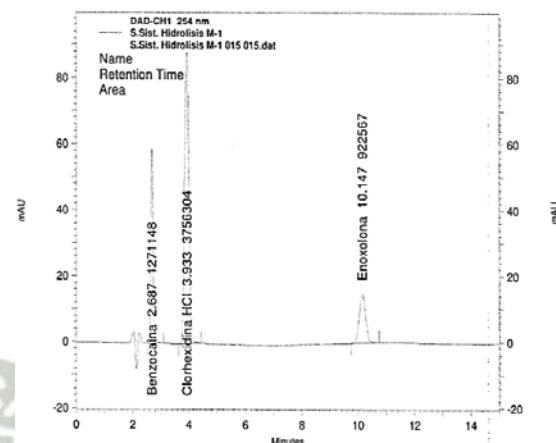


ANEXOS

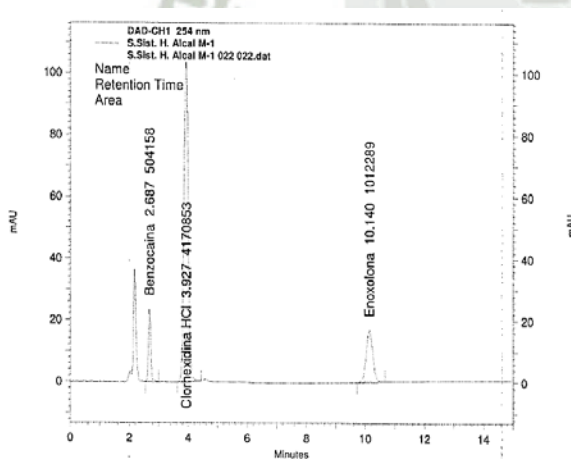
ANEXO N°1. CROMATOGRAMAS CORRESPONDIENTES A LA SELECTIVIDAD DE SISTEMA



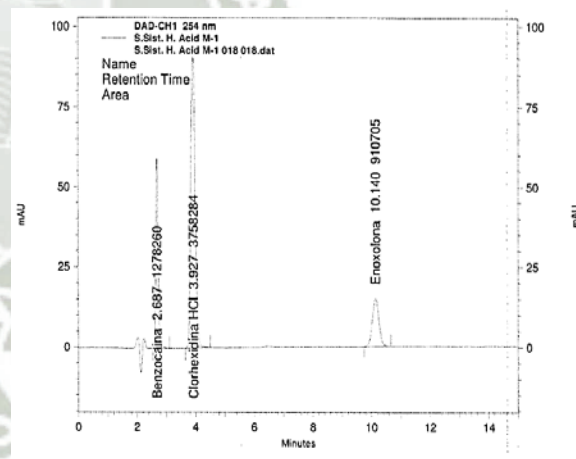
**Cromatograma N° 1. Condiciones
normales**



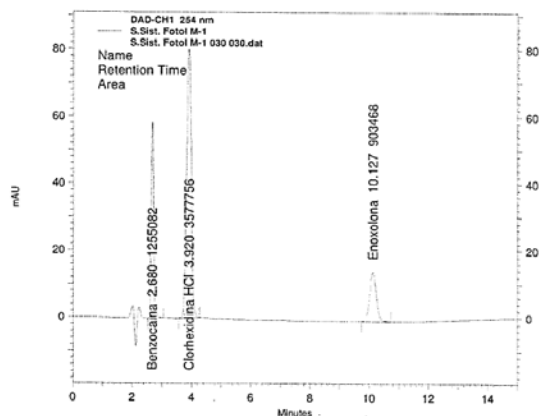
Cromatograma N° 2. Hidrólisis



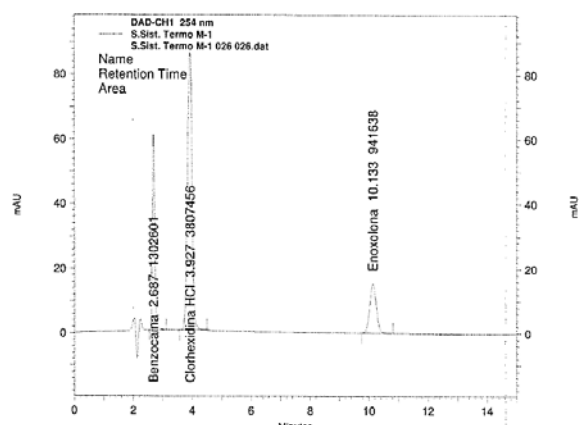
**Cromatograma N° 3. Hidrólisis
alcalina**



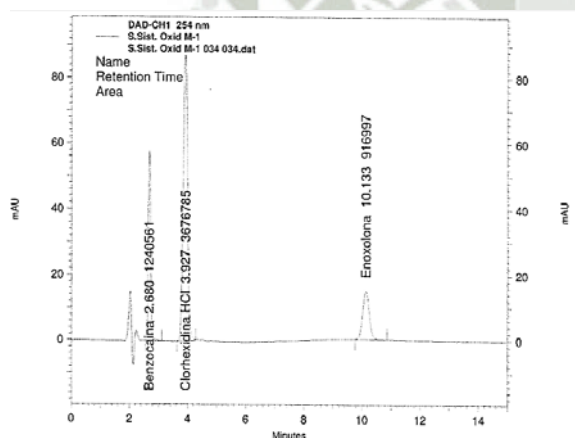
Cromatograma N° 4. Hidrólisis ácida



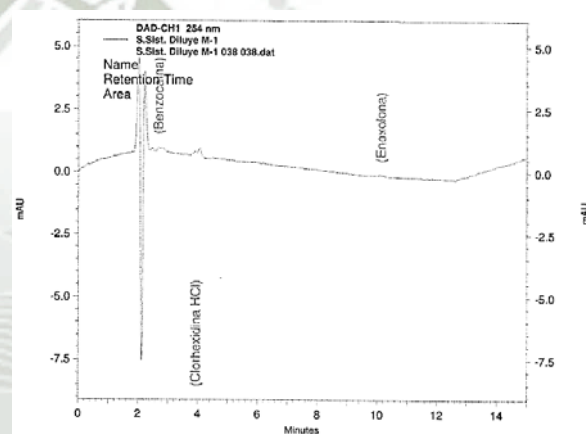
Cromatograma N° 5. Fotólisis



Cromatograma N° 6. Termólisis

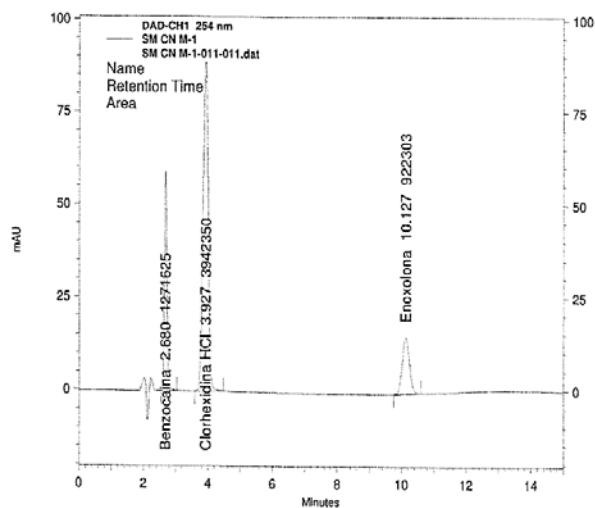


Cromatograma N° 7. Oxidación

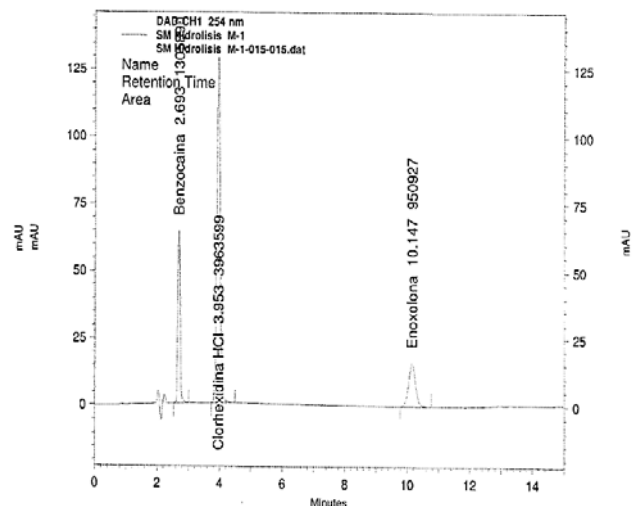


Cromatograma N° 8. Blanco

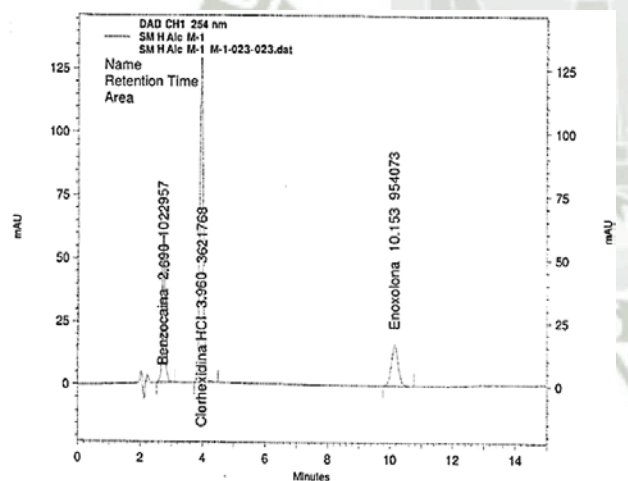
ANEXO N° 2. CROMATOGRAMAS CORRESPONDIENTES A LA SELECTIVIDAD DE MÉTODO



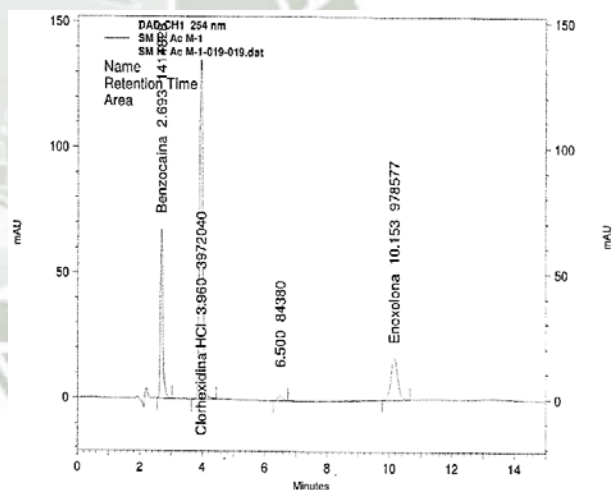
**Cromatograma N° 9. Condiciones
normales**



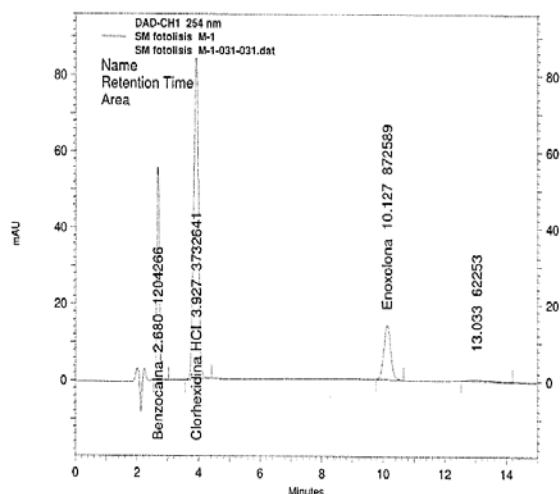
Cromatograma N° 10. Hidrólisis



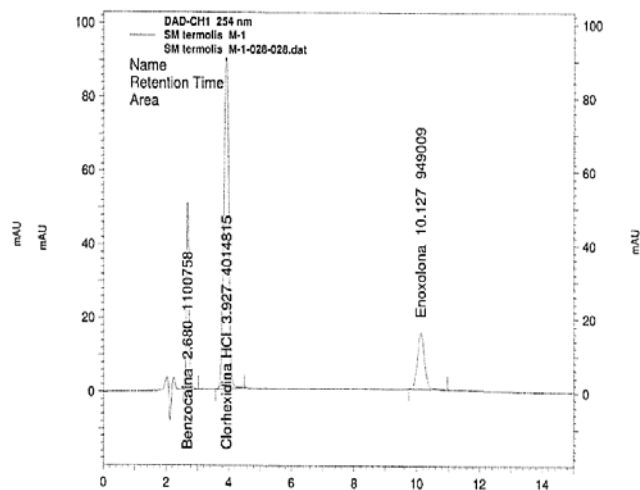
**Cromatograma N° 11. Hidrólisis
alcalina**



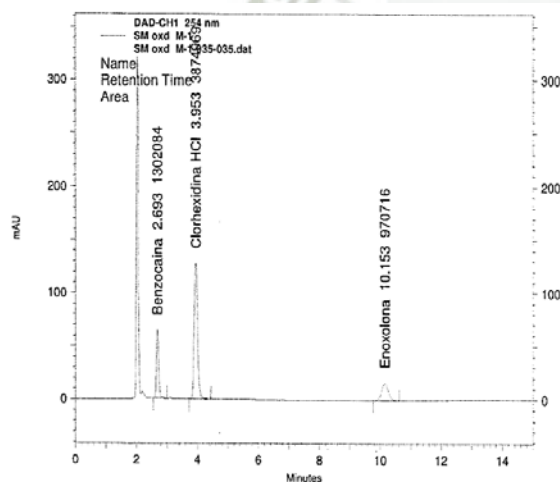
**Cromatograma N° 12. Hidrólisis
ácida**



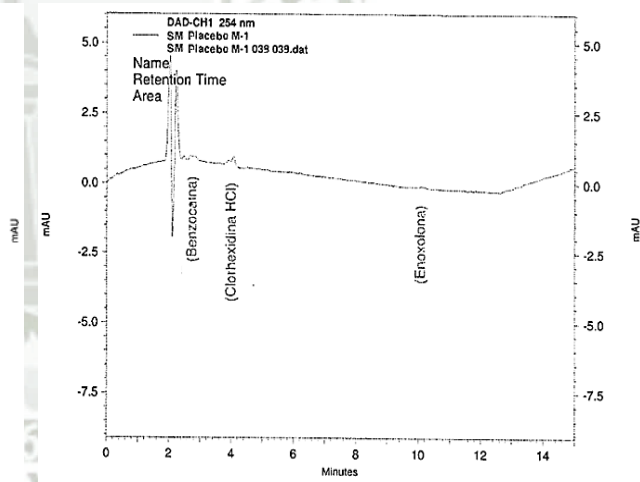
Cromatograma N° 13. Fotólisis



Cromatograma N° 14. Termólisis

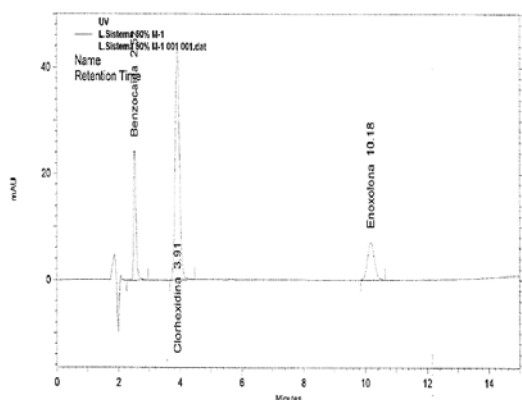


Cromatograma N° 15. Oxidación

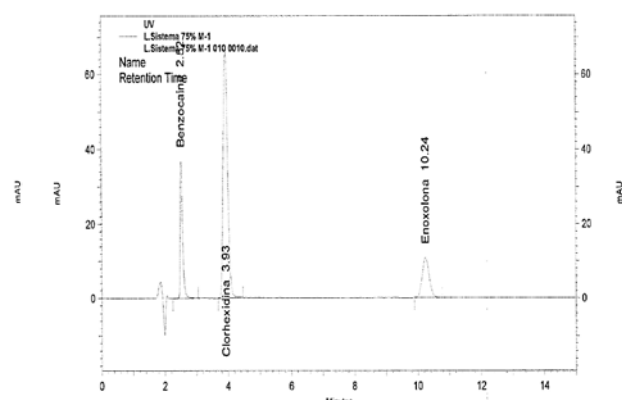


Cromatograma N° 16. Placebo

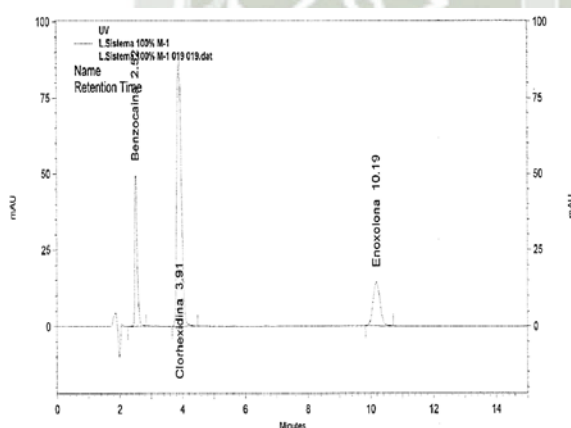
ANEXO N° 3. CROMATOGRAMAS CORRESPONDIENTES A LA LINEALIDAD DE SISTEMA



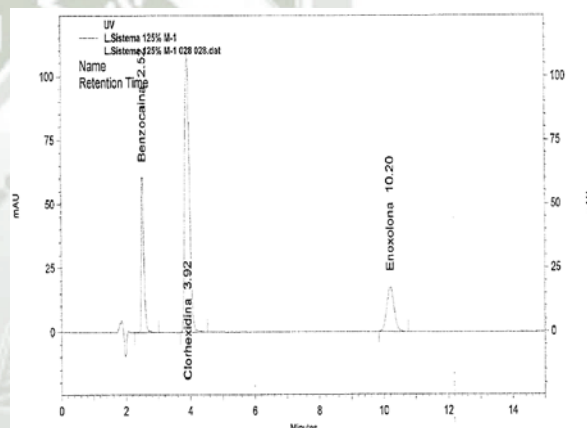
**Cromatograma N° 17. Concentración
al 50 %**



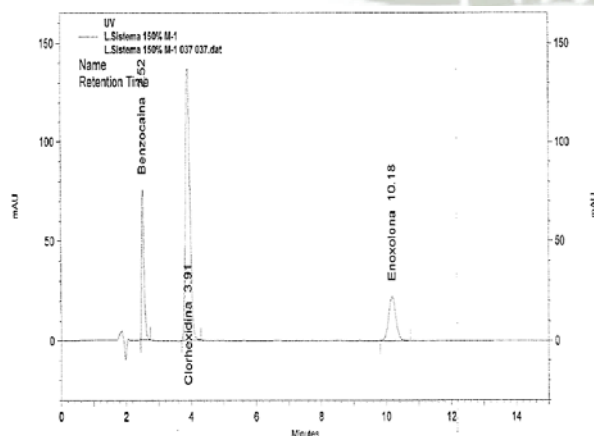
**Cromatograma N° 18. Concentración
al 75 %**



**Cromatograma N° 19. Concentración
al 100 %**

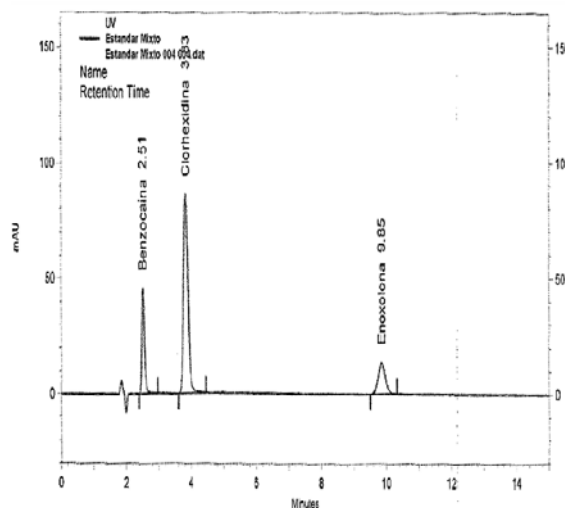


**Cromatograma N° 20. Concentración
al 125 %**

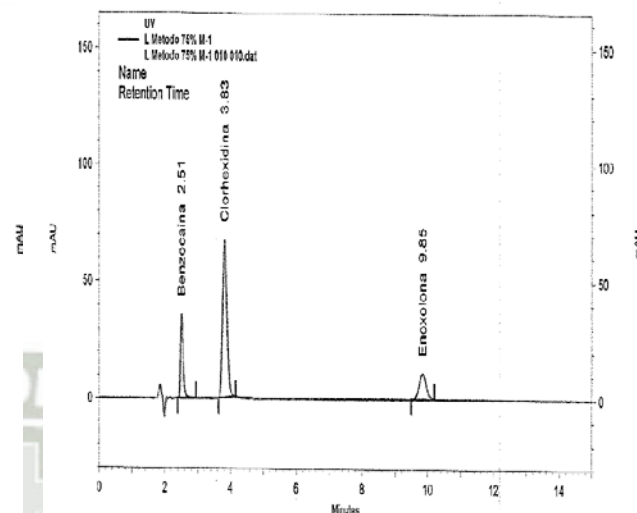


**Cromatograma N° 21. Concentración
al 150 %**

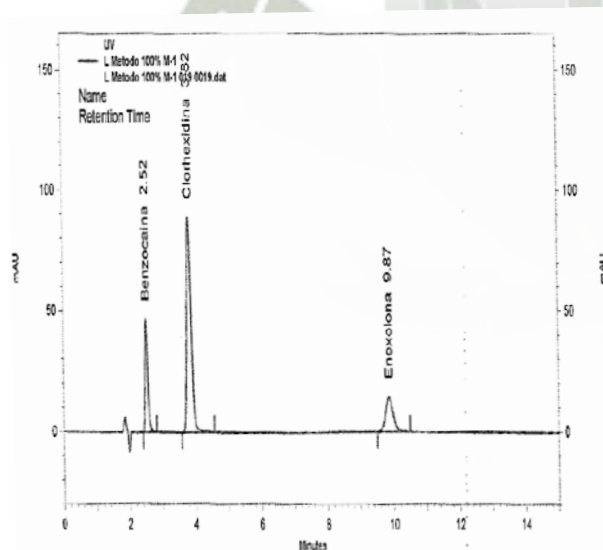
ANEXO N° 4. CROMATOGRAMAS CORRESPONDIENTES A LA LINEALIDAD DE MÉTODO Y EXACTITUD



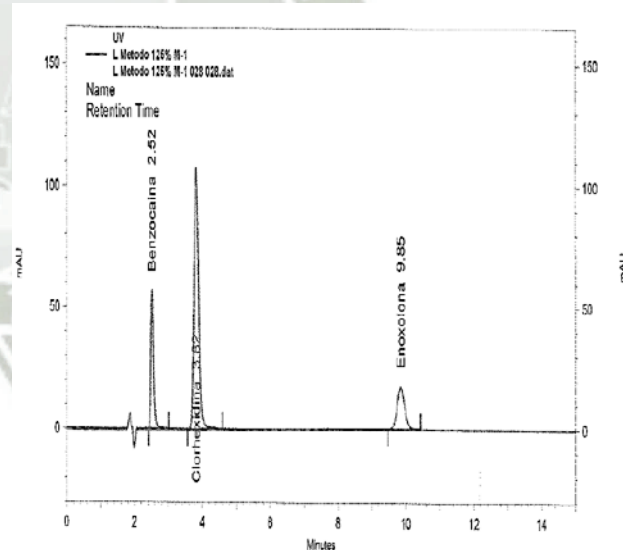
Cromatograma N° 22. Estándar Mixto



**Cromatograma N° 23. Concentración
al 75 %**

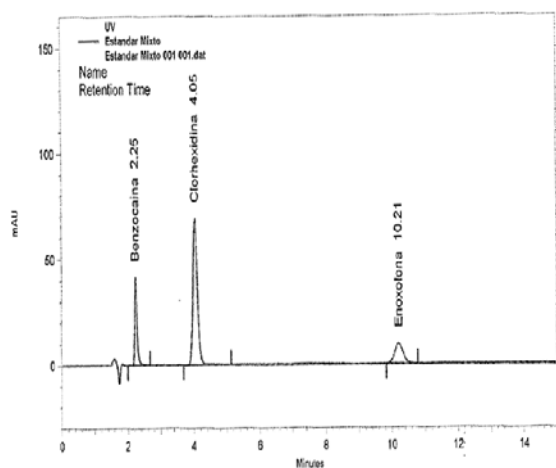


**Cromatograma N° 24. Concentración
al 100 %**

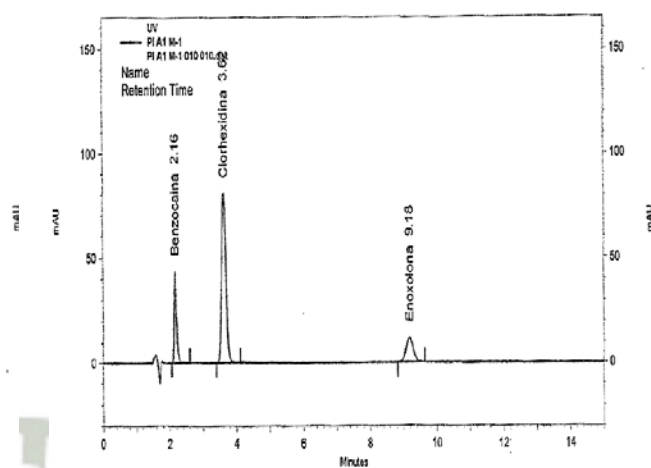


**Cromatograma N° 25. Concentración
al 125 %**

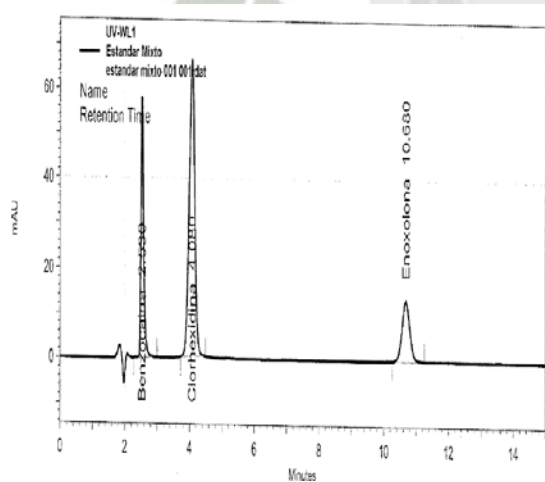
ANEXO N° 5. CROMATOGRAMAS CORRESPONDIENTES A LA PRECISIÓN INTERMEDIA



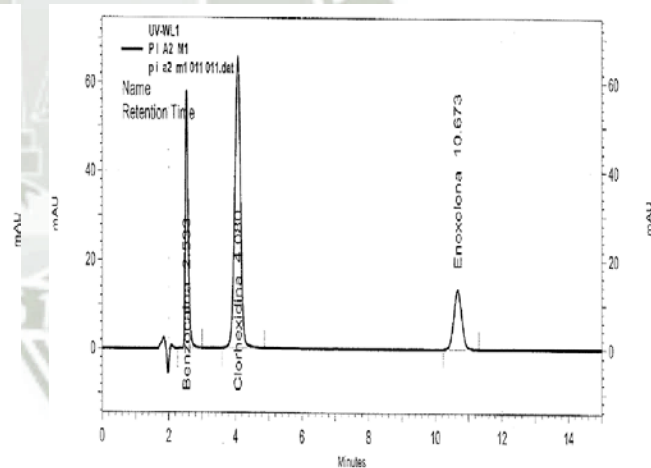
**Cromatograma N° 26. Estándar del día
1, equipo 1**



**Cromatograma N° 27. Muestra del día
1, equipo 1**

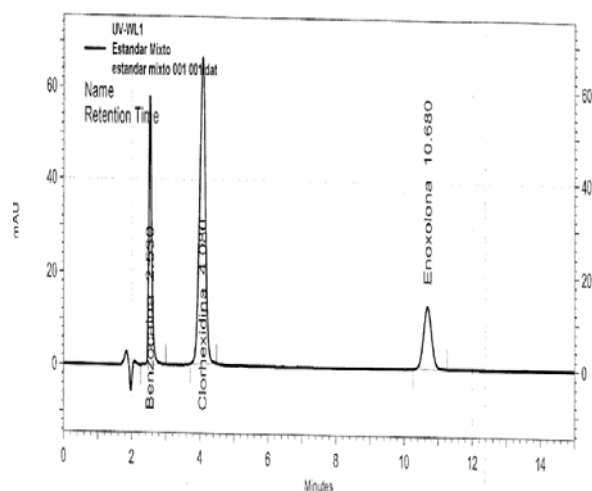


**Cromatograma N° 28. Estándar del día
2, equipo 2**

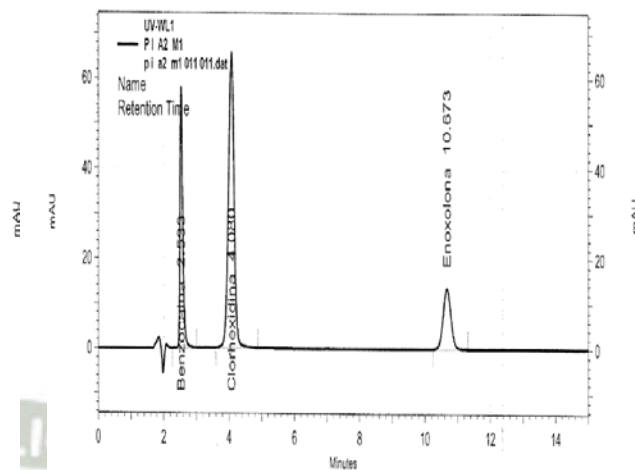


**Cromatograma N° 29. Muestra del día
2, equipo 2**

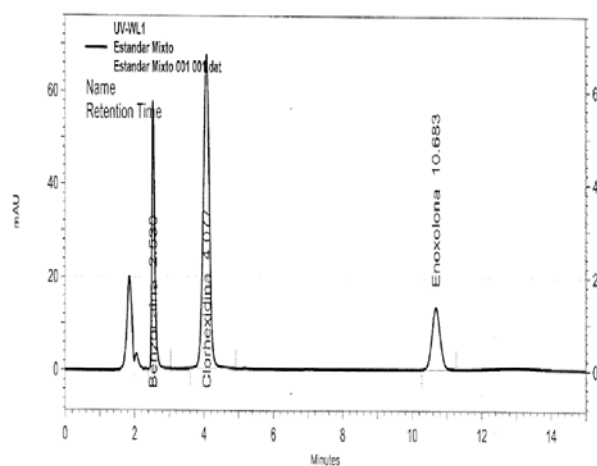
ANEXO N° 6. CROMATOGRAMAS DE ESTABILIDAD DE MUESTRA PREPARADA



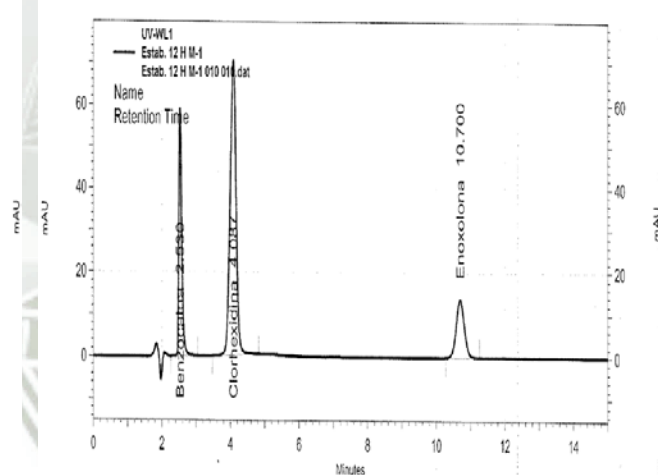
**Cromatograma N° 30. Estándar a las
0 H**



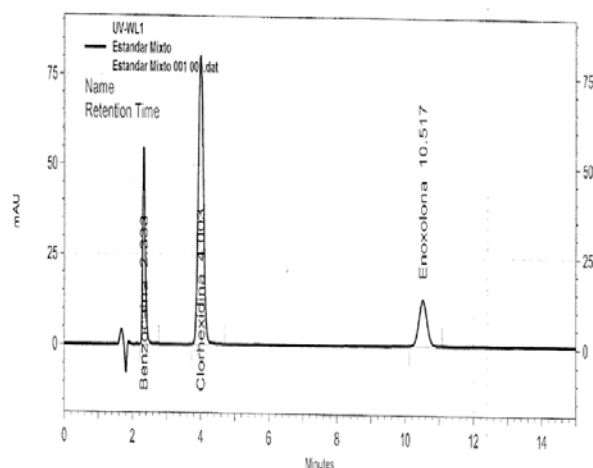
**Cromatograma N° 31. Muestra a las
0 H**



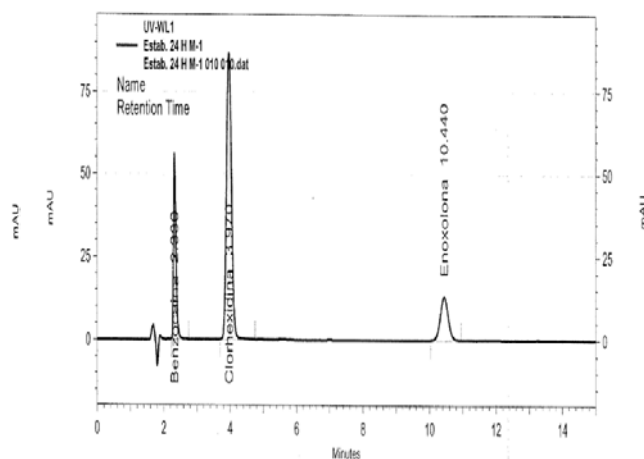
**Cromatograma N° 32. Estándar a las
12 H**



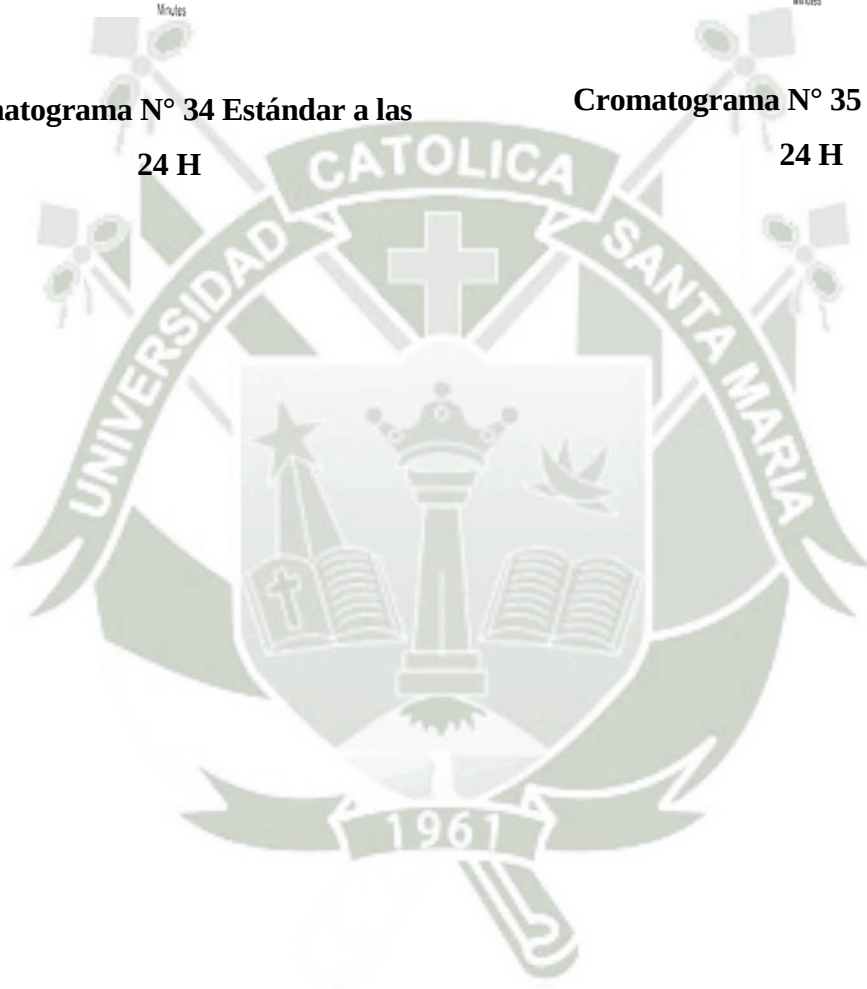
**Cromatograma N° 33. Muestra a las
12 H**



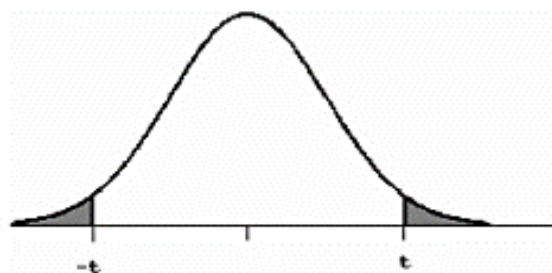
**Cromatograma N° 34 Estándar a las
24 H**



**Cromatograma N° 35 Muestra a las
24 H**



ANEXO N° 7.

Tabla de cuantiles de la distribución t de Student


(a) El área de las dos colas está sombreada en la figura.

(b) Si H_A es direccional, las cabeceras de las columnas deben ser divididas por 2 cuando se acota el P-valor.

gl	ÁREA DE DOS COLAS						
	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001	0,0001
1	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	636,619	6366,198
2	1,886	2,920	4,303	6,695	9,925	31,598	99,992
3	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,924	28,000
4	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610	15,544
5	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869	11,178
6	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959	9,082
7	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408	7,885
8	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041	7,120
9	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781	6,594
10	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587	6,211
11	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437	5,921
12	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318	5,694
13	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221	5,513
14	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140	5,363
15	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073	5,239
16	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015	5,134
17	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965	5,044
18	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922	4,966
19	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883	4,897
20	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850	4,837
21	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819	4,784
22	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792	4,736
23	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,767	4,693
24	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745	4,654
25	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725	4,619
26	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707	4,587
27	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,690	4,558
28	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674	4,530
29	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,659	4,506
30	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646	4,482
40	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,551	4,321
60	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,460	4,169
100	1,290	1,660	1,984	2,364	2,626	3,390	4,053
140	1,288	1,656	1,977	2,353	2,611	3,361	4,006
∞	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,291	3,891

ANEXO N° 8.

FÓRMULA CUALICUANTITATIVA

Clorhidrato De Clorhexidina 5 mg + Benzocaina 4 mg + Enoxolona 3 mg

Comprimidos Orales

Cada Comprimido Contiene:

PRINCIPIO ACTIVO	CANTIDAD		FUNCIÓN
Clorhidrato de clorhexidina	5.000	mg	Principio Activo
Benzocaína	4.000	mg	Principio Activo
Enoxolona	3.000	mg	Principio Activo
EXCIPIENTES			
Sacarosa	251.500	mg	Diluyente
Manitol	811.000	mg	Diluyente
Sucralosa	4.000	mg	Agente edulcorante
Dióxido de Silicio coloidal	12.000	mg	Deslizante
Polisorbato 80	24.000	mg	Agente solubilizante
Povidona (K 30)	54.000	mg	Aglutinante
Talco	7.500	mg	Lubricante
Estearato de Magnesio	12.000	mg	Lubricante
Fumarato sódico de Estearilo	12.000	mg	Lubricante
Alcohol etílico 96 °	0.235	mL	Disolvente

ANEXO N° 9. CERTIFICADOS DE ANÁLISIS DE LOS EQUIPOS UTILIZADOS



CERTIFICADO DE ANALISIS

Nombre del Estándar : Clorhidrato de Clorhexidina
Número de lote : SMAART/QC/CHH/2015/010
Fecha de Análisis : 2015-11-26
Fecha de Vencimiento : 2018-08-31
Cantidad : 5000 mg aprox.
Procedencia : India
Conservación : Conservar en envases impermeables protegidos de la luz.

Pruebas	Especificaciones	Resultados
Descripción	Polvo cristalino blanco a casi blanco	Polvo cristalino blanco
Solubilidad	Poco soluble en agua y en propilenglicol, muy ligeramente soluble en etanol (96%)	Poco soluble en agua y en propilenglicol, muy ligeramente soluble en etanol (96%)
Pérdida por secado	No más de 1,0 %	0,04 %
Pureza	97,02 – 101,00 % Tal Cual	98,43 % Tal Cual

Estándar de Trazabilidad:

Clorhidrato de Clorhexidina CRS

Lote: 2

Metodología Analítica: Cuantificación por Titulación Potenciometrica según BP

Laboratorios Naturales y Genericos S.A.C.

Miguel Grau 317 Cerro Colorado Arequipa, Perú (054) 251292
Parque Industrial de Río Seco Calle1 Mza A'3 Cerro Colorado Arequipa, Perú (054) 316031
Inscrita en la Partida N° 11006712 SUNARP

www.laboratoriosportugal.com
e-mail: labportugal@laboratoriosportugal.com

CERTIFICADO DE ANALISIS

Nombre del Estándar : Enoxolona
 Número de lote : 14051003
 Fecha de Análisis : 2015-11-27
 Fecha de Vencimiento : 2018-05-11
 Cantidad : 5000 mg aprox.
 Procedencia : China
 Conservación : Conservar en envases impermeables protegidos de la luz.

Pruebas	Especificaciones	Resultados
Descripción	Polvo cristalino blanco a casi blanco	Polvo cristalino casi blanco
Solubilidad	Prácticamente insoluble en agua, soluble en etanol, escasamente soluble en cloruro de metileno.	Prácticamente insoluble en agua, soluble en etanol, escasamente soluble en cloruro de metileno.
Pérdida por secado	Máximo 0,5 %	0,16 %
Pureza	97,51 – 101,00 % Tal Cual f	100,76 % Tal Cual

Estándar de Trazabilidad:

Enoxolona CRS EP

Lote: 2

Metodología Analítica: Cuantificación por Titulación Potenciometrica según BP

Laboratorios Naturales y Genericos S.A.C.

Miguel Grau 317 Cerro Colorado Arequipa, Perú (054) 251292
 Parque Industrial de Río Seco Calle1 Mza A'3 Cerro Colorado Arequipa, Perú (054) 316031
 Inscrita en la Partida N° 11006712 SUNARP

www.laboratoriosportugal.com
 e-mail: labportugal@laboratoriosportugal.com

CERTIFICADO DE ANALISIS

Nombre del Estándar : Enoxolona
 Número de lote : 14051003
 Fecha de Análisis : 2015-11-27
 Fecha de Vencimiento : 2018-05-11
 Cantidad : 5000 mg aprox.
 Procedencia : China
 Conservación : Conservar en envases impermeables protegidos de la luz.

Pruebas	Especificaciones	Resultados
Descripción	Polvo cristalino blanco a casi blanco	Polvo cristalino casi blanco
Solubilidad	Prácticamente insoluble en agua, soluble en etanol, escasamente soluble en cloruro de metileno.	Prácticamente insoluble en agua, soluble en etanol, escasamente soluble en cloruro de metileno.
Pérdida por secado	Máximo 0,5 %	0,16 %
Pureza	97,51 – 101,00 % Tal Cual f	100,76 % Tal Cual

Estándar de Trazabilidad:

Enoxolona CRS EP

Lote: 2

Metodología Analítica: Cuantificación por Titulación Potenciometrica según BP

Laboratorios Naturales y Genericos S.A.C.

 Miguel Grau 317 Cerro Colorado Arequipa, Perú (054) 251292
 Parque Industrial de Río Seco Calle1 Mza A' 3 Cerro Colorado Arequipa, Perú (054) 316031
 Inscrita en la Partida N° 11006712 SUNARP

 www.laboratoriosportugal.com
 e-mail: labportugal@laboratoriosportugal.com

Certificate of Analysis

1.00063.0000 Acetic acid (glacial) 100% anhydrous for analysis EMSURE® ACS,ISO,
Reag. Ph Eur
Batch K48283163

	Spec. Values		Batch Values	
Assay (alkalimetric)	≥ 99.8	%	99.9	%
Identity	passes test		passes test	
Colour	≤ 10	Hazen	< 5	Hazen
Acetaldehyde	≤ 2	ppm	< 2	ppm
Acetic anhydride	≤ 100	ppm	27	ppm
Titrateable base	≤ 0.0004	meq/g	< 0.0004	meq/g
Solidification temperature	≥ 16.3	°C	16.4	°C
Chloride (Cl)	≤ 0.4	ppm	< 0.2	ppm
Phosphate (PO ₄)	≤ 0.4	ppm	< 0.1	ppm
Heavy metals (as Pb)	≤ 0.5	ppm	< 0.5	ppm
Sulphate (SO ₄)	≤ 0.4	ppm	< 0.4	ppm
Ag (Silver)	≤ 0.005	ppm	< 0.005	ppm
Al (Aluminium)	≤ 0.020	ppm	< 0.010	ppm
As (Arsenic)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Au (Gold)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
B (Boron)	≤ 0.100	ppm	< 0.010	ppm
Ba (Barium)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Be (Beryllium)	≤ 0.005	ppm	< 0.005	ppm
Bi (Bismuth)	≤ 0.050	ppm	< 0.010	ppm
Ca (Calcium)	≤ 0.100	ppm	< 0.020	ppm
Cd (Cadmium)	≤ 0.020	ppm	< 0.010	ppm
Co (Cobalt)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Cr (Chromium)	≤ 0.020	ppm	< 0.010	ppm
Cu (Copper)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Fe (Iron)	≤ 0.050	ppm	< 0.040	ppm
Ga (Gallium)	≤ 0.050	ppm	< 0.010	ppm
Ge (Germanium)	≤ 0.020	ppm	< 0.010	ppm
Hg (Mercury)	≤ 0.005	ppm	< 0.005	ppm
In (Indium)	≤ 0.050	ppm	< 0.050	ppm
K (Potassium)	≤ 0.100	ppm	< 0.050	ppm
Li (Lithium)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Mg (Magnesium)	≤ 0.050	ppm	< 0.010	ppm
Mn (Manganese)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Mo (Molybdenum)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Na (Sodium)	≤ 0.200	ppm	< 0.010	ppm
Ni (Nickel)	≤ 0.020	ppm	< 0.010	ppm
Pb (Lead)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Pt (Platinum)	≤ 0.100	ppm	< 0.050	ppm
Sn (Tin)	≤ 0.050	ppm	< 0.010	ppm
Sr (Strontium)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Ti (Titanium)	≤ 0.050	ppm	< 0.010	ppm

Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Germany): +49 6151 72-0
EMD Millipore Corporation - a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany
 290 Concord Road, Billerica, MA 01821, USA, Phone: (978) 715-4321

Page 1 of 2

Certificate of Analysis

1.00063.0000 Acetic acid (glacial) 100% anhydrous for analysis EMSURE® ACS,ISO,
Reag. Ph Eur
Batch K48283163

Tl (Thallium)	≤ 0.020	ppm	< 0.010	ppm
V (Vanadium)	≤ 0.010	ppm	< 0.005	ppm
Zn (Zinc)	≤ 0.030	ppm	< 0.010	ppm
Zr (Zirconium)	≤ 0.050	ppm	< 0.010	ppm
Substances reducing potassium dichromate	passes test		passes test	
Substances reducing potassium permanganate	≤ 20	ppm	< 20	ppm
Evaporation residue	≤ 5	ppm	< 5	ppm
Water	≤ 0.2	%	0.10	%
Dilution test	passes test		passes test	
Minimum shelf life: see product label				

Date of examination (DD.MM.YYYY) 30.08.2016

Dr. Reiner Vogt
Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.



Certificate of Analysis

1.00030.0000 Acetonitrile gradient grade for liquid chromatography LiChrosolv® Reag. Ph
Eur

Batch I851230

Batch Values		
Purity (GC)	≥ 99.9	%
Identity (IR)	conforms	
Evaporation residue	≤ 2.0	mg/l
Water	≤ 0.02	%
Colour	≤ 10	Hazen
Density (d 20 °C/20 °C)	0.78	
Refractive index (n 20/D)	1.344	
Boiling range (80-82°C)	≥ 95	% (v/v)
Acidity	≤ 0.0002	meq/g
Alkalinity	≤ 0.0002	meq/g
Gradient grade (at 210 nm)	0.1	mAU
Gradient grade (at 254 nm)	0.1	mAU
Fluorescence (as quinine at 254 nm)	0.1	ppb
Fluorescence (as quinine at 365 nm)	0.1	ppb
Transmission (at 193 nm)	75	%
Transmission (at 195 nm)	88	%
Transmission (from 230 nm)	≥ 98	%

Filtered by 0.2 µm filter.

Suitable for UPLC / UHPLC / Ultra HPLC - instruments.

Conforms to Acetonitrile for chromatography and Acetonitrile R1 according to Reag.Ph Eur;
conforms to the requirements of ACS for liquid chromatography suitability.

Date of release (DD.MM.YYYY) 07.09.2016

Minimum shelf life (DD.MM.YYYY) 30.09.2019

Dr. Ute Volkwein

Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Germany): +49 6151 72-0

EMD Millipore Corporation - a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany

290 Concord Road, Billerica, MA 01821, USA, Phone: (978) 715-4321

SALSA Version 463101 /990000367236// Date: 07.09.2016

Page 1 of 1

Certificate of Analysis

1.06007.0000 Methanol gradient grade for liquid chromatography LiChrosolv®
Reag. Ph Eur
Batch I850707

Batch Values		
Purity (GC)	≥ 99.9	%
Identity (IR)	conforms	
Evaporation residue	≤ 2.0	mg/l
Water	≤ 0.02	%
Colour	≤ 10	Hazen
Density (d 20 °C/20 °C)	0.793	
Boiling point	64 - 65	°C
Acidity	≤ 0.0002	meq/g
Alkalinity	≤ 0.0002	meq/g
Gradient grade (at 235 nm)	≤ 2.0	mAU
Gradient grade (at 254 nm)	≤ 1.0	mAU
Fluorescence (as quinine at 254 nm)	≤ 1.0	ppb
Fluorescence (as quinine at 365 nm)	≤ 0.5	ppb
Transmission (at 210 nm)	≥ 20	%
Transmission (at 220 nm)	≥ 60	%
Transmission (at 230 nm)	≥ 75	%
Transmission (at 235 nm)	≥ 83	%
Transmission (at 250 nm)	≥ 95	%
Transmission (from 260 nm)	≥ 98	%
Absorbance (at 225 nm)	0.146	

Filtered by 0.2 µm filter.
Suitable for UPLC / UHPLC / Ultra HPLC - instruments.

Conforms to Methanol R1 and R2 according to Reag. Ph Eur;
conforms to the requirements of ACS for liquid chromatography suitability.

Date of release (DD.MM.YYYY) 02.09.2016
Minimum shelf life (DD.MM.YYYY) 30.09.2019

Dr. Ute Volkwein
Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.



Certificate of Analysis

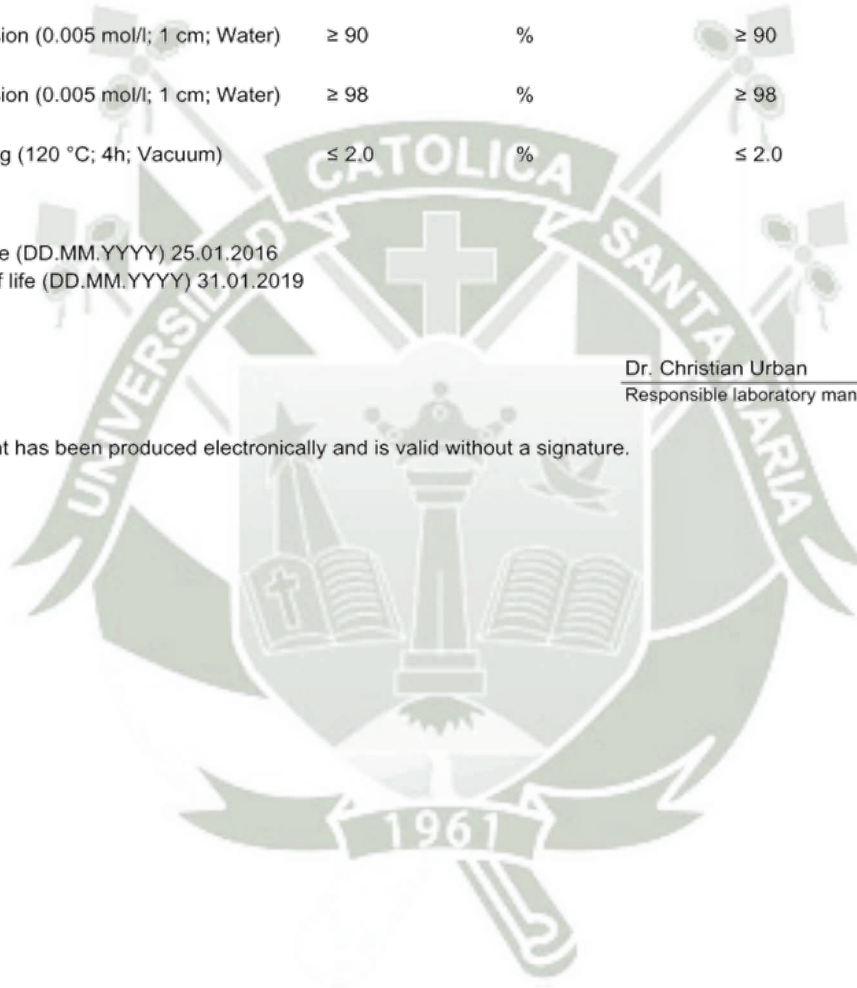
1.18307.0000 Octane-1-sulfonic acid sodium salt for ion pair chromatography LiChropur®
Batch K47521707

	Spec. Values		Batch Values	
Assay (alkalimetric, calculated on dried substance)	≥ 99.0	%	100.0	%
Identity (IR-spectrum)	conforms		conforms	
pH (100 g/l, water)	5.5 - 7.5		5.9	
UV-transmission (0.005 mol/l; 1 cm; Water) (at 200 nm)	≥ 70	%	≥ 70	%
UV-transmission (0.005 mol/l; 1 cm; Water) (at 220 nm)	≥ 90	%	≥ 90	%
UV-transmission (0.005 mol/l; 1 cm; Water) (at 250 nm)	≥ 98	%	≥ 98	%
Loss on drying (120 °C; 4h; Vacuum)	≤ 2.0	%	≤ 2.0	%

Date of release (DD.MM.YYYY) 25.01.2016
Minimum shelf life (DD.MM.YYYY) 31.01.2019

Dr. Christian Urban
Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.



Specification

1.07209.1000 Hydrogen peroxide 30% (Perhydrol®) for analysis EMSURE® ISO

	Specification	
Assay (manganometric)	≥ 30.0	%
Colour	≤ 10	Hazen
Free acid (as H ₂ SO ₄)	≤ 30	ppm
Chloride (Cl)	≤ 0.5	ppm
Nitrate (NO ₃)	≤ 2	ppm
Phosphate (PO ₄)	≤ 1	ppm
Sulphate (SO ₄)	≤ 1	ppm
Heavy metals (as Pb)	≤ 1	ppm
Total nitrogen (N)	≤ 4	ppm
Al (Aluminium)	≤ 0.5	ppm
As (Arsenic)	≤ 0.01	ppm
Ba (Barium)	≤ 0.05	ppm
Be (Beryllium)	≤ 0.01	ppm
Bi (Bismuth)	≤ 0.1	ppm
Ca (Calcium)	≤ 0.2	ppm
Cd (Cadmium)	≤ 0.01	ppm
Co (Cobalt)	≤ 0.01	ppm
Cr (Chromium)	≤ 0.02	ppm
Cu (Copper)	≤ 0.01	ppm
Fe (Iron)	≤ 0.05	ppm
Ge (Germanium)	≤ 0.05	ppm
K (Potassium)	≤ 0.1	ppm
Li (Lithium)	≤ 0.01	ppm
Mg (Magnesium)	≤ 0.05	ppm
Mn (Manganese)	≤ 0.01	ppm
Mo (Molybdenum)	≤ 0.02	ppm
Na (Sodium)	≤ 0.1	ppm
Ni (Nickel)	≤ 0.02	ppm
Pb (Lead)	≤ 0.01	ppm
Sr (Strontium)	≤ 0.01	ppm
Ti (Titanium)	≤ 0.1	ppm
Tl (Thallium)	≤ 0.05	ppm
V (Vanadium)	≤ 0.01	ppm
Zn (Zinc)	≤ 0.05	ppm
Zr (Zirconium)	≤ 0.1	ppm
Non volatile matter	≤ 50	ppm
ISO-reagent		
Expiry date: see product label		

Dr. Reiner Vogt

Responsible laboratory manager quality control

Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Germany): +49 6151 72-0
EMD Millipore Corporation - a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany
290 Concord Road, Billerica, MA 01821, USA, Phone: (978) 715-4321

Page 1 of 2

QSI

SERVICIO Y ATENCIÓN TÉCNICA EN CALIBRACIONES

Certificado de Calibración

Número de Certificado **M0270 2016**

Orden de Servicio 0120 - EX - 11114

Solicitante LABORATORIOS NATURALES Y GENERICOS S.A.C.

Dirección Calle Miguel Grau N° 317 Urb. La Libertad - Cerro Colorado - Arequipa

Objeto de Calibración BALANZA

Marca METTLER TOLEDO

Modelo XP105DR

Serie B015024435

Procedencia SUIZA

Identificación CC-BLZ-010

Capacidad Máxima 31 g / 120 g

División de escala (d) 0,00001 g / 0,0001 g

División de verificación (e) 0,001 g

Tipo ELECTRÓNICA

Ubicación ZONA DE PESADO

Fecha de Calibración 2016-03-30

Método de Calibración

Comparación directa con pesas patrones de acuerdo al Procedimiento de Calibración de Balanzas de Funcionamiento no Automático Clase I y Clase II, PC - 011 del SNM-INDECOPI, Cuarta Edición abril 2010.

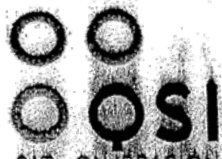
Lugar de Calibración ZONA DE PESADO
Calle Miguel Grau N° 317 Urb. La Libertad - Cerro Colorado - Arequipa

Condiciones Ambientales

	Inicio	Fin
Temperatura	23,5 °C	23,6 °C
Humedad Relativa	68,9 %	69,1 %

Incertidumbre

La incertidumbre reportada en el presente certificado es la incertidumbre expandida de medición que resulta de multiplicar la incertidumbre estándar por el factor de cobertura $k=2$. La estimación de la incertidumbre se realizó según el Procedimiento de Calibración de Balanzas de Funcionamiento no Automático Clase I y Clase II, PC - 011 del SNM-INDECOPI, Cuarta Edición abril 2010. Generalmente, el valor de la magnitud está dentro del intervalo de los valores determinados con la incertidumbre expandida con una probabilidad de aproximadamente 95 %.

Sello	Fecha de Emisión	Jefe de Línea - Calibración
	2016-04-04	
SAT - CALIBRACIÓN		Fernando Chacmana Linares

QUÍMICA SUIZA INDUSTRIAL DEL PERÚ SA

El contenido de este documento sólo puede publicarse o reproducirse de forma completa
Química Suiza Industrial del Perú SA - Servicio y Atención Técnica en Calibraciones
Telf.: 710-4000 Anexo 2541
e-mail: satcalibracion@qsiindustrial.biz

Página 1 de 3

F-SATC-33
v.01

M0270 2016

Observaciones

De acuerdo a la NMP:003:2009 - 2da Edición, Instrumento de Pesaje de Funcionamiento No Automático; el límite inferior (capacidad mínima) de medida para esta balanza es de 0,001 g para intervalo de 0 g a 31 g y de 31 g para el intervalo de 31 g a 120 g.
Los Errores Máximos Permitidos (emp) mostrados en este documento corresponden a los emp para balanzas en uso de funcionamiento no automático de clase de exactitud 1, según NMP:003:2009 - 2da Edición.
Los resultados del presente documento, son válidos únicamente para el objeto calibrado y se refieren al momento y a las condiciones en que fueron ejecutadas las mediciones, al solicitante le corresponde definir la frecuencia de calibración en función al uso, conservación y mantenimiento del instrumento de medición.

Resultados de la Medición

INSPECCIÓN VISUAL

Ajuste cero	TIENE	Batida	NO TIENE
Cable de fibra	TIENE	Cable	NO TIENE
Plataforma	TIENE	Nivelado	TIENE
Sistema de trabajo	NO TIENE		

ENSAYO DE REPETIBILIDAD

Medición Nº	Capacidad (kg)	U	E	Capacidad (kg)	U	E
	(g)	(mg)	(mg)	(g)	(mg)	(mg)
1	60,0000	0	0,0	120,0001	0	0,1
2	60,0000	0	0,0	120,0001	0	0,1
3	60,0000	0	0,0	120,0001	0	0,1
4	60,0000	0	0,0	120,0001	0	0,1
5	60,0000	0	0,0	120,0001	0	0,1
6	60,0000	0	0,0	120,0001	0	0,1
7	60,0000	0	0,0	120,0001	0	0,1
8	60,0000	0	0,0	120,0002	0	0,2
9	60,0000	0	0,0	120,0001	0	0,1
10	60,0000	0	0,0	120,0001	0	0,1
CAPACIDAD		0,0		120,0001	0	0,1
EMP		2		2		

ENSAYO DE EXCENTRICIDAD

2	5
1	
3	4

VISTA FRONTAL

Data: 10/03/2016 10:00:00					Data: 10/03/2016 10:00:00				
Nº	Capacidad (kg)	U (g)	E (mg)	E (mg)	Capacidad (kg)	U (g)	E (mg)	E (mg)	
1	0,00000	0,00000	0	0,00	40,0000	40,0000	0	0,0	
2		0,00000	0	0,00		40,0000	0	0,0	
3		0,00000	0	0,00		40,0001	0	0,1	
4		0,00000	0	0,00		40,0002	0	0,2	
5		0,00000	0	0,00		40,0001	0	0,1	
1									

QUÍMICA SUIZA INDUSTRIAL DEL PERÚ SA

El contenido de este documento solo puede publicarse o reproducirse de forma completa
Química Suiza Industrial del Perú SA - Servicio y Atención Técnica en Calibraciones
Telf.: 710-4000 Anexo 2541
e-mail: satcalibracion@qsiindustrial.biz

Página 2 de 3

F-SATC-33

Certificado de Calibración

ENSAYO DE PESAJE

Carga	CARGA CRESCIENTE			CARGA DECRECIENTE			Carga
	g	mg	kg	g	mg	kg	
0,00000	0,00000	0	0,00				
0,00100	0,00099	0	-0,01	-0,01	0,00098	0	-0,02
0,10000	0,09998	0	-0,02	-0,02	0,09996	0	-0,04
9,99999	9,99999	0	0,00	0,00	9,99998	0	-0,01
19,99999	20,00000	0	0,01	0,01	20,00001	0	0,02
29,99999	30,00000	0	0,01	0,01	30,00001	0	0,02
50,00000	50,00000	0	0,0	0,0	50,00001	0	0,1
60,00000	60,00000	0	0,0	0,0	60,00000	0	0,0
80,00000	80,00000	0	0,0	0,0	80,00000	0	0,0
100,00000	100,00000	0	0,0	0,0	99,99999	0	-0,1
120,00000	120,00000	0	0,0	0,0	120,00000	0	0,0

emp Error Máximo Permitido I Indicación del instrumento E Error encontrado
Ec Error Corregido ΔL Carga Agregada

LECTURA CORREGIDA E INCERTIDUMBRE DE LA BALANZA

$$\text{Lectura corregida} = R - 0,00000035 \times R$$

$$\text{Incertidumbre Expandida (U1)} = 2 \times \sqrt{0,000000000085 \text{ g}^2 + 0,0000000000052 \times R^2}$$

$$\text{Incertidumbre Expandida (U2)} = 2 \times \sqrt{0,0000000027 \text{ g}^2 + 0,000000000052 \times R^2}$$

U1 Incertidumbre Expandida correspondiente al Intervalo de 0 g a 31 g
U2 Incertidumbre Expandida correspondiente al Intervalo de 31 g a 120 g

Trazabilidad

Este certificado de calibración documenta la trazabilidad a los patrones nacionales e internacionales que materializan las unidades físicas de medida de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI).

[illegible]

QUÍMICA SUIZA INDUSTRIAL DEL PERÚ SA

El contenido de este documento solo puede publicarse o reproducirse de forma completa
Química Suiza Industrial del Perú SA - Servicio y Atención Técnica en Calibraciones
Telf.: 710-4000 Anexo 2541
e-mail: satcalibración@qsiindustrial.biz



SERVICIO Y ATENCIÓN TÉCNICA EN CALIBRACIONES

Certificado de Calibración

Número de Certificado **M0821 2016**

Orden de Servicio 0411- EX - 11114 - 4

Solicitante LABORATORIOS NATURALES Y GENERICOS S.A.C.

Dirección Calle Miguel Grau N° 317 Urb. La Libertad - Cerro Colorado - Arequipa

Objeto de Calibración BALANZA

Marca METTLER TOLEDO

Modelo XPE105

Serie B435980154

Procedencia SUIZA

Identificación CC-BLZ-075

Capacidad Máxima 120 g

División de escala (d) 0,00001 g

División de verificación (e) 0,001 g

Tipo ELECTRÓNICA

Ubicación ZONA DE PESADO - FISICO QUÍMICO

Fecha de Calibración 2016-10-12

Método de Calibración

Comparación directa con pesas patrones de acuerdo al Procedimiento de Calibración de Balanzas de Funcionamiento no Automático Clase I y Clase II. PC - 011 del SNM-INDECOPI, Cuarta Edición abril 2010.

Lugar de Calibración ZONA DE PESADO - FISICO QUÍMICO
Calle 1 Mza. A Lte. 3 Parque Ind. Río Seco - Arequipa

Condiciones Ambientales

	Inicial	Final
Temperatura	23,3 °C	23,4 °C
Humedad Relativa	28,3 %	28,4 %

Incertidumbre

La incertidumbre reportada en el presente certificado es la incertidumbre expandida de medición que resulta de multiplicar la incertidumbre estándar por el factor de cobertura $k=2$. La estimación de la incertidumbre se realizó según el Procedimiento de Calibración de Balanzas de Funcionamiento no Automático Clase I y Clase II. PC - 011 del SNM-INDECOPI, Cuarta Edición abril 2010. Generalmente, el valor de la magnitud está dentro del intervalo de los valores determinados con la incertidumbre expandida con una probabilidad de aproximadamente 95 %.

Sello

Fecha de Emisión

Coordinador



2016-10-24

Carlos Mateo Villanueva

QUIMICA SUIZA INDUSTRIAL DEL PERU SA

El contenido de este certificado sólo puede publicarse o reproducirse de forma completa
Química Suiza Industrial del Perú SA - Servicio y Atención Técnica en Calibraciones
Av. República de Panamá 2577, La Victoria - Lima - Telf.: +51-1 710-4000 Anexo 2541
e-mail: satcalibracion@qsiindustrial.biz

Página 1 de 3

F-SATC-46
v.03

Observaciones

De acuerdo a la NMP:003:2009 - 2da Edición, Instrumento de Pesaje de Funcionamiento No Automático; el límite inferior (capacidad mínima) de medida para esta balanza no debe ser menor a 0,001 g

Los Errores Máximos Permitidos (emp) mostrados en este documento corresponden a los emp para balanzas en uso de funcionamiento no automático de clase de exactitud 1, según NMP:003:2009 - 2da Edición

Los resultados del presente documento, son válidos únicamente para el objeto calibrado y se refieren al momento y a las condiciones en que fueron ejecutadas las mediciones, al solicitante le corresponde definir la frecuencia de calibración en función al uso, conservación y mantenimiento del instrumento de medición.

Resultados de la Medición

INSPECCIÓN VISUAL

Ajuste de cero	TIENE	Escala	NO TIENE
Oscilación Libre	TIENE	Cursor	NO TIENE
Plataforma	TIENE	Nivelación	TIENE
Sistema de traba	NO TIENE		

ENSAYO DE REPETIBILIDAD

Medición N°	Carga L1= 49,99995 g			Carga L2= 99,99985 g			
	I [g]	ΔL [mg]	E [mg]	I [g]	ΔL [mg]	E [mg]	
1	49,99999	0	0,04	99,99996	0	0,11	
2	49,99998	0	0,03	99,99997	0	0,12	
3	49,99997	0	0,02	99,99996	0	0,11	
4	49,99998	0	0,03	99,99998	0	0,13	
5	49,99999	0	0,04	99,99996	0	0,11	
6	49,99998	0	0,03	99,99997	0	0,12	
7	49,99997	0	0,02	99,99996	0	0,11	
8	49,99999	0	0,04	99,99998	0	0,13	
9	49,99998	0	0,03	99,99997	0	0,12	
10	49,99998	0	0,03	99,99998	0	0,13	
$\Delta E_{\max}$ [mg]			0,02	$\Delta E_{\max}$ [mg]			0,02
emp [mg]			1	emp [mg]			2

ENSAYO DE EXCENTRICIDAD

2	5
1	
3	4

VISTA FRONTAL

N°	Determinación del Eo				Determinación del Error corregido Ec				
	Carga [g]	I [g]	ΔL [mg]	E [mg]	Carga [g]	I [g]	ΔL [mg]	E [mg]	Ec [mg]
1	0,00000	0,00000	0	0,00	39,99999	40,00006	0	0,07	0,07
2		0,00000	0	0,00		40,00011	0	0,12	0,12
3		0,00000	0	0,00		40,00004	0	0,05	0,05
4		0,00000	0	0,00		40,00000	0	0,01	0,01
5		0,00000	0	0,00		40,00008	0	0,09	0,09
emp ± [mg]									1

QUIMICA SUIZA INDUSTRIAL DEL PERU SA

El contenido de este certificado sólo puede publicarse o reproducirse de forma completa
Química Suiza Industrial del Perú SA - Servicio y Atención Técnica en Calibraciones
Av. República de Panamá 2577, La Victoria - Lima - Telf.: +51-1 710-4000 Anexo 2541
e-mail: satcalibracion@qindustrial.biz

ENSAYO DE PESAJE

Carga [g]	CARGA CRECIENTE				CARGA DECRECIENTE				emp ±[mg]
	l [g]	ΔL [mg]	E [mg]	Ec [mg]	l [g]	ΔL [mg]	E [mg]	Ec [mg]	
0,00000	0,00000	0	0,00						
0,00100	0,00101	0	0,01	0,01	0,00099	0	-0,01	-0,01	1
0,01000	0,01000	0	0,00	0,00	0,00997	0	-0,03	-0,03	1
0,10001	0,10000	0	-0,01	-0,01	0,09998	0	-0,03	-0,03	1
1,00000	0,99998	0	-0,02	-0,02	0,99998	0	-0,02	-0,02	1
9,99999	10,00001	0	0,02	0,02	9,99999	0	0,00	0,00	1
19,99999	20,00002	0	0,03	0,03	19,99999	0	0,00	0,00	1
49,99995	49,99998	0	0,03	0,03	49,99997	0	0,02	0,02	1
69,99994	70,00001	0	0,07	0,07	69,99999	0	0,05	0,05	2
99,99985	99,99997	0	0,12	0,12	99,99996	0	0,11	0,11	2
119,99984	119,99998	0	0,14	0,14	119,99998	0	0,14	0,14	2

emp Error Máximo Permitido I Indicación del instrumento E Error encontrado
Ec Error Corregido ΔL Carga Agregada

LECTURA CORREGIDA E INCERTIDUMBRE DE LA BALANZA

$$\text{Lectura corregida} = R - 0,00000093 \times R$$

$$\text{Incertidumbre Expandida} = 2 \times \sqrt{0,00000000017 \text{ g}^2 + 0,0000000000016 \times R^2}$$

R Lectura, cualquier indicación obtenida después de la calibración.

Trazabilidad

Este certificado de calibración documenta la trazabilidad a los patrones nacionales e internacionales que materializan las unidades físicas de medida de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI).

[illegible]

QUIMICA SUIZA INDUSTRIAL DEL PERU SA

El contenido de este certificado sólo puede publicarse o reproducirse de forma completa
Química Suiza Industrial del Perú SA - Servicio y Atención Técnica en Calibraciones
Av. República de Panamá 2577, La Victoria - Lima - Telf.: +51-1 710-4000 Anexo 2541
e-mail: satcalibracion@qsindustrial.biz

Página 3 de 3

F-SATC-46
v.03

QSI

SERVICIO Y ATENCIÓN TÉCNICA EN CALIBRACIONES

Certificado de Calibración

Número de Certificado

M0477 2016

Orden de Servicio

0238 - EX - 11809

Solicitante

LABORATORIOS NATURALES Y GENERICOS S.A.C.

Dirección

Parque Industrial Río Seco Mza A Lt 2 1ra Etapa Cerro Colorado - Arequipa

Objeto de Calibración

BALANZA

Marca

METTLER TOLEDO

Modelo

ML204T

Serie

B620492054

Procedencia

SUIZA

Identificación

CC-BLZ-079

Capacidad Máxima

220 g

División de escala (d)

0,0001 g

División de verificación (e)

0,001 g

Tipo

ELECTRÓNICA

Ubicación

ZONA DE PESADO - CONTROL DE CALIDAD

Fecha de Calibración

2016-06-22

Método de Calibración

Comparación directa con pesas patrones de acuerdo al Procedimiento de Calibración de Balanzas de Funcionamiento no Automático Clase I y Clase II. PC - 011 del SNM-INDECOPI, Cuarta Edición abril 2010.

Lugar de Calibración

ZONA DE PESADO - CONTROL DE CALIDAD
Parque Industrial Río Seco Mza A Lt 2 1ra Etapa Cerro Colorado - Arequipa

Condiciones Ambientales

	Inicial	Final
Temperatura	22,2 °C	22,3 °C
Humedad Relativa	33,7 %	33,1 %

Incertidumbre

La incertidumbre reportada en el presente certificado es la incertidumbre expandida de medición que resulta de multiplicar la incertidumbre estándar por el factor de cobertura $k=2$. La estimación de la incertidumbre se realizó según el Procedimiento de Calibración de Balanzas de Funcionamiento no Automático Clase I y Clase II. PC - 011 del SNM-INDECOPI, Cuarta Edición abril 2010. Generalmente, el valor de la magnitud está dentro del intervalo de los valores determinados con la incertidumbre expandida con una probabilidad de aproximadamente 95 %.

Sello

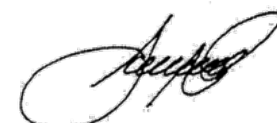
Fecha de Emisión

Jefe de Línea - Calibración



SAT - CALIBRACIÓN

2016-06-28



Fernando Chacmana Linares

QUÍMICA SUIZA INDUSTRIAL DEL PERÚ SA

El contenido de este documento sólo puede publicarse o reproducirse de forma completa
Química Suiza Industrial del Perú SA - Servicio y Atención Técnica en Calibraciones
Telf.: 710-4000 Anexo 2541
e-mail: satcalibracion@qsiindustrial.biz

Página 1 de 3

F-SATC-46
v.03

ENSAYO DE PESAJE

Carga [g]	CARGA CRECIENTE				CARGA DECRECIENTE				emp ±[mg]
	l [g]	ΔL [mg]	E [mg]	E _c [mg]	l [g]	ΔL [mg]	E [mg]	E _c [mg]	
0,0010	0,0010	0	0,0						
0,0100	0,0100	0	0,0	0,0	0,0098	0	-0,2	-0,2	1
0,1000	0,1000	0	0,0	0,0	0,0998	0	-0,2	-0,2	1
1,0000	1,0000	0	0,0	0,0	0,9999	0	-0,1	-0,1	1
10,0000	10,0000	0	0,0	0,0	9,9999	0	-0,1	-0,1	1
20,0000	20,0001	0	0,1	0,1	19,9999	0	-0,1	-0,1	1
50,0000	50,0001	0	0,1	0,1	49,9999	0	-0,1	-0,1	1
100,0000	100,0000	0	0,0	0,0	99,9999	0	-0,1	-0,1	2
150,0000	150,0001	0	0,1	0,2	150,0000	0	0,0	0,1	2
200,0000	200,0002	0	0,2	0,2	200,0001	0	0,1	0,1	3
220,0000	220,0002	0	0,2	0,2	220,0002	0	0,2	0,2	3

emp Error Máximo Permitido I Indicación del instrumento E Error encontrado
Ec Error Corregido ΔL Carga Agregada

LECTURA CORREGIDA E INCERTIDUMBRE DE LA BALANZA

$$\text{Lectura corregida} = R - 0,00000089 \times R$$

$$\text{Incertidumbre Expandida} = 2 \times \sqrt{0,0000000078 \text{ g}^2 + 0,0000000000063 \times R^2}$$

R Lectura, cualquier indicación obtenida después de la calibración.

Trazabilidad

Este certificado de calibración documenta la trazabilidad a los patrones nacionales e internacionales que materializan las unidades físicas de medida de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI).

[illegible]

QUÍMICA SUIZA INDUSTRIAL DEL PERÚ SA

El contenido de este documento sólo puede publicarse o reproducirse de forma completa
Química Suiza Industrial del Perú SA - Servicio y Atención Técnica en Calibraciones
Telf.: 710-4000 Anexo 2541
e-mail: satcalibracion@qsiindustrial.biz

Página 3 de 3

F-SATC-46
v.03

Certificado de Calibración

M0477 2016

Observaciones

De acuerdo a la NMP:003:2009 - 2da Edición, Instrumento de Pesaje de Funcionamiento No Automático; el límite inferior (capacidad mínima) de medida para esta balanza no debe ser menor a 0,01 g

Los Errores Máximos Permitidos (emp) mostrados en este documento corresponden a los emp para balanzas en uso de funcionamiento no automático de clase de exactitud **I**, según NMP:003:2009 - 2da Edición

Los resultados del presente documento, son válidos únicamente para el objeto calibrado y se refieren al momento y a las condiciones en que fueron ejecutadas las mediciones, al solicitante le corresponde definir la frecuencia de calibración en función al uso, conservación y mantenimiento del instrumento de medición.

Resultados de la Medición

INSPECCIÓN VISUAL

Ajuste de cero	TIENE	Escala	NO TIENE
Oscilación Libre	TIENE	Cursor	NO TIENE
Plataforma	TIENE	Nivelación	TIENE
Sistema de traba	NO TIENE		

ENSAYO DE REPETIBILIDAD

Medición N°	Carga L1= 110,0000 g			Carga L2= 220,0000 g			
	I [g]	ΔL [mg]	E [mg]	I [g]	ΔL [mg]	E [mg]	
1	109,9999	0	-0,1	220,0001	0	0,1	
2	109,9999	0	-0,1	220,0001	0	0,1	
3	109,9999	0	-0,1	220,0002	0	0,2	
4	110,0000	0	0,0	220,0002	0	0,2	
5	110,0000	0	0,0	220,0001	0	0,1	
6	109,9999	0	-0,1	220,0002	0	0,2	
7	109,9999	0	-0,1	220,0001	0	0,1	
8	109,9999	0	-0,1	220,0002	0	0,2	
9	110,0000	0	0,0	220,0002	0	0,2	
10	109,9999	0	-0,1	220,0001	0	0,1	
$\Delta E_{\max}$ [mg]			0,1	$\Delta E_{\max}$ [mg]			0,1
emp [mg]			2	emp [mg]			3

ENSAYO DE EXCENTRICIDAD



N°	Determinación del Eo				Determinación del Error corregido Ec				
	Carga [g]	I [g]	ΔL [mg]	E [mg]	Carga [g]	I [g]	ΔL [mg]	E [mg]	Ec [mg]
1	0,0010	0,0010	0	0,0	70,0000	70,0000	0	0,0	0,0
2		0,0010	0	0,0		70,0000	0	0,0	0,0
3		0,0010	0	0,0		70,0000	0	0,0	0,0
4		0,0010	0	0,0		70,0002	0	0,2	0,2
5		0,0010	0	0,0		70,0000	0	0,0	0,0
emp ± [mg]									2

QUÍMICA SUIZA INDUSTRIAL DEL PERÚ SA

El contenido de este documento sólo puede publicarse o reproducirse de forma completa
Química Suiza Industrial del Perú SA - Servicio y Atención Técnica en Calibraciones
Telf.: 710-4000 Anexo 2541
e-mail: satcalibracion@qsiindustrial.biz

Página 2 de 3

F-SATC-46
v.03

REPORTE DE SERVICIO TÉCNICO



Servicio Técnico (region):	Tipo de Intervención:	n.º de la Orden:
Pedro Avalos	Preventive Maintenance	WO-01135027
Fecha de aviso:	Fecha de Intervención:	Técnico de Servicio:
17/08/2016	16/08/2016 09:00 AM	Pedro Avalos
Nº Pedido Cliente: 0016/2016	Número Pedido MERCK:	Código FSE:
Responsable de Ventas:	Tag Cliente:	

DIRECCION DE ENVÍO	
Calle:	País: Peru
Ciudad: Arequipa	Código Postal:
Edo./dpto./reg./prov.: Arequipa	

DIRECCION DE LA INTERVENCIÓN	
Compañía: LABORATORIOS NATURALES	Contacto: Erika Talavera Vasquez
Calle: Parque Industrial Río Seco	n.º Teléfono:
Localización: Naturgen	Email: etalavera@laboratoriosportugal.com
Ciudad: Arequipa	Usuario: Erika Talavera Vasquez
Edo./dpto./reg./prov.: Zip:	n.º Teléfono Usuario:
Edificio:	Planta:
Puerta:	

Información del Sistema		
Número de modelo	Número de Serie	Designación
VWRIHITA890-0152	16E18-073	PUMP L2130

REPORTE DE SERVICIO TÉCNICO



Listado de Trabajo

Número Catalogo	Descripción	Cant.	Precio Ud.	Sub Total
VWRI655-1080	PISTON AND DRAIN VALVE SEAL (BLACK)	2.00	PEN 0.00	PEN 0.00
VWRIHITA885-1884-B	PLUNGER SEAL PUMP INERT SHORT	2.00	PEN 0.00	PEN 0.00
VWRIHITA080-3276	PLUNGE TIP SYRINGE 500 UL 1 UNIT	1.00	PEN 0.00	PEN 0.00
VWRI890-3234	DILUTION VALVE SEAL L-2200	1.00	PEN 0.00	PEN 0.00
VWRIHITA890-3243-B	INJECTION VALVE SEAL L-2200 New Version	1.00	PEN 0.00	PEN 0.00
VWRIHITA080-3269	DRAIN TUBE	1.00	PEN 0.00	PEN 0.00
				Gran Total: PEN 0.00

Trabajo a Realizar

mantenimiento preventivo HPLC ELITE 7

Trabajo Realizado

Se encontró el equipo con mensaje de error: WL mechanism error. Éste error fue solucionado al realizar el mantenimiento correspondiente, luego del mantenimiento no se presentó este error, el cual pudo haberse producido por falta de lubricación en los ejes de motor WL y limpieza.

Se encuentra el filtro de entrada con obstrucción, se recomienda su reemplazo P/N:638-1423.

Se observa la válvula de gradiente del canal C no trabaja correctamente, se procedió a colocar Tapón para que no origine acumulación de aire a los otros canales, se requiere reemplazo P/N:890-6502.

Se encontraron las tuberías de acero muy desgastadas, se procedió a cortarlas y adaptarlas adecuadamente, se tuvo que dejar en préstamo 2 ferrules para poder realizar dichas adaptaciones. Se recomienda por tanto reemplazo de los siguientes repuestos: tubería de acero 0.7mm DI P/N:1022203, tuercas de acero P/N:7010-009 (ctd12), ferrules de acero P/N:638-1099 (ctd12), para poder activar posición 3 de columnas en el módulo horno.

Se requiere reemplazo de tubería de unión de segunda cabeza de bomba con válvula de purga P/N:890-1116. Se requiere reemplazo de sello del puerto de inyección, está muy por encima del tiempo de vida útil y se encuentra con desgaste P/N:890-3183.

También se requiere tener en stock Empaquetadura de válvula check P/N:810-1345 (ctd4).

Se observa dañada la tubería de ingreso hacia el canal C, se sugiere reemplazo P/N:890-1215.

REPORTE DE SERVICIO TÉCNICO



Se observa rajada la perilla de válvula de purga, se sugiere reemplazo P/N:890-1106.
En el módulo autosampler se observa dañado los fotosensores de posición de eje z y vial, lo que origina mensajes de error al utilizar las primeras posiciones del rack. Se requiere el reemplazo de éstos fotosensores: P/N:890-6723 y P/N:890-6724. También se observa con ligero desgaste el Photosensor de posición de jeringa P/N:890-6725, por tanto se sugiere tener en stock éste repuesto.
Se observa rajado el pozo de lavado, lo cual origina fugas al realizar los lavados en las inyecciones, se requiere el reemplazo de éste repuesto P/N:890-3297.
Se realizan pruebas de operatividad.
Equipo queda operativo.

Cliente:

Date: 17/08/2016 05:07 PM

Firma de Cliente:



W. G. Placencia
Q.F. Gladis Elina Sosa Tenante
JEFE DE CONTROL DE CALIDAD
C.Q.F.P. N° 07271

Date: 17/08/2016 05:07 PM

Firma del Técnico Servicio:



Date: 17/08/2016 05:07 PM

Merck Millipore is a division of Merck KGaA, Darmstadt, Germany

Software Verification Report

Date: martes, 03 de mayo de 2016 Time: 04:57:26 p.m.
[UTC -05:00:00] Host Name: PCLAB160

Windows User Name : controln Base Revision Number: A.02.01 Product Name : Agilent OpenLAB

Install Type: Agilent OpenLAB Additional Packages: Details

Base Reference File Name : AgilentOpenLAB.xml

Summary :

Overall Evaluation of Installation Check :PASS

File Report Summary

No missing files or invalid files found
No system file difference found

GAC File Report Summary

No missing or invalid GAC files found

Files Registration Report Summary

Not registered files: NONE
No missing registered files found

Registry Report Summary

No Invalid registry entries found

Details

ID	Description
42	Hitachi PM Add-On 1.61
55	Agilent OpenLAB Data Analysis [1.159.23]
64	Shimadzu Nexera/Prominence Driver 1.10 SP1
65	Hitachi LaChrom Add-On
66	Agilent OpenLAB CDS EZChrom ELSD Drivers 1.2 [94]
68	Agilent Classic GC A.04.06 [1.072.0]
70	Waters LC Add-on for EZChrom 4.1.0.0
71	Agilent 35900E Add-on 3.3.1
72	Agilent GC 78xx-5.03.048 68xx-6.23.009
73	Agilent OpenLAB CDS EZChrom LC Drivers A.02.09 [015]
75	Alltech LC Detectors Add-On 4.1.0.0
77	Hitachi LC Add-On 4.69

MERCK

CERTIFICADO DE VERIFICACIÓN

Merck Peruana S.A.

Certifica que el Sistema HPLC:

<i>Tipo</i>	<i>Modelo</i>	<i>N ° Serie</i>
<i>Bomba</i>	<i>CM-5160</i>	<i>1530-013</i>
<i>Inyector Automático</i>	<i>CM-5260</i>	<i>1529-015</i>
<i>Horno</i>	<i>CM-5310</i>	<i>1550-098</i>
<i>Detector UV</i>	<i>CM-5410</i>	<i>1524-074</i>
<i>Software</i>	<i>OpenLab</i>	<i>DEW0325844</i>

Fue verificado teniendo como base de funcionamiento las normas de SOP (Procedimientos Estándar de Operación), encontrándose totalmente de acuerdo con las especificaciones del Fabricante.

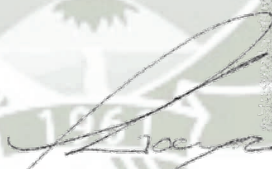
Fecha:

03 Mayo 2016

Certificado valido hasta:

Mayo.2017

Responsable de Verificación



Hebert Loayza Chuquisengo
Jefe de Servicio Técnico
Merck Peruana S.A.

ANEXO N° 10. REGISTRO FOTOGRÁFICO DEL PROCESO DE VALIDACIÓN



**Fotografía N° 1. Comprimidos de
Clorhexidina HCl + Benzocaína
+ Enoxolona en blister: Anverso**



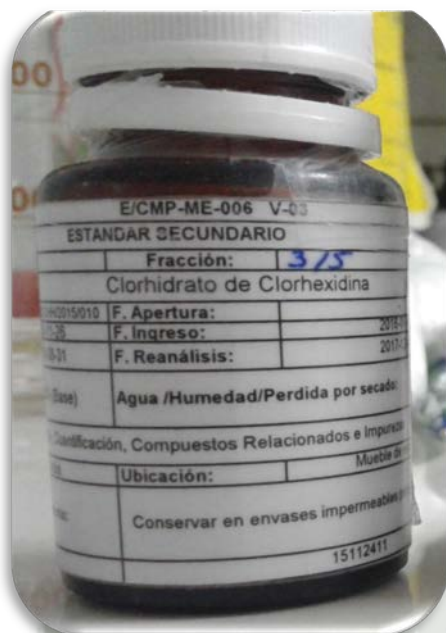
**Fotografía N° 2 Comprimidos
de Clorhexidina HCl +
Benzocaína + Enoxolona en
blister: Reverso**



**Fotografía N° 3. Análisis
organoléptico de los
comprimidos.**



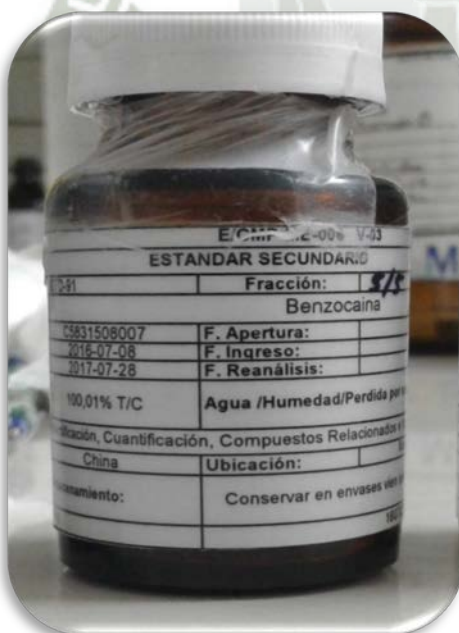
**Fotografía N° 4. Muestra
pulverizada lista para pesar**



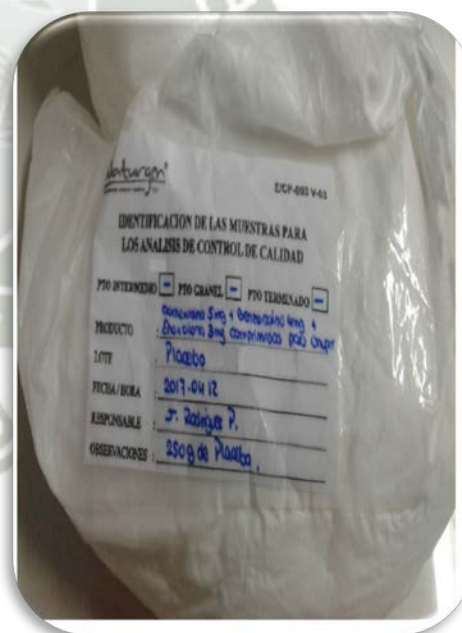
Fotografía N° 5. Estándar secundario de Clorhexidina Clorhidrato



Fotografía N° 6. Estándar secundario de Enoxolona



Fotografía N° 7. Estándar secundario de Benzocaína



Fotografía N° 8. Placebo de Clorhexidina HCl + Benzocaína + Enoxolona



Fotografía N° 9. HPLC Lacrom
elite serie 17e19.043



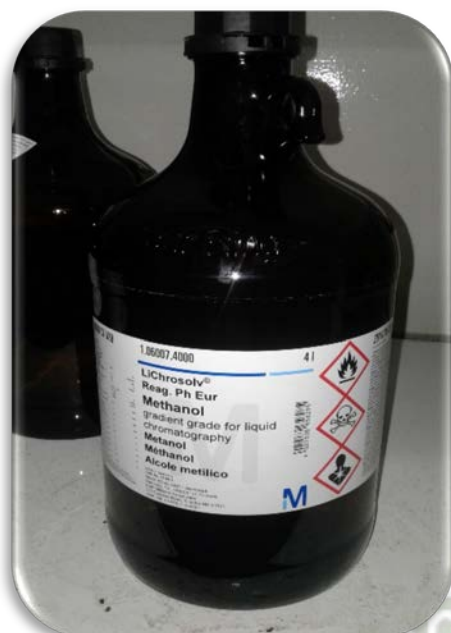
Fotografía N° 10. HPLC Lacrom
Elite Chromaster serie 1524-074



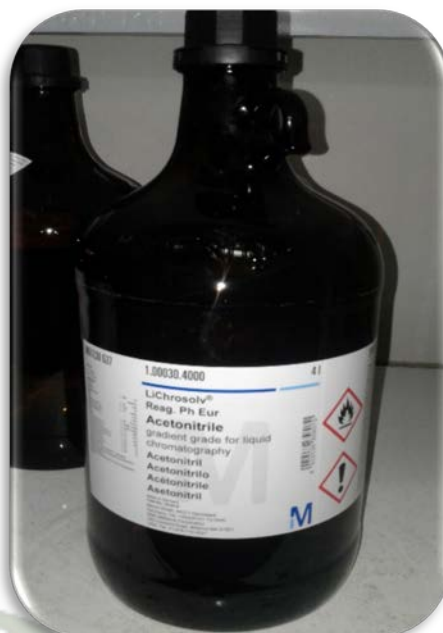
Fotografía N° 11. Balanza analítica
Mettler Toledo



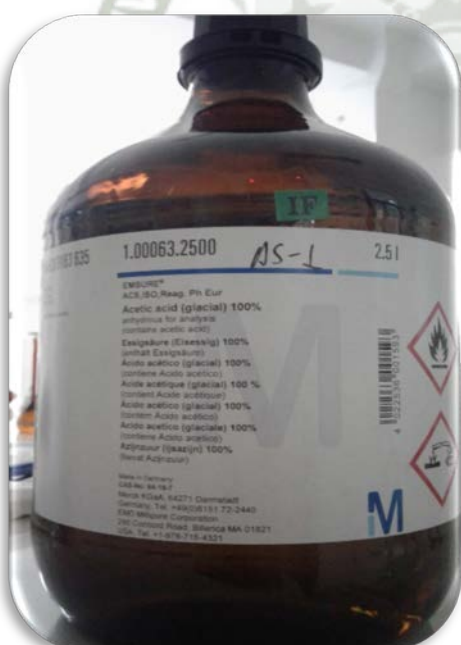
Fotografía N° 12. Columna Luna
Phenyl Hexyl 250 mm X 4.0 mm
(5 μ m).



Fotografía N° 13. Metanol grado HPLC



Fotografía N° 14. Acetonitrilo grado HPLC



Fotografía N° 15. Ácido acético glacial para análisis



Fotografía N° 16. Octanosulfonato de sodio para análisis