

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS,  
BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS**  
**PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE CROMATOGRFÍA  
LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN EN LA DETERMINACIÓN  
DEL DICLOFENACO SÓDICO EN AMPOLLAS**

**Tesis presentada por el Bachiller:**

**CORIPUNA LUQUE ROGERS JACQUOU**

**Para optar el Título Profesional de:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**Asesor: PhD. José Villanueva Salas**

**AREQUIPA - PERÚ**

**2013**

## DEDICATORIA

*A mi Familia y de manera muy especial a mi  
Madre y mi Padre.*



## **AGRADECIMIENTOS**

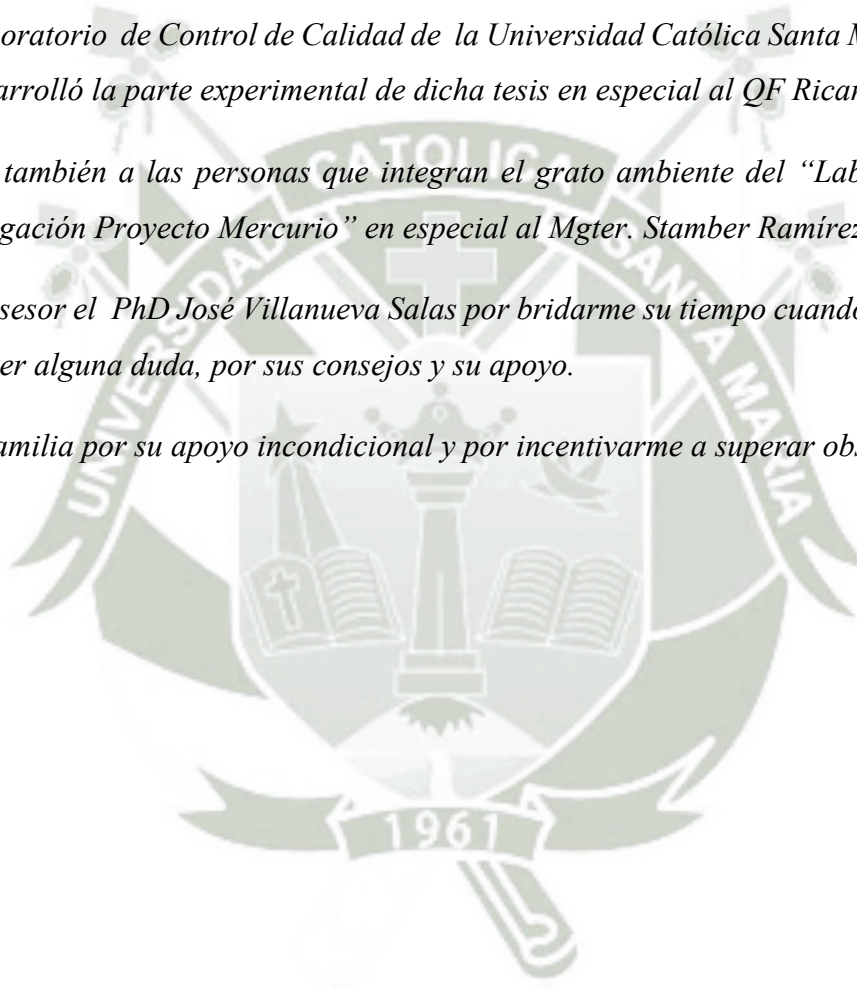
*A la Universidad Católica de Santa María, al Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica y de manera muy especial a sus docentes por la muy buena enseñanza impartida en las aulas y por su apoyo incondicional en mi formación profesional.*

*Al Laboratorio de Control de Calidad de la Universidad Católica Santa María donde se desarrolló la parte experimental de dicha tesis en especial al QF Ricardo Abril .*

*Como también a las personas que integran el grato ambiente del “Laboratorio de investigación Proyecto Mercurio” en especial al Mgter. Stamber Ramírez Revilla.*

*A mi asesor el PhD José Villanueva Salas por brindarme su tiempo cuando necesitaba absolver alguna duda, por sus consejos y su apoyo.*

*A mi familia por su apoyo incondicional y por incentivar-me a superar obstáculos.*



## ÍNDICE

### CAPÍTULO I

RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN .....	9
OBJETIVOS .....	11
HIPÓTESIS.....	12

### CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO.....	13
2.1    DICLOFENACO SÓDICO.....	13
2.1.1    Definición.....	13
2.1.2    Nombre y estructura química .....	13
2.1.3    Síntesis del Diclofenaco .....	14
2.1.4    Mecanismos de acción .....	14
2.1.5    Indicación terapéuticas y usos.....	15
2.1.6    Contraindicaciones.....	16
2.2    CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) .....	16
2.2.1    Concepto .....	16
2.2.2    Aplicación y práctica.....	17
2.2.3    Bases de la separación cromatográfica.....	19
2.2.4    Partes.....	25
2.2.4.1    Fase estacionaria y fase móvil.....	25
2.2.4.2    Bomba .....	27
2.2.4.3    Inyectores .....	28
2.2.4.4    Detectores.....	29
2.2.4.5    Sistemas de toma y procesamiento de datos .....	31
2.2.5    Aptitud del sistema.....	32
2.2.6    Interpretación de cromatogramas .....	32

2.2.7	Calificación del sistema .....	34
2.2.7.1	Calificación del HPLC .....	35
2.2.7.2	Calificación operacional: .....	36
2.2.7.3	Calificación de resolución:.....	36
2.2.7.4	Calibración de equipos.....	37
2.2.7.5	Verificación o comprobación de equipos.....	37
2.3	MÉTODO ANALÍTICO .....	37
2.3.1	Concepto .....	37
2.3.2	Fases en el desarrollo de un método analítico.....	38
2.3.2.1	Definición de las características y requerimientos que debe satisfacer el método analítico:.....	38
2.3.2.2	Puesta a punto del método analítico:.....	38
2.3.2.3	Validación del método analítico:.....	38
2.4	VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO.....	38
2.4.1	Definiciones de validación.....	38
2.4.2	¿Cuándo es necesario validar un método de ensayo?.....	40
2.4.3	Estrategia para la Validación de Métodos.....	41
2.4.4	Tipos de validación .....	43
2.4.4.1	Validación prospectiva.....	43
2.4.4.2	Validación retrospectiva.....	43
2.4.4.3	Revalidación.....	44
2.4.5	Datos requeridos para la validación .....	44
2.4.6	Parámetros analíticos. ....	45
2.4.6.1	Especificidad o selectividad:.....	46
2.4.6.2	Linealidad e intervalo.....	49
2.4.6.3	Precisión:.....	50
2.4.6.4	Exactitud: .....	51
2.4.6.5	Limites .....	52

### CAPÍTULO III

PARTE EXPERIMENTAL .....	56
3.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS: .....	56
3.2 MUESTRA.....	57
3.3 METODOLOGÍA .....	57

3.3.1	Método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	57
3.3.1.1	Condiciones cromatográficas.....	57
3.3.1.2	Preparación de la fase móvil.....	58
3.3.1.3	Preparación de las soluciones de trabajo.....	58
3.4	VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	58
3.4.1	Ensayo de selectividad o especificidad.....	59
3.4.2	Ensayo de linealidad.....	60
3.4.3	Ensayo de precisión.....	61
3.4.4	Ensayo de exactitud.....	62
3.4.5	Ensayo de sensibilidad.....	63
3.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	64

## CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	65
4.1 SELECTIVIDAD.....	65
4.2 LINEALIDAD.....	69
4.3 PRECISIÓN.....	73
4.4 EXACTITUD.....	74
4.5 SENSIBILIDAD.....	76
CONCLUSIONES.....	81
ANEXOS.....	85

## RESUMEN

El procedimiento analítico para la validación del Diclofenaco Sódico en ampollas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se realizó en el Laboratorio de Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María.

Para la validación se evaluaron los parámetros de desempeño de los procedimientos analíticos como son: selectividad, linealidad, exactitud y precisión.

Para dar mayor sustento a ésta validación se realizó también la determinación del límite de cuantificación que dio como resultado **4.458267 ug/mL** lo que nos indica que a esta concentración el analito puede ser detectado por el HPLC y también determinamos el límite de detección que dio como resultado **5.898158 ug/mL**, lo que nos indica que a esta concentración el analito puede ser cuantificado con un grado de confianza previamente establecido (exactitud y precisión) bajo las condiciones experimentales establecidas..

Los resultados de éstos parámetros de desempeño han demostrado que el procedimiento analítico propuesto para la validación del Diclofenaco Sódico en ampollas, es selectivo, lineal, exacto y preciso.

De ésta forma se comprobó que dicho procedimiento analítico ofrece gran confiabilidad para poder ser empleado en los laboratorios de control de calidad.

## ABSTRACT

The analytical procedure for validation of Diclofenac Sodium in ampoules by high performance liquid chromatography (HPLC) was performed in the Quality Control Laboratory of the Catholic University of Santa Maria.

To validate the performance parameters of the analytical procedure were evaluated with selectivity, lineability, exactitude and accuracy.

To give further support to this validation was also performed to determine the LOQ resulting 4.458267 ug / mL which indicates that at this concentration the analyte can be detected by HPLC and determined the detection limit given as result 5.898158 ug / mL, which indicates that at this concentration the analyte can be quantified with a confidence level previously established (accuracy and precision) under the experimental conditions.

The results of this development parameters were evaluated though statistical test, demonstrating that the analytical procedure proposed for the validation of diclofenac sodium in ampoules is selective, lineal, exactly and accurate.

In this form, the fact that this analytical procedure offers reliability to be used in the quality control laboratories was proved

# CAPITULO I

## GENERALIDADES

### INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo se va a estandarizar un método para la validación del Diclofenaco Sódico en ampollas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

Los procedimientos para la evaluación de los niveles de calidad de los fármacos en el país están dados por la Dirección General de Insumos, Medicamentos y Drogas (DIGEMID) a través del Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Farmacéuticos, como instrumento normativo necesario para cautelar la calidad en la fabricación de los productos farmacéuticos. Este organismo gubernamental se rige, a su vez, de reglamentaciones dadas por organismos internacionales reconocidos oficialmente como Food and Drug Administration (FDA), Organización Mundial de la Salud (OMS), Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Conferencia Internacional Tripartita Sobre Armonización (ICH), Farmacopea Europea (BP) y Americana (USP). [9]

Así los métodos y procedimientos de los procesos se optimizan para garantizar un producto de calidad satisfactoria, realizando procedimientos de forma clara y documentada, de ésta manera anular el concepto de error, disminuir la incidencia de repetición de procesos, pérdidas o rechazos y así lograr una reducción de costos, llegar a la mejora continua y competir en el mercado. [1]

El desarrollo y validación de métodos analíticos para productos farmacéuticos es una tarea que se viene realizando en diferentes laboratorios farmacéuticos peruanos en los últimos años, debido a las exigencias de calidad y a la mejora de la productividad.

La validación de los métodos analíticos utilizados en la actividades de control desempeña un papel determinante pues de ellos depende la comprobación confiable y reproducible de los índices de calidad de las materias primas y productos, lo cual

contribuye notablemente al aseguramiento de la calidad seguridad y eficiencia de los mismos. [10]

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la validación como: “El establecimiento de una evidencia documentada, que suministra un alto grado de seguridad, de que un proceso específico elaborará en forma permanente, un producto que cumple unas características y especificaciones de calidad predeterminada”. [21]

El procedimiento analítico será validado tomando en cuenta los parámetros de desempeño analítico de selectividad, linealidad, exactitud, precisión, límites de detección y cuantificación. Todo éste procedimiento se llevará a cabo con el fin de contar con un método confiable e idóneo para el análisis de cuantificación del Diclofenaco Sódico en ampollas que será de utilidad para los laboratorios de control de nuestro medio



## OBJETIVOS

- Desarrollar y validar un método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución para la determinación del Diclofenaco Sódico en ampollas
- Aplicar el método desarrollado y validado a la determinación de Diclofenaco Sódico en un medicamento comercial.



## HIPÓTESIS

Dado que la validación del principio activo para Diclofenaco Sódico en ampollas no se encuentra en la **USP 35 NF 30** es probable que se pueda desarrollar una metodología analítica por Cromatografía Líquida de Alta Resolución y ser validada.



# CAPÍTULO II

## MARCO TEÓRICO

### 2.1 DICLOFENACO SÓDICO

#### 2.1.1 Definición

El **Diclofenaco** (también conocido como **diclofenac**) es un medicamento inhibidor relativamente no selectivo de la ciclooxigenasa y miembro de la familia de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) indicado para reducir inflamaciones y como analgésico, pues reduce dolores causados por heridas menores y dolores tan intensos como los de la artritis. También se puede usar para reducir los cólicos menstruales.

#### 2.1.2 Nombre y estructura química

Nombre Químico: ácido 2-[2-[(2,6-diclorofenil) amino]fenil]acético

Peso Molecular: 296.148 g/mol

Fórmula molecular: C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>

Estructura Química:

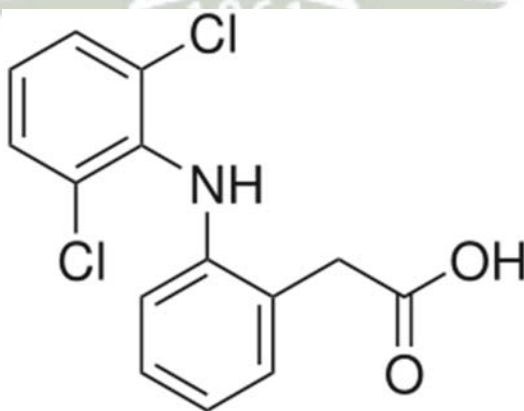


FIGURA N° 1.- Estructura molecular del *DICLOFENACO Sódico*

### 2.1.3 Síntesis del Diclofenaco

#### Método General para la síntesis de Diclofenaco [17]

La síntesis de Diclofenaco requiere el uso de una cadena de *ácido acético* de un *ácido  $\alpha$ -arilacético* que es introducida por *SE Ar* (*Sustitución electrofílica Aromática*).

#### Mecanismo de Reacción

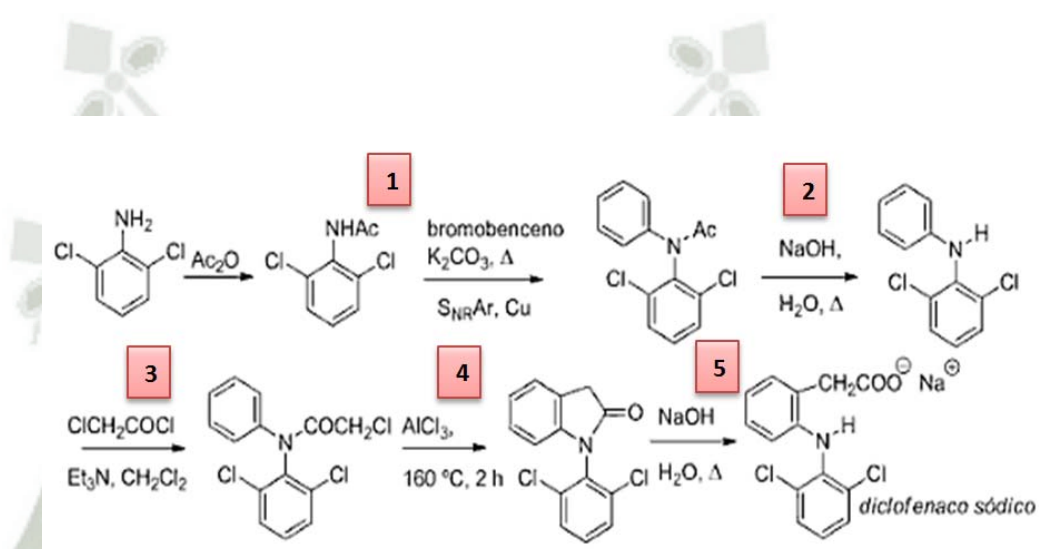


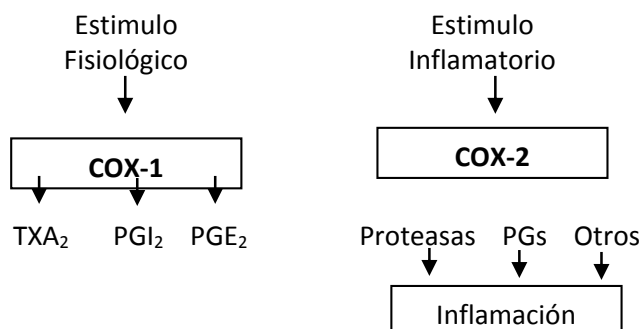
FIGURA N° 2.- Síntesis *DICLOFENACO Sódico*

### 2.1.4 Mecanismos de acción

El mecanismo comúnmente aceptado es la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX) que cataliza el primer paso de la ruta biosintética en la que se generan diversas prostaglandinas y tromboxanos a partir del ácido araquidónico. [17]

Otros factores tales como la inhibición de la migración leucocitaria, la neutralización de los radicales libres son mediados por acción de los AINES.

La acción *analgésica* es debida a la prevención de la acción sensibilizadora de las prostaglandinas sobre los nociceptores, mientras que la acción *antipirética* puede correlacionarse con la inhibición de la síntesis de prostaglandinas.



**FIGURA 3. Acciones de las dos formas de la enzima ciclooxigenasa: COX**

### 2.1.5 Indicación terapéuticas y usos

El Diclofenaco se aplica en el tratamiento de:

Padecimientos músculo-esqueléticos, en especial artritis (artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante).

Ataques de gota.

Manejo del dolor causado por cálculos renales y vesiculares.

Una indicación adicional es el tratamiento de las migrañas agudas.

El Diclofenaco se usa regularmente para tratar el dolor leve a moderado posterior a cirugía o tras un proceso traumático, particularmente cuando hay inflamación presente.

El fármaco es efectivo contra el dolor menstrual.

En supositorios rectales.

El Diclofenaco puede considerarse el medicamento de primera elección para la analgesia preventiva y la náusea posoperatoria..

Existen también presentaciones con licencia venta libre sin receta para emplearse contra dolores leves y fiebre asociada con infecciones comunes.

### 2.1.6 Contraindicaciones

- Hipersensibilidad reconocida al Diclofenaco
- Historia de reacciones alérgicas (broncoespasmo, rinitis, urticaria).
- Tercer trimestre del embarazo
- Ulceración estomacal y/o duodenal activa
- Sangrado gastrointestinal
- Padecimientos inflamatorios intestinales tales como enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa
- Recientemente la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, en inglés) ha advertido no tratar con este fármaco a pacientes convalecientes de cirugía cardíaca.
- Severa insuficiencia hepática (clase C, según la escala Child-Pugh).
- Severa insuficiencia renal (depuración de creatinina < 30 mL/min)
- Cuidado especial se debe tener en pacientes con sangrado severo (como hemorragia cerebral).
- Disfunción eréctil

## 2.2 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

### 2.2.1 Concepto

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), también llamada cromatografía de líquidos de alta resolución, es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. Las separaciones se logran por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada. [23]

Cromatografía líquida de alta resolución es una de las técnicas analíticas más extensamente usada en la industria. Es usada para separar y analizar

componentes a través de la transferencia de masa del analito entre la fase estacionaria y fase móvil.

La técnica de Cromatografía líquida de alta resolución, utiliza una fase móvil líquida para separar los componentes de la mezcla. Los componentes primero son disueltos por sí mismos en un solvente forzado a fluir (vía la fase móvil) a través de una columna (fase estacionaria) bajo alta presión. La mezcla es resuelta en sus componentes dentro de la columna y la cantidad de resolución es dependiente en la interacción entre los componentes del soluto y la fase estacionaria y fase líquida. La interacción del soluto con la fase móvil y estacionaria puede ser manipulada a través de diferentes opciones de ambos, solvente y fase estacionaria.

### **2.2.2 Aplicación y práctica.**

La popularidad de esta metodología se debe a su gran versatilidad, ya que cubre un amplio espectro de aplicaciones, excelente capacidad para el análisis de trazas (en muchos casos ppb), rapidez y adaptabilidad al análisis cuantitativo.

La HPLC se utiliza en casi todos los laboratorios industriales, organismos oficiales, universidades y en todos los laboratorios donde se realicen investigaciones químicas y bioquímicas.

En los años venideros la HPLC continuará jugando un rol predominante en los laboratorios de investigaciones farmacéuticas, de síntesis orgánica, bioquímicos, biológicos, de control de medio ambiente y alimentarios. [23]

Aún por extraño que parezca una de las mayores limitaciones de HPLC es la falta de operadores experimentados. El entrenamiento en técnicas modernas de HPLC en las universidades es escaso, casi nulo. Esto ocurre debido al alto costo de los instrumentos y a que los profesores de otra generación no tuvieron la oportunidad de adquirir experiencia en esta

disciplina, por lo cual el entrenamiento debe recaer o en el fabricante del instrumento o en el químico experimentado en la materia. [25]

La HPLC ha tenido una creciente difusión desde comienzos de la década del 70, y hoy representa una de las herramientas más empleadas en el laboratorio analítico moderno, ya sea esté dedicado a la investigación básica o aplicada, industrial, biológico o bromatológico. [25]

Según define la IUPAC (International Union Of Pure And Applied Chemistry) “La cromatografía es un método, usado primariamente 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 la otra se mueve. [16]

La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel.

La fase estacionaria puede estar extendida como una capa o distribuida como una película, etc. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa”.

Una definición tan general como esta puede sin embargo presentar restricciones, por ejemplo ante el desarrollo en la década del 60 de la Cromatografía de Fluidos Supercríticos (SFC) y la comercialización a partir de 1987 de este tipo de cromatógrafos, en los cuales la fase móvil no es ni un gas ni un líquido, sino un fluido supercrítico. Quizás por ello sea conveniente, sólo relacionar la cromatografía con un método separativo y aceptar la definición de Guiddings: “un método de migración en zonas”, abriendo la mente ante los cambios que continuamente se producen. [23]

La idea de la HPLC misma, siglas que se debieron a “High Pressure Liquid Chromatography” debieron ser cambiadas cuando los cromatografistas se dieron cuenta que la presión sólo constituía una herramienta que forzaba la fase móvil a atravesar la columna, sin constituirse por sí en una variable del sistema. Sin embargo, y ante la

“universalidad” consumada del término “HPLC”, se decidió simplemente buscarle otro significado, resultando “High Resolución Liquid Chromatography” [23]

### 2.2.3 Bases de la separación cromatográfica.

La cromatografía líquida es, como todos los métodos cromatográficos, un método separativo por esencia. Así el lugar donde se produce la separación, la columna, puede ser considerado el corazón del sistema cromatográfico, alrededor del cual se centra todo, ya que alrededor de él se monta un equipo de mayor o menos complejidad. [2,24]

El cromatógrafo líquido básico estará constituido por:

- Un reservorio de solvente que alimenta al sistema con la fase móvil.
- Un sistema que permite la introducción de la muestra: el inyector.
- Un sistema para forzar el pasaje de la muestra y la fase móvil a través de la columna: la bomba.
- Un sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna. El detector.
- Un sistema de registro de los datos provenientes del detector. La señal del detector puede ser análoga y puede ser utilizada tal cual por un registrador gráfico o por un integrador, o digitalizada, para que pueda ser interpretada y procesada por un
- Computador.

Una vez realizado el análisis cromatográfico se obtienen 2 productos:

1. Un gráfico, el cromatograma, que relaciona la concentración de soluto en función del tiempo (de elusión).
2. Un eluido o eluato, el líquido proveniente de la columna que, de recolectarse en forma secuencial o escalonada (manualmente o con un colector de fracciones), contiene la fase móvil, e idealmente los componentes de la muestra separados. [24]

Cuando la muestra y la fase móvil son forzadas a atravesar la fase estacionaria, entran en juego distintos tipos de interacción entre cada uno de los componentes. Interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones dipolares y electroestáticas, son las responsables de la mayor o menos afinidad de cada uno de los componentes de la muestra por la fase móvil o la fase estacionaria. Así el componente más afín a la fase estacionaria se retiene más y tarda más en eluir (es decir, en salir de la columna) y el más afín a la fase móvil se retiene menos y eluye antes. [2,23]

### **Fundamento de separación**

Entre las características de la separación la resolución es la de mayor importancia. En consecuencia será la ecuación de la resolución la que se tomará como punto de partida:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{k'}{k'+1} \right) (\alpha - 1)$$

donde  $k'$  es el factor de capacidad,  $N$  el número de platos teóricos de la columna y  $\alpha$  el factor de separación. La ecuación nos muestra la relación fundamental de la cromatografía de líquidos puesto que resume las variables de la separación en tres grupos: retención ( $k'$ ), eficacia de la columna ( $N$ ) y selectividad ( $\alpha$ ).

Cambiando las condiciones de separación, por ejemplo haciendo  $k'$  más pequeño la resolución disminuirá y aumentando el valor de  $k'$  la resolución mejorará.

Cuando se aumenta  $\alpha$ , los tiempos de retención de dos picos consecutivos pueden cambiar de forma distinta aumentando, en cualquier caso, la resolución. Cuando se aumenta la eficacia de la columna, los picos serán más estrechos y la resolución entre ellos será, por tanto, mayor. Por una parte, los valores de  $k'$  y  $\alpha$  serán función de los siguientes factores que regulan el equilibrio de los analitos entre la fase estacionaria y la fase móvil:

- Componentes de la fase móvil
- Componentes de la fase estacionaria
- Temperatura

Por otra parte, los valores de  $N$  dependen de las condiciones de la columna:

- Velocidad de flujo
- Longitud de columna
- Tamaño de partícula

#### A. **Variabilidad de la retención ( $k'$ )**

La influencia de la fuerza del disolvente es muy importante: mientras que los disolventes fuertes disminuyen la retención, los disolventes débiles ayudan a la retención. Para formar la fase móvil se utilizará como mínimo una mezcla de dos disolventes (A y B) siendo la fuerza de B mayor que la de A.

No solo hay que tener en cuenta la fuerza del disolvente con respecto a su influencia sobre %B sino que también tiene su importancia el tipo de disolvente utilizado. Los disolventes más utilizados son el

acetonitrilo, el metanol y el tetrahidrofurano (THF). Entre ellos la sucesión en función de su fuerza es la siguiente:

Agua (el más débil) < metanol < acetonitrilo < etanol  
< tetrahidrofurano < propanol < cloruro de metileno (el más fuerte)

#### B. **Variabilidad de la selectividad**

Una vez de que hemos fijado la elución de los analitos en el intervalo  $k'$  hay que adecuar la separación entre los picos con el fin de obtener una elución lo más selectiva posible. Eso conlleva la optimización de  $\alpha$  lo que, como antes se ha dicho, se puede llevar a cabo por medio de cambios en la fase móvil, el empaquetamiento de la columna y/o la temperatura. De las opciones anteriormente citadas el cambio en la fase móvil es la que parece más simple y esto se puede llevar a cabo de dos formas: cambiando la fuerza del disolvente y cambiando el tipo de disolvente

En cuanto a las características de la fase móvil, una de las que tienen más importancia es la polaridad. Por medio de la polaridad se pueden predecir las interacciones que los analitos pueden tener con la fase móvil, el disolvente y/o la fase estacionaria. Es decir, cuando se aumenta la polaridad las interacciones son más fuertes.

#### C. **Eficacia de la columna**

Las columnas para HPLC son tubos de acero inoxidable o plástico que poseen una longitud de 5-30 cm y un diámetro interno de 1-5 mm. La tendencia de hoy en día es utilizar columnas cada vez más pequeñas (3-5 cm) y de diámetro interno también cada vez más pequeño (1-2 mm) para de esta forma hacer los tiempos de análisis más cortos. Las columnas capilares (diámetros internos de 180-300  $\mu\text{m}$ ) están obteniendo cada vez más fama puesto que reducen el tiempo de análisis y ahorran disolvente. Las columnas son caras y con el material particulado (suciedad) del disolvente o la muestra se

pueden degradar fácilmente. En consecuencia, por delante de la columna se coloca una precolumna o una columna pequeña de protección. La precolumna es una columna corta del mismo material que la columna analítica. Puesto que los solutos y partículas finas quedan totalmente pegados, esa precolumna habrá que cambiarla frecuentemente. Los soportes de las fases estacionarias de la HPLC son partículas de sílice. En el mercado se pueden encontrar sílices de distinto tamaño de partícula, distinta superficie externa y distinto tamaño de poro. Las partículas pueden ser esféricas o irregulares. Las columnas llenas de partículas irregulares tienen una menor eficacia pero son más baratas y se utilizan en cromatografías de pretratamiento. Puesto que por encima de valores de  $\text{pH} = 8$  la sílice es soluble en agua, no se puede trabajar por encima de ese  $\text{pH}$ . Ya hay algunos tipos de sílice aptos para ser utilizados en el intervalo de  $\text{pH} 9-10$  y para cromatografiar compuestos básicos en el intervalo de  $\text{pH} 8-12$  utilizando soportes poliméricos del tipo del poliestireno. En función de la fase estacionaria, la cromatografía de líquidos se puede clasificar, entre otras, en cromatografía de adsorción, de intercambio de iones, de exclusión por tamaño de partícula y cromatografía de afinidad.

#### D. **Características de la fase estacionaria**

El empaquetamiento de la columna tiene su efecto directo en la separación entre los picos. De todas formas, no es muy conveniente mezclar empaquetamientos diferentes en la misma columna aunque se puedan unir unos con otros. En consecuencia, el cambio de la columna trae un cambio simultáneo de la selectividad a diferencia del cambio de la fase móvil. Ese acontecimiento es el que limita la habilidad de la columna para ajustar la separación de muchos componentes. En consecuencia, el cambiar la columna acarrea un readecuamiento de la fase móvil para poder llevar a cabo la separación.

La mayoría de las columnas de la HPLC tienen una fase estacionaria enlazada, es decir, superficies de partículas de sílica con capas orgánicas de revestimiento unidas por enlaces covalentes.

E. **Influencia de la eficacia de la columna**

Una vez de que se han ajustado las variables analizadas en los apartados anteriores cabe esperar que se obtenga una separación adecuada. De todas formas, como ha quedado demostrado en la ecuación si se aumenta  $N$ , manteniendo  $\alpha$  y  $k'$  constantes aumenta la resolución de los compuestos. En consecuencia, una vez ajustados  $\alpha$  y  $k'$  se puede pensar en ajustar el valor de  $N$  bien para aumenta la resolución o si ésta fuera muy grande ( $R_s > > 2$ ) para acortar los tiempo de elución de la separación. Igualmente, se producirá un aumento del número de platos teóricos en las siguientes condiciones:

- Con un empaquetamiento adecuado de la columna
- Con columnas más largas
- Con flujos bajos (no demasiado bajos)
- Con empaquetamientos de partículas más pequeñas
- Minimizando cualquier efecto exterior sobre la columna

El tamaño de partícula normal para la HPLC es de 3-20  $\mu\text{m}$ . Al disminuir el tamaño de partícula los picos son más estrechos y la resolución aumenta. Al disminuir el tamaño de partícula, disminuye la altura de los platos aunque se aumente el flujo

F. **Efecto de la temperatura**

Calentando las columnas cromatográficas, en general, disminuye la viscosidad del disolvente y las presiones necesarias para conseguir

flujos más rápidos son menores. Al aumentar la temperatura, disminuyen los tiempos de retención y se mejora la resolución puesto que aumenta la velocidad de difusión del soluto. Por el contrario, el aumento de la temperatura puede disminuir la vida de la columna. Si no se controla, la temperatura puede cambiar con las condiciones del medio. Manteniendo el horno a una temperatura un grado superior a la del ambiente se puede mejorar la repetitividad de los tiempos de retención así como la exactitud del análisis cuantitativo.

Es conocido que si se aumenta 1 °C de la temperatura la retención ( $k'$ ) disminuye en 1 o 2 %. Los cambios en el factor de capacidad pueden tener también su efecto en la selectividad, por lo que la temperatura es un factor a tener en cuenta para ajustar la resolución y la separación. Tomar la temperatura como variable influyente tiene una consecuencia directa: es muy fácil de controlar y no implica cambiar la columna y la fase móvil.

## 2.2.4 Partes

### 2.2.4.1 Fase estacionaria y fase móvil.

Para la mayoría de los análisis farmacéuticos, la separación se logra por la partición de los compuestos presentes en la solución de prueba entre la fase móvil y la estacionaria. [23]

Los sistemas que constan de fases estacionarias polares y fases móviles no polares se describen como de fase normal, mientras que, por el contrario, cuando se emplean fases móviles polares y fases estacionarias no polares se denomina cromatografía en fase reversa. La cromatografía de partición se emplea para compuestos solubles en hidrocarburos de peso molecular menor de 1000. La afinidad de un compuesto por la fase estacionaria, y por consiguiente su tiempo de retención en la columna se controla mediante una fase móvil más o menos polar. La polaridad de la

fase móvil puede variar mediante el agregado de un segundo y, a veces, un tercer o hasta un cuarto componente. [2,23,25]

Las columnas para cromatografía de líquidos se construyen normalmente con tubos de acero inoxidable de diámetro interno uniforme, tienen una longitud entre 10 y 30 cm. Por lo común, las columnas son rectas y se pueden alargar, si es necesario, acoplando dos o más columnas. El diámetro interno de las columnas es a menudo de 4 a 10 mm; y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son de 3,5 a 10  $\mu\text{m}$  de formas irregulares o esféricas. [2]

Las fases estacionarias para la moderna cromatografía de líquidos de fase reversa constan normalmente de una fase orgánica químicamente unida a sílice u otros materiales. La sílice o también llamado silicagel es un sólido amorfo y poroso de gran área superficial (30 a 500  $\text{m}^2$ ) y alto volumen de poro (0,4 a 1,2  $\text{mL/g}$ ), químicamente es un óxido de silicio hidratado ( $\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), sus átomos internos ligados por  $\text{O}_2$  y los superficiales por OH. [2]

La partícula de la fase ligada está compuesta por un material de base: silicagel, alúmina, agarosa, copolímero de estireno, que se unen químicamente a un compuesto con un grupo funcional determinado. La unión más frecuente es la de silicagel por medio de una unión covalente tipo siloxano Si-O-R. [2]

Las partículas pequeñas recubiertas con una capa delgada de fase orgánica proporcionan una baja resistencia a la transferencia de masa y, por lo tanto, se obtiene una transferencia rápida de los compuestos entre la fase estacionaria y la móvil. La polaridad de la columna depende de la polaridad de los grupos funcionales unidos, que varía desde el octadecilsilano, relativamente no polar a grupos nitrilos muy polares. [2,23]

Las fases estacionarias líquidas no unidas deben ser en gran medida inmiscibles con la fase móvil. Aun así, generalmente es necesario saturar previamente la fase móvil con la fase estacionaria para impedir la redisolución de la fase estacionaria de la columna. Las fases estacionarias poliméricas recubiertas sobre el soporte son más duraderas. [23]

Las columnas pueden calentarse para proporcionar separaciones más eficaces pero rara vez se las utiliza a temperaturas por encima de los 60° C, debido a la potencial degradación de la fase estacionaria o la volatilidad de la fase móvil. [25]

#### 2.2.4.2 Bomba

Los sistemas de bombeo de HPLC administran cantidades exactas de fase móvil desde los recipientes hasta la columna mediante una tubería y uniones adecuadas para altas presiones. [23]

Existen 3 tipos de bombas, cada una con sus propias ventajas y desventajas: bombas recíprocas, bombas de jeringa o desplazamiento y bombas neumáticas o de presión constante. [2.23]

#### Características de las bombas

- **Caudal.** Los equipos convencionales operan con caudales entre 0.1 y 10.0 mL/min y trabajan con presiones de hasta 6000 psi. [23]
- **Exactitud en el caudal.** La exactitud en la medición del caudal se refiere a la divergencia entre el caudal de trabajo establecido y el caudal real entregado. La importancia en la exactitud del caudal reside en la importancia que pueda darse a la exactitud en la determinación de los tiempos de retención de las sustancias a cuantificar. [23]
- **Ruido.** El ruido se refiere a las variaciones denominadas pulsaciones que presentan las bombas recíprocas, y que conducen a variaciones en el caudal de solventes entregado en intervalos cortos

de tiempo. A pesar de que cierto nivel de ruido es habitual, deficiencias en el sistema de bombeo como válvulas tapadas, burbujas de aire ocluidas en los cabezales o sellos en mal estado intensifican notoriamente su valor. Este parámetro es de importancia crucial para asegurar resultados cuantitativamente válidos debido a que las áreas de los picos de HPLC varían cuando varía el caudal de solvente. [23]

- **Deriva.** La deriva es un cambio continuo (positivo o negativo) en la entrega de solvente que se produce en intervalos de tiempo muy largos. La deriva en el caudal conduce a diferencias en las áreas de los picos durante operaciones automáticas en períodos largos (por ejemplo toda la noche) [23]
- **Sistema de corte.** Es conveniente que la bomba posea sistemas de corte de caudal cuando se superan valores límites de presión tanto superior como inferior. Este sistema de corte evita, que excesos en la presión del sistema cromatográfico pueda dañar los componentes más sensibles como columnas y celda de los detectores. También permite detectar posibles pérdidas de solvente o la incorporación de burbujas de aire al agotarse la fase móvil. [23]

#### 2.2.4.3 Inyectores

Después de ser disueltos en la fase móvil u otra solución apropiada, los compuestos que se van a cromatografiar se inyectan en la fase móvil, ya sean manualmente usando jeringas o inyectores de espiral o bien automáticamente mediante el uso de inyectores automáticos. [2,24] Estos últimos constan de un carrusel o una gradilla para sostener los viales de muestra cuya parte superior se encuentra tapada con un septo o un perforable y un dispositivo de inyección para transferir las muestras desde los viales a un espiral conectado al cromatógrafo. [24]

Los inyectores automáticos pueden programarse para controlar el volumen de muestreo, el número de inyecciones, y los ciclos de enjuague del espiral, el intervalo entre las inyecciones y otras variables operativas. [25]

El inyector debe reunir una serie de características importantes, entre ellas:

- Debe ser fácil de operar.
- Debe ser inerte al ataque químico y capaz de soportar altas presiones.
- Debe ser preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida en el sistema.
- No debe provocar diluciones importantes de la solución inyectada.

[23]

#### **2.2.4.4 Detectores**

La mayoría de métodos de HPLC usados actualmente requieren del uso de detectores espectrofotométricos. Este tipo de detector consta de una celda de flujo colocada en el extremo de la columna. Un haz de radiación UV pasa a través de la celda de flujo y se introduce en el detector. A medida que los compuestos eluyan de la columna, pasan a través de la celda y absorben la radiación lo que da lugar a cambios cuantificables en el nivel de energía. [25]

Existen detectores de longitud de onda fija, variable y múltiple; siendo el más utilizado los detectores de longitud de onda variable, porque permiten seleccionar libremente la longitud de onda de trabajo, escogiendo la mayor absorción del analito. Para la investigación de desarrollo de técnicas analíticas se recomienda utilizar el detector de arreglo de diodos que emplea un conjunto de fotodiodos, para conseguir

la luz transmitida en todo el espectro de absorción del eluido en tiempo real. [2,23,25]

Los detectores de longitud de onda variable contienen una fuente de luz continua, como una lámpara de deuterio o de xenón de alta presión y un monocromador o un filtro de interferencia para generar radiación monocromática a una longitud de onda seleccionada por el operador. [23]

Los detectores nos permiten ver y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica. [2,25]

Los detectores deben reunir ciertas características importantes, entre ellas:

- **Poseer una respuesta lineal.** El detector debe medir alguna propiedad lineal del analito que se incremente linealmente al aumentar su concentración. Se denomina rango lineal de un detector al rango de concentraciones que produce una respuesta lineal. [2]
- **Responder a todos los solutos.** La situación ideal es, obviamente, que el detector responda a todo tipo de solutos, pero esto no siempre es posible en HPLC debido a que para la detección deben obtenerse instrumentos capaces de medir una propiedad diferencial entre un líquido (la fase móvil) y un sólido (los analitos disueltos). [2]
- **Tener la sensibilidad apropiada.** Habitualmente esta propiedad se contrapone con la universalidad de detección. Es decir que detectores que responden a todos los analitos en general poseen sensibilidades menores, y en contrapartida, detectores que poseen una alta sensibilidad no responden a todos los solutos. [2,23]

- **No afectarse por cambios de temperatura.** En lo posible los cambios de temperatura no deben modificar la señal emitida por los detectores. [23]
- **Poseer una buena relación señal/ruido.** El ruido de un detector es la máxima amplitud de la combinación de los términos de ruido largos y cortos en un período de tiempo dado. Estas perturbaciones que se producen en la línea base del detector se deben a la electrónica propia del instrumento, a problemas relacionados con las variaciones de temperatura, oscilaciones de la tensión de la línea eléctrica, o a fluctuaciones en el caudal. [23]
- **No destruir la muestra.** Esta propiedad es una característica de casi todos los detectores de HPLC (una excepción es el electroquímico) y resulta muy importante cuando se desea recolectar al analito aislado. [2,23]

#### 2.2.4.5 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. Se emplean también para programar la cromatografía de líquidos, controlando la mayoría de las variables y proporcionando periodos largos de operación sin necesidad de supervisión. [2,25]

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. [23]

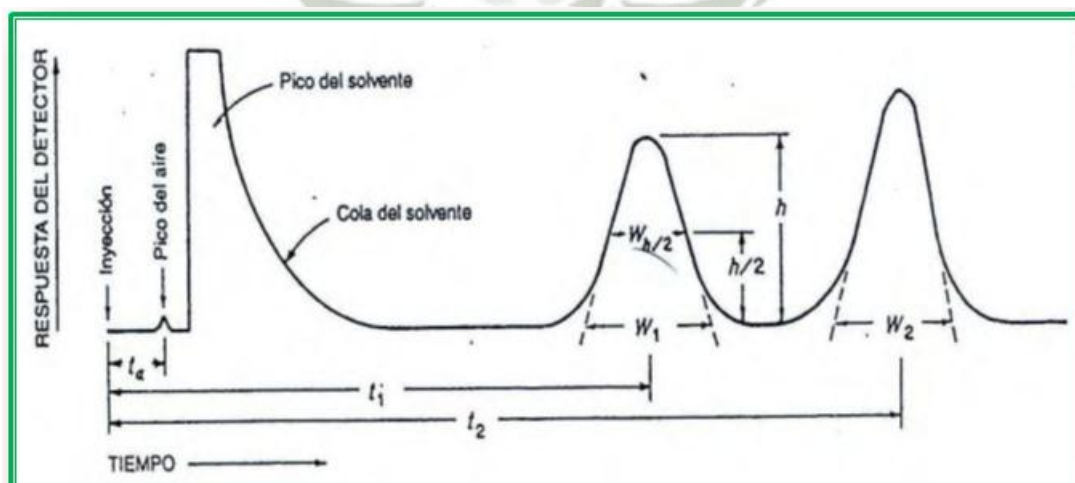
Este registro y la eventual manipulación se obtienen a partir de la señal proveniente del detector por medio de un sistema de toma y procesamiento de datos, entre los que podemos citar:

- **Registrador gráfico**, que convierte la señal en un gráfico del tipo X-Y.
- **Integrador**, que permiten no sólo 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. [23,25]

### 2.2.5 Aptitud del sistema

Las pruebas de aptitud del sistema son una parte integral de los métodos de cromatografía de líquidos. Se emplean para verificar que la sensibilidad de detección, la resolución y la reproducibilidad del sistema cromatográfico, son adecuadas para el análisis que se va a realizar. Las pruebas se basan en el concepto de que el equipo, los componentes electrónicos, las operaciones analíticas y las muestras que deben analizarse constituyen un sistema integral que pueden evaluarse como tal. [28]

### 2.2.6 Interpretación de cromatogramas



Fuente: USP 32

**FIGURA 4.** Separación cromatográfica de dos sustancias.

La figura 4 representa una separación cromatográfica típica de dos sustancias, 1 y 2, donde  $t_1$  y  $t_2$  son los tiempos de retención respectivos,  $h$ ,  $h/2$ , y  $W$   $h/2$  son la altura, la mitad de la altura y el ancho a la altura media, respectivamente,  $W_1$  y  $W_2$  son los anchos respectivos de los picos 1 y 2 en la línea base. Los picos de aire son una característica de los cromatogramas de gases y corresponden al frente de la fase móvil en la cromatografía de líquidos. [28]

Los tiempos de retención cromatográficos son característicos de los compuestos que representan pero no son únicos. [26,28]

La cantidad de platos teóricos ( $N$ ) es una medida de la eficiencia de la columna. Para los picos gaussianos se calcula por las ecuaciones:

$$N = 16 (t / W)^2 \quad \text{o} \quad N = 5.54 (t / wh/2)^2$$

En donde  $t$  es el tiempo de retención de la sustancia y  $W$  es el ancho del pico de su base, obtenidos al extrapolar los lados relativamente rectos del pico hasta la base.  $Wh/2$  es el ancho del pico a la mitad de la altura, obtenido directamente por integradores electrónicos. El valor de  $N$  depende de la sustancia cromatografiada así como de las condiciones operativas, como por ejemplo la fase móvil, la velocidad del flujo y la temperatura del gas transportador, la calidad del relleno, la uniformidad del relleno dentro de la columna y para, las columnas capilares, el espesor de la película en fase estacionaria, el diámetro interno y la longitud de la columna. [28]

La separación de dos componentes en una mezcla, la resolución,  $R$  está determinada por la ecuación:

$$R = 2 (t_2 - t_1) / w_2 + w_1$$

En donde  $t_2$  y  $t_1$  son los tiempos de retención de los 2 componentes, y  $w_2$  y  $w_1$  son los anchos correspondientes en las bases de los picos obtenidos al extrapolar los lados relativamente rectos de los picos hasta la línea base. [28]

El área del pico y la altura del pico son generalmente proporcionales a la cantidad de compuesto eluido. Estos se miden generalmente mediante integradores electrónicos pero se pueden determinar mediante enfoques más clásicos. En general, se emplean las áreas de los picos pero pueden ser menos exactas si se producen interferencias.

Para lograr un trabajo cuantitativo exacto, los componentes que se han de medir deben separarse de cualquier componente interferente. Se deben de evitar las asimetrías tanto en la parte anterior como en la posterior del pico y la medición de picos dentro de las colas de los disolventes. [26,28]

### **2.2.7 Calificación del sistema**

La calificación es la ejecución de pruebas para determinar si un componente de un proceso posee los atributos requeridos para trabajar correctamente y conducir verdaderamente a los resultados esperados. El significado de validación a veces se extiende para incorporar el concepto de calificación. [28]

La calificación del sistema es una premisa necesaria para poder validar. [3]

Para llevar a cabo la calificación se procede a la calibración del equipo y a la comprobación de métodos y sistemas. [9,26,28]

Las etapas de la calificación son:

**A. Calificación del diseño (DQ).**- Establecer y proveer evidencia documentaria que las premisas, los sistemas auxiliares, equipos y procesos han sido diseñados de acuerdo a los requerimientos de las Buenas Prácticas de Manufactura. [28]

**B. Calificación de la Instalación (IQ).**- Establecer con evidencia objetiva que todos los aspectos claves del proceso del equipo y sistemas auxiliares de la instalación se adhieren a la especificación aprobada del fabricante y que las recomendaciones del proveedor del equipo están consideradas convenientemente. [28]

**C. Calificación operacional (OQ).**- Establecer por límites objetivos del control del proceso de evidencia y niveles de acción que tienen como resultado al producto que reúne todos los requisitos predeterminados. [28]

**D. Calificación del Resolución (PQ).**- Establecer por evidencia objetiva que el proceso, bajo condiciones anticipadas, produce constantemente un producto que reúne todos los requisitos predeterminados. [28]

#### 2.2.7.1 Calificación del HPLC

- Calificación de Instalación:
- Pueden considerarse los siguientes datos:
- Nombre del equipo.
- Nombre del fabricante, modelo o tipo.
- Número de serie.
- Fecha en la que fue recibido.
- Condiciones en la que fue recibido (nuevo o usado).
- Fecha en la que el equipo fue puesto en servicio por el laboratorio (localización del equipo en el laboratorio).
- Instructivo de operación.

- Instructivo de mantenimiento

### 2.2.7.2 Calificación operacional:

Debe ser realizado por un técnico calificado.

**TABLA N° 1**

### PARÁMETROS A EVALUAR EN UN SISTEMA HPLC<sup>25</sup>

Módulo	Parámetro	Importante para:
Bomba	Reproducibilidad de flujo Precisión de gradiente	Reproducibilidad/RT/A/H
Inyector	Reproducibilidad Residuo de muestra	Precisión de resultados Exactitud de precisión de resultados
Horno	Reproducibilidad de T°	RT/A/H/forma de pico
Detector	Ruido Energía de Lámpara Relación señal/ruido Precisión de longitud de onda Linealidad	Sensibilidad Sensibilidad Sensibilidad Sensibilidad, Transferencia de resultados Precisión de resultados
Columna mas sistema completo	Forma de pico Asimetría de pico RT, resolución, platos Teóricos	Procesos de datos, identificación, reproducibilidad. Procesos de datos, identificación, Reproducibilidad. Procesos de datos, identificación, Reproducibilidad.

### 2.2.7.3 Calificación de resolución:

Es verificado por el usuario, trabajando con estándares certificados: por ejemplo metilparabeno. [26,28]

#### **2.2.7.4 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. [1,28]

#### **2.2.7.5 Verificación o comprobación de equipos**

Es el examen a un instrumento para verificar el cumplimiento de sus especificaciones.

Por ejemplo para un equipo HPLC puede ser:

- Ruido en la línea base del detector.
  - Precisión en la inyección (automático)
  - Reproducibilidad del tiempo de retención de una bomba, etc.
- [1,26,28]

## **2.3 MÉTODO ANALÍTICO**

### **2.3.1 Concepto**

- El método analítico se refiere a la forma de realizar el análisis. Este debe describir en detalle los pasos necesarios para realizar cada prueba analítica. Esta puede incluir a las preparaciones de la muestra, los estándares de referencia y los reactivos, uso de aparatos, generación de la curva de calibración, uso de la fórmula para los cálculos, etc.; pero no se limita sólo a ello. [7]

### 2.3.2 Fases en el desarrollo de un método analítico

El desarrollo lógico del método analítico transcurre en tres fases:  
[1,7,9,26]

#### 2.3.2.1 Definición de las características y requerimientos que debe satisfacer el método analítico:

Precisión exigible, sensibilidad deseable, grado de selectividad, tiempo, coste, tipo de instrumentación necesaria, etc.

#### 2.3.2.2 Puesta a punto del método analítico:

Desde los primeros estudios de tanteo con patrones hasta la utilización del método en muestras reales, pasando por la definición de los parámetros de idoneidad que garanticen el buen funcionamiento del sistema en el método del análisis.

#### 2.3.2.3 Validación del método analítico:

Esta tercera etapa permitirá conocer la fiabilidad del método para su aplicación rutinaria y, en combinación con las etapas anteriores, sus características de funcionamiento con consecuencias positivas para su rendimiento

## 2.4 VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO

### 2.4.1 Definiciones de validación

El término “validación” apareció oficialmente por primera vez en los años 70. [1]

A continuación se presenta una selección de definiciones:

- Dertinger, Gänshirt, Steinigen (“GAP Praxisgerechtes Arbeiten in pharmazeutische analytischen Laboratories”, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 1984) **“Validación es la prueba**

(evidencia) y la documentación de la confiabilidad de un método”.

- H. Bosshardt, F. Schorderet, H. Feltkamp, P.Fuchs y H. Sucker (Pharmazeutische Qualitätskontrolle, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1983): “Bajo el término validación se comprende **todas aquellas medidas**, pasando por el planteamiento, la ejecución y la documentación, **que demuestran la validez de un método analítico**. Los costos de la comprobación dependen de la metodología, de los equipos y de los requisitos de la calidad de los resultados”.
- Chapmann, 1985: “Validación **no es sino el sentido común natural del hombre bien organizado y bien documentado**”.
- United States Pharmacopeia : “Validación es el **proceso por el cual se muestra, mediante experimentos de laboratorio, que los indicadores de rendimiento (características) de un método satisfacen las exigencias de una aplicación prevista.**”
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), 1995: “El objetivo de la validación de un método analítico es **demostrar que éste es adecuado para la finalidad prevista.**”
- International Organisation of Standardisation ISO 8402, 1994 § 2.18: “**Confirmar** en base a un estudio y mediante la puesta a punto de una prueba objetiva, **que las particulares exigencias para un uso especial previsto han sido satisfechas**” (prueba objetiva: información comprobable basada en hechos/datos generados mediante observación y medición de un ensayo, o por otros medios).
- ISO/IEC 17025:2005, § 5.4.5.1. “Validación es la **confirmación por examinación y la provisión de evidencia objetiva de que los particulares requisitos para un uso previsto son satisfechos**”.

#### 2.4.2 ¿Cuándo es necesario validar un método de ensayo?

Un método de ensayo se valida cuando es necesario verificar que los parámetros ejecutados son los adecuados para resolver un problema analítico en particular. El laboratorio debe validar (Requisito 5.4.5.2 de la Norma NTP ISO/IEC 17025): [1,10,26]

- Los métodos de ensayo no normalizados: Es aquel método de ensayo desarrollado por el propio laboratorio u otras partes no reconocidas. Por ejemplo: métodos de ensayo publicados o recopilados en revistas técnicas o textos; métodos de ensayo de fabricantes de bienes tales como equipos, kits de ensayo, instrumentos portátiles.
- Los métodos de ensayo modificados, ampliados o aplicados a un alcance diferente al originalmente establecido en la norma. (Se considera también un método de ensayo no normalizado)
- Cuando alguna de las condiciones cambia para un método ya validado (por ejemplo: un instrumento con características diferentes, o muestras con diferente matriz).
- Cuando el control de calidad indica que un método establecido cambia con el tiempo
- Cuando un método establecido es usado en un laboratorio diferente, o con diferentes analistas o diferentes instrumentos
- Cuando se desea demostrar la equivalencia entre dos métodos, por ejemplo un nuevo método y uno estándar.

#### **La validación es necesaria porque:**

- Proporciona un alto grado de confianza y seguridad en el método analítico y en la calidad de los resultados.

- Permite un conocimiento profundo de sus características de funcionamiento. [1]

**Este conocimiento y seguridad en el método analítico que ha sido validado se traduce en:**

- Disminución del número de fallos y repeticiones con el consiguiente ahorro de los costes asociados.
- Cumplimiento de los plazos previstos de análisis.
- Optimización del método, por ejemplo, mejorando la característica de practicidad y posibilidades de automatización. [1,26]

**Por otra parte, los métodos analíticos deben validarse para cumplir con las exigencias legales:**

- El borrador de las normas de Buena Fabricación de Medicamentos de la CEE (Comunidad Económica Europea), en el capítulo de control de calidad, indica que los métodos de análisis deben estar validados.
- Las Good Manufacturing Practice de los Estados Unidos indican que deben establecerse y documentarse la exactitud, sensibilidad, especificidad y reproducibilidad de los métodos analíticos utilizados. [1,26,28]

#### **2.4.3 Estrategia para la Validación de Métodos: [15]**

- La validez de un método específico debe ser demostrada en experimentos de laboratorio usando muestras o estándares que son similares a las muestras desconocidas analizadas rutinariamente. La preparación y ejecución debe seguir un protocolo de validación, de preferencia, escrito en un formato instructivo paso a paso. Posibles pasos para una completa validación de un método son los siguientes:

- Desarrollar un protocolo de Validación, un procedimiento operacional, o un plan máster de validación (VMP).
- Para un proyecto específico de validación, definir los responsables y sus tareas.
- Desarrollar un plan del proyecto de validación.
- Definir la aplicación, objetivo y alcance del método.
- Definir los parámetros de desempeño y criterios de aceptación.
- Definir los experimentos de validación.
- Verificar las características de desempeño relevantes de los equipos.
- Calificar a los materiales: estándares y reactivos de pureza, cantidad apropiada, suficiente estabilidad.
- Realizas experimentos de pre-validación.
- Ajustar parámetros del método y/o criterios de aceptación si fuese necesario.
- Desarrollar todos los experimentos de validación.
- Desarrollar los procedimientos operacionales estándar para poder ejecutar el método de forma rutinaria.
- Definir los criterios para re-validación.
- Definir los tipos y frecuencia de las pruebas de idoneidad del sistema, y/o controles de calidad analítica de rutina.
- Documentar los experimentos de la validación y los resultados en un reporte de validación.

- Las características de desempeño del método deben ser basadas en el uso que se le dará a dicho método. No siempre es necesario validar todos los parámetros analíticos que están disponibles para técnicas específicas. Los parámetros iniciales deben ser escogidos de acuerdo a la experiencia del analista y a un buen raciocinio. Los parámetros finales deben concordar entre el laboratorio o el analista que realiza la validación y el laboratorio o individuo que use el método, o la información que se genere del método.

#### **2.4.4 Tipos de validación**

Existen 3 tipos de validaciones, las cuales son:

- Prospectiva
- Retrospectiva
- Revalidaciones

##### **2.4.4.1 Validación prospectiva**

Se realiza cuando la verificación del cumplimiento de las condiciones establecidas para un proceso o método analítico se lleva a cabo antes de la comercialización del producto. Este tipo de validación se aplica cuando se elabora un nuevo método analítico.

Es típico en los laboratorios de investigación y desarrollo, y se realiza de acuerdo con un protocolo perfectamente planificado. Comprende el estudio de todos los criterios necesarios para demostrar el buen funcionamiento del método. [1,11,26]

##### **2.4.4.2 Validación retrospectiva**

Se realiza cuando la idoneidad del método o proceso analítico se basa en la garantía constatada a través de los datos analíticos del producto ya comercializado, se aplica a métodos no validados previamente y de los que se tiene una amplia historia de resultados. [1,11,26]

#### 2.4.4.3 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. [1,4,26]

Entre los motivos que exige una nueva validación tenemos:

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

#### 2.4.5 Datos requeridos para la validación

Los requisitos de las pruebas farmacopeicas varían desde determinaciones analíticas muy rigurosas hasta evaluaciones subjetivas de atributos. Considerando esta amplia variedad es lógico que diferentes procedimientos de prueba requieran diferentes esquemas de validación. [28]

Categorías de prueba más habituales para los que se exige datos de validación. [28]

- **Categoría I:** Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.
- **Categoría II:** Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en de fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos procedimientos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.

- **Categoría III:** Procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño (por ejemplo, disolución, liberación de fármacos)
- **Categoría IV:** Pruebas de Identificación. (Ver Tabla 2)

#### 2.4.6 Parámetros analíticos.

Se evaluará la parte analítica de la validación. Se determinarán los parámetros analíticos estipulados por la Farmacopea Norteamericana USP 32 para la validación de una metodología analítica de un producto farmacéutico, la que recomienda realizar los siguientes parámetros analíticos (categoría I): exactitud, precisión, especificidad y linealidad. Cabe señalar que para hacer más sólida esta validación se realizará límite de detección y límite de cuantificación. [28]

**TABLA N°2**

**PARÁMETROS DE DESEMPEÑO DE LOS PROCEDIMIENTOS  
ANALÍTICOS VALIDABLES [28]**

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO	Categoría I	Categoría II Análisis cuantitativos	Categoría II Pruebas de Límite	Categoría III	Categoría IV
1. Exactitud	Sí	Sí	*	*	No
2. Precisión	Sí	Sí	No	Sí	No
3. Especificidad	Sí	Sí	Sí	*	Sí
4. Límite de detección	No	No	Sí	*	No
5. Límite de cuantificación	No	Sí	No	*	No
6. Linealidad	Sí	Sí	No	*	No
7. Intervalo	Sí	Sí	*	*	No

Fuente: USP 32

\* Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica

#### 2.4.6.1 Especificidad o selectividad:

Es un atributo o propiedad del método por el cual la respuesta obtenida corresponde exclusivamente al compuesto que se desea detectar y cuantificar, sin ninguna interferencia por parte de los demás componentes de la matriz.

Las guías ICH definen especificidad como la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz.

Otras autoridades internacionales de reconocido prestigio (IUPAC, AOAC) han preferido el término “selectividad“, conservando “especificidad” para procedimientos que resulten completamente selectivos. [1,16,26,28]

Consideraremos los términos selectividad y especificidad como equivalentes.

La selectividad es una condición esencial para conseguir una buena exactitud por lo que es, en todos los casos, un criterio clave. Los estudios de selectividad o especificidad varían según el tipo de método analítico:

- Métodos de identificación. La selectividad debe demostrar que el método funciona en presencia de otras sustancias que pueden interferir y aquéllas de composición similar
- Ensayos de pureza. La selectividad debe garantizar que el método analítico permite una evaluación de las impurezas que se pretenden analizar cualitativa o cuantitativamente. Si, por ejemplo, se trata de determinar impurezas o sustancias extrañas por cromatografía en capa fina, hay que demostrar que el método es capaz de separarlas todas de acuerdo a los límites de detección y/o cuantificación establecidos.

- Determinación cuantitativa de un componente. Cuando se determina la riqueza de una materia prima o el contenido en principio activo u otro componente (conservador, antioxidante) en un medicamento, el estudio de selectividad debe asegurar que la señal medida con el método analítico procede únicamente de la sustancia analizada sin interferencia de excipientes, productos de degradación y/o impurezas. [1,23,28]

Los ensayos de degradación artificial descritos permiten no sólo el mejor conocimiento y eventual corrección de la técnica empleada, sino que también orientan al desarrollo de nuevas formulaciones de productos, indicando las condiciones de mayor agresividad, las mejor soportadas por la sustancia, condiciones de almacenamiento, tipo de envase, etc. (pH, labilidad a la hidrólisis, fotólisis, oxidación, etc.). [1,19]

#### **DETERMINACIÓN:**

En una valoración, la demostración de especificidad requiere evidencia de que el procedimiento no resulte afectado por la presencia de impurezas o excipientes. En la práctica, esto puede hacerse agregando al fármaco o producto farmacéutico una cantidad conocida de excipientes o de impurezas en concentraciones adecuadas, y demostrando que el resultado del análisis no ha sido afectado por la presencia de estos materiales extraños. [1,18,20,26]

Como no se cuenta con estándares de impurezas o productos de degradación se llevará a cabo ensayos de degradación artificial, como son:

- Termólisis: producida por calentamiento de la droga a la temperatura fijada (por ejemplo 105°C).
- Hidrólisis a pH neutro, por calentamiento con agua grado HPLC durante una hora.

- Hidrólisis alcalina, por calentamiento con NaOH 0.1N durante una hora.
- Hidrólisis ácida, por calentamiento con HCl 0.1N durante una hora.
- Fotólisis, por exposición de la droga a la luz UV de onda corta.
- Oxidación, por calentamiento en baño maría de una solución de la droga con agua oxigenada o por burbujeo de oxígeno. [1,18,26,28]

Se recomienda que la degradación no sea mayor del 20% de la concentración inicial, de modo que puede ser conveniente repetir alguno de los ensayos empleando condiciones más suaves o bien más enérgicas. [26]

Este análisis debe complementarse con el estudio de la pureza u homogeneidad del pico correspondiente al analito. Este estudio consiste en determinar si existe algún producto correspondiente al del analito y que no alcance a evidenciarse. [1,26,28]

Las guías ICH afirman que cuando se utilizan los procedimientos cromatográficos, deberán presentarse cromatogramas representativos para demostrar el grado de selectividad y los picos deberán identificarse adecuadamente. [26]

Adicionalmente inyectar la solución diluyente (2- Propanol) y la fase móvil.

#### 2.4.6.2 Linealidad e intervalo

- **Definición de linealidad**

Es determinada por la capacidad del método de entregar resultados linealmente proporcionales a la concentración del analito en la muestra. Se evidencia una proporcionalidad directa entre la concentración y la respuesta. [26,28]

- **Definición de intervalo**

El intervalo de un procedimiento analítico es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito (incluyendo estos niveles) en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad. El intervalo se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados de la prueba obtenidos mediante el método analítico (por ejemplo, porcentaje, parte por millón). [26,28]

- **Determinación**

La linealidad debe establecerse en el intervalo completo del procedimiento analítico. Debería establecerse inicialmente mediante examen visual de un gráfico de señales como función de concentración de analito del contenido. Si al parecer existe una relación lineal, los resultados de la prueba deberían establecerse mediante métodos estadísticos adecuados (por ejemplo, mediante el cálculo de una línea de regresión por el método de los cuadrados mínimos). [1,20,26,28]

En algunos casos para obtener la linealidad entre la respuesta de un analito y su concentración, es posible que haya que someter los datos de una prueba a una transformación matemática. Los datos obtenidos a través de la línea de regresión pueden ser útiles para proporcionar estimaciones matemáticas del grado de linealidad. [1,26,28]

Se determinará según recomienda las Guías ICH. Se realizarán un mínimo de 5 concentraciones inyectadas por triplicado dentro del Intervalo de 50-150% de la concentración de prueba. [39]

Es aceptable si esta se encuentra dentro del rango de aceptación, el cual establece que el valor del coeficiente de correlación debe ser mayor de 0,995 y RSD (Desviación Estándar Relativa) menor a 2,0% entre lecturas de cada una de las muestras. [26,28]

#### **2.4.6.3 Precisión:**

Es el grado de dispersión o de concordancia entre resultados individuales, cuando el método de análisis se aplica repetidamente a diferentes muestras. La precisión se puede catalogar de la siguiente manera:

- **Reproducibilidad**

Medida de la precisión de los resultados de un método efectuado sobre la misma muestra, pero en condiciones diferentes (Diferentes laboratorios, diferentes equipos, diferentes analistas). No forma parte de la documentación de la validación del método analítico para la solicitud de autorización de comercialización. [1,18,26,28]

- **Precisión intermedia**

Se refiere al uso de los procedimientos analíticos a diferentes días, es decir variables de laboratorio, tales como cambio de equipos, analistas, etc. [1,18,26,28]

- **Repetibilidad**

Medida de la precisión de un método efectuado en iguales condiciones; igual muestra, igual analista, iguales equipos y reactivos. [1,18,26,28]

- **Determinación**

La precisión de un método analítico se determina mediante el análisis de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea, que permita calcular estadísticamente estimaciones válidas de la desviación estándar o de la desviación estándar relativa (coeficiente de variación). [26,28]

Los análisis de este contexto son análisis independientes de muestras que se han llevado a cabo mediante el procedimiento analítico completo, desde la preparación de las muestras hasta el resultado final de las pruebas.

Las guías ICH recomiendan que se evalúe la repetibilidad del sistema analizando un mínimo de nueve determinaciones a la concentración nominal (concentración final del estándar y de la muestra en la metodología analítica) y la repetibilidad del método analizando un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado para el procedimiento (es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración o un mínimo de seis al 100% de la concentración de prueba). [26]

Límite de aceptación:  $RSD < 2,0\%$ .

#### **2.4.6.4 Exactitud:**

Es la diferencia entre el valor de la concentración considerado como verdadero y el valor experimental, cuando se aplica el método varias veces a diferentes muestras. Matemáticamente se expresa como porcentaje de recuperación. [1,26,28]

La exactitud de un método analítico debe establecerse en todo su intervalo. [19,26]

- **Determinación**

En la valoración de un principio activo en un medicamento, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del método a mezclas sintéticas de los componentes del producto farmacéutico (placebo) al que se hallan añadido cantidades conocidas de analito dentro del intervalo del método. [1,26,28]

Estadísticamente, suele efectuarse un test de “t” de Student para determinar si el valor medio hallado y valor considerado verdadero no difieren significativamente para un grado de probabilidad determinado. [1,26,28]

Los documentos ICH recomiendan que se evalúe la exactitud realizando un mínimo de nueve determinaciones de tres niveles de concentración, cubriendo el intervalo especificado (es decir, tres concentraciones y determinaciones repetidas de cada determinación). [26]

Límites de aceptación: RSD debe ser menor al 2,0% y el porcentaje de recuperación no debe ser menor al 98% ni mayor a 102%, para considerar el método como exacto. [26]

#### **2.4.6.5 Límites**

Es una propiedad del método para presentar un gran cambio en la respuesta cuando se produce un pequeño cambio en la concentración. [1,26]

- **Límite de detección o cantidad mínima detectable**

Hace referencia a la mínima concentración del compuesto en estudio que es posible detectar con certeza pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones experimentales establecidas. [1,18,19,26,28]

El límite de detección, según la IUPAC, es la menor concentración o cantidad de analito detectable con razonable certeza por un procedimiento analítico dado. Es decir, es la cantidad o concentración mínima del analito a partir de la cual es factible realizar el análisis. [16]

Un resultado “positivo” no es suficiente para que el analista considere detectado un analito. Se precisa, además, conocer el límite de detección en las condiciones del método. De lo contrario, se puede incurrir en un falso positivo: suponer el analito presente en la muestra cuando de hecho no lo está. [1,26,28]

El límite de detección es un parámetro analítico de gran interés en análisis de trazas, contaminantes y productos de degradación. [28]

- **Límite de cuantificación o cantidad mínima cuantificable**

Es la concentración más baja de un compuesto presente en una muestra, que puede ser cuantificada con un grado de confianza previamente establecido (exactitud y precisión) bajo las condiciones experimentales establecidas. [1,19,26,28]

El límite de cuantificación es un término cuantitativo (menor cantidad medible) mientras que el límite de detección es cualitativo (menor cantidad detectable). [1]

- **Determinación**

Para el límite de detección, en el caso de procedimientos analíticos instrumentales que presentan ruido de fondo, las guías ICH describen un enfoque usual que consiste en comparar las señales medidas a partir de muestras con bajas concentraciones de analito con las de muestra blanco. Se establece la concentración mínima a la que puede detectarse confiablemente un analito. Las relaciones señal-ruido habitualmente aceptables son de 2:1 ó 3:1. Otros enfoques dependen de la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de las respuestas. [26]

Independientemente del método utilizado, el límite de detección debería validarse posteriormente mediante el análisis de un número adecuado de muestras preparadas al límite de detección o de las que se sabe se encuentran cerca de dicho límite.

Para el límite de cuantificación, en el caso de procedimientos analíticos instrumentales que presentan ruido de fondo, las guías ICH describen un enfoque común que consiste en comparar las señales medidas a partir de muestras con bajas concentraciones conocidas de analito con las de muestra blanco. Se establece la concentración mínima a la que puede cuantificarse confiablemente un analito. Una relación señal-ruido habitualmente aceptable es de 10:1. Otros enfoques dependen de la determinación de la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de la respuesta. Independientemente del método utilizado, el límite de cuantificación debería validarse posteriormente mediante el análisis de un número adecuado de muestras de las que se sepa se encuentran cerca del límite de cuantificación o fueron preparadas a este límite. [26,29]

En éste trabajo de investigación se determinara los límites mediante la curva de calibración, considerando concentraciones bajas de analito, por extrapolación a concentración cero.

- a) Se determina la pendiente de la curva de calibración (concentración vs respuesta) en un rango apropiado: **b**
- b) Se obtiene otra curva de calibración, inyectando por triplicado cada punto, pero en este caso para concentraciones menores de analito, determinándose la ecuación de esta nueva recta de calibración y se extrapola la respuesta a concentración cero, obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco: **Ybl**
- c) Se determina la desviación estándar correspondiente a cada concentración del punto 2, se calcula la recta correspondiente a concentración vs “s” y se extrapola como en el caso anterior la desviación estándar a concentración cero, obteniéndose el estimado **Sbl**, correspondiente a la desviación estándar del blanco.

Se calcula el límite de detección y el Límite de cuantificación para “n” medidas individuales como: [26,29]

$$\text{Límite de detección} = \frac{Y_{bl} + 3 S_{bl}}{b} * \frac{1}{\sqrt{n}}$$

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{Y_{bl} + 10 S_{bl}}{b} * \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Límite de aceptación: sin rango.

## CAPÍTULO III

### PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS:

##### a) Materiales:

- Fiolas de 10, 25, 50 y 100 mL.
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 5 y 10 mL.
- Micropipetas de 200  $\mu$ L y 1000  $\mu$ L.
- Beakers de 50, 100 y 250 mL.
- Equipo de filtración al vacío.
- Matraz Kitasato de 500 mL.
- Jeringas descartables de 3 y 5 mL.
- Papel filtro.
- Membranas filtrantes Millipore Millex de 0.27 y 0.45  $\mu$ m.

##### b) Reactivos

- Estándar: Diclofenaco Sódico (Estandar Secundario).
- Ácido fosfórico 85% (MERCK) P.A.
- Sodio fosfato monoácido de sodio (MERCK) P.A.
- Fosfato bifásico de Sodio (MERCK) P.A.
- Metanol grado HPLC
- NaOH (MERCK) P.A.
- KOH (MERCK) P.A.
- HCl (MERCK) P.A.
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MERCK) P.A.

### c) Equipos

- Balanza analítica (Ohaus Pioneer, serie 8328170085)
- Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) Lachron (L-2000) compuesto de las siguientes partes:
  - ✓ Inyector (Lachron)
  - ✓ Bomba (Lachron- Modelo L-2130)
  - ✓ Columna (MERCK- Lichrospher® 100 RP-18e de 12.5 cm)
  - ✓ Detector DAD: (Lachron-Modelo L-2450)
  - ✓ Software: EZchrom Elite.
- Jeringa de inyección HPLC de 100 uL.
- Baño María (Gemmyco, Serie YCW – 010 E)
- Bomba de Vacío (Cole Parmer, Serie 0310500312)
- El agua utilizada fue de calidad ultrapura (18.2 MΩ) obtenida con un equipo EASY pure II, Barnstead.

## 3.2 MUESTRA

Se utilizaron 20 ampollas de Diclofenaco Sódico en la presentación de 75 mg / 3 mL, procedentes de un Laboratorio Nacional, de diferentes lotes de producción.

## 3.3 METODOLOGÍA

### 3.3.1 Método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

#### 3.3.1.1 Condiciones cromatográficas.

- Equipo: Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC)
- Columna : RP- 18 de 12.5cm
- Sistema : Isocrático
- Longitud de onda : 254 nm
- Temperatura : 20 °C.
- Flujo : 1.0 mL/min
- Volumen de inyección : 20 µL

- Tiempo de retención : aprox 4.3 min.
- Tiempo de corrida : 7 min.

### 3.3.1.2 Preparación de la fase móvil.

**Buffer fosfato pH 2,5:** Mezclar iguales volúmenes de Ácido Fosfórico 0,01 M y Fosfato de Sodio Monobásico 0,01 M y llevarlo a pH 2,5  $\pm$  0,1 con Ácido Fosfórico o Hidróxido de Sodio.

**Fase Móvil:** Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de Metanol y Buffer Fosfato pH 2,5. (70:30).

### 3.3.1.3 Preparación de las soluciones de trabajo

#### A. Preparación del estándar.

Pesar una cantidad equivalente a 50 mg de Diclofenaco Sódico estándar de referencia tal cual, transferirlo a una fiola de 50 mL, adicionar 30 mL de metanol, sonicar para disolver si es necesario y completar a volumen con metanol, mezclar. Filtrar por membrana de nylon 0,2  $\mu$ m de porosidad.

Las concentración será: Diclofenaco Sódico 1000 ug/mL

#### B. Preparación de la muestra.

Transferir 1.0 mL de muestra de cada ampolla de Diclofenaco Sódico a una fiola de 100 mL. Adicionar 50 mL de metanol, sonicar por 10 minutos, enfriar si es necesario, completar a volumen con metanol filtrar a depósitos de vidrio descartando los primeros mililitros. Filtrar por membrana de nylon 0,2  $\mu$ m de porosidad. (Concentración aproximada: 250 ug/mL)

## 3.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

De acuerdo a los criterios mencionados en el punto 2.4.6, se analizarán los siguientes parámetros:

- Selectividad o especificidad.
- Linealidad.
- Precisión.
- Exactitud.
- Sensibilidad.

Todas las determinaciones se realizarán utilizando las condiciones cromatográficas y la fase móvil descrita en 3.3.1.1 y 3.3.1.2 respectivamente.

#### 3.4.1 Ensayo de selectividad o especificidad

Para demostrar que el método propuesto produce una señal medible debida sólo a la presencia del analito, libre de interferencia de otros componentes, se sometió una solución estándar al de Diclofenaco Sódico (al 100 %) a los siguientes procesos de estrés para generar los compuestos potencialmente interferentes:

##### **Preparación del estándar al 100 %:**

Diclofenaco Sódico: Potencia 99.92 %.

Lote: 090812-2

Pesar una cantidad equivalente a 25.00 mg de Diclofenaco Sódico, transferirlo a una fiola de 100 mL, adicionar 60 mL de metanol, sonicar para disolver si es necesario y completar a volumen con metanol, mezclar. Filtrar por membrana de nylon 0,2  $\mu$ m de porosidad. (Concentración final: 250 ug/mL).

- **Hidrólisis ácida:** 5.0 mL de una solución de Diclofenaco Sódico (250 ug/mL) más 5 mL de HCl 0.1N fueron sometidos a temperatura de 80°C por 1 hora.
- **Hidrólisis alcalina:** 5.0 mL de una solución de Diclofenaco Sódico (250 ug/mL) más 5 mL de NaOH 0.1 N fueron sometidos a temperatura de 80 °C por 1 hora.

- **Hidrólisis:** 5.0 mL de una solución de Diclofenaco Sódico (250 ug/mL) más 5 mL de agua fueron sometidos a temperatura de 80 °C por 1 hora.
- **Oxidación:** 5.0 mL de una solución de Diclofenaco Sódico (250 ug/mL) más 5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fueron sometidos a temperatura de 80 °C por 1 hora.
- **Fotólisis:** 5.0 mL de una solución de Diclofenaco Sódico (250 ug/mL) fueron sometidos a luz ultravioleta por 1 hora.

### 3.4.2 Ensayo de linealidad

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta. Además, conjuntamente se determina el rango lineal, es decir, el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de analito para lo cual el método ha sido probado y dentro de los cuales se puede efectuar el dosaje por interpolación en una curva estándar.

#### A. LINEALIDAD DEL SISTEMA

Preparar 05 soluciones estándares en concentraciones crecientes a partir de una misma solución patrón (solución madre), el intervalo de concentración está comprendido entre 50 % y 150 % de la concentración final de trabajo.

**Solución madre:** preparar de acuerdo a lo descrito en el punto 3.3.1.3 concentración final: 1000 ug/mL.

**Solución A:** Tomar 5.0 mL de la solución madre en fiola de 10 mL y enrasar a volumen con metanol. Concentración final: 500 ug/mL.

**Estándar al 150 %:** Tomar 5.0 mL de la solución madre en fiola de 10 mL y enrasar a volumen con metanol. Concentración final: 500.00 ug/mL.

**Estándar al 125%:** Tomar 5.0 mL de la solución A en fiola de 10 mL y enrasar a volumen con metanol. Concentración final: 250.00 ug/mL.

**Estándar al 100 %:** Tomar 2.5 mL de la solución A en fiola de 10 mL y enrasar a volumen con metanol. Concentración final: 125.00 ug/mL.

**Estándar al 75 %:** Tomar 1.25 mL de la solución A en fiola de 10 mL y enrasar a volumen con metanol. Concentración final: 62.50 ug/mL.

**Estándar al 50 %:** Tomar 0.625 mL de la solución estándar de 250 ug/mL en fiola de 10 mL y enrasar a volumen con metanol. Concentración final: 31.25 ug/mL.

### 3.4.3 Ensayo de precisión

Está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repentinamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea.

La precisión se expresa matemáticamente como la desviación estándar,  $\sigma$ , estimada analíticamente por  $s$  ó más comúnmente como la desviación estándar relativa (DSR) o coeficiente de variación (CV).

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Donde  $n$  es el número de medidas,  $X_i$  es el valor medido en el ensayo  $i$  y  $\bar{X}$  el estimador de la medida poblacional  $\mu$ , calculando como:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

Por su parte, la desviación estándar relativa o coeficiente de variación se calcula como:

$$DSR = \frac{s. 100}{\bar{X}}$$

Para determinar la precisión del método, es decir el grado de dispersión de las medidas alrededor de su valor medio; se tomó como valor central una solución de Diclofenaco Sódico de 125 ppm, la solución se inyectó al equipo de HPLC por 06 veces, se determinará con el cálculo de la desviación estándar relativa o coeficiente de variación, no debe ser mayor al 2.0 %

#### 3.4.4 Ensayo de exactitud

La exactitud es el parámetro que nos permite conocer que tan cerca del valor real se encuentra el valor medido.

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

- a) Porcentaje de recuperación: entre 98.00 – 102.00 %
- b) Coeficiente de variación: menor o igual al 2.0 %.

Para demostrar si el método es exacto se utilizó:

- Diclofenaco Sódico preparado a una concentración de 1000 ppm.
- Diclofenaco Sódico en ampollas (75 mg/3 mL), tomar 0.1 mL de una ampolla y diluir a fiola de 10 mL con metanol, obteniéndose a una concentración de 250 ppm. Posteriormente tomar 0.1 mL de la misma ampolla y añadir 2.5 mL del estándar preparado, diluir a fiola de 10 mL con metanol, obteniéndose a una concentración de 500

ppm. Se analizaron 20 muestras, leer las soluciones por separado en HPLC.

El porcentaje de recuperación se calcula de la siguiente manera:

$$(\%) \text{ Recuperación} = \left( \frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100$$

$C_1$  = Concentración determinada de la muestra adicionada.

$C_2$  = Concentración determinada de la muestra no adicionada.

$C_3$  = Concentración adicionada.

### 3.4.5 Ensayo de sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de un analito que puede producir un resultado significativo. Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método son los límites de detección y de cuantificación.

- a) **Límites de detección:** corresponde según a la USP, a la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra, en las condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración (% , ppm, ppb, etc).
- b) **Límites de cuantificación:** según la misma referencia, es la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables y se expresa también en unidades de concentración.

Los límites de detección y cuantificación se pueden estimar a partir de una curva de regresión, considerándose concentraciones bajas de analito, por extrapolación a concentración cero.

- a) Se determina la pendiente de la curva de calibración (concentración vs respuesta) en el rango apropiado: **b**

- b) Se obtiene otra curva de calibración, inyectando cada punto por triplicado, pero para concentraciones menores de analito, determinándose la ecuación de esta nueva recta de calibración y se extrapola la respuesta a concentración cero, obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco:  $y_{bl}$ .
- c) Se determina la desviación estándar correspondiente a cada concentración del punto 2, se calcula la recta correspondiente a concentración vs S y se extrapola como en el caso anterior la desviación estándar a concentración cero, obteniéndose el estimado  $s_{bl}$ , correspondiente a la desviación estándar del blanco.

$$\text{Límite de detección} = \frac{Y_{bl} + 3S_b}{b} \frac{1}{\sqrt{n}}$$

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} \frac{1}{\sqrt{n}}$$

### 3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El cálculo de los parámetros estadísticos se realizó en el programa Microsoft Excel.

# CAPÍTULO IV

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

En razón de que no existe un método establecido y mucho menos estandarizado por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) que permita determinar cuantitativamente las concentraciones de Diclofenaco Sódico en ampollas, en el presente trabajo de investigación se determinó y validó un método de cromatografía líquida de alta resolución HPLC para la determinación de Diclofenaco Sódico en ampollas.

Para validación del método se tuvieron en cuenta los parámetros establecidos por la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) la Farmacopea de los Estados Unidos XXVIII (USP XXVIII) y la Official Methods of Analysis 1990 (AOAC) como son:

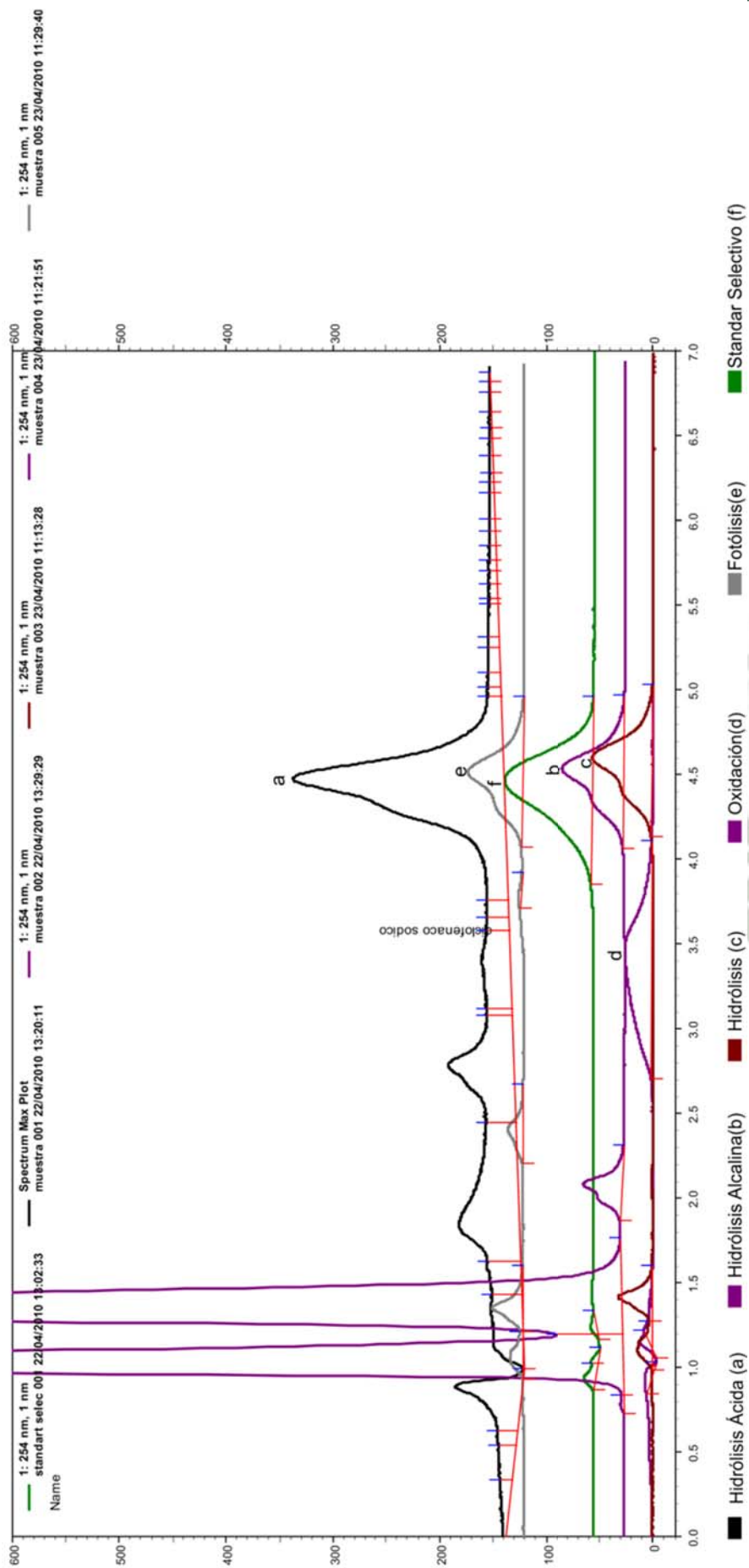
- Selectividad.
- Linealidad.
- Precisión.
- Exactitud.
- Sensibilidad.

### PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

#### 4.1 SELECTIVIDAD

Es la aptitud de un método para determinar exacta y específicamente el analito de interés en presencia de otros componentes en la matriz de la muestra bajo las condiciones establecidas del ensayo.

En la Figura 4.1 se muestran los picos de degradación del estándar de Diclofenaco Sódico (250 ug/mL), sometido a estrés fisicoquímico correspondientes a hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina, hidrólisis, oxidación y fotólisis.



**FIGURA 4.1.** Determinación de la selectividad: a) Hidrólisis ácida, b) Hidrólisis alcalina, c) Hidrólisis, d) Oxidación, e) Fotólisis y f) Estándar Diclofenaco Sódico.

## A. ESTÁNDAR

Podemos observar en el gráfico el pico correspondiente al Diclofenaco Sódico a un tiempo de retención entre 4 y 5 minutos. (Ver Figura 4.1 f)

## B. HIDRÓLISIS ÁCIDA

Al someter al estándar por calentamiento por una hora a 80 °C, con HCL 1N, se puede observar que hubo una pequeña degradación en el pico y un aumento en el tamaño del mismo. (Ver Figura 4.1 a)

## C. HIDRÓLISIS ALCALINA

Al someter al estándar a una hidrólisis alcalina por calentamiento durante una hora a 80 °C, con NaOH 1N, podemos observar una completa degradación en el pico y una disminución en el tamaño del mismo. (Ver Figura 4.1 b)

## D. HIDRÓLISIS

El estándar fue sometido a calentamiento por una hora a 80 °C, con agua, se observó una degradación en el pico. (Ver Figura 4.1 c)

## E. OXIDACIÓN

Se sometió al estándar a calentamiento por una hora a 80 °C en Baño María con peróxido de hidrogeno, se observó que si hubo degradación debido al cambio en el tiempo de retención y ensanchamiento del pico. (Ver Figura 4.1 d)

## F. FOTÓLISIS

Al someter al estándar a luz ultravioleta durante una hora, podemos observar que esta si interfiere en la degradación en el cual se ve una degradación en el pico. (Ver Figura 4.1 e)

Por lo que se puede concluir que al someter al Diclofenaco Sódico a condiciones de estrés físicoquímico, los productos de degradación producen algunos cambios en el pico y en el tiempo de retención a excepción de la oxidación que produce

una notoria degradación.

## 4.2 LINEALIDAD

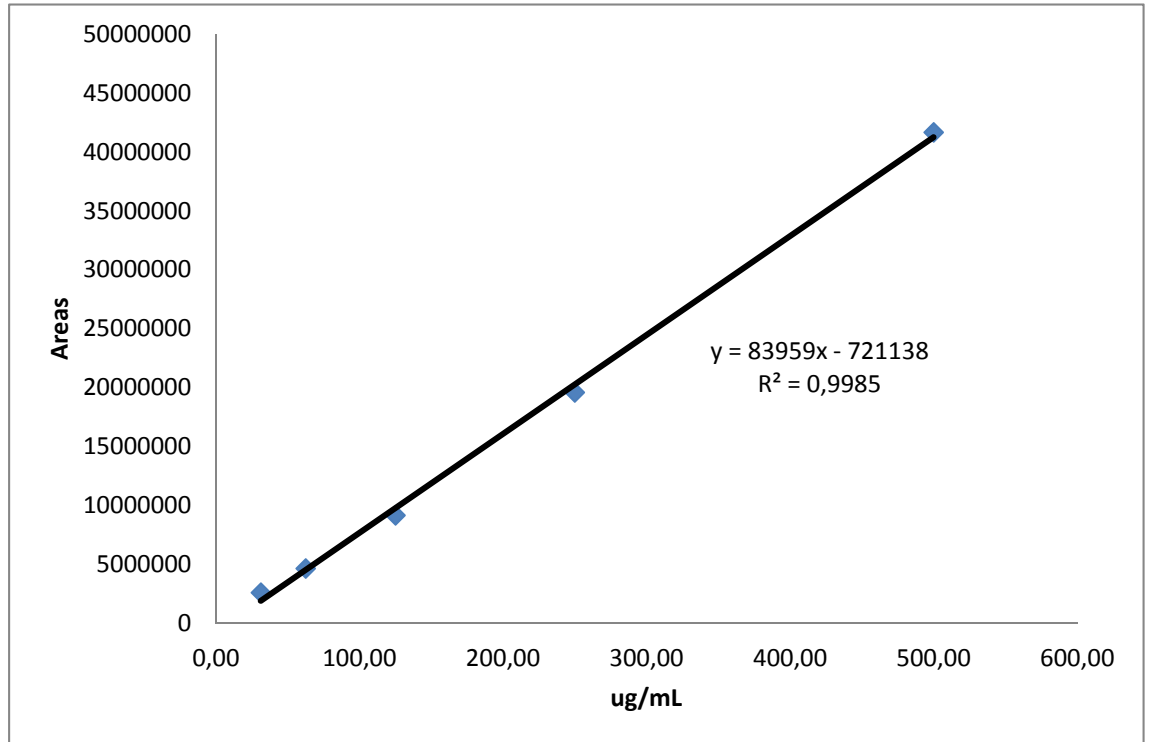
Para la determinación de la linealidad del método se realizaron mediciones del área del pico de Diclofenaco Sódico a diferentes concentraciones (31.25, 62.50, 125, 250 y 500 ppm) y se analizaron por duplicado tres estándares de la misma concentración, los resultados obtenidos de las áreas correspondientes a las concentraciones se muestran en la Tabla N° 4.1

**TABLA N° 4.1 CÁLCULOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD**

Concentración Teórica (%)	Muestras	Ci ug/mL	Áreas		PROMEDIO (Áreas)	S	RSD
			Iny. 1	Iny. 2			
50	St1	31,25	2644892	2624823	2612253	41862	1,60
	St2		2644591	2638966			
	St3		2546998	2573249			
75	St1	62,50	4725472	4658421	4663804	39898	0,86
	St2		4625412	4696096			
	St3		4651962	4625461			
100	St1	125,00	9154830	9198451	9167796	36769	0,40
	St2		9165241	9193216			
	St3		9193216	9101819			
125	St1	250,00	19678514	19728615	19606540	265879	1,36
	St2		19829525	19852415			
	St3		19233394	19316779			
150	St1	500,00	41135546	42058281	41679653	551908	1,32
	St2		42012485	40822786			
	St3		42003334	42045487			

En la Tabla 4.1 se puede observar que a medida que se utilizó mayores concentraciones del estándar de Diclofenaco Sódico, se obtuvo un incremento en las áreas, lo que demostraría que los resultados obtenidos por el método analítico son proporcionales a la concentración del analito.

La representación gráfica de la recta de regresión en un sistema de coordenadas junto con los valores experimentales, permite visualizar la bondad del ajuste, como se puede apreciar en la Figura 4.2.



**Figura 4.2** Representación Gráfica de la Linealidad.

En la figura 4.2, a partir del rango de las concentraciones finales y el valor promedio del área, se obtuvo el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) igual a 0.9985, el cual debe ser por lo menos de 0.99 para ser aceptado; una pendiente (b) de 83959; un intercepto ( $\alpha$ ) de 721138 y un coeficiente de correlación (r) de 0.9993.

Con los resultados del estudio de la linealidad, la relación entre la variable independiente (concentración) y la variable dependiente (área) se expresa matemáticamente haciendo una estadística de regresión, tal como se expresa en la Tabla 4.2.



**Tabla 4.2.** Determinación de la linealidad para los datos de la gráfica de regresión.

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9993
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,9985
R <sup>2</sup> ajustado	0,9980
Error típico	708409,63
Observaciones	5

Para la evaluación y certificación de la existencia de una correlación significativa entre  $x$ ,  $y$  se tuvo en cuenta el contraste estadístico para el coeficiente de correlación donde se calcula el valor  $t_{regresión}$  (de acuerdo a fórmula) con  $n-2$  grados de libertad a un intervalo de confianza del 95 % y este se compara con el valor de  $t_{tabla}$ .

De acuerdo a fórmula se obtienen valores de 45.18 y 2.048 para  $t_{regresión}$  y  $t_{tabla}$  respectivamente( anexo 2) indicando la existencia de una correlación significativa entre  $x$ ,  $y$ .

El mejor indicador del modelo lineal no es  $r$ , sino un aprueba estadística, así el análisis de varianza se muestra en la Tabla 4.3, donde se evidencia la existencia de una alta correlación entre los datos de concentración y su respuesta, por tal razón se concluye que el método presenta una proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta en el área.

**TABLA 4.3** Análisis de Varianza para la determinación de la linealidad.

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
<b>Regresión</b>	1	1.0243E+15	1.0243E+15	2041.143	2.3872E-05
<b>Residuos</b>	3	1.5055E+12	5.0184E+11		
<b>Total</b>	4	1.0258E+15			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
<b>Intercepción</b>	-721137.86	479595.584	-1.50363741	0.22971257	-2247425.05	805149.333
<b>Variable X 1</b>	83959.4689	1858.37334	45.1790106	2.3872E-05	78045.2955	89873.6422

### 4.3 PRECISIÓN

Se realizó una serie de medidas de un estándar de 125 ppm correspondiente al 100 % de la concentración de prueba, para determinar el grado de concordancia entre ellas, en la Tabla 4.4, se observa una DSR (Desviación Estándar Relativa) de 0.28 %, según la USP se pueden considerar como adecuada una DSR no mayor a 2.0 %, por lo que podemos afirmar que el método realizado a través de la presente investigación es un método preciso.

**Tabla 4.4.** Determinación de la Precisión.

<b>LECTURA</b> N°	<b>Concentración al 100</b> %
<b>1</b>	100,77
<b>2</b>	100,23
<b>3</b>	99,92
<b>4</b>	100,19
<b>5</b>	100,19
<b>6</b>	100,27
<b>Promedio</b>	100,26
<b>s</b>	0,28
<b>DSR %</b>	0,28

De los resultados obtenidos se puede ver que hay concordancia entre las concentraciones halladas de los 06 ensayos realizados. Demostrando que existe repetitividad en el método esto debido a que se realizó por el mismo analista, mismo día y mismo instrumento.

#### 4.4 EXACTITUD

Este parámetro se refiere al valor medio que se obtiene, el cual debe ser muy próximo al de referencia. Dicho de otro modo la recuperación del analito debe acercarse al 100%.

En la Tabla 4.5 se muestra el porcentaje de recuperación obtenido con respecto a la concentración de la muestra analizada.

**Tabla 4.5.** Determinación de la Exactitud.

Muestras	Área Promedio Muestra	Área Promedio Muestra + Estándar	Concentración Hallada (ppm)	% de Recuperación
1	27292479	48451626	252,02	100,81
2	29120784	49916298	247,69	99,07
3	24254414	45110004	248,40	99,36
4	25046372	45667750	245,61	98,24
5	23825984	44743904	249,14	99,66
6	23744147	45115071	254,54	101,82
7	24400267	45277317	248,66	99,46
8	24039900	45421631	254,67	101,87
9	24546404	45462904	249,13	99,65
10	24304140	45673879	254,52	101,81
11	20353593	41394692	250,61	100,24
12	25519210	46641797	251,58	100,63
13	24830636	45830287	250,12	100,05
14	22873821	43782660	249,03	99,61
15	24287391	45362646	251,02	100,41
16	25297139	46122633	248,04	99,22
17	25002925	46186321	252,31	100,92
18	25254583	46188405	249,33	99,73
19	25134545	46212662	251,05	100,42
20	23878057	44685445	247,83	99,13
<b>Promedio</b>				100,19
<b>s</b>				1,05
<b>RSD %</b>				1,05

De la Tabla 4.5 se obtiene que el promedio del porcentaje de recuperación experimental es de 100.19 %. Los valores obtenidos son sometidos a un análisis estadístico de la prueba t para media de dos muestras emparejadas como se muestra en la Tabla 4.6. Al aplicar la prueba estadística de t de student, encontramos que  $p > 0.05$ , lo que indicaría que no existe diferencia significativa entre el porcentaje de recuperación hallado y el teórico, entonces podemos afirmar que el método analítico propuesto es exacto.

**Tabla 4.6.** Análisis estadístico de la Exactitud.

	% <i>RECUPERACION</i>	% <i>TEORICO</i>
<b>Media</b>	100.1945	100
<b>Varianza</b>	1.104215526	0
<b>Observaciones</b>	20	20
<b>Diferencia hipotética de las medias</b>	0	
<b>Grados de libertad</b>	19	
<b>Estadístico t</b>	0.827766181	
<b>P(T&lt;=t) una cola</b>	0.209039606	
<b>Valor crítico de t (una cola)</b>	1.729132812	
<b>P(T&lt;=t) dos colas</b>	0.418079212	
<b>Valor crítico de t (dos colas)</b>	2.093024054	

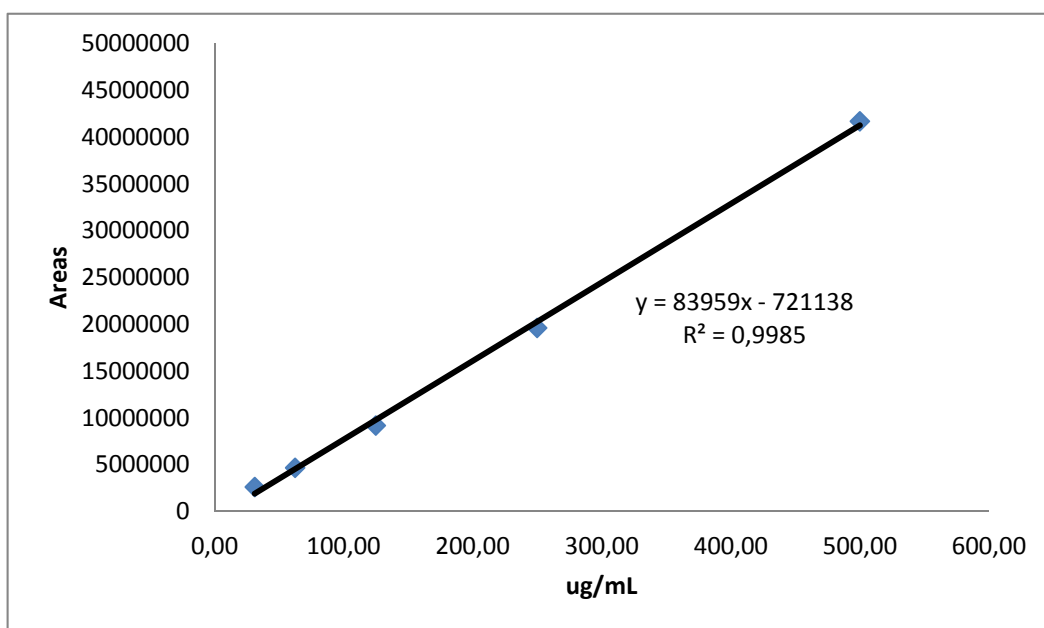
## 4.5 SENSIBILIDAD

Para determinar la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo, se trabajó con concentraciones de 31.25, 62.5, 125, 250 y 500 ppm y se realizó la curva de regresión. Las áreas promedio obtenidas se muestran en la Tabla 4.7.

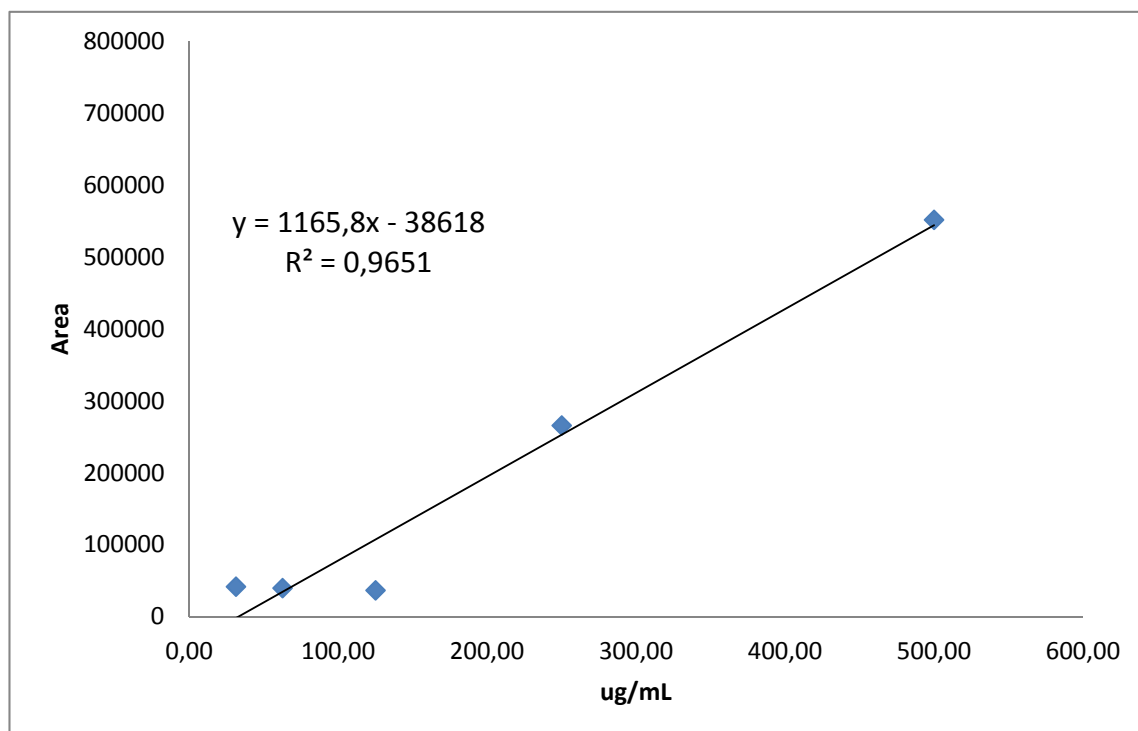
Tabla 4.7. Datos para la determinación de la Sensibilidad.

Concentración ppm	Promedio (Áreas)	s	RSD
<b>31,25</b>	2612253	41862	1,60
<b>62,50</b>	4663804	39898	0,86
<b>125,00</b>	9167796	36769	0,40
<b>250,00</b>	19606540	265879	1,36
<b>500,00</b>	41679653	551908	1,32

Con los datos de la Tabla 4.7 se realizaron las curvas de calibración para la concentración y áreas promedios (Ver Figura 4.3) y para la concentración y desviación estándar (Ver Figura 4.4), con estos datos se procedió al cálculo del límite de detección y de cuantificación.



**fFigura 4.3** Representación Gráfica de la Linealidad.



**Figura 4.4** Representación Gráfica de la Concentración Vs Desviación estándar.

Con los datos obtenidos en las Figuras 4.3 y 4.4 se calculó de límite de detección y cuantificación

$$\text{Límite de Detección: } LD = \frac{Y_{bl} + 3(S_{bl})}{b} \frac{1}{\sqrt{n'}}$$

$$LD = 4.46 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Límite de Cuantificación: } LC = \frac{Y_{bl} + 10(S_{bl})}{b} \frac{1}{\sqrt{n'}}$$

$$LC = 5.90 \mu\text{g/mL}$$

La mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar es de 4.46  $\mu\text{g/mL}$  y la mínima cantidad de analito presente en la muestra que puede ser cuantificada, con una adecuada precisión y exactitud es de 5.90  $\mu\text{g/mL}$ .

## CONCLUSIONES

- La metodología analítica para la validación del Diclofenaco Sódico en ampollas por cromatografía líquida de alta resolución, cumple con los parámetros de desempeño de la validación, es decir, es una metodología selectiva, lineal, precisa y exacta; demostrando así su confiabilidad para poder ser empleada en los laboratorios de control de calidad.
- Mediante el cumplimiento satisfactorio del proceso de validación, queda demostrada la aplicabilidad e idoneidad de ésta metodología analítica.



## BIBLIOGRAFÍA

1. **ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE FARMACÉUTICOS DE LA INDUSTRIA** (AEFI), Sección Catalana, *Comisión de Normas de Buena Fabricación y Control de Calidad. Validación de Métodos Analíticos*. Madrid; 1999.
2. **BARCELLI V.** *Curso de Entrenamiento de Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) Lachrom Merck*; Abril 2009; Lima.
3. **BENDER G.**, *Métodos Instrumentales en Química Clínica*, 1ra Ed. Saragoza, Editorial Acribia S.A., 1997
4. **CÁCERES, C.A.**; “*Validación de la Metodología Analítica por HPLC para el Producto Farmacéutico Prefem®*”; Unidad de Práctica Optativa para Optar al título de Químico farmacéutico; Universidad de Chile, 2002
5. **CASTILLO B., GONZALES R.** *Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos 2000*. Revista cubana de farmacia
6. **CUATRECASAS LI.**, *Gestión integral de la Calidad: Implantación, Control y Certificación*, 1a ed., Barcelona, Ediciones Gestion 2000, 1999.
7. *Curso de Desarrollo de Métodos*; Universidad Peruana Cayetano Heredia; Lima; 10-15 Enero 2009.
8. **DOMINIQUE Pradeau.** “*Análisis Químicos Farmacéuticos de Medicamentos*” Editorial Noriega, Mexico-España-Venezuela, 1998
9. *El Peruano*, guía de validación, Pág. 238364- 238366, 2003
10. **EURACHEM**, *The fitness for purpose of analytical methods*, First English Edition, 1998.

11. **FDA.** US Department of health and human services. Guidance for Industry Bioanalytical Methods, validation for human studies. (12, 1998)
12. **GOODMAN** Gilman, A. (1996). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9° Ed. McGraw Hill editorial. Texas USA. 1123 – 1130.
13. **FRANCIS ROUESSAC; ANNICK ROUESSAC**, “*Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas*” Mc Graw-Hill-Interamericana de España-Madrid 5ta Edición 2003.
14. **GONZALES** Gutierrez, Jorge Luis y Velázquez Benítez, Evelyn Milagros “*Validación y comparación del método de cromatografía líquida de alta resolución con el método voltamétrico en la determinación de timerosal en vacunas contra la hepatitis B*”
15. **HUBER L.**, Validation and Qualification in Analytical Laboratories, Second Edition, Informa Healthcare, USA, 2007.
16. **JEBRELL** W.H., Harris R.S. The vitamins. Vol. 1. 2nd ed. New York: Academic Press, 1967
17. **LÓPEZ** Alcántara Ana Lilia, Moreno Velázquez Eber, Murrieta González Alejandra, Universidad Autónoma Metropolitana México D.F  
LABORATORIO DE QUIMICA ORGÁNICA II
18. Manual Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María.
19. **MORA** Evelyn; “*Protocolo de Validación de la Metodología Analítica para la Estandarización de Diclofenaco Sódico Materia Prima por Cromatografía Líquida de Alta Presión*”; Unidad de Práctica Optativa para Optar al Título de Químico Farmacéutico; Universidad de Chile, 2006.
20. **MORALES** de la C.C. “*Desarrollo y Validación Prospectiva de una técnica analítica por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para el Enalapril 10 mg. tabletas cubiertas*”; Tesis para optar el Título Profesional de

Químico Farmacéutico; Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, 2004.

21. **PINE S.**, Hendrickson J., Cram D., Hammond G., *Química Orgánica*, 4º Ed. (2º Ed. en español) México D.F., McGraw-Hill/Interamericana de México S.A. de C.V, 1992
22. Regulación 41/07. Validación de métodos de analíticos. Centro Estatal para el Control de Medicamentos (CECMED). La Habana, 2007. Disponible en: [http://www.cecmecmed.sld.cu/Pages/Reg\\_EvalEL.htm](http://www.cecmecmed.sld.cu/Pages/Reg_EvalEL.htm)
23. **REVIEWER** Guidance, “*Validation of Chromatographic Methods*”, CDER, EPA, USA;1994.
24. **SEGALL A.** *Curso de Post-grado Universidad de Buenos Aires Implementación de GLP en el Laboratorio de Control Físicoquímico*; Julio 2006.
25. **SWARTZ, M.**, Krull, I. *Validation of Chromatographic Methods*. Pharm. Technol 22 (Mar.): 104-118, 1998.
26. The Merck Index. 12ª Edición. Merck & Co. INC. Whitehouse station, N.J. USA 1996.
27. United States Pharmacopeia Convention Inc., United States Pharmacopeia 35 NF-30, 2012 . [Versión electrónica]..
28. **VALDEZ A.N.**, Cuadros Q.E. “*Validación del método de valoración de Loratadina en tabletas por HPLC*”; Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico; Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima,1999
29. **VALLS O.**, Del Castillo B., *Técnicas Instrumentales en Farmacia y Ciencias de la Salud*, 4a ed. Barcelona, Ediciones Piro, 1998.



## ANEXO N° 1

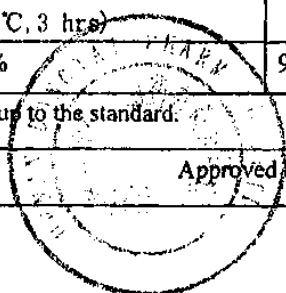
# CERTIFICADO DE ANÁLISIS DEL ESTÁNDAR DE DICLOFENACO SÓDICO

**HENAN DONGTAI PHARM CO. LTD**

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

Product : Diclofenac Sodium		According to: USP30
Batch No.: 090812-2	Mfg. Date: Aug.12,2009	Exp. Date: Aug.11,2013
Quantity: 300kg		Packing: 25kg/fibre drum

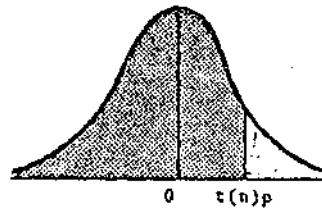
ITEMS	SPECIFICATION	RESULTS
Characteristics	A white or slightly yellowish Crystalline powder	WHITE
Identification	A.IR	ACCORD
	B.HPLC	ACCORD
	C. Test of sodium salt	CONFORM
Color of solution	5.0% of methanol solution 440nm, NMT 0.050	0.011
Clarity of solution	Equal to methanol	PASS
PH	7.0~8.5	7.44
Related substances	Any Specified impurity: NMT0.2%	Not detected
	Any unspecified impurity: NMT0.1%	Not detected
	Total impurities: NMT 0.5%	Not detected
Heavy metals	NMT 10 PPM	PASS
Loss on drying	NMT 0.5% (lg, 100°C~105°C, 3 hrs)	0.20%
Assay	99.0%~101.0%	99.92%
Conclusion: It accords with USP30. Be up to the standard.		
Tested by: Liu Wenying		Approved by: Wang Haizhou



## ANEXO N° 2

### TABLA ESTADÍSTICA DE LA DISTRIBUCIÓN "T" DE STUDENT

3.7 DISTRIBUCION ACUMULATIVA  $t$



n	p								
	0.75	0.80	0.85	0.90	0.95	0.975	0.990	0.995	0.9995
1	1.0005	1.376	1.963	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	636.619
2	0.816	1.061	1.386	1.836	2.920	4.303	6.965	9.925	31.598
3	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	12.941
4	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	8.610
5	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	6.859
6	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.959
7	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	5.405
8	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	5.041
9	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.781
10	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.587
11	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.710	3.106	4.437
12	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	4.318
13	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	4.221
14	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	4.140
15	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	4.073
16	0.690	0.866	1.071	1.337	1.746	2.120	2.584	2.921	4.015
17	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.965
18	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.922
19	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.540	2.861	3.883
20	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.850
21	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.819
22	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.792
23	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.767
24	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.745
25	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.725
26	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.477	2.779	3.707
27	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.690
28	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.674
29	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.659
30	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.646
35	0.682	0.852	1.052	1.306	1.690	2.030	2.438	2.724	3.591
40	0.681	0.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.551
45	0.680	0.850	1.048	1.301	1.680	2.014	2.412	2.690	3.520
50	0.680	0.849	1.047	1.299	1.676	2.008	2.403	2.678	3.496
55	0.679	0.849	1.047	1.297	1.673	2.004	2.396	2.669	3.476
60	0.679	0.848	1.046	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.460
70	0.678	0.847	1.045	1.294	1.667	1.994	2.381	2.648	3.435
80	0.678	0.847	1.044	1.293	1.665	1.990	2.374	2.638	3.416
90	0.678	0.846	1.043	1.291	1.662	1.987	2.368	2.632	3.402
100	0.677	0.846	1.042	1.290	1.661	1.984	2.364	2.626	3.389
200	0.676	0.844	1.039	1.286	1.653	1.972	2.445	2.601	3.340
300	0.676	0.843	1.038	1.285	1.650	1.968	2.437	2.592	3.323
400	0.676	0.843	1.038	1.284	1.649	1.966	2.434	2.588	3.315
500	0.676	0.843	1.037	1.284	1.648	1.965	2.432	2.586	3.310
1000	0.675	0.842	1.037	1.283	1.647	1.962	2.427	2.581	3.301
$\infty$	0.67449	0.84162	1.03643	1.28155	1.64485	1.95996	2.32630	2.57582	3.29053