

# UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y  
BIOTECNOLÓGICAS

PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**“DESARROLLO Y VALIDACIÓN PROSPECTIVA DE UNA TÉCNICA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC) PARA CUANTIFICAR LIDOCAÍNA BASE EN UNA POMADA, AREQUIPA-2012”.**

**TESIS PRESENTADA POR LA BACHILLER:  
CCORIMANYA GUTIERREZ KAROL ANABERTH**

**Para optar el título profesional de :  
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**ASESOR:  
Ph.D. JAIME CÁRDENAS GARCÍA**

**AREQUIPA-PERÚ**

**2012**

## ÍNDICE

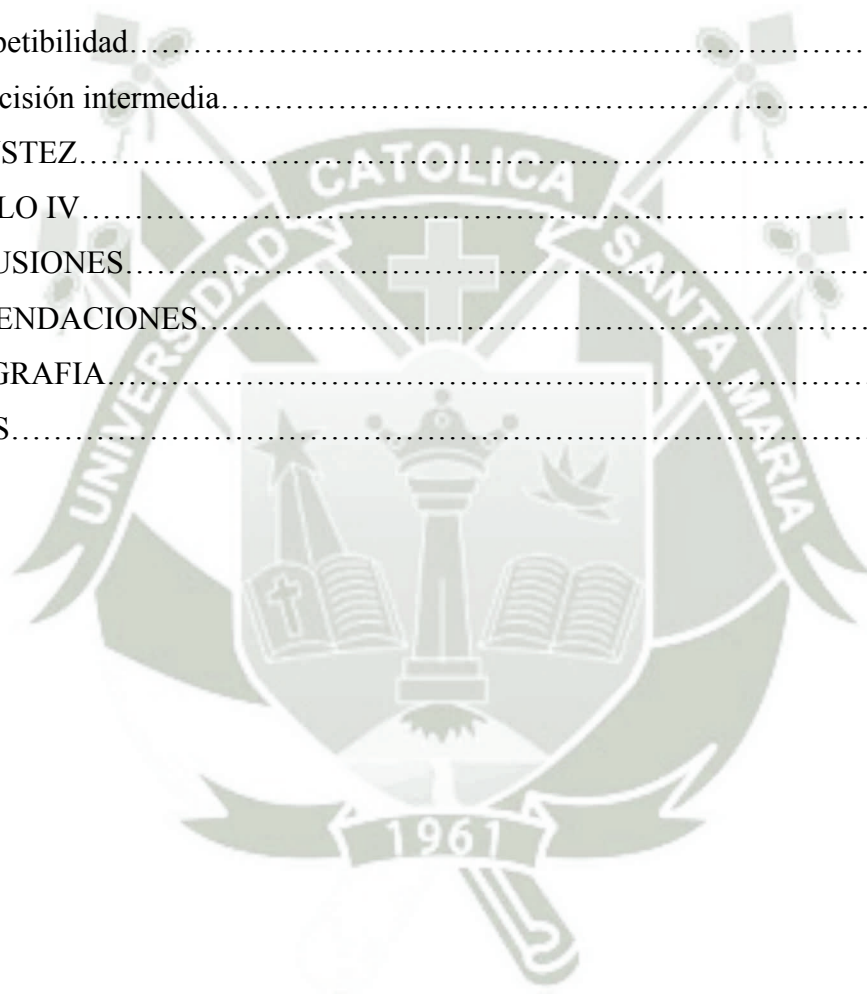
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
HIPÓTESIS.....	5
OBJETIVOS.....	6
CAPÍTULO I.....	7
MARCO TEÓRICO.....	7
1. LIDOCAÍNA BASE.....	7
1.1 Nombre y estructura química .....	7
1.2 Química y relación entre estructura y actividad .....	7
1.3 Propiedades farmacológicas.....	8
1.4 Mecanismo de acción.....	9
1.5 Aplicaciones clínicas.....	11
1.6 Farmacocinética.....	11
1.7 Reacciones Adversas .....	12
1.8 Formas Farmacéuticas.....	13
1.8.1 Procedimiento para la elaboración de lidocaína 5% pomada.....	18
1.8.2 Preparados, dosis y vías de administración.....	21
1.9 Métodos para cuantificar lidocaína base.....	22
1.9.1 Método 1: Valoraciones Volumétricas Residuales.....	22
1.9.2 Método 2: Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	24
1.9.2.1 Definición.....	24
1.9.2.2 Partes.....	25

1.9.2.3 Bases de la separación.....	30
1.9.2.4 Nomenclatura.....	31
1.9.2.5 Cromatografía en fase reversa.....	33
2. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	36
2.1 Definición analítica.....	36
2.2 Otros términos relacionados con la validación.....	36
2.3 Razones que justifican la validación de métodos analíticos.....	37
2.4 Métodos susceptibles de ser validados.....	38
2.5 Entorno legal.....	38
2.5.1 Requerimientos para el registro.....	38
2.5.2 Normas de correcta fabricación de medicamentos.....	38
2.5.3 Farmacopeas.....	38
2.6 Organización: buenas prácticas de laboratorio.....	39
2.7 Fases en el desarrollo de un método analítico y criterios de validación.....	39
2.7.1 Definición de las características de practicabilidad.....	40
2.7.2 Estudios de estabilidad de la muestra preparada para análisis.....	40
2.7.3 Características de fiabilidad.....	40
2.7.3.1 Especificidad.....	41
2.7.3.2 Linealidad.....	42
2.7.3.3 Precisión.....	42
2.7.3.4 Exactitud.....	43

2.7.3.4 Robustez.....	45
2.8 Categorías de la validación.....	45
2.9 Tipos de validación.....	46
2.9.1 Validación Retrospectiva.....	46
2.9.2 Validación Prospectiva.....	46
2.9.3 Revalidación.....	47
3. RAZONES QUE JUSTIFICAN EL CAMBIO DE TÉCNICA.....	47
CAPÍTULO II.....	49
MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
1. MATERIAL.....	49
1.1 Muestras.....	49
1.2 Material de laboratorio.....	50
1.3 Reactivos.....	50
1.4 Equipos.....	51
2. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS.....	52
3. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN.....	53
3.1 Especificidad.....	53
3.2 Linealidad.....	54
3.3 Exactitud.....	55
3.4 Precisión.....	55
3.5 Robustez.....	55
3.6 Rango.....	56
4. MÉTODO ANALÍTICO.....	56
4.1 Tipo de método analítico.....	56
4.2 Descripción de la técnica analítica.....	56
4.3 Fórmula.....	58

5. PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS A EVALUAR.....	58
5.1 Especificidad.....	58
5.2 Linealidad.....	61
5.2.1 Linealidad del sistema.....	61
5.2.2 Linealidad del metodo.....	62
5.3 Exactitud.....	64
5.4 Precisión.....	64
5.4.1 Precisión instrumental.....	64
5.4.2 Repetibilidad.....	64
5.4.3 Precisión intermedia.....	65
5.5 Robustez.....	66
5.6 Rango.....	67
6. ANÁLISIS DE DATOS.....	67
6.1 Estudio de la linealidad.....	67
6.2 Estudio de la exactitud.....	73
6.3 Estudio de la precisión.....	74
6.4 Estudio de la robustez.....	76
CAPÍTULO III.....	77
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	77
1. ESTABLECIMIENTO DEL MÉTODO.....	77
1.1 Selección de la Columna.....	77
1.2 Selección de la longitud de onda.....	79
1.3 Selección de la fase móvil.....	83
1.4 Mecanismo de interacción de la columna cromatografica con el compuesto químico.....	89

2. ESPECIFICIDAD.....	91
3. LINEALIDAD.....	99
3.1 Linealidad del sistema.....	96
3.2 Linealidad del método.....	116
4. EXACTITUD.....	134
5. PRECISIÓN.....	137
5.1 Precisión instrumental.....	137
5.2 Repetibilidad.....	139
5.3 Precisión intermedia.....	143
6. ROBUSTEZ.....	148
CAPÍTULO IV.....	153
CONCLUSIONES.....	153
RECOMENDACIONES.....	154
BIBLIOGRAFIA.....	155
ANEXOS.....	159



## *AGRADECIMIENTOS*

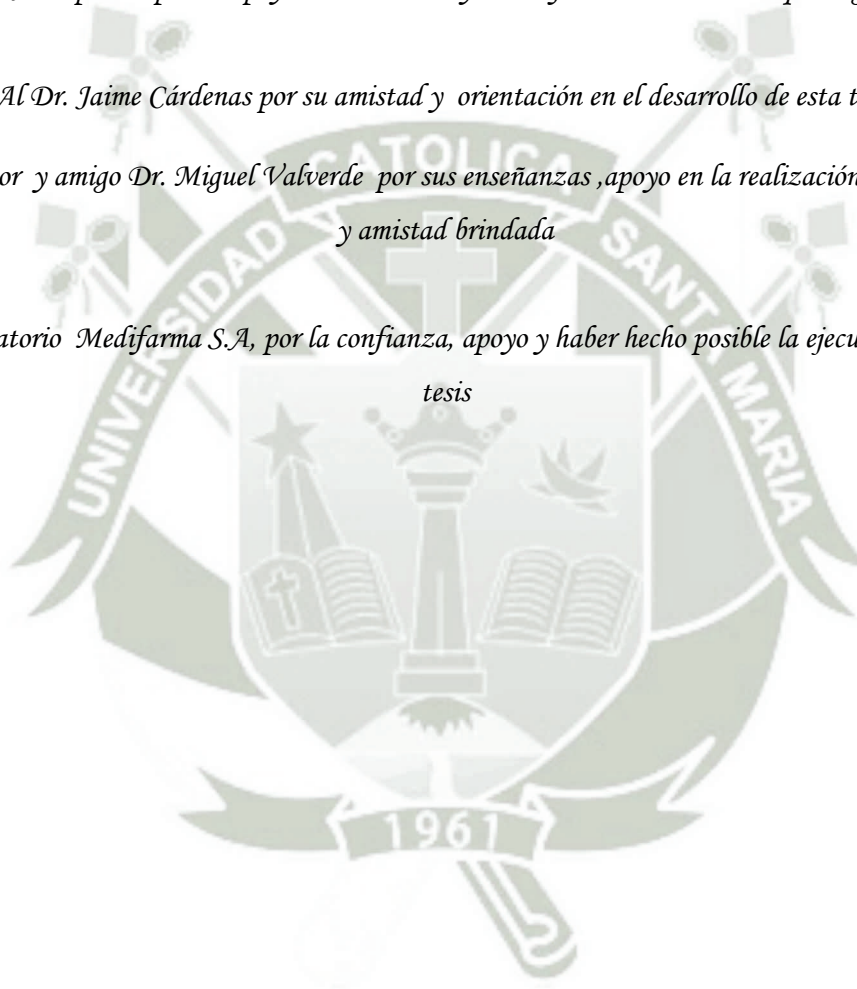
*A DIOS por ser siempre mi guía espiritual*

*A mi padres por su apoyo incondicional y ser mi fortaleza en todo lo que hago*

*Al Dr. Jaime Cárdenas por su amistad y orientación en el desarrollo de esta tesis*

*A mi asesor y amigo Dr. Miguel Valverde por sus enseñanzas, apoyo en la realización de esta tesis  
y amistad brindada*

*Al laboratorio Medifarma S.A, por la confianza, apoyo y haber hecho posible la ejecución de esta  
tesis*



## RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó con el fin de confirmar y documentar que los resultados obtenidos en el desarrollo y validación prospectiva de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para cuantificar lidocaína base en una pomada son confiables, consistentes y repetitivos en las condiciones establecidas. Esto teniendo en cuenta que la validación es un requisito imprescindible para el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Laboratorio. Se llevo a cabo en el laboratorio Medifarma S.A área de control de calidad.

Para la validación de una pomada que contiene Lidocaína base como principio activo se desarrolló un método de análisis por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC); las condiciones cromatográficas se establecieron con un sistema isocrático en fase reversa, columna L1 (octadecilsilano) 150 mm x 4.6 mm x 5  $\mu$ m Zorbax Extend, la fase móvil compuesta por metanol:buffer fosfato pH 8.0 (75:25), con un flujo de 1.0 mL/minuto, temperatura de 25 °C, la longitud de onda fijada en el detector UV fue 230 nm y el volumen de inyección de 10  $\mu$ L. El tiempo de retención fue de 3.5 minutos estableciéndose un tiempo de corrida de 8.0 minutos. Se evaluaron los parámetros como la linealidad, precisión, exactitud, especificidad y rango, obteniéndose resultados adecuados lo que se demostró mediante el diseño experimental que la metodología analítica es lineal dado que se obtuvo un coeficiente de correlación  $r=0.9991$ ; es precisa ya que el coeficiente de variación (CV) de la precisión instrumental para las áreas y los tiempos fue  $\leq 2.0\%$ ; la repetibilidad tuvo un CV = 1.00 % ; la precisión intermedia tuvo un CV = 0.8%; es exacta con una recuperación media de 99.59 %; es específica dado que no se evidenció interferencia de productos degradados o de los excipientes en el análisis del principio activo, estos parámetros están dentro del rango establecido.

**Palabras claves:** Lidocaína base, Pomada, Validación, Cromatografía Líquida de Alta Performance, Especificidad, Linealidad, Precisión, Exactitud y Rango.

## ABSTRACT

The present investigation was performed in order to confirm and document that the results obtained in the development and prospective validation of an analytical technique for high performance liquid chromatography (HPLC) to quantify lidocaine ointment based on reliable, consistent and repetitive in the conditions. This considering that validation is a prerequisite for compliance with Good Laboratory Practice. Was carried out in the laboratory Medifarma SA quality control area. For validation of an ointment containing lidocaine as active basis developed a method of analysis by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) chromatographic conditions were established with isocratic reverse phase column L1 (octadecylsilane) 150 mm x 4.6 mm x 5  $\mu$ m Zorbax Extend, the mobile phase consisting of methanol: phosphate buffer pH 8.0 (75:25) at a flow rate of 1.0 mL / min, 25 ° C, the fixed wavelength UV detector was in 230 nm and the injection volume of 10  $\mu$ L, the retention time of 3.5 minutes, running time of about 8.0 minutes were evaluated parameters such as linearity, accuracy, precision, specificity, and range, obtaining adequate results, it was shown, by experimental design, analytical methodology that is linear since we obtained a correlation coefficient  $r = 0.9991$ , is required because the coefficient of variation (CV) of the instrumental precision for areas and times is  $\leq 2.0\%$ , the repeatability has a CV = 1.00%, intermediate precision has a CV = 0.8%, is accurate with an average recovery of 99.59% is specified as evidenced no interference or degradation products of the excipients in the analysis of the active principle, these parameters are within the stated range.

Keywords: Lidocaine basis, Pomade, Validation, High Performance Liquid Chromatography, specificity, linearity, precision, accuracy and range.

## INTRODUCCIÓN

Referente al tema de calidad está definida como la totalidad de características de una entidad, que le confieren la aptitud para satisfacer las necesidades del cliente, cuyos objetivos principales son: prevenir riesgos, detectar discrepancias y corregirlas, mejorar la eficiencia y reducir costos. Además juega un papel muy importante el Control de Calidad que hace uso del ambiente físico de un laboratorio analítico y que tiene como propósito esencial producir resultados de alta calidad, confiabilidad, garantizar que el proceso de medición es exacto, confiable y adecuado para el propósito para el cual es aplicado. <sup>(1,2)</sup>

Los procedimientos para la evaluación de los niveles de calidad de los medicamentos en el país están dados por la Dirección General de Insumos, Medicamentos y Drogas (DIGEMID) como instrumento normativo necesario para cautelar la calidad en la fabricación de los productos farmacéuticos, quienes a través de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL). Asegurando la calidad de los medicamentos. 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), Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC), Conferencia Internacional Tripartita Sobre Armonización (ICH), Farmacopeas Europeas y Americana. <sup>(2,3)</sup>

El control de la calidad es parte de las BPM y comprende el muestreo, especificaciones y ensayos como también a los procedimientos de organización, documentación y autorización que aseguren que los ensayos necesarios y pertinentes realmente se efectúen, y que no se permita liberación de los materiales, ni se autorice la venta o suministro de los productos, hasta que su calidad haya sido comprobada como satisfactoria. <sup>(3)</sup>

Por eso el control analítico de un producto farmacéutico o de sus ingredientes es necesario para asegurar la eficacia y seguridad del mismo, teniendo en cuenta las especificaciones establecidas y comprobadas durante la elaboración del producto. <sup>(3)</sup>

De igual manera la validación siendo parte esencial de las BPM, es por tanto, un elemento del programa de Garantía de Calidad. Por lo cual se hace imprescindible la validación cuyos principios se aplican a todas las metodologías descritas en Farmacopeas y también a aquellas no incluidas pero que se utilizan en Industria Farmacéutica. <sup>(2,4)</sup>

## HIPÓTESIS

Dado que el método analítico de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es capaz de detectar una variedad de sustancias es probable que este método permita la cuantificación de lidocaína en pomada tomando en cuenta los parámetros de validación establecidos por la USP.

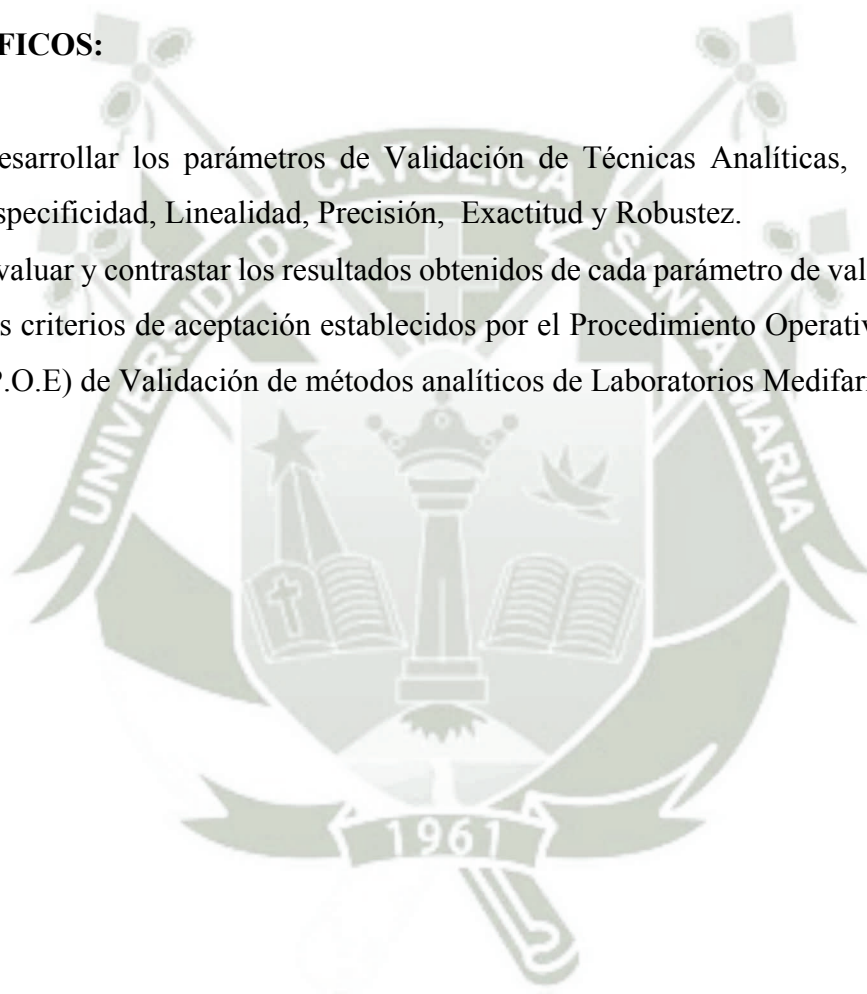
## OBJETIVOS

### GENERALES:

- Desarrollar y validar de manera prospectiva una Técnica Analítica por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para cuantificar Lidocaína base en una pomada.

### ESPECÍFICOS:

- Desarrollar los parámetros de Validación de Técnicas Analíticas, como son: Especificidad, Linealidad, Precisión, Exactitud y Robustez.
- Evaluar y contrastar los resultados obtenidos de cada parámetro de validación con los criterios de aceptación establecidos por el Procedimiento Operativo Estándar (P.O.E) de Validación de métodos analíticos de Laboratorios Medifarma S.A.



## CAPÍTULO I

### MARCO TEÓRICO

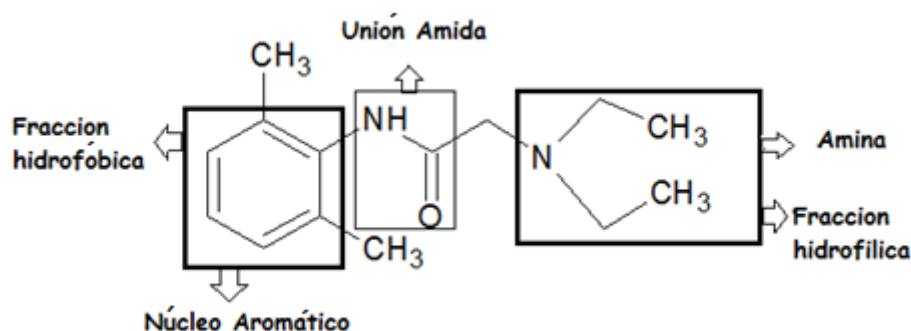
#### 1. Lidocaína base

##### 1.1 Nombre y estructura química

**IUPAC:** Acetamide, 2-(diethylamino)-N-(2,6-dimethylphenyl)-;2-(Dietilamino)-2',6'-acetoxilidida.

**Peso Molecular:** 234.34 g/mol

**Formula Molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sup>(5)</sup>



**Fig. N° 1.1** Estructura de la lidocaína

##### 1.2 Química y relación entre estructura y actividad

Estructuralmente, las moléculas de los actuales anestésicos locales están integradas por tres elementos básicos:

- Un grupo hidrofóbico: un anillo aromático, determinante de la liposolubilidad, difusión y fijación de la molécula. La liposolubilidad del fármaco determina la potencia farmacológica: a mayor liposolubilidad mayor potencia.<sup>(6)</sup>

- Un grupo hidrofílico: una amina secundaria o terciaria, que modula la hidrosolubilidad y por consiguiente su difusión sanguínea e ionización.<sup>(6)</sup>
- Una cadena intermedia con un enlace de tipo éster o amida, responsable de la velocidad de metabolización del fármaco y, por tanto, determinante de la duración de la acción y su toxicidad.<sup>(6)</sup>

La naturaleza del enlace que une la cadena intermedia con el anillo aromático será determinante de las propiedades farmacocinéticas del fármaco y servirá de base para la clasificación de este grupo de medicamentos. El enlace tipo éster se hidroliza con mayor rapidez que el tipo amida al ser degradado, a nivel sanguíneo, por las colinesterasas plasmáticas versus la degradación hepática que requiere el enlace amida. Esta misma característica es también la que confiere mayor estabilidad fisicoquímica a los anestésicos tipo aminoamida, permitiendo así su combinación con ácidos y bases fuertes y disminuyendo su sensibilidad respecto a la luz y la temperatura.<sup>(6)</sup>

### 1.3 Propiedades farmacológicas

La acción anestésica se aprecia sobre cualquier membrana excitable, es decir, los anestésicos locales pueden actuar en cualquier punto de una neurona, soma, dendritas, axón, terminación sináptica y terminación receptora en cualquier centro o grupo neuronal, ganglios e, incluso, en la membrana muscular y en el miocardio.<sup>(10)</sup>

Sistema nervioso central: Cuando los anestésicos locales se administran directamente por vía intravenosa a dosis altas o cuando se absorben con rapidez desde localizaciones periféricas, pueden alcanzar concentraciones plasmáticas suficientes para afectar la fisiología de varios sistemas orgánicos, en particular el SNC y el sistema cardiocirculatorio.<sup>(10)</sup>

En el SNC, la respuesta es compleja, con una mezcla de signos de depresión y de excitación secundaria a inhibición de vías inhibitoras. La acción estimulante se caracteriza por náuseas, vómitos, agitación psicomotriz,

confusión, verborrea, temblores y convulsiones. La depresión generalizada del SNC origina coma, paro respiratorio y muerte.<sup>(10)</sup>

Sistema cardiovascular: A las dosis comúnmente utilizadas para producir anestesia local o regional no afectan la función cardiovascular, pero tienen la potencialidad de actuar directa e indirectamente a todos los niveles: corazón, vasos y vías nerviosas reguladoras. A dosis terapéuticas pueden producir taquicardia e, incluso, aumento de la resistencia periférica por acción vasoconstrictora en algunos territorios. Pero dosis altas provocan vasodilatación arteriolar e hipotensión, tanto por acción directa sobre los vasos como por reducir la conducción adrenérgica vasoconstrictora, y alteraciones de la función cardíaca en forma de depresión de la conducción y de la contractilidad. En general se necesita mayor concentración de anestésico local para producir depresión cardiovascular que para originar actividad convulsiva.<sup>(10)</sup>

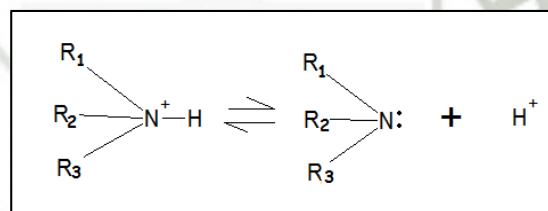
Ejerce su acción como antiarrítmico disminuyendo la despolarización, el automatismo y la excitabilidad en los ventrículos durante la fase diastólica mediante una acción directa sobre los tejidos, en especial la red de Purkinje, sin involucrar al sistema autónomo.<sup>(10)</sup>

#### **1.4 Mecanismo de acción**

Los anestésicos suprimen la respuesta al dolor, porque inhiben a los nervios sensoriales que transmiten el estímulo doloroso al SNC, bloquean la conducción de fibras nerviosas al actuar directamente en las membranas nerviosas, e interactúan con estas para inhibir el cruce de los iones de sodio a través de las membranas. Si se inhibe el movimiento de los iones de sodio, los nervios no se despolarizan y la conducción de impulsos por el nervio se bloquea. Este bloqueo de conducción nerviosa es reversible. Los nervios sensoriales transmiten impulsos de dolor, tacto calor, frío al cerebro, los nervios sensoriales y los nervios autónomos son las primeras fibras que bloquean los anestésicos locales.<sup>(11)</sup>

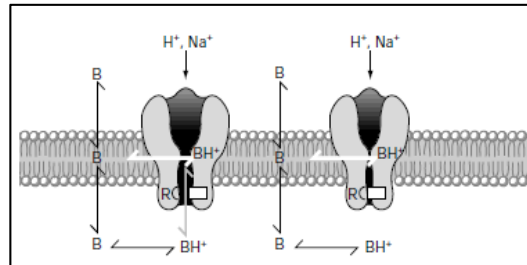
Los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de potencial se bloquean por algunos fármacos utilizados como antiarrítmicos, como anestésicos locales o como los anticonvulsivos. Los anestésicos locales se unen a los canales de sodio en la membrana de las células nerviosas, bloqueando la iniciación y la transmisión de los impulsos nerviosos. <sup>(12)</sup>

Todos estos datos indican que el sitio de fijación para anestésicos locales está situado en la porción interna de la región transmembrana del canal y que la forma no ionizada del anestésico actúa como vehículo transportador para atravesar la fase lipídica de la membrana neuronal. Una vez que la molécula de anestésico se halla en el interior del canal, la forma ionizada es la responsable de la interacción con el receptor y por lo tanto de la actividad farmacológica. En la Fig.Nº1.2 podemos ver la ionización de un anestésico local.



**Fig.Nº1.2** Ionización de un anestésico local

Los compuestos polares ( $\text{BH}^+$ ) para acceder al sitio de fijación para anestésicos locales desde el interior de la célula, a través del poro axoplásmico requieren que se encuentre abierto, mientras que los compuestos apolares (B) lo hacen directamente a través de la membrana. <sup>(7)</sup> En la Fig.Nº 1.3 podemos ver la interacción de los compuestos polares con los canales de sodio y los compuestos apolares con la membrana.



**Fig.Nº 1.3** Interacción de los anestésicos locales con el canal de sodio

### 1.5 Aplicaciones clínicas

La aplicación tópica de anestésicos locales alivia el dolor y el prurito que se relaciona con quemaduras de sol, abrasiones de la piel, picaduras de insectos y otras reacciones alérgicas, así como erupciones por varicela, alivio sintomático del prurito anal y genital, el envenenamiento con hiedra y muchas otras dermatosis agudas y crónicas<sup>(11)</sup>

Anestesia local tópica en membranas mucosas accesibles (endoscopia o exploración de esófago, laringe, boca, cavidad nasal, faringe, recto, tráquea y tracto urinario), alivio sintomático de trastornos anorrectales (hemorroides, dolor anorrectal), tratamiento de trastornos de la cavidad oral (dolor por irritación, inflamación en lesiones de boca y encías, dolor por prótesis dental), tratamiento del dolor, prurito e inflamación de las enfermedades menores de la piel. Por vía parenteral está indicada para producir anestesia local o regional, analgesia y bloqueo neuromuscular en grado variable antes de las intervenciones quirúrgicas dentales y parto obstétrico; por vía intravenosa o intramuscular (acción sistémica) es el fármaco de elección para el tratamiento de urgencia de las arritmias ventriculares.<sup>(8)</sup>

### 1.6 Farmacocinética

- El efecto anestésico máximo por aplicación tópica de la lidocaína se produce en 2 a 4 minutos, y la anestesia dura de 30 a 45 minutos. Los anestésicos

locales se absorben rápidamente en la circulación después de su aplicación tópica a las mucosas. <sup>(10)</sup>

- Metabolismo:

Amidas: son metabolizadas por el hígado por las oxidasas microsomales de función mixta por alquilación a monoetilglicina y xilidida seguida de hidrólisis. <sup>(10)</sup>

- Ésteres: son metabolizados por pseudocolinesterasas plasmáticas. Algunos pacientes poseen pseudocolinesterasas atípicas, por lo que tienen un metabolismo retardado de los anestésicos locales tipo éster. <sup>(10)</sup>

- Excreción: Por vía renal, en su gran mayoría en forma de metabolitos inactivos más hidrosolubles y una pequeña proporción con las heces. La eliminación de los anestésicos locales de tipo amida está disminuida en el recién nacido, en la enfermedad hepática y en la insuficiencia renal. <sup>(10)</sup>

- La unión a proteínas es importante pues determina cuánto va a durar el efecto del anestésico. Cuanto más unido este a proteínas, más retardado va a ser el metabolismo. La lidocaína tiene menor unión a proteínas, su efecto es más corto. <sup>(9)</sup>

- El pKa (inicio del efecto): Es la constante de disociación ácida representa el pH al cual una sustancia esta ionizada al 50%. Esto es importante porque entre más cercana sea el pKa al pH fisiológico, más rápido inicia el efecto del fármaco, mayor es la proporción de la forma no ionizada y más rápida su penetración a través de las membranas de los nervios, el pKa de la lidocaína es 7.9, el pH fisiológico es de 7.4 de esta forma existe un alto porcentaje de forma no ionizada que puede atravesar la membrana celular para llegar a su sitio de acción y se acepta que solo puede hacerlo en formas de amina no cargada por esto es que el inicio del efecto de la lidocaína es más rápido (2-4 minutos). <sup>(9)</sup>

- Cuanto más liposoluble es más potente es decir que puede atravesar fácilmente la membrana celular para ejercer su efecto, la lidocaína en comparación de otros es menos liposoluble. <sup>(9)</sup>

## 1.7 Reacciones Adversas

Administración tópica: rash cutáneo, urticaria o angioedema por reacción alérgica, administración parenteral como anestésico local: rash cutáneo, urticaria o angioedema por reacción alérgica; como anestésico dental: adormecimiento prolongado de labios y boca; como anestésico raquídeo: cefaleas, náuseas, vómitos y tortícolis. Administración parenteral como antiarrítmico: rash cutáneo y angioedema por reacción alérgica, dolor en el punto de inyección ansiedad, mareos, somnolencia.<sup>(10)</sup>

## 1.8 Formas Farmacéuticas semisólidas

### Pomadas

Los pomadas son preparados farmacéuticos caracterizados por su consistencia semisólida. Están destinadas a ser aplicadas sobre la piel o las mucosas con el fin de ejercer una acción local o dan lugar a la penetración cutánea de principios activos, o por su propia acción emoliente o protectora. Añade asimismo que deberán tener un aspecto externo homogéneo.<sup>(11)</sup>

En relación a los excipientes integrantes de la pomadas, la Farmacopea Europea indica que pueden ser sustancias de origen natural o sintético y estar constituidos por un sistema de una o varias fases y que de acuerdo con la naturaleza del excipiente, la pomada puede tener propiedades hidrofílicas o hidrofóbicas. Se indica que dichas formas galénicas pueden contener además agentes antimicrobianos, antioxidantes, estabilizantes, emulgentes y espesantes: asimismo se precisa la necesidad de su esterilidad cuando estén destinadas a ser aplicadas en heridas abiertas, piel gravemente dañada y también las de aplicación oftálmica.<sup>(11)</sup>

Los tipos de bases para pomadas usadas como vehículos para drogas son seleccionadas o diseñadas para la liberación óptima de las drogas. Las

propiedades de las pomadas varían, ya que están diseñadas para usos específicos y para facilitar su aplicación o la magnitud de esta.<sup>(11)</sup>

La definición oficial incluye bases vaselinadas, es decir oleosas, bases de emulsión, ya sea agua en aceite (W/O) o aceite en agua (O/W) y las llamadas bases hidrosolubles.<sup>(11)</sup>

Una base para pomada que funcione como vehículo de una droga debe ser optimizada para una en especial. Una base no debe de ser irritante, tiene que ser fácil de eliminar, debe ser estable, no debe depender del pH y compatible con la droga.<sup>(11)</sup>

### **Clasificación**

Todos los preparados de consistencia semisólida están, de hecho, englobados en la definición genérica de pomadas, pero a menudo se utilizan otras denominaciones más específicas, relacionadas con sus características fisicoquímicas y su consistencia más o menos blanda.<sup>(11)</sup>

Deben distinguirse varias categorías de pomadas<sup>(11)</sup>

**A. Las pomadas propiamente dichas:** Constan de un excipiente de una sola fase en el que se pueden dispersar sólidos o líquidos, constituidas por preparados bien de :

- a) **Naturaleza Hidrófoba:** No pueden absorber más que pequeñas cantidades de agua. Las sustancias que más se emplean en su formulación son: vaselina, parafina, parafina líquida, aceites vegetales, glicéridos sintéticos, ceras y siliconas líquidas.
- b) **Hidroabsorbentes:** Pueden absorber grandes cantidades de este líquido.

Sus excipientes son los de las pomadas hidrófobas a los cuales se incorporan emulgentes tipo W/O como la lanolina, los alcoholes de grasas de lana, esteres de sorbitano, monoglicéridos y alcoholes grasos.

- Bases emulgentes O/W

- Bases de absorción W/O

- c) **Hidrófilos:** Se elaboran con excipientes miscibles en agua, tales como los polietilenglicoles líquidos y sólidos. Pueden contener cantidades adecuadas de agua.<sup>(11)</sup>

### **Excipientes hidrófilos**

Son vehículos sin grasas constituidas por materiales que, por si mismos o en presencia de agua, adquieren consistencia semisólida y son útiles como excipientes para a la aplicación de fármacos sobre la piel.<sup>(12)</sup>

No poseen capacidad oclusiva y no favorecen, por si mismos, la penetración de los fármacos. A pesar de ellos, se consideran muy adecuados como vehículos de diversos fármacos. Las ventajas de estas bases residen en su acción favorable sobre los tejidos y su fácil eliminación por lavado. Sin embargo, presentan algunos inconvenientes, como son, por una parte, su tendencia a deshidratarse con pérdida de su textura original y por otra, la necesidad, casi siempre, de adicionar conservantes que garanticen el grado de pureza microbiana adecuado.<sup>(12)</sup>

### **Excipientes anhidros**

Tienen mayor margen de compatibilidad con los medicamentos y se utilizan en muchos casos como vehículos de estos. Los más importantes dentro del grupo son los polietilenglicoles (macrogoles), que son polímeros de fórmula general.<sup>(12)</sup>

Los elementos de peso molecular 200-700 son líquidos de viscosidad creciente; los de peso molecular 800-1500 tienen consistencia semisólida, y los superiores 3000-6000 son céreos o sólidos (carbowax). Mediante combinaciones en proporciones conveniente de

polietilenglicoles de bajo y elevado peso molecular se obtienen productos que poseen consistencia de pomadas.<sup>(12)</sup>

Su ventaja principal es la de ser soluble en agua. A medida que el peso molecular aumenta, se van haciendo más y más compatibles con las grasas, hasta el punto de que los últimos forman parte de algunos excipientes grasos.<sup>(12)</sup>

Los polietilenglicoles son útiles como vehículos de fármacos, pero poseen algunas incompatibilidades (compuestos fenólicos, ácido benzoico y algunos fármacos específicos). No obstante, por sus propiedades dermatológicas, las bases de polietilenglicol han alcanzado gran difusión. Su utilización es especialmente adecuada para pieles seboreicas. No son irritantes, poseen una buena capacidad de adherencia y extensibilidad sobre la piel y no impiden la transpiración gaseosa ni la sudoración. Su elevada higroscopicidad hace que se consideren excelentes excipientes para el secado de heridas.<sup>(12)</sup>

## B. Cremas

Las cremas son emulsiones líquidas viscosas o semisólidas de tipo aceite en agua O/W o agua en aceite W/O. Las cremas farmacéuticas se clasifican como bases lavables con agua y se describen en la sección pomadas. Son formas farmacéuticas constituidas por dos fases: una lipófila y otra acuosa; tienen consistencia blanda por su alto contenido acuoso.<sup>(13)</sup>

**Hidrófobas:** La fase continua o externa es la fase lipófila debido a la presencia en su composición de emulgentes tipo W/O.

**Hidrófilas:** La fase externa es de naturaleza acuosa debido a la presencia en su composición de emulgentes tipo O/W.

Una diferencia entre la crema y la pomada es que la pomada fluye con dificultad y las cremas fluyen fácilmente, además las pomadas son siempre monofásicas.

**C. Pastas:** Contienen elevadas proporciones de sólidos finamente dispersos en el excipiente lipófilo (pastas grasas) o hidrófilo (pastas acuosas) por lo que, generalmente, su consistencia es bastante elevada. Son muy consistentes y de bajo flujo, contienen polvos insolubles como óxido de zinc, almidón, caolín, talco.<sup>(13)</sup>

**D. Geles:** Los geles (a veces llamados jaleas) son sistemas semisólidos que consisten de suspensiones compuestas por partículas inorgánicas pequeñas o moléculas orgánicas grandes interpenetradas por un líquido. Cuando la masa del gel consiste en una red de partículas pequeñas separadas, el gel se clasifica como un sistema bifásico.<sup>(13)</sup>

Los geles monofásicos consisten en macromoléculas orgánicas distribuidos de modo uniforme a través de un líquido de manera que no existen límites aparentes entre las macromoléculas dispersas y el líquido. Los geles monofásicos pueden obtenerse de macromoléculas sintéticas (p.ej. carbómero) o de gomas naturales (p.ej. tragacanto) y estas últimas llamadas mucílagos. Si bien los geles generalmente son acuosos, pueden utilizarse alcoholes o aceites como fase continua.<sup>(13)</sup>

Los geles pueden usarse para la administración de drogas en forma tópica. La definición de BP establece que los geles consisten en líquidos gelificados mediante agentes gelificantes adecuados.<sup>(13)</sup>

**Geles hidrófobos:** Las bases de los geles hidrófobos (oleogeles) por lo general consisten en parafina líquida con polietileno o aceites grasos gelificados con silica coloidal o jabones de aluminio y zinc.<sup>(13)</sup>

**Geles hidrófilos:** Las bases de los geles hidrófilos (hidrogeles) por lo general consisten en agua, glicerol o propilenglicol gelificados con agentes gelificantes como tragacanto, almidón, derivados de la celulosa, silicatos de aluminio y magnesio.<sup>(13)</sup>

### 1.8.1 Procedimiento para la elaboración de lidocaína 5% pomada

#### Formulación:

MATERIAS PRIMAS DE LA FORMULACIÓN	CANTIDAD	
Polietilenglicol 400	48.00	g
Propilenglicol	25.00	g
Polietilenglicol 4000	22.00	g
Lidocaína Base	5.126	g

En un beaker de 500 mL adicionar polietilenglicol 400 calentar a 80° C aproximadamente, una vez caliente adicionar polietilenglicol 4000 agitar hasta completa disolución, agregar lidocaína base en esta mezcla disolviendo en caliente y bajo constante agitación manual, agregar lentamente y bajo agitación propilenglicol, agitar manualmente hasta completa homogenización.

#### Características de la lidocaína base

Polvo cristalino blanco o ligeramente amarillo. Tiene un olor característico y es estable al aire. Muy soluble en alcohol y cloroformo, fácilmente soluble en benceno y éter, prácticamente insoluble en agua y se disuelve en aceites. <sup>(5,14)</sup>

#### Características de los excipientes

Al elaborar la pomada que contiene lidocaína base como principio activo se tuvo como excipientes bases hidrosolubles lo cual significa que se disuelven fácilmente en agua ofreciendo una ventaja al momento de disolver la pomada en la fase móvil (agua: metanol) de nuestro método por cromatografía líquida de alta performance permitiendo así una recuperación adecuada del principio activo el cual pretendemos cuantificar.

**Propilenglicol** <sup>(5)</sup>

Iupac: propano-1,2-diol

**Descripción**

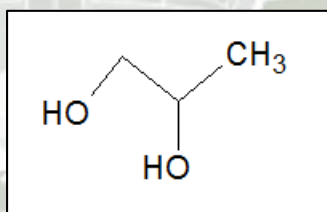
Líquido transparente, incoloro, viscoso, con un sabor leve característico prácticamente inodoro. Absorbe la humedad cuando se expone al aire húmedo.

pH (25°C): 7.0-8.5

Peso específico: 1.035-1.037

**Solubilidad**

- Con agua, con acetona y con cloroformo: miscible
- En éter: soluble
- Con muchos aceites esenciales: disuelve
- Con aceites fijos: inmisible



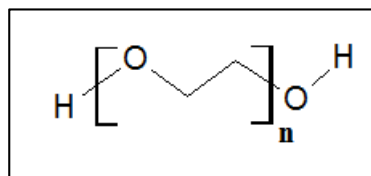
**Fig.Nº1.4** Estructura del propilenglicol

**Polietilenglicol 400** <sup>(5)</sup>

Iupac: Poli(oxietileno)

Líquido transparente a levemente turbio, incoloro o prácticamente incoloro, levemente higroscópico y viscoso, con un leve olor característico y un peso específico a 25°C de aproximadamente 1.12.

La temperatura de solidificación aproximada es de 6°C.



**Fig. N°1.5** Estructura del polietilenglicol

### **Solubilidad**

- Con agua: miscible
- En acetona, en alcohol, en cloroformo, en éter monoetílico: soluble
- En acetato de etilo y en tolueno: soluble
- En éter y en hexano: insoluble

### **Polietilenglicol 4000** <sup>(5)</sup>

Material plástico, prácticamente inodoro e insípido, blanco, ceroso, con una consistencia similar a la cera de abejas, o bien como copos, perlas o polvos de color blanco cremoso. pH:4.5-.7.5

### **Solubilidad**

- En agua: Fácilmente Soluble
- En acetona, en alcohol, en cloroformo, en éter monoetílico de etilenglicol, en acetato de etilo y en tolueno: soluble
- En éter y en hexano: insoluble

### 1.8.2 Preparados, dosis y vías de administración<sup>(15)</sup>

En la tabla N° 1.1 se muestran los diferentes preparados de la lidocaína, sus respectivas dosis y vías de administración.

**Tabla N° 1.1** Características de la lidocaína anestésico local de uso común

MEDICAMENTO	DURACIÓN	VÍA	PRESENTACIONES	DOSIS
Lidocaína	0.5-1h	Inyección	solución 2 y 4%	
		Intravenosa	10 a 20 mg/mL	1 a 1.5 mg/Kg de peso corporal
	90 min	Intramuscular		4 a 5 mg/Kg
		Infiltración	0.5 a 1 %	
		Infusiones		1 a 4 mg / min
Lidocaína	3h	Tópica	parche de lidocaína al 5%	
		Tópica	jalea 2%,ungüento 2.5% y 5%	

- En el laboratorio Medifarma S.A se elaboró una pomada de lidocaína al 5% cuya dosis se presenta a continuación:
  - a) Dosis usual en adultos y adolescentes:  
Anestésico local de mucosas.
    - Mucosa oral: Tópica, aplicar pomada al 5% a la mucosa oral previamente seca.
    - Para uso durante el ajuste de nuevas dentaduras: Aplicar a toda la superficie dental que tenga contacto con la mucosa hasta un máximo de 5 g de pomada por dosis o 20 g de pomada por día.
    - Orofaringea: Tópica, aplicar pomada al 5% al área deseada o al instrumento antes de la inserción.
  - b) Dosis usual pediátrica:  
Anestésico local de mucosas: Tópico, la dosis debe ser individualizada, dependiendo de la edad, peso y condición física del niño, hasta un máximo

de 4.5 mg por kg de peso corporal o 2.5 g de pomada en un período de 6 horas.

## 1.9 Métodos para cuantificar lidocaína base

**1.9.1 Método 1 Valoraciones Volumétricas Residuales:** Algunas valoraciones farmacopeicas requieren la adición de un volumen determinado de una solución volumétrica, en exceso del necesario para reaccionar con la sustancia a valorar. Después, el excedente de esta solución se valora con una solución volumétrica. Esto constituye una volumetría residual y también se conoce como "retrovaloración" o "valoración por retorno". La cantidad de la sustancia valorada se puede calcular a partir de la diferencia entre el volumen de la solución volumétrica que se agregó originalmente corregida por medio de una valoración con un blanco y el consumido por la solución volumétrica en la retrovaloración, teniendo en cuenta los respectivos factores de molaridad o normalidad de las dos soluciones y el factor de equivalencia para la sustancia indicado en la monografía correspondiente. <sup>(5)</sup>

### Dosaje:

Rango establecido según USP 36:

El Ungüento de Lidocaína es lidocaína en una base hidrófila de ungüento adecuada. Contiene no menos de 95.0 por ciento y no más de 105.0 por ciento de la cantidad declarada de lidocaína y como lidocaína base contiene no menos de 4.75 g/100 g y no más de 5.25 g/100 g. <sup>(5)</sup>

Lidocaína base : 5,00(4.75-5.25)g/100g

% : (95.0%-105.0%)

### Valoración:

Pesar con exactitud una cantidad de 1 g de muestra y transferir a un separador que contenga de 10 a 15 mL de agua purificada, mezclar para asegurar la dilución total de la pomada, agregando 1 mL de hidróxido de amonio 6N y extraer agitando con cuatro porciones de 20 mL de cloroformo. Combinar los extractos clorofórmicos y

evaporar con ayuda de una corriente de aire tibio, agregando 25.0 mL de ácido sulfúrico 0.02N SV hasta justo antes de eliminar la última traza de cloroformo. Completar la evaporación de cloroformo. Adicionar 0.5 mL de indicador de lidocaína y valorar el exceso de ácido sulfúrico con hidróxido de sodio 0.02N SV hasta la aparición de un color verde. Realizar un blanco en las mismas condiciones que la muestra.<sup>(5)</sup>

**Indicador de lidocaína:** Preparar una mezcla de 3 partes de verde de bromocresol SR y 1 parte de rojo de metilo SR.<sup>(5)</sup>

**Verde de bromocresol SR:** Disolver 50 mg de verde de bromocresol en 100 mL de alcohol y filtrar si fuera necesario.<sup>(5)</sup>

**Rojo de metilo SR:** Disolver 100 mg de rojo de metilo en 100 mL de alcohol y filtrar si fuera necesario.<sup>(5)</sup>

**Cálculos:**

$$\text{Lidocaína base g/100 g} = \frac{(Gb - Gm) \times F \times 4.686 \times 100}{Wm \times 1000}$$

**Dónde:**

Gb: Volumen en mL del hidróxido de sodio 0.02 N SV consumidos en el blanco

Gm: Volumen en mL del hidróxido de sodio 0.02 N SV consumidos en la muestra

F: Factor de corrección del hidróxido de sodio 0.02 N SV

4.686: mg equivalente de lidocaína por cada mL de ácido sulfúrico 0.02N SV

Wm: peso de la muestra expresada en g.<sup>(5)</sup>

Solución Valorada (SV): solución de concentración exactamente conocida, que contiene una masa conocida de soluto en un volumen definido de solución o de solvente.

- Cálculo del mg equivalente de lidocaína por mL de ácido sulfúrico 0.02 N

**Lidocaína base:****Peso Molecular:** 234.34 g/mol

$$\frac{1 \text{ mol}}{L} \times \frac{234.34 \text{ g}}{\text{mol}}$$

1 M	234.34 g	1000 mL
0.01 M	2.3434 g	1000 mL
0.01 N	2.3434 mg	1 mL
0.02 N	4.686 mg	1 mL

**1.9.2 Método 2: Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)****1.9.2.1 Definición:**

La cromatografía de líquidos según se usa en compendios, es sinónimo de cromatografía líquida de alta presión y de cromatografía líquida de alta resolución. La cromatografía de líquidos es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida.

La cromatografía es un método separativo, la columna, donde se produce la separación puede considerarse el corazón del sistema cromatográfico.

(16)

Se utiliza para separar y determinar las especies presentes en muestras de materiales orgánicos, inorgánicos y biológicos. La cromatografía de líquidos de alta resolución se puede clasificar según la naturaleza de la fase estacionaria. Así existe, la cromatografía de partición o cromatografía de líquido-líquido, de adsorción o cromatografía líquido-sólido, de intercambio iónico o cromatografía iónica, de exclusión molecular y cromatografía de afinidad.<sup>(16)</sup>

### 1.9.2.2 Partes:

#### **Un reservorio de fase móvil:**

El reservorio es el recipiente que contiene la fase móvil. Puede ubicarse externamente en un equipo modular, y en general algunos centímetros sobre el nivel de la bomba para que la fuerza de gravedad dirija el solvente hacia esta.<sup>(16)</sup>

#### **Tuberías:**

La fase móvil empleada en HPLC debe circular por tuberías que conectan el reservorio de solvente con la bomba, la bomba con el inyector, este con uno o más detectores conectados en serie, y eventualmente con un colector de fracciones o válvulas de distribución. Es evidente que estas tuberías deberán ser inertes, y de acuerdo a su ubicación en el sistema cromatográfico, resistente a altas presiones. Así se emplean tubos de acero inoxidable o poliméricas.<sup>(16)</sup>

**Uniones:** Las uniones permiten conectar las tuberías, y con ellas, los distintos componentes del sistema cromatográfico.<sup>(16)</sup>

#### **Bomba:**

Las bombas de HPLC impulsan la fase móvil proveniente del reservorio de solvente hacia el inyector, y desde allí hacia la columna. Su caudal de trabajo puede ser muy variable, según la escala de trabajo escogida. Existen bombas capaces de entregar caudales muy pequeños, del orden de microlitros/ minuto pasando a caudales de unos pocos mililitros/ minuto para la cromatografía analítica convencional.<sup>(16)</sup>

#### **Inyectores:**

El inyector es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal de solvente a través del sistema.<sup>(16)</sup>

### Detectores:

El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite “ver” y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica, se utilizan distintos tipos de sistemas de detección que pueden clasificarse de la siguiente forma: <sup>(16)</sup>

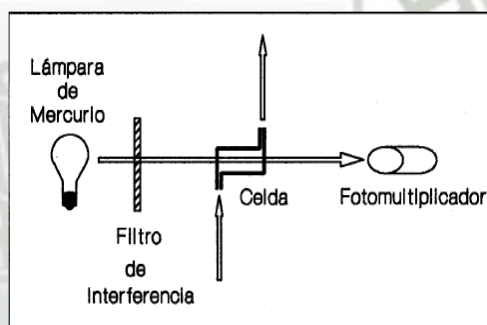
- a) Los detectores basados en una **propiedad de la disolución** miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene el analito en comparación con la misma fase móvil pura, también llamados detectores generales suelen ser poco sensibles, ejemplos: detector de índice de refracción y el de conductividad.
- b) Los detectores selectivos basados en una **propiedad del soluto** responden a una propiedad física o físico-química del soluto, y que generalmente no la presenta la fase móvil. Suelen ser bastante selectivos y muy sensibles, por ejemplo el detector UV, que producirá una señal proporcional a la absorbancia del soluto a una longitud de onda dada.

### Detectores UV:

Es el detector más empleado en HPLC. Posee buena sensibilidad y rango lineal, y permite detectar analitos en el orden de nanogramos. No es destructivo y puede emplearse con gradiente de solventes, con la única limitación de que estos sean transparentes en la longitud de onda de trabajo. Es un detector muy poco sensible a los cambios de caudal y temperatura. El detector UV opera en el rango de 190 a 350 nm, y en algunos equipos se puede extender a la zona del visible del espectro (350 a 700 nm) recibiendo así el nombre de detector UV/visible. La concentración del analito en la muestra se determina por aplicación de la ley de Beer:  $A = a \cdot b \cdot C$  donde A es la absorbancia, a es la absorptividad molar del analito, b es el camino óptico de la celda medido en cm y C es la concentración del analito en la muestra expresado en moles/L. <sup>(16)</sup>

Existen dos tipos de detectores UV: los de longitud de onda fija y los de longitud de onda variable.<sup>(16)</sup>

**Detectores de longitud de onda fija:** Este detector opera a longitudes de onda prefijadas, determinadas por las líneas de emisión de su lámpara, habitualmente de mercurio de baja presión. Como longitudes de onda de trabajo se utilizan las bandas de emisión de la lámpara de mercurio, especialmente la fuerte línea de 254 nm. El verdadero monocromador del instrumento es la propia emisión de la lámpara pero, para eliminar líneas de otras longitudes de onda lejanas a la línea de trabajo se utilizan filtros de interferencia. La lámpara de mercurio no emite a 280 nm, pero los filtros de óxido de fósforo, al ser irradiados con la lámpara de mercurio emiten a esa longitud de onda.<sup>(16)</sup>



**Fig. 1.6** Detector de onda fija o fotométrica

#### **Detector de onda variable o espectrofotométrico:**

Este detector es simplemente un espectrofotómetro, en el cual se reemplaza el compartimiento de cubetas por una celda de flujo. Es mucho más versátil que el detector de longitud de onda fija ya que al tener red de difracción permite seleccionar libremente la longitud de onda de trabajo. Podremos escoger así la longitud de onda de máxima absorción del analito para aumentar la sensibilidad de medición. Emplea una lámpara de emisión continua, de deuterio o de xenón. La luz emitida por la lámpara se enfocan a un monocromador, habitualmente una red holográfica de

difracción, y la luz monocromática escogida se dirige hacia la celda de medida y de allí hacia el fotomultiplicador.<sup>(16)</sup>

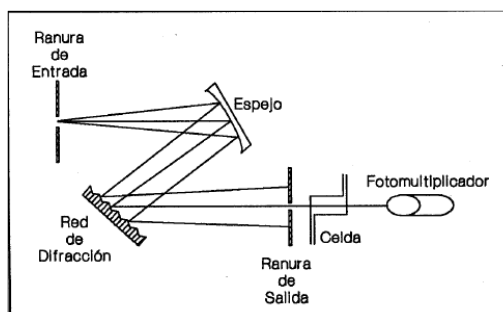


Fig.Nº 1.7 Detector de onda variable o espectrofotométrico

#### **Fase estacionaria:**

Las separaciones se logran por procesos de partición, adsorción e intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada. Las fases estacionarias más comúnmente usadas son la sílice modificada o las microperlas de polímero. Las microperlas se modifican agregando hidrocarburos de cadena larga.<sup>(16)</sup>

#### **Columna cromatográfica:**

El término columna incluye columnas de acero inoxidable, de acero inoxidable con recubrimiento interno y poliméricas, rellenas con una fase estacionaria. La longitud y el diámetro de las columnas afectan la separación y por lo tanto, las dimensiones típicas se incluyen en la monografía individual.<sup>(16)</sup>

#### **Fase móvil:**

La fase móvil es un disolvente o mezcla de disolventes.<sup>(16)</sup>

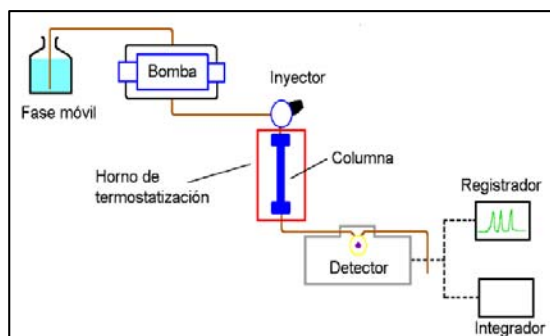
**Elución en gradiente:** Se denomina elución en gradiente o programación del disolvente a la técnica de cambiar continuamente la composición del disolvente durante la cromatografía.<sup>(16)</sup>

**Sistema de toma y procesamiento de datos:** El resultado del ensayo cromatográfico es, por un lado, la obtención de fracciones separadas de los componentes de la muestra, y por el otro, la de un gráfico o cromatograma, de cuya interpretación pueden extraerse conclusiones cualitativas y cuantitativas. 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. <sup>(16)</sup>

**Registro gráfico,** que convierte la señal en un gráfico de tipo X-Y <sup>(16)</sup>

**Integrador,** que permiten no solo obtener un registro gráfico (cromatograma) sino también su tratamiento matemático para el cálculo de concentraciones. <sup>(16)</sup>

**Computador:** Básicamente, el integrador es una computadora de uso muy específico. En este punto nos referimos a una computadora, que permite con el software apropiado tanto el registro gráfico del cromatograma como los cálculos apropiados, la manipulación de datos, el almacenamiento de ensayos, generación de reportes, e incluso el manejo global de varios cromatógrafos. Como las computadoras necesitan señales digitalizadas, se necesita una interface analógica digital que convierta la señal analógica entregada por el detector. <sup>(16)</sup>

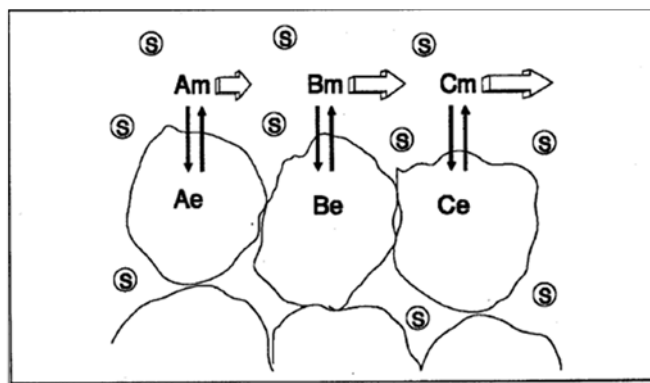


**Fig.Nº 1.8** Esquema de los componentes de un equipo para HPLC

En la Fig. Nº 1.8 podemos observar que el cromatógrafo líquido está constituido por un reservorio de solventes que alimenta al sistema con la fase móvil, luego el inyector que permite la introducción de la muestra; la bomba la cual es un sistema para forzar el pasaje de la muestra y la fase móvil a través de la columna; el detector sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna, el sistema de registro de los datos provenientes del detector, la señal del detector la cual puede ser interpretada y procesada por una computadora como resultado del análisis cromatográfico se obtiene un cromatograma el cual relaciona la concentración de soluto en función del tiempo de elución.<sup>(16)</sup>

### 1.9.2.3 Bases de la separación:

Cuando la muestra y la fase móvil son forzados 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 electrostáticas que son las responsables de la menor o mayor afinidad de cada uno de los componentes de la muestra por la fase móvil o la fase estacionaria. Así, el componente más a fin a la fase estacionaria se retiene más y tarda más en eluir (es decir en salir de la columna) y el más a fin a la fase móvil se retiene menos y eluye antes.<sup>(16)</sup>



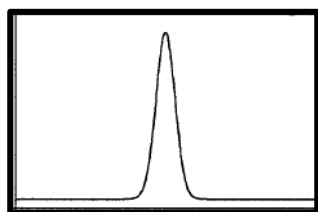
**Fig.Nº 1.9** Separación hipotética de los solutos A, B, C, en equilibrio entre la fase móvil (m) y la estacionaria (e).S representa las moléculas de fase móvil.

En la Fig. Nº 1.9 se muestran algunas partículas de la fase estacionaria, moléculas de solvente (de la fase móvil) y moléculas de soluto (A, B, C), constituyentes de la muestra en ensayo. Para A, B, C: representado con el subíndice “m” la fracción del solutos disuelta en la fase móvil y con el subíndice “e” la disuelta en la fase estacionaria. Las características químicas de las especies A, B, C pueden ser, en relación a las moléculas del solvente y a los grupos funcionales de la fase estacionaria, lo suficientemente diferentes como para ser atraídas con distinta fuerza por esta última.

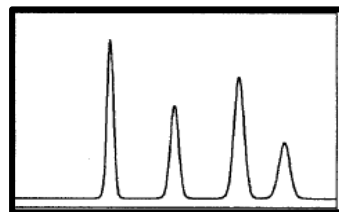
#### 1.9.2.4 Nomenclatura:

La nomenclatura en cromatografía fue estandarizada por la American Society for testing and Materials, ASTM y la International Unión of Pure and Applied Chemistry, IUPAC.<sup>(16)</sup>

**Cromatogramas:** Un cromatograma en una representación gráfica de la respuesta del detector.<sup>(16)</sup>



a) Pico gaussiano



b) Picos gaussiano separados

**Fig.N° 2.0** Algunos tipos de picos cromatográfico

**Volumen de elución ( $V_e$ ):** Es el volumen de fase móvil eluida entre la inyección y la elución de la concentración máxima del soluto. A caudal constante, el tiempo transcurrido entre dichos puntos corresponde al tiempo de elución o tiempo de retención.<sup>(16)</sup>

**Volumen muerto ( $V_o$ ):** Es el volumen total de solventes entre el punto de inyección y el de detección. Comprende el volumen que la fase móvil puede ocupar entre las partículas, entre las partículas y la pared de la columna, en el interior de las tuberías, uniones, etc.<sup>(16)</sup>

**Pico:** El pico es la porción de cromatograma que registra la respuesta del detector cuando un componente individual eluye de la columna.<sup>(16)</sup>

**Línea de base:** Es la porción del cromatograma donde solo se aprecia la elución de la fase móvil, sin señal debida al soluto.<sup>(16)</sup>

**Tiempo de retención ( $T_r$ ):** Es el tiempo medido entre la inyección y la elución de la concentración máxima del soluto enésimo (máxima señal). La distancia entre este máximo de la señal y la línea de base es la altura del pico en cuestión.<sup>(16)</sup>

**Factor de capacidad ( $K$ ):** Es el cociente entre el número de moles de soluto en la fase estacionaria y el número de moles de soluto en la fase móvil y está relacionado con el coeficiente de distribución entre ambas fases.<sup>(16)</sup>

$$K = \frac{\text{Número de moles del soluto en la fase estacionaria}}{\text{Número de moles del soluto en la fase móvil}}$$

**Resolución(R):** El objetivo primario de la cromatografía es la separación de los constituyentes de una muestra. Es natural, entonces, la necesidad de contar con una expresión cuantitativa de la calidad de la separación. La resolución se calcula por cada par de picos adyacentes como: <sup>(16)</sup>

$$R = \frac{(t_2 - t_1)}{1/2(w_2 + w_1)}$$

Dónde:

$t_2$  y  $t_1$  : tiempos de retención de los picos 2 y 1

$w_2$  y  $w_1$  : anchos de pico medidos en su base.

**Ancho de pico (w):** Esta medición se puede efectuar con varios objetivos: para calcular la eficiencia de la columna (platos teóricos), la resolución, para el cálculo manual de área de picos y en algunos integradores electrónicos se ingresa como dato de ajuste de integración. <sup>(16)</sup>

**Platos teóricos:** La eficiencia de una columna cromatográfica y por lo tanto su poder separativo se mide en función de su número de platos teóricos. <sup>(16)</sup>

#### 1.9.2.5 Cromatografía en fase reversa

La difusión de la fase reversa se debe a un factor clave: la silicagel (como también la alúmina), es un material fuertemente higroscópico. El agua adsorbida, que forma capas simples o múltiples alrededor de la partícula y llega a tapar sus poros, es responsable de la pérdida de actividad de la fase estacionaria en fase normal. <sup>(16)</sup>

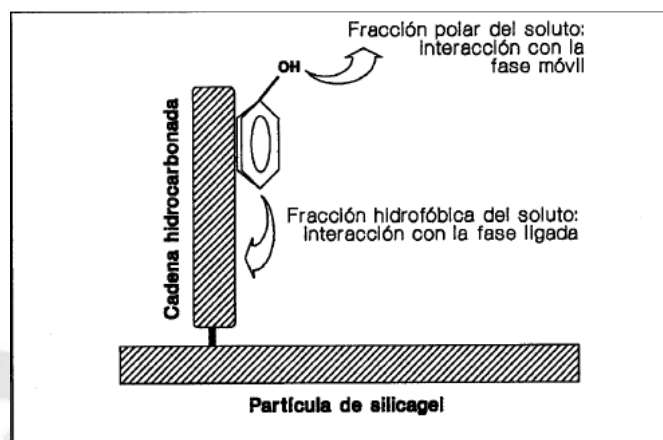
Las ventajas de la cromatografía en fase reversa pueden resumirse así:

- Compuestos no iónicos, iónicos e ionizables pueden ser separados en la misma columna, con la misma fase móvil.
- La fuerza de atracción superficie no polar –soluto es débil.
- La adsorción irreversible, frecuente en silicagel, raramente ocurre
- La fase móvil predominante es agua, abundante y económica.
- El modificador orgánico predominante, metanol, es asequible en calidad y precios adecuados.
- El orden de elución es predecible, en función de la hidrofobicidad del analito.
- Se necesita poco tiempo para el equilibrio del sistema luego de un cambio de fase móvil.

**Mecanismo de retención:** Se ha sugerido que el modo de interacción entre el soluto y la fase ligada puede ser de tres tipos, partición del soluto entre la fase móvil y una fase estacionaria líquida, adsorción sobre una fase estacionaria sólida.<sup>(16)</sup>

En HPLC, la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es muy polar en general mezcla de agua y un modificador orgánico, metanol. Como el material de relleno de la columna es no polar, las únicas fuerzas de interacción posibles deberían ser las de Van der Waals, descartándose la priori otras interacciones. Sin embargo, las fuerzas de Van der Waals no bastan por si mismas para justificar la retención observada.

La teoría **solvofóbica de Horvath** es probablemente la de mayor aceptación. Según esta, la fuerza de retención en fase reversa se debe al aumento de entropía que acompaña a la transferencia del soluto de la fase móvil (polar) a la fase estacionaria (no polar). Dicho de otro modo, la interacción de las moléculas de soluto y de solvente es mucho más débil que la interacción de las moléculas de solvente entre sí. Como consecuencia, el soluto es expulsado de la fase móvil y forzado a penetrar en la fase estacionaria, que actúa como receptor pasivo.<sup>(16)</sup>



**Fig.N° 2.1** Mecanismo de retención en fase reversa. Interacción de fenol con la fase estacionaria y la fase móvil.

La magnitud de la interacción soluto y fase estacionaria será mayor cuanto mayor sea el tamaño del grupo apolar y consecuentemente, la superficie de contacto. Por el contrario, las funciones polares del soluto favorecerán la interacción con los solventes polares y reducirán la retención.<sup>(16)</sup>

**La cadena hidrocarbonada:** El sustituyente más empleado en fase reversa es de tipo alquílico, especialmente C18 y en menor proporción C8. En HPLC, se observa que para igual carga de carbono, a mayor longitud de cadena corresponde mayor retención y para igual longitud de cadena alquílica, a mayor cobertura mayor retención.<sup>(16)</sup>

Berendsen observó que la retención de una serie de solutos aumenta con la longitud de la cadena hidrocarbonada de la fase ligada. En primer lugar, se comprueba que a mayor hidrofobicidad del soluto corresponde mayor retención.<sup>(16)</sup>

Aparentemente, la porción terminal de la cadena hidrocarbonada de la fase estacionaria es la que participa en el proceso de separación si nuestro soluto posee un grupo apolar de mayor tamaño, la superficie de contacto con la fase estacionaria será mayor y se retendrá más y si el soluto fuera de gran tamaño molecular, solo cadenas largas podrían separarlo eficientemente.<sup>(16)</sup>

## 2. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

### 2.1 Definición analítica

La validación de técnicas analíticas es el establecimiento de evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos.

La validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.<sup>(17)</sup>

### 2.2 Otros términos relacionados con la validación

#### CALIFICACIÓN

La operación por la que se comprueba que un equipo funciona correctamente y produce en realidad los resultados previstos.<sup>(17)</sup>

#### CALIBRACIÓN

Conjunto de operaciones que determinan, bajo condiciones previamente definidas, la relación entre los valores indicados por el sistema de medición y los valores conocidos correspondientes a un patrón de referencia.<sup>(17)</sup>

Por lo tanto, VALIDAR es verificar documentalmente que un método o proceso hace lo que tiene que hacer. CALIFICAR es dotar o verificar las cualidades o características inherentes a un aparato y calibración es una parte de la cualificación. Es por ello que los métodos deben ser validados y los equipos calificados.<sup>(18)</sup>

El tema documentario es muy importante también porque nos permite obtener la información y los parámetros necesarios para adecuar nuestra validación. Por lo tanto existen directivas como<sup>(18,19)</sup>

- Informes 34 y 37 de la OMS
- RESOLUCION N°0008-2003/INDECOPI-CRT
- GUIA DE LA AOAC
- GUIA DE LA FAO
- GUIA EURACHEM
- GUIA BRASILEÑA
- ICH Q2A: Validation of Analytical Procedures: Methodology
- ICH Q2B: Text on Validation of Analytical Procedures:

### **2.3 Razones que justifican la validación de métodos analíticos**

Las razones que justifican la validación de técnicas analíticas son:

- a) Demostrar que los métodos son adecuados a los análisis propuestos en las condiciones descritas, la validación es la herramienta que permite obtener las pruebas documentales al respecto.
- b) Trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados, lo cual a su vez minimizara el número de fallos y repeticiones permitiendo un ahorro de costos.
- c) Trabajar con métodos validados permite no solo el conocimiento del método analítico sino también cumplir con las exigencias legales tanto del registro de especialidades farmacéuticas como de las buenas prácticas del laboratorio con el fin de asegurar la calidad, eficacia del producto y cumplir con la regulación del país <sup>(18,19)</sup>

### **2.4 Métodos susceptibles de ser validados <sup>(17)</sup>**

- Ensayos de identificación
- Ensayos para la determinación del analito de interés de un materia prima o de una especialidad farmacéutica.
- Ensayos para la determinación de características farmacotécnicas inherentes (test de disolución).
- Ensayos de limite impurezas y cuantificación de impurezas.
- Ensayos para la determinación de analitos en fluidos biológicos.
- Ensayos microbiológicos.

## 2.5 Entorno Legal <sup>(17)</sup>

### 2.5.1 Requerimientos para el registro

Además la FDA requiere para el registro de nuevos productos que los métodos analíticos sean validados y debidamente documentados.

### 2.5.2 Normas de correcta fabricación de medicamentos

Las normas de correcta fabricación de medicamentos de la CEE indica que los métodos de análisis deben estar validados, de igual forma las Good Manufacturing Practice de los EEUU indican que deben establecerse y documentarse la exactitud, sensibilidad, especificidad y reproducibilidad de los métodos analíticos utilizados.

### 2.5.3 Farmacopeas

#### **Validación frente a los Métodos Oficiales y/o de Farmacopeas:**

Se puede diferenciar entre validación de métodos de análisis de principios activos y especialidades farmacéuticas.

a) Principios activos de síntesis: Los métodos oficiales o de Farmacopea se consideran validados siempre y cuando se apliquen a principios activos con la misma ruta de síntesis.

b) Especialidades: No es recomendable considerar ningún método oficial o de farmacopea totalmente validado para una especialidad, puesto que difícilmente tendrá los mismos componentes ni la misma proporción.

## 2.6 Organización: buenas prácticas de laboratorio <sup>(17)</sup>

Para validar un método analítico se requiere en primer lugar un entorno de trabajo que garantice la seguridad de los resultados que se obtengan. La consecución de esta garantía de calidad requiere trabajar de acuerdo con unas pautas correctas.

Las BPL surgieron para evitar deficiencias tales como experimentos sin protocolos previos, datos y resultados no supervisados o trazables, instrumentos y reactivos en condiciones inaceptables, muestras no representativas, personal no cualificado, etc.

Frente a estas deficiencias las BPL preconizaban un sistema unificado de trabajo y de gestión.

Las áreas de trabajo bajo normas BPL son:

- a) Organización y personal de laboratorio
- b) Instalaciones
- c) Cuidado, alojamiento y confinamiento de los elementos utilizados en los sistemas experimentales biológicos.
- d) Aparatos, materiales, reactivos
- e) Sistemas experimentales
- f) Productos de referencia
- g) Documentación
- h) Archivos: almacenamiento y conservación de registros
- i) Verificación de estudios
- j) Inspecciones

## 2.7 Fases en el desarrollo de un método analítico y criterios de validación <sup>(17)</sup>

El desarrollo lógico de un método analítico transcurre en diferentes fases.

### 2.7.1 Definición de las características de practicabilidad <sup>(17)</sup>

Han de evaluarse los parámetros de practicabilidad del método analítico: Precisión exigible, sensibilidad deseable, grado de selectividad, tiempo, coste, tamaño de la muestra, cualificación del personal, tipo de equipo e instrumentación, condiciones de seguridad.

### **2.7.2 Estudios de estabilidad de la muestra preparada para análisis** <sup>(17)</sup>

La estabilidad de la muestra preparada para analizar se evalúa durante la fase de desarrollo del método junto con la robustez.

La estabilidad de las disoluciones de la muestra, después de su preparación según el método de análisis, debe ser evaluada de acuerdo al tiempo requerido para su realización. Muchos laboratorios utilizan equipos automáticos que procesan muestras durante largos periodos de tiempo, con lo que la muestra puede permanecer horas preparada antes de ser analizada de la misma forma debe demostrarse la estabilidad de las muestras y patrones preparados si se utilizan durante varios días.

La forma de evaluación de este parámetro consistiría en realizar inyecciones replicadas de una misma muestra a lo largo del tiempo que se considere necesario. En caso de que la estabilidad de la muestra pueda afectar al resultado en el periodo de tiempo evaluado, se ha de hacer constar en el método de análisis.

### **2.7.3 Características de fiabilidad** <sup>(17)</sup>

Dichas características son las que demuestran la capacidad de un método analítico para mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación.

Además debemos tener en cuenta las características de desempeño del método, las cuales se expresan en función de los siguientes parámetros analíticos <sup>(4,27)</sup>:

#### **2.7.3.1 Especificidad :** <sup>(17)</sup>

Expresa la capacidad del método para medir y/o identificar simultáneamente o de forma separada los analitos de interés, en forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que pueden estar presentes en la muestra.

Otra posible aproximación se puede realizar mediante el estudio de muestras sometidas al estrés para generar los compuestos potencialmente interferentes. Este tipo de estudios adquiere especial importancia para los métodos en que se desea evaluar la estabilidad de un principio activo o forma farmacéutica. Se debe comprobar a ser posible, la identidad del analito y que la señal proviene solo de él.

La presencia de interferencias puede tener distintos efectos en la determinación de analito como:

Imposibilitar su inequívoca identificación (aparición de falsos positivos)

Distorsionar la respuesta del analito (afecta normalmente la pendiente y ordenada en el origen de la recta de calibrado). Este efecto puede delatar la presencia de interferencias desconocidas. La selectividad de un método analítico se debería determinar antes de iniciar el estudio de cualquier otro parámetro de validación, dado que debe conocerse en que grado la respuesta del método es únicamente proporcionada por el analito; sin interferencias de otras sustancias relacionadas con el de una u otra forma.

#### Ámbito de aplicación

Determinación cuantitativa de un compuesto o riqueza de un principio activo: El método debe evitar la interferencia de excipientes, productos de degradación y/o impurezas en la respuesta proporcionada por el compuesto o el principio activo objeto de la evaluación analítica.

#### **2.7.3.2 Linealidad:** <sup>(17)</sup>

Expresa la capacidad del método para brindar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un rango establecido.

Dentro del rango establecido se recomienda estudiar al menos cinco niveles de concentración al 50%, 75%, 100%, 125%, 150% del contenido teórico y analizarlas por triplicado con un total de quince determinaciones, se establece como criterio práctico analizarlas en sentido creciente de concentración y se recomienda hacer pesadas individuales.

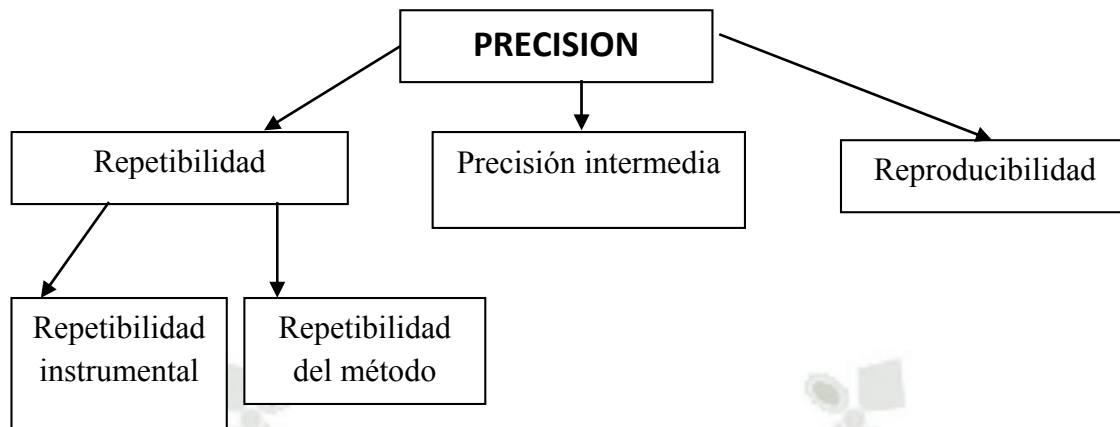
Con los resultados del estudio de la linealidad se prepara una tabla relacionando las cantidades o concentraciones  $x$  (variable independiente) y la respuesta (variable dependiente por ejemplo áreas, alturas, absorbancias, etc.). La relación entre ambas variables se expresa matemáticamente como una recta de regresión del tipo  $y=bx+a$ . La representación gráfica de la recta de regresión en un sistema de coordenadas junto con los valores experimentales, permite visualizar la bondad del ajuste.

### 2.7.3.3 Precisión: <sup>(17)</sup>

Refleja la medida en que los valores de una serie repetida de ensayos analíticos que se realizan sobre una muestra homogénea son semejantes entre si.

El objetivo del estudio de precisión es conocer la variabilidad del método de ensayo.

La precisión engloba diferentes tipos de estudios:



**Repetibilidad:** Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos, etc.) en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.

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

**Reproducibilidad:** Estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios.

La precisión de un método analítico se expresa generalmente como el coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas.

#### 2.7.3.4 Exactitud: <sup>(17)</sup>

Expresa la proximidad de un valor de referencia y el valor experimentalmente encontrado.

No debe confundirse exactitud y precisión. La precisión está relacionada con la dispersión de una serie de mediciones, pero no da una indicación de lo cerca que esta del valor verdadero. Se puede tener mediciones muy precisas pero poco exactas; sin embargo, para que un método sea exacto se requiere un cierto grado de precisión.

### ¿Cuál es el valor verdadero del analito en la muestra?

Cuando se dispone de patrones de referencia certificados, el valor de dicho patrón es el que se acepta como valor verdadero. La exactitud puede evaluarse aplicando el método sobre dicho patrón o bien analizando muestras de placebo o de problema a las que se añadió una cantidad conocida de dicho patrón o mediante la comparación de dicho método con un método de referencia validado del que ya se demostró su exactitud; entonces el valor verdadero es el que se obtiene con dicho método de referencia y se compara con el valor hallado con el método nuevo que se quiere validar.

- 1) Principio activo (analito puro)
- 2) Placebo cargado con el analito



Los documentos de la ICH recomiendan que se evalúe la exactitud utilizando un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración.

### AMBITO DE APLICACIÓN: <sup>(17)</sup>

Según la guía ICH, Q2A debe ensayarse la exactitud en métodos de análisis para la valoración en materia prima, en producto acabado y en métodos de análisis de cuantificación de impurezas.

### 2.7.3.5 Robustez: <sup>(17)</sup>

Es el grado de reproducibilidad de los resultados mediante el análisis de las mismas muestras bajo una variedad de condiciones.

**Rango:** Es el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito. <sup>(4)</sup>

## 2.8 Categorías de la validación <sup>(17)</sup>

Los parámetros a considerar varían según las exigencias legales de diferentes organizaciones, fundamentalmente del método analítico seleccionado y el uso para el cual está previsto. Por tanto, los requisitos de validación necesarios se establecen dependiendo de la categoría del ensayo.

Debido a la variedad de ensayos analíticos existentes, se hace necesario establecer categorías que faciliten el estudio y reconozcan el tipo de información que se requiere para la validación de un método analítico, según la clasificación de la USP 36, estos métodos se dividen en cuatro categorías.

- *Categoría I:* Cuantificación de componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.
- *Categoría II:* Determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados.
- *Categoría III:* Determinación de las características de desempeño (disolución, liberación de fármacos)
- *Categoría IV:* Pruebas de identificación.

Todo previamente establecido nos ayuda en el desarrollo de la validación planteada, estableciendo los parámetros adecuados.

En la tabla 1.2 recomendada en la guía ICH Q2A me permite mostrar que se evaluará uno u otro parámetro de validación dependiendo básicamente del tipo de ensayo.<sup>(17)</sup>

**Tabla N° 1.2** Datos requeridos para la validación de métodos analíticos <sup>(17)</sup>

Parámetro	Identificación	Impurezas		Valoración:
		Cuantitativo	Test limite	Disolución Contenido
Exactitud	No	Si	No	Si
Precisión				
Repetibilidad	No	Si	No	Si
Precisión Intermedia	No	Si	No	Si
Selectividad	Si	Si	Si	Si
Límite de detección	No	No	Si	No
Límite de cuantificación	No	Si	No	No
Linealidad	No	Si	No	Si
Rango	No	Si	No	Si

## 2.9 Tipos de validación <sup>(17)</sup>

### 2.9.1 Validación Retrospectiva

Establecer una evidencia documentada de la idoneidad de un producto o proceso basándose en la evaluación de datos históricos acumulados existentes del mismo siempre y cuando no se hayan modificado los procedimientos, maquinarias, tamaño de lote y características de las sustancias empleadas.

### 2.9.2 Validación Prospectiva

Se realiza cuando la verificación del cumplimiento de las condiciones establecidas para un método analítico, se llevan a cabo antes de la comercialización del producto.

### 2.9.3 Revalidación <sup>(17)</sup>

La introducción de un cambio que pueda afectar la idoneidad del método analítico establecido por la validación, es decir una revalidación total o parcial de dicho método analítico. Entre los motivos que exigen una nueva validación tenemos:

- Cuando ha pasado varios años se tiene que seguir demostrando que el método sigue siendo válido.
- Con el cambio de muestra.
- Cuando se produzcan cambios sustanciales en los instrumentos o materiales utilizados.
- Al aplicar la técnica analítica en diferente laboratorio.
- Modificaciones de parámetros analíticos como los tiempos de agitación, proceso de extracción, concentración, etc.<sup>(19)</sup>

### 3.0 RAZONES QUE JUSTIFICAN EL CAMBIO DE TÉCNICA

Las razones que justifican dicho cambio se explicará a continuación:

- En la técnica anterior por el método volumétrico se trabaja con un mayor empleo de reactivos como cloroformo, alcohol, hidróxido de amonio, ácido sulfúrico los cuales son tóxicos, altamente irritantes y nocivos para la salud del analista, entorno y cuidado del ecosistema.

Cloroformo:

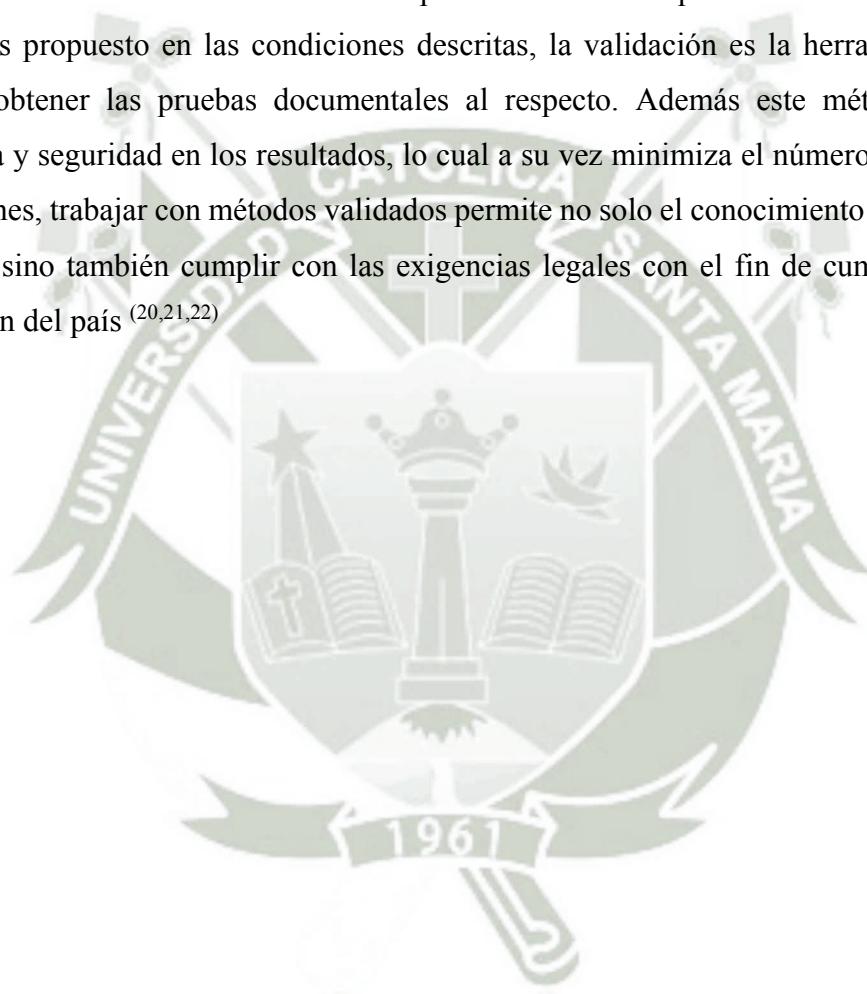
Puede ser fatal si se ingiere, inhala o si es absorbido a través de la piel, causa irritación a la piel, ojos y aparato respiratorio, puede afectar el sistema nervioso central, sistema cardiovascular, riñones, hígado, se sospecha de riesgo de cáncer, puede causar cáncer, el riesgo de cáncer depende del nivel y duración de la exposición.

- Las soluciones valoradas que se emplea no son de uso frecuente en el laboratorio por lo que se tiene que preparar y valorar el mismo día de su uso lo cual toma tiempo debido a que las sales para la factorización tienen que ser previamente

desechadas; la factorización es la acción de cálculo del factor de una disolución mediante una titulación.

- Una inadecuada agitación no me va permitir disolver bien la muestra y su posterior extracción será defectuosa por lo que este paso resulta crítico en dicho método y hace de este método engorroso por la demanda de reactivos y tiempo por todas estas razones es que se justifica el cambio de dicho método por una validación.

La validación de esta técnica analítica me permite demostrar que el método es adecuado al análisis propuesto en las condiciones descritas, la validación es la herramienta que permite obtener las pruebas documentales al respecto. Además este método ofrece confianza y seguridad en los resultados, lo cual a su vez minimiza el número de fallos y repeticiones, trabajar con métodos validados permite no solo el conocimiento del método analítico sino también cumplir con las exigencias legales con el fin de cumplir con la regulación del país <sup>(20,21,22)</sup>



## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. MATERIAL:

##### 1.1 MUESTRAS:

Las muestras a analizar serán:

- a.- Producto terminado contenido en su envase definitivo.
- b.- Placebo del producto.
- c.- Principio activo más el placebo en las concentraciones requeridas para el análisis de los parámetros a estudiar.

##### a. Producto:

Nombre : Pomada de Lidocaína Base al 5%  
Lote : 1057652

- b. Placebo, blanco o matriz de la muestra:** Es un blanco de la muestra problema que contenga todos los ingredientes de la muestra problema excepto los analitos.

##### Preparación:

Se obtiene al mezclar todos los auxiliares de la formulación de Lidocaína 5% Pomada, excluyendo al principio activo, en las mismas proporciones que en la fórmula de fabricación:



**1.4 EQUIPOS:**

ITEM	NOMBRE	SERIE	MARCA	MODELO	CÓDIGO	CALIFICADO CALIBRADO
1	Cromatógrafo Líquido de Alta Performance	JP73065342/ DE62957554/ DE64768830/ DE63070573/ DE64258638	Agilent Technologies	AT 1200 DAD	AT 1200- DAD CAL-E93	Conforme
2	Cromatógrafo Líquido de Alta Performance	JP73063941/ DE62957619/ DE64768675/ DE63070616/ DE71362674	Agilent Technologies	AT 1200 VWD	AT 1200- 3 CAL-E97	Conforme
3	Balanza Analítica	1127490591	Mettler Toledo	XP 205DR	CAL- BAL-01	Conforme
4	Potenciómetro	075770	Orión	520 A+	CAL-E83	Conforme
5	Estufa	11-S-1	Precisión Científica /Terco	16	CAL-E21	Conforme
6	Agitador de Baño Ultrasónico	RPC 110410664E	Brandon	8510	CAL-E58	Conforme
7	Lámpara de Luz Ultravioleta (254nm – 366nm)	72260	Deshaga	-----	CAL-E24	Conforme

**OTROS:**

Columna cromatográfica L1 (octadecil silano) 150 mm x 4.6 mm x 5 µm  
(ZorbaxExtend)

**2. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS**

Considerando la validación de la técnica analítica del tipo de Determinación Cuantitativa de un componente en un producto terminado por HPLC (Categoría I <1225> USP36 NF30), se desarrollarán los siguientes parámetros: <sup>(5)</sup>

- Especificidad
- Linealidad:
  - Linealidad del sistema
  - Linealidad del método
- Intervalo
- Exactitud
- Precisión :
  - Repetibilidad instrumental
  - Repetibilidad del método
  - Precisión Intermedia
- Robustez
- Límite de Cuantificación (LC)
- Límite de Detección (LD)

### 3. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Se estableció a priori para cada uno de los parámetros a evaluar, según Procedimiento Operativo Estándar (P.O.E). de Validación de métodos analíticos de Laboratorios Medifarma S.A.<sup>(5,17)</sup>

Los criterios de aceptación para cada uno de los parámetros estudiados, son los siguientes:

**3.1 ESPECIFICIDAD:** El método es *Específico* si el placebo y los posibles productos, no deben dar una respuesta cuantificable. Es decir la posible degradación no interfieren con la determinación del analito.<sup>(1, 19,21)</sup>

Se recomienda que la degradación no sea mayor del 20% de la concentración inicial.

**Para su determinación se tomara en cuenta:**

- Tiempos de retención
- Áreas
- La modificación de las condiciones cromatográficas
- Las reacciones degradativas

**Cuadro N° 2.1:** Criterios de aceptación para *Especificidad*:

Parámetro	Criterio de aceptación
% Recuperación	98 – 102 %
Interferencia	No debe ser mayor a 20%

**3.2 LINEALIDAD:** El método posee una adecuada *Linealidad* si la recta de regresión construida con las concentraciones de los analitos y sus áreas respectivas cumple con los parámetros de regresión lineal y significación estadística.

**Cuadro N° 2.2:** Criterios de aceptación para *Linealidad*:

Parámetro	Criterio de aceptación
Coefficiente de Correlación	$r \geq 0.995$
Coefficiente de Determinación	$r^2 \geq 0.990$
Coefficiente de variación de los factores de respuesta	$CV < 2.0\%$
Homogeneidad de varianzas	$G_{exp} < G_{tablas}$
Anova	$F_{exp} > F_{tablas}$
Test de proporcionalidad	$t_{exp} < t_{tabla}$
Significación estadística de la pendiente	$t_{exp} > t_{tabla}$

**3.3 EXACTITUD:** El método es *Exacto* si cumple con lo siguiente:

**Cuadro N° 2.3:** Criterios de aceptación para *Exactitud*:

Parámetro	Criterio de aceptación
% Recuperación	98 – 102 %
t de Student	t exp < t tabla

**3.4 PRECISIÓN:** El método es *Preciso* si el Coeficiente de Variación (CV) de los diferentes tipos de estudio cumple con los criterios de aceptación.<sup>(21)</sup>

**Cuadro N° 2.4:** Criterios de aceptación para *Precisión*:

Tipo de estudio	Criterio de aceptación
Repetibilidad del Sistema	CV < 2.0 %
Repetibilidad del Método	CV < 2.0 %
Precisión Intermedia	CV < 4.0 %

**3.5 ROBUSTEZ:** El método es *Robusto* si cumple con lo siguiente:

**Cuadro N° 2.5:** Criterios de aceptación para *Robustez*:

Parámetro	Criterio de aceptación
Coefficiente de variación	CV < 2.0 %

**3.6 RANGO:** El rango del método es validado (80 % - 120 %) cuando éste provee aceptable precisión, exactitud y linealidad dentro del intervalo ensayado. <sup>(1,21,23)</sup>

#### 4.0. MÉTODO ANALÍTICO

##### 4.1. TIPO DE MÉTODO ANALÍTICO

Técnica analítica propia por HPLC

##### 4.2. DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA

DOSAJE : **LIDOCAÍNA BASE** 5.00 (4.75 – 5.25) g/100 g  
(95.0% - 105.0%)

Método.- Cromatografía de Líquidos (HPLC)

##### Sistema Cromatográfico:

Fase móvil : Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de:  
Metanol HPLC: Buffer fosfato pH 8.0 (75:25)

##### Preparación Buffer fosfato pH 8.0:

Pesar con exactitud alrededor de 5.465 g de fosfato monobásico de potasio en 900 mL de agua purificada y ajustar a pH 8.0 ± 0.05 con hidróxido de potasio al 50%, luego diluir a volumen de 1000 mL. Homogeneizar.

Detector : UV, 230 nm

Columna : L1 (octadecil silano) 150 mm x 4.6 mm x 5 µm (Zorbax Extend)

Velocidad de flujo : 1.0 mL/minuto

Temperatura : 25 °C

: 10 µL

Volumen de  
inyección

Tiempo de retención : 3.5 minutos aproximadamente.

Tiempo de corrida : 8.0 minutos aproximadamente

#### **Aptitud del Sistema.-**

Factor de Asimetría : No más de 2.0

Desviación estándar : No más de 2.0% entre réplicas de inyección del estándar.  
relativa

#### **Preparación del estándar.-**

Pesar con exactitud alrededor de 50 mg de Lidocaína base, transferir a fiola de 50 mL, adicionar 20 mL de fase móvil, llevar al ultrasonido por 5 minutos, llevar a temperatura ambiente y diluir a volumen con fase móvil. Medir 5 mL de la solución anterior, transferir a fiola de 50 mL y diluir a volumen con fase móvil. Homogenizar, filtrar por 0.45  $\mu\text{m}$  e inyectar. (Conc. 0.1 mg/mL)

#### **Preparación de la muestra.-**

Pesar con exactitud alrededor de 1 g de muestra (equivalente a 50 mg de Lidocaína base), transferir a fiola de 50 mL, adicionar 20 mL de fase móvil, agitar mecánicamente por 10 minutos, llevar al ultrasonido por 5 minutos, llevar a temperatura ambiente y diluir a volumen con fase móvil. Medir 5 mL de la solución anterior, transferir a fiola de 50 mL y diluir a volumen con fase móvil. Homogenizar, filtrar por 0.45  $\mu\text{m}$  e inyectar. (Conc. 0.1 mg/mL)

**4.3 FÓRMULA (\*):** Los cálculos para la valoración de Lidocaína base obedecieron a lo siguiente :

Lidocaína base g/100g =

$$\frac{AM \times WSt \times 5 \times Pot \times 50 \times 50}{ASt \times 50 \times 50 \times WM \times 5} \times 100$$

Dónde:

- AM : Área de la muestra  
ASt : Área del estándar  
WSt : Peso del estándar expresado en mg  
WM : Peso de la muestra expresado en mg  
PotSt : Potencia de estándar expresado en fracción decimal como tal cual

Se prepararon las muestras para los análisis correspondientes en cada parámetro de validación, teniendo en cuenta procedimientos de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria y la USP 36, las cuales detallamos a continuación:

## 5.0 PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS A EVALUAR

### 5.1 ESPECIFICIDAD

#### A. Determinación de interferencia del diluyente:

##### a. Diluyente:

Analizar el diluyente. El resultado de análisis del diluyente no debe dar una respuesta cuantificable. Esto indica que el diluyente no interfiere en el análisis del analito.

Debe ser el mismo que se utiliza para la última dilución de las muestras, en este caso el diluyente es el mismo de la fase móvil se filtra por duplicado.

**B. Determinación de interferencia de excipientes:****a. Preparación del estándar:**

Disolver 50 mg de Lidocaína base en fiola de 50 mL diluir con 20 mL de fase móvil llevar a agitación por 10 minutos, ultrasonido por 5 minutos, diluir a volumen con fase móvil, tomar 5 mL de esta solución y llevar a fiola de 50 mL, diluir a volumen con fase móvil.

**b. Placebo:**

Analizar el placebo, según la técnica analítica: El resultado de análisis del placebo no debe dar una respuesta cuantificable. Esto indica que los excipientes no interfieren en el análisis del analito.

Pesar 1 gramo de placebo en fiola de 50 mL diluir con 20 mL de fase móvil llevar a agitación por 10 minutos, ultrasonido por 5 minutos, diluir a volumen con fase móvil, tomar 5 mL de esta solución y llevar a fiola de 50 mL, diluir a volumen con fase móvil.

**c. Recobro:**

Efectuar el análisis respectivo comparando la respuesta del análisis con la de un patrón puro del principio activo, (ver exactitud, muestras al 100%). Determinar la especificidad del método midiendo el grado de interferencia obtenida por la diferencia de resultados del análisis del principio activo con y sin placebo. Los resultados obtenidos deben concordar con  $\pm 2\%$  del teórico.

Preparar una muestra de placebo con el principio activo al 100% por duplicado: Pesar 1 gramo de placebo más 50.0 mg de Lidocaína base en fiola de 50 mL diluir con 20 mL de fase móvil llevar a agitación por 10 minutos, ultrasonido por 5 minutos, diluir a volumen con fase móvil, tomar 5 mL de esta solución y llevar a fiola de 50 mL, diluir a volumen con fase móvil.

**C. Determinación de Interferencia de Productos de Degradación:**

- **Preparación del placebo:** pesar 1 gramo de placebo en fiola de 50 ml.
- **Preparación de la muestra:** pesar con exactitud alrededor de 1 g de placebo y 50 mg de Lidocaína base, transferir a fiola de 50 ml.
- **Preparación del estándar:** disolver 50 mg de Lidocaína base en fiola de 50 ml

Tratar con los siguientes métodos de degradación:

1. **Hidrólisis ácida**, por calentamiento en baño maría a 50°C con 5 mL HCl 0.1N por 2 horas y posterior neutralización con 5 mL NaOH 0.1 N.
2. **Hidrólisis alcalina**, por calentamiento en baño maría a 50°C con 5 mL NaOH 0.1N por 2 horas y posterior neutralización con 5 mL HCl 0.1 N.
3. **Oxidación**, por 2 horas en baño maría a 50°C con 5 gotas de Peróxido de Hidrógeno al 30%.
4. **Termólisis**, por calentamiento en estufa a 70°C por 15 horas
5. **Fotólisis**, exposición en lámpara de luz UV por 5 días

Luego de someter la muestra, estándar y placebo a las degradaciones continuamos con la preparación del placebo, estándar y muestra como se describe a continuación:

#### **Preparación del placebo:**

Adicionar 20 mL de fase móvil, agitar mecánicamente por 10 minutos, llevar al ultrasonido por 5 minutos, llevar a temperatura ambiente y diluir a volumen con fase móvil. Medir 5 mL de la solución anterior, transferir a fiola de 50 mL y diluir a volumen con fase móvil. Homogenizar. Se preparó una muestra y se analizó por duplicado, filtrar por 0.45  $\mu\text{m}$  e inyectar.

#### **Preparación de la muestra:**

Adicionar 20 mL de fase móvil, agitar mecánicamente por 10 minutos, llevar al ultrasonido por 5 minutos, llevar a temperatura ambiente y diluir a volumen con fase móvil. Medir 5 mL de la solución anterior, transferir a fiola de 50 mL y diluir a volumen con fase móvil. Homogenizar. Se preparó una muestra y se analizó por duplicado, filtrar por 0.45  $\mu\text{m}$  e inyectar. (Conc. 0.1 mg/mL).

#### **Preparación del estándar:**

Adicionar 20 mL de fase móvil, llevar al ultrasonido por 5 minutos, llevar a temperatura ambiente y diluir a volumen con fase móvil. Medir 5 mL de la solución anterior, transferir a fiola de 50 mL y diluir a volumen con fase móvil. Homogenizar. Se preparó una muestra y se analizó por duplicado filtrar por 0.45  $\mu\text{m}$  e inyectar. (Conc. 0.1 mg/mL).

## 5.2 LINEALIDAD

### Determinación

#### Intervalos de trabajo

Por ser un ensayo de valoración de un producto terminado cuya especificación es de 95% a 105%, el intervalo de trabajo será: 85% - 115% de la concentración de trabajo.

#### 5.2.1 Linealidad del Sistema

Se trabajó con estándar secundario de Lidocaína base de manera que se obtuvieron 5 concentraciones diferentes (50%, 75%, 100%, 125% y 150%), trabajar por triplicado con 3 soluciones stock.

##### a. Concentración al 50%

Disolver 62.5 mg de Lidocaína base en fiola de 50 mL diluir con 20 mL de fase móvil llevar a ultrasonido por 5 minutos, diluir a volumen con fase móvil. . Se preparó por triplicado (*Solución Stock*).

Tomar 2 mL de la solución stock y llevar a fiola de 50 mL , diluir a volumen con fase móvil, filtro por 0.45  $\mu\text{m}$  e inyectar .(Conc. 0.05 mg/mL).

##### b. Concentración al 75%

Tomar 3 mL de la solución stock y llevar a fiola de 50 mL, diluir a volumen con fase móvil, filtro por 0.45  $\mu\text{m}$  e inyectar. (Conc. 0.075 mg/mL).

**c. Concentración al 100%**

Tomar 4 mL de la solución stock y llevar a fiola de 50 mL, diluir a volumen con fase móvil, filtro por 0.45  $\mu\text{m}$  e inyectar. (Conc. 0.1 mg/mL).

**d. Concentración al 125%**

Tomar 5 mL de la solución stock y llevar a fiola de 50 mL, diluir a volumen con fase móvil, filtro por 0.45  $\mu\text{m}$  e inyectar. (Conc. 0.125 mg/mL).

**e. Concentración al 150%**

Tomar 6 mL de la solución stock y llevar a fiola de 50 mL, diluir a volumen con fase móvil, filtro por 0.45  $\mu\text{m}$  e inyectar. (Conc. 0.150 mg/mL).

### 5.2.2 Linealidad del Método

**a. Preparación del estándar al 100%**

Simultáneamente con las muestras, analizar dos estándares de concentración conocida, al 100% de la concentración nominal de trabajo. Disolver 50 mg de Lidocaína base en fiola de 50 mL diluir con 20 mL de fase móvil llevar a ultrasonido por 5 minutos, diluir a volumen con fase móvil, tomar 5 mL de esta solución y llevar a fiola de 50 mL, diluir a volumen con fase móvil (Preparación por duplicado).

**b. Preparación de las muestras:**

Preparar soluciones de placebo enriquecidos con el principio activo en tres niveles de concentración que cubran el intervalo de trabajo, por pesadas independientes y por triplicado:

85%, 100% y 115% de la concentración nominal de trabajo en rango establecido.

**b.1 Concentración al 85% (por triplicado):**

Pesar 1 gramo de placebo más 42.5 mg de Lidocaína base en fiola de 50 mL diluir con 20 mL de fase móvil llevar a agitación por 10 minutos, ultrasonido por 5 minutos, diluir a volumen con fase móvil, tomar 5 mL de esta solución y llevar a fiola de 50 mL, diluir a volumen con fase móvil.

**b.2 Concentración al 100% (por triplicado):**

Pesar 1 gramo de placebo más 50.0 mg de Lidocaína base en fiola de 50 mL diluir con 20 mL de fase móvil llevar a agitación por 10 minutos, ultrasonido por 5 minutos, diluir a volumen con fase móvil, tomar 5 mL de esta solución y llevar a fiola de 50 mL, diluir a volumen con fase móvil.

**b.3 Concentración al 115% ( por triplicado):**

Pesar 1 gramo de placebo más 57.5 mg de Lidocaína base en fiola de 50 mL diluir con 20 mL de fase móvil llevar a agitación por 10 minutos, ultrasonido por 5 minutos, diluir a volumen con fase móvil, tomar 5 mL de esta solución y llevar a fiola de 50 mL, diluir a volumen con fase móvil.

### 5.3 EXACTITUD

## **Determinación**

### **a. Preparación del Estándar:**

Disolver 50 mg de Lidocaína base en fiola de 50 mL diluir con 20 mL de fase móvil llevar a ultrasonido por 5 minutos, diluir a volumen con fase móvil, tomar 5 mL de esta solución y llevar a fiola de 50 mL, diluir a volumen con fase móvil (Preparación por duplicado).

### **b. Preparación de las muestras:**

Para este estudio se trabaja con las mismas muestras preparadas para la determinación de la linealidad del método. Se recomienda un mínimo de 9 determinaciones sobre 3 niveles de concentraciones del analito que cubran el rango especificado, por ejemplo 3 determinaciones por 3 niveles de concentraciones, que podrían ser la concentración central y las concentraciones en los extremos del rango.

## **5.4 PRECISIÓN**

### **Determinación:**

#### **5.4.1 PRECISIÓN INSTRUMENTAL:**

Para evaluar la precisión instrumental inyectar 6 veces consecutivas una solución del estándar. Determinar el CV de las áreas y de los tiempos de retención obtenidos. El coeficiente de variación obtenido debe ser menor o igual 2%.

##### **a. Preparación del estándar:**

Disolver 50 mg de Lidocaína base en fiola de 50 mL diluir con 20 mL de fase móvil llevar a agitación por 10 minutos, ultrasonido por 5 minutos, diluir a volumen con fase móvil, tomar 5 mL de esta solución y llevar a fiola de 50 mL, diluir a volumen con fase móvil.

#### **5.4.2 REPETIBILIDAD**

Determinar la Desviación Estándar (S) y el Coeficiente de Variación (CV).

Criterio de aceptación: Coeficiente de Variación (CV)  $\leq$  2%

##### **a. Preparación del estándar:**

Pesar con exactitud alrededor de 50 mg de Lidocaína base, transferir a fiola de 50 mL, adicionar 20 mL de fase móvil, llevar al ultrasonido por 5 minutos, llevar a temperatura ambiente y diluir a volumen con fase móvil. Medir 5 mL de la solución anterior, transferir a fiola de 50 mL y diluir a volumen con fase móvil. Homogenizar, filtrar por 0.45  $\mu\text{m}$  e inyectar. (Conc. 0.1 mg/mL)

**b. Preparación de la muestra (producto terminado):**

Analizar 6 muestras independientes de un lote fabricado

Pesar con exactitud alrededor de 1 g de muestra (equivalente a 50 mg de Lidocaína base), transferir a fiola de 50 mL, adicionar 20 mL de fase móvil, agitar mecánicamente por 10 minutos, llevar al ultrasonido por 5 minutos, llevar a temperatura ambiente y diluir a volumen con fase móvil. Medir 5 mL de la solución anterior, transferir a fiola de 50 mL y diluir a volumen con fase móvil. Homogenizar, filtrar por 0.45  $\mu\text{m}$  e inyectar. (Conc. 0.1 mg/mL)

### 5.4.3 PRECISIÓN INTERMEDIA

Un segundo analista realizará otro día el análisis del mismo lote empleado en la repetibilidad usando el mismo método analítico y diferente equipo. Determinar la Desviación Estándar (S) y el Coeficiente de Variación (CV).

Criterio de aceptación: Coeficiente de variación entre analistas:  $\leq 4\%$ .

**a. Precisión Intermedia día 1:**

**Analista “A”**

**Preparación del estándar:**

Se tomó el estándar realizado en el parámetro de la repetibilidad.

**Muestra:**

Se tomó las muestras realizadas el parámetro de la repetibilidad

**b. Precisión Intermedia día 2:****Analista “B”****Preparación del estándar:**

Pesar con exactitud alrededor de 50 mg de Lidocaína base, transferir a fiola de 50 mL, adicionar 20 mL de fase móvil, llevar al ultrasonido por 5 minutos, llevar a temperatura ambiente y diluir a volumen con fase móvil. Medir 5 mL de la solución anterior, transferir a fiola de 50 mL y diluir a volumen con fase móvil. Homogenizar, filtrar por 0.45  $\mu\text{m}$  e inyectar. (Conc. 0.1 mg/mL)

**Preparación de la muestra:**

Analizar 6 muestras independientes de un lote fabricado.

Pesar con exactitud alrededor de 1 g de muestra (equivalente a 50 mg de Lidocaína base), transferir a fiola de 50 mL, adicionar 20 mL de fase móvil, agitar mecánicamente por 10 minutos, llevar al ultrasonido por 5 minutos, llevar a temperatura ambiente y diluir a volumen con fase móvil. Medir 5 mL de la solución anterior, transferir a fiola de 50 mL y diluir a volumen con fase móvil. Homogenizar, filtrar por 0.45  $\mu\text{m}$  e inyectar. (Conc. 0.1 mg/mL)

**5.5 ROBUSTEZ****Determinación:**

Estabilidad de la muestra después de 24 horas en refrigeración.

La influencia de este factor se evaluará de la siguiente manera:

Se calcula el coeficiente de variación (CV)  $\leq 2\%$  entre los resultados de las muestras trabajadas en las condiciones iniciales y las mismas muestras trabajadas con la nueva condición.

**Preparación del estándar:**

Pesar con exactitud alrededor de 50 mg de Lidocaína base, transferir a fiola de 50 mL, adicionar 20 mL de fase móvil, llevar al ultrasonido por 5 minutos, llevar a temperatura ambiente y diluir a volumen con fase móvil. Medir 5 mL de la solución anterior, transferir a fiola de 50 mL y diluir a volumen con fase móvil. Homogenizar, filtrar por 0.45  $\mu\text{m}$  e inyectar. (Conc. 0.1 mg/mL).

**Preparación de la muestra:**

Se consideran las 3 primeras muestras de la repetibilidad como análisis inicial y estas mismas muestras permanecen aproximadamente 24 horas en refrigeración y se vuelven a correr con un estándar recientemente preparado.

**RANGO:** El rango del método es validado cuando éste provee aceptable precisión, exactitud y linealidad dentro del intervalo ensayado. <sup>(5,18)</sup>

## 6.0 ANÁLISIS DE DATOS

### 6.1 ESTUDIO DE LA LINEALIDAD

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido. El método posee una adecuada *Linealidad* si la recta de regresión construida con las concentraciones de los analitos y sus áreas respectivas cumple con los parámetros de regresión lineal y significación estadística.

## ANÁLISIS DE DATOS

Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis estadístico de regresión lineal, T - Student y ANOVA con un nivel de significancia del 5%. ( $\alpha = 0.05$ ).<sup>(18)</sup>

## A. CÁLCULO DE LA RECTA DE REGRESIÓN

Partimos de la relación simple entre dos variables:

$$Y = f(X)$$

Indica que Y es una función o variable dependiente (áreas) de la variable X (concentración)

El segundo paso es la especificación de la forma como esas dos variables se relacionan, esta relación se expresa matemáticamente mediante una recta de regresión donde :

$$y = bx + a$$

x = Concentración (mg/mL)

y = Absorbancia (Abs)

Siendo:

b = Valor de la pendiente

a = Término independiente

**Fórmula para hallar a y b:**

$$b = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}}$$

$$a = \frac{\sum Y_i - b \sum X_i}{n}$$

Siendo a y b los estimadores de la ordenada al origen y pendiente respectivamente, n el número de mediciones,  $X_i$  es la concentración e  $Y_i$  el valor medido en el ensayo independiente de la apariencia de la recta, resulta conveniente evaluar los estimadores de regresión en un intervalo de confianza dado  $p=0.05$

## B. INTERPRETACIÓN ESTADÍSTICA DE LA REGRESIÓN LINEAL

Realizar la interpretación estadística de la regresión lineal, a través del cálculo de:

a. Cálculo del coeficiente de correlación ( r )

$$r = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sqrt{\left( \sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n} \right) \left( \sum Y_i^2 - \frac{(\sum Y_i)^2}{n} \right)}}$$

b. Cálculo del coeficiente de determinación (  $r^2$  )

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

c. Test estadístico del coeficiente de correlación ( r )

$$t_r = \frac{[r]\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

El valor  $r = 1$  indica una recta perfectamente lineal,  $r = -1$  una recta perfectamente lineal de pendiente negativa y  $r = 0$  la no correlación de “x” e “y”, r es generalmente mayor de 0.99 y los valores menores de 0.90 son raros. Sin embargo, el mejor

indicador del modelo lineal no es r sino un test estadístico, en el cual se calcula un valor de T con n-2 grados de libertad y se compara con el valor t tablas para el nivel de confianza requerido.

En este caso, la hipótesis nula es la no correlación entre X e Y. Si el valor observado de  $T_{\text{regresión}}$  es mayor que  $T_{\text{tabla}}$ , se rechaza la hipótesis, siendo la correlación lineal significativa con la probabilidad calculada.

**d. TEST DE LINEALIDAD:**

**d.1 Limite de confianza de la pendiente “ b”**

Significación estadística de la varianza ( $S^2$ ) de la pendiente b:

El límite de confianza para el estimador de la pendiente (b) se calcula en función de su varianza.

$$S_{xy}^2 = \frac{\sum Y^2i - a \sum Yi - b \sum XiYi}{n - 2}$$

$$S_b = \sqrt{\frac{S(xy)^2}{\sum X^2i - \frac{(\sum Xi)^2}{n}}}$$

Luego, los límites de confianza de la pendiente b:

Intervalo de confianza para b:

$$b = b \pm t \cdot S_b$$

Donde t es para n-2 grados de libertad, con un nivel de significancia del 5%. ( $\alpha = 0.05$ ).

**d.2 Test estadístico de la pendiente o significancia estadística de la desviación estándar de la pendiente “b”**

$$t \text{ exp} = \frac{|b|}{Sb}$$

### d.3 Limite de confianza del intercepto “a”

Por su parte, el límite de confianza del estimador de la ordenada al origen (a) se calcula en función de su varianza.

$$S_a = \sqrt{(Sb)^2 \frac{\sum X^2i}{n}}$$

Intervalo de confianza para a:

$$a = a \pm t \cdot S_a$$

### d.4 Test estadístico del intercepto “a” o test de proporcionalidad

$$t \text{ exp} = \frac{|a|}{S_a}$$

### d.5 Coeficiente de variación de los factores de respuesta

$$CVf\% = \frac{Sf}{xf} \times 100$$

Dónde:

Desviación Estándar de f : Sf

Coeficiente de Variación % de f : CVf %

Promedio de f :  $\bar{x}_f$

## C. ANÁLISIS DE LA VARIANZA: ANOVA

**c.1 Homogeneidad de Varianzas:** Para determinar la homogeneidad de varianzas necesitamos determinar a priori las varianzas para cada nivel de concentración cuya fórmula es la siguiente:

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

A partir de esto podemos realizar el test de Cochran de homogeneidad de varianzas determinando el G exp:

$$G_{exp} = \frac{s^2_{maxima}}{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2}$$

Dónde:

$s^2_{maxima}$ : *varianza maxima de los K grupos*

$s^2$ : *varianza de cada grupo K*

## c.2 ANOVA

Este procedimiento estadístico se usó para determinar si el modelo lineal proporciona un buen ajuste a los datos es decir existe una relación estadísticamente significativa

entre “x” e “y” esto se determina a través del valor-P en la tabla ANOVA si este es menor que el nivel de significación  $\alpha = 0.05$ , existe una relación estadísticamente significativa es decir existe una alta correlación entre los datos de concentración y áreas con un nivel de confianza del 95.0%. Por lo que el método es lineal.

## 6.2 ESTUDIO DE LA EXACTITUD:

La exactitud de un procedimiento analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero.

### a. Promedio de Estándar (ST):

$$ST = \frac{St_1 + St_2}{2}$$

Dónde:

St<sub>1</sub> : Estándar 1 (mg)

St<sub>2</sub> : Estándar 2 (mg)

### b. Determinación del Factor

$$F = \frac{WSt \times 5 \times 50 \times 50}{50 \times 50 \times 1 \times 5}$$

### c. Muestra Hallada:

$$mgHallados = \frac{AreaMta}{AreaSt} \times F$$

Dónde:

mg Hallados : Miligramos de lidocaína base hallados.

$A_{mp}$  : Área de la muestra  
 $A_{St}$  : Área promedio del estándar  
 $F$  : Factor de la muestra

#### b. Porcentaje de Recuperación (% Rec):

$$\%R = \frac{X_H \times 100}{X_A}$$

Dónde:

$X_H$  : Cantidad Hallada  
 $X_A$  : Cantidad Añadida

### 6.3 ESTUDIO DE LA PRECISIÓN

La precisión expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas.

La precisión se expresa matemáticamente como la desviación estándar, estimada analíticamente por  $s$ .

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

Donde  $n$  es el número de medidas,  $X_i$  es el valor medido en el ensayo  $i$  y  $\bar{X}$  el estimador de la media poblacional, media aritmética u calculado 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

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

#### Límites de Confianza:

$$\text{Intervalo de Confianza Promedio} = \bar{x} \pm \frac{t \text{ tabla } x s}{\sqrt{n}}$$

#### Determinación de la cantidad en g/100g:

Lidocaína base g/100g =

$$\frac{AM \times WSt \times 5 \times Pot \times 50 \times 50}{ASt \times 50 \times 50 \times WM \times 5} \times 100$$

Dónde

- A M : Área de la muestra
- A St : Área del estándar
- W St : Peso del estándar expresado en mg
- WM : Peso de la muestra expresado en mg
- Pot St : Potencia de estándar expresado en fracción decimal como tal cual

## 6.4 ESTUDIO DE LA ROBUSTEZ

La guía ICH, Q2A define la robustez de un método analítico como la medida de su capacidad para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando idea de su fiabilidad o

estabilidad durante su empleo en rutina. Es por tanto la capacidad que demuestra el procedimiento de análisis para proporcionar resultados validos en presencia de pequeñas cambios respecto de las condiciones descritas en el método, susceptibles de producirse durante su utilización.

Los estudios de robustez de un método de análisis permiten, por una parte, conocer la estabilidad de dicho método ante pequeñas modificaciones de las condiciones descritas en el y por tanto su independencia frente a estas. Por otra parte, también permiten conocer en muchos casos las condiciones de trabajo óptimas.<sup>(18)</sup>

El mejor test para establecer si hay diferencia significativa en los resultados obtenidos en el análisis inicial y final es un **TEST T.PAREADO** que se cálcula a partir de la siguiente fórmula.

$$t : \frac{\bar{d} \cdot \sqrt{n}}{s}$$

Dónde:

$\bar{d}$  : promedio de la diferencia de las muestras iniciales menos las muestras finales

s : desviación estándar

n : número de dat

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### DESARROLLO Y VALIDACIÓN PROSPECTIVA DE UNA TÉCNICA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC) PARA CUANTIFICAR LIDOCAÍNA BASE EN UNA POMADA

La cromatografía líquida de alta performance es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y en una fase móvil líquida. La separación en este caso se logra por procesos de adsorción. El tiempo de elución de cada principio activo depende de su naturaleza química, la composición y la velocidad de flujo de la fase móvil y la composición y el área de la fase estacionaria, que en este caso consiste en una columna rellena con material L1 (Octadecilsilano unido químicamente a sílice porosa). Siendo esta metodología de uso rutinario en la Industria Farmacéutica, se hace necesario demostrar que cumple con los parámetros de validación establecidos y que nos permitirá obtener los resultados previstos. <sup>(15,23)</sup>

#### 1. Establecimiento del Método:

##### 1.1 Selección de la Columna

Compuestos	Columna	Fase móvil
Bases débiles	Preferida C18 Alternativa C8	Agua-modificador

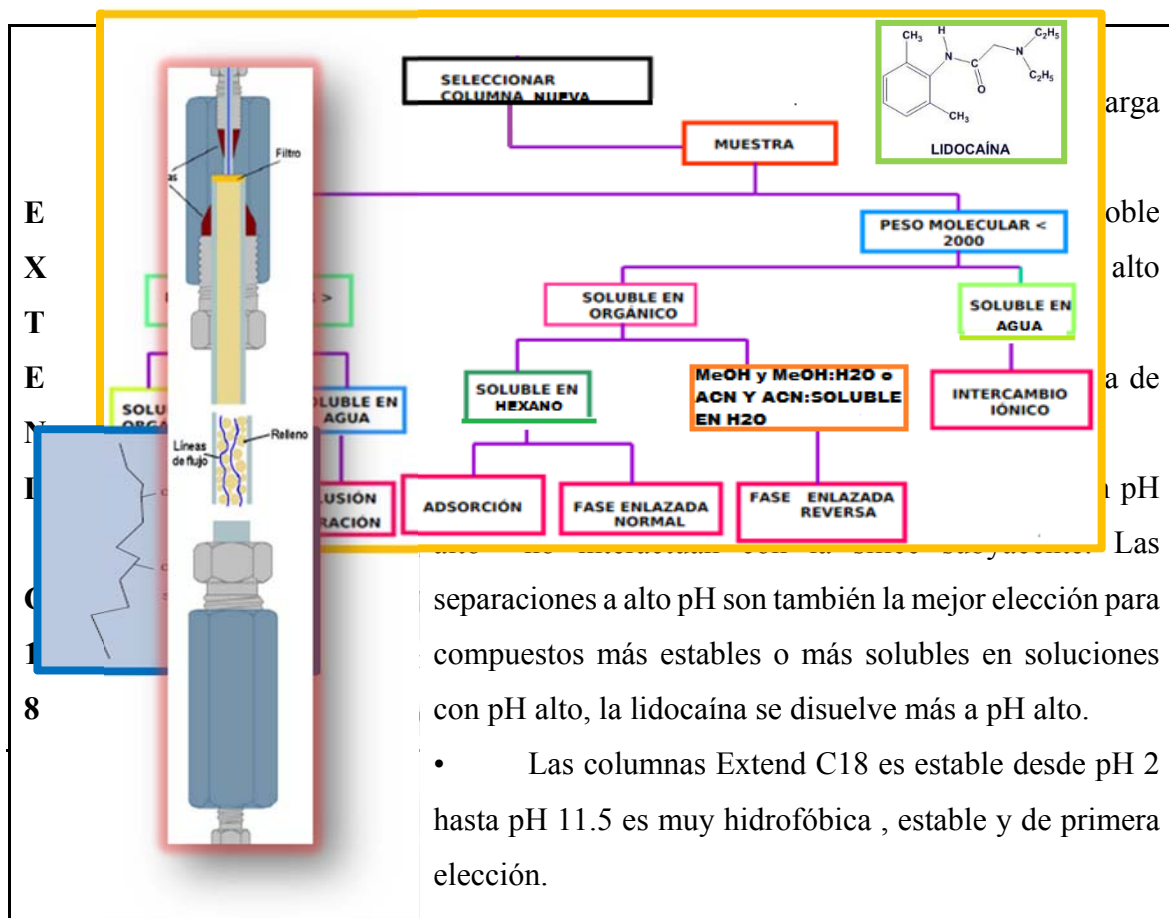


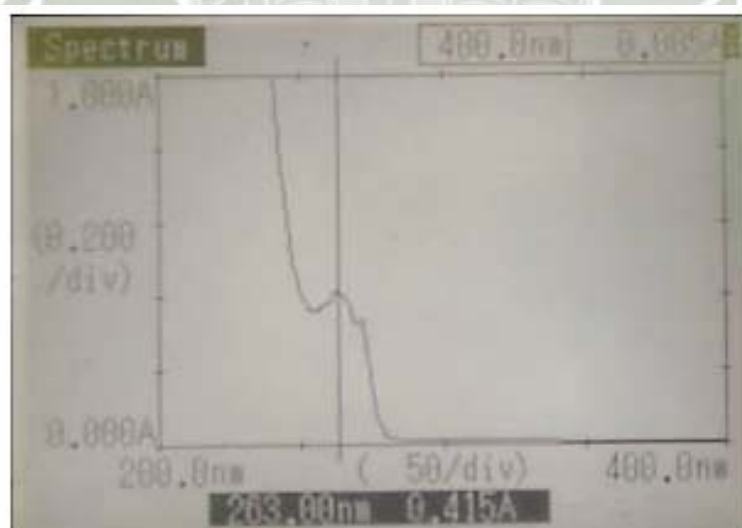
Fig.N° 3.1 Diagrama de flujo de selección de columnas para HPLC en función del tipo de muestra

En la Fig. N° 3.1 constituye un guía para la selección de la columna a utilizar en su análisis por HPLC para el desarrollo de métodos de muestras de moléculas pequeñas cuyo peso molecular  $< 2000$ , proteínas y péptidos cuyo peso molecular  $> 2000$  a partir de ello determinamos su solubilidad en agua o en disolvente orgánico y consecuentemente la naturaleza de la fase estacionaria.<sup>(24)</sup>

## 1.2 Selección de la longitud de onda

Para establecer la adecuada longitud de onda de trabajo hemos tomado como antecedente el desarrollo de un método analítico y validación de lidocaína en pomada por espectrofotometría UV en el cual se trabajo de la siguiente manera:

La solución madre de patrón de lidocaína que tiene la concentración  $1000\mu\text{g/ml}$  se diluyó aún más a  $100\mu\text{g/ml}$  con HCl  $0.1\text{ M}$ . La absorbancia de la solución resultante fue escaneada en el UV espectrómetro que va desde  $200\text{-}400\text{nm}$ . El gráfico muestra el máximo de absorción a  $263 \pm 1\text{ nm}$ .<sup>(25)</sup>



**Fig N°3.2** Spectro UV de lidocaína en  $0.1\text{M HCl}$   $\lambda$  máx  $263\text{nm}$

A partir de esto nosotros podemos tener una idea de la longitud de onda de máxima absorción y con este antecedente hemos podido optimizar el método con la ayuda de un detector con arreglo de diodos el cual me permite acceder a un espectro tridimensional función con la cual podemos determinar la longitud de onda de máxima absorción según el gráfico tridimensional que presentamos a continuación la longitud de onda de máxima absorción es de 220 nm para lidocaína base.

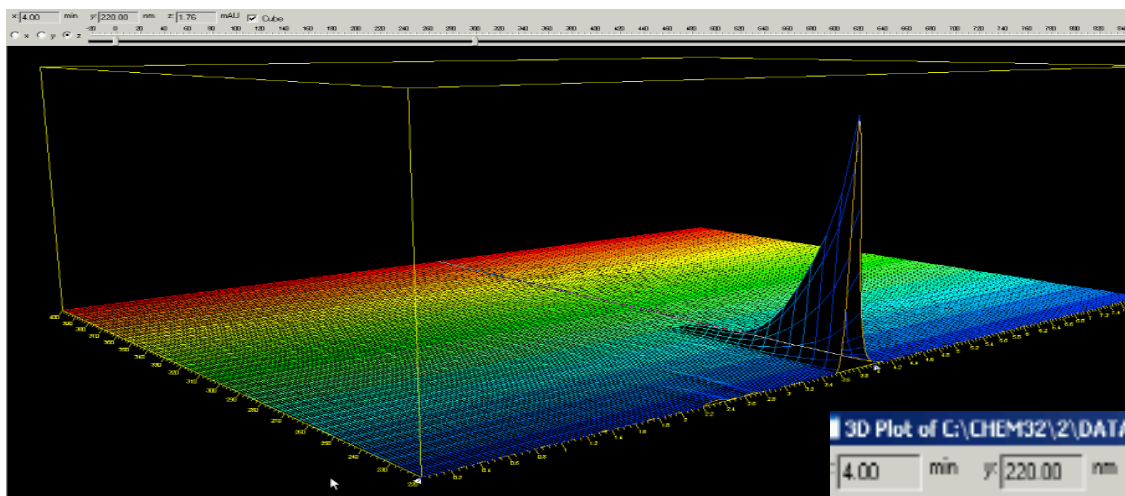


Fig N°3.3 Spectro tridimensional de lidocaína  $\lambda$  máx 220nm

Aunque la longitud de onda de absorción máxima según el gráfico tridimensional sea de 220 nm es necesario evitar cualquier tipo de interferencia en la absorción de nuestro analito con la longitud de onda de máxima absorción de la fase móvil el cual está compuesta por metanol: buffer fosfato pH 8.0 (75:25) y cuyas longitudes de onda de máxima absorción son las siguientes: el buffer fosfato presenta absorción a una longitud de onda de 200 nm; el metanol absorbe a una longitud de onda de 201, el agua absorbe a una longitud de onda de 191 nm.

Es por ello que para obtener un pico libre de cualquier posible interferencia se trabajó a una longitud de onda de 230 nm.

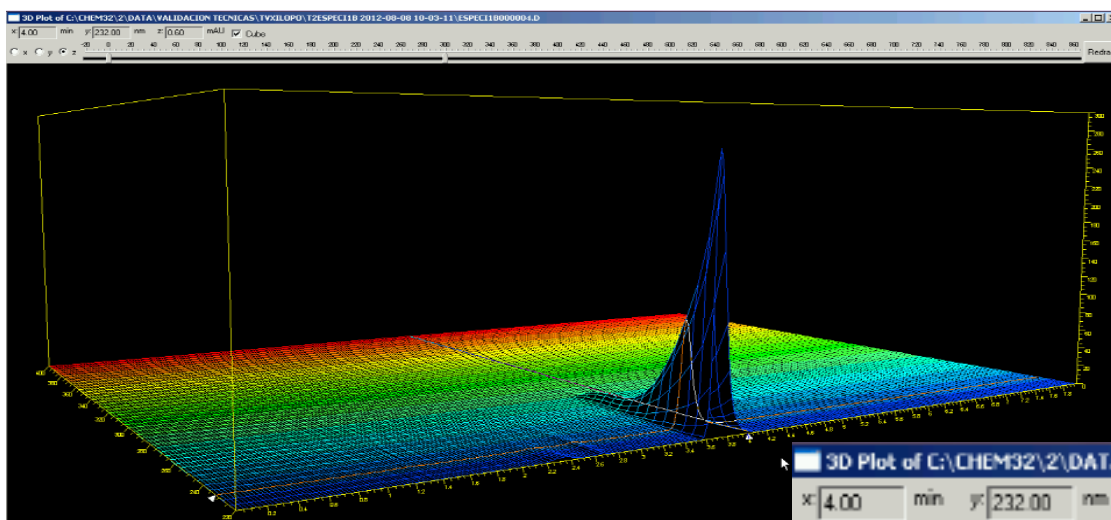


Fig N°3.4 Spectro tridimensional de lidocaína  $\lambda$  230nm

Además se tomó en cuenta esta longitud de onda porque la lidocaína tiene como cromóforo al anillo aromático el cual es el responsable de bandas de absorción en las regiones ultravioleta a su vez corresponde a la porción hidrófoba que se retiene en la columna. El anillo aromático sustituido con el grupo amino presenta una longitud de onda de máxima absorción a 230 nm. que corresponde a la misma longitud de onda utilizada en el presente informe.<sup>(26)</sup>

**TABLA N° 3.1** Máximos de absorción en el ultravioleta de algunos bencenos monosustituidos. <sup>(26)</sup>

C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> X, donde -X es	Banda Primaria o banda K	
	$\lambda$ max,nm	$\epsilon > 30000$
-H	203.5	7400
-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	203	7500
-CH <sub>3</sub>	206.5	7000

-I	207	7000
-Cl	209.5	7400
-Br	210	7900
-OH	210.5	6200
-OCH <sub>3</sub>	217	6400
-CO <sub>2</sub> H	230	11600
-NH <sub>2</sub>	230	8600
-COCH <sub>3</sub>	245.5	9800
-CHO	249.5	11400
-NO <sub>2</sub>	268.5	7800

**FUENTE:**J.R.Dyer.Applications of Absorption spectroscopy of Organic Compounds”

$\epsilon$ :coeficiente de extinción molar

Los hidrocarburos aromáticos poseen dos absorciones características conocidas como banda E (etilénica) y banda B (bencenoide) que se ven modificadas por la presencia de dobles enlaces conjugados conocidas como banda K (conjugación) y la presencia de elementos con pares de electrones sin compartir: banda R (radicalaria).<sup>(27)</sup>

El anillo aromático sustituido con el grupo amino que presenta la lidocaína base absorbe en la bandas K por la presencia de dobles enlaces conjugados y lo hace a una longitud de 230 nm, estas bandas k o bandas primarias se caracterizan por absortividades molares altas.

### 1.3 Selección de la fase móvil

La selección del disolvente se basa en la solubilidad y la estabilidad del fármaco en en el sistema de disolventes, así como la extracción del fármaco a partir de su formulación.

Lidocaína pomada puede ser libremente soluble en agua y en disolventes orgánicos como etanol, cloroformo, n-hexano a partir de esto elegimos como sistema de disolventes al agua y al metanol que de preferencia es el mismo que el de la fase

móvil como en nuestro método. Para la adecuada selección de la fase móvil se tubo en cuenta una serie de parámetros que se describen a continuación :

#### **Absorción en el ultravioleta:**

Para la selección de la fase móvil es importante tener en cuenta que su absorción en el ultravioleta no debe producir ninguna señal al mismo tiempo de retención que el compuesto químico de nuestro interés.

**Tabla N° 3.2** Longitud de onda de máxima absorción de los disolventes más comunes.<sup>(28)</sup>

Disolvente	$\lambda$ (nm )
acetonitrilo	190
agua	191
ciclohexano	195
hexano	195
metanol	201
etanol	204
eter	215
Cloruro de metileno	220
cloroformo	237
Tetracloruro de carbono	257

**FUENTE:** Burdick & Jackson solvents, Agilent Technologies

En la **TABLA N° 3.2**. Nuestros solventes de trabajo no van a producir ningún tipo de señal teniendo en cuenta que nosotros trabajamos a una  $\lambda$  (nm ) de 230 nm, ya que ellos tienen una absorción a una longitud menor como por ejemplo el agua que absorbe a una longitud de onda de 191 nm y el metanol a una longitud de onda de 201 nm por lo tanto esos solventes se confundirían con el ruido no produciendo ninguna señal al mismo tiempo de retención que el principio activo.

#### **Polaridad:**

En la cromatografía de fase inversa, la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es polar, las columnas de fase reversa, muy hidrofóbicas, tienen afinidad por compuestos de baja polaridad. Como consecuencia, la operación con sistemas isocráticos con fases móviles muy polares, conduce a su retención en la fase estacionaria. En la separación de la fase inversa el soluto que primero sale es el más polar. Si se aumenta la polaridad de la fase móvil, se prolongará el tiempo de retención, mientras que las fases móviles con polaridades menores acortan los tiempos de retención.

Uno de los índices para seleccionar la fase móvil y el más útil es el índice de polaridad (fuerza eluotrópica).

El agua es un disolvente altamente polar y al mezclarlo con el metanol de polaridad menor obtenemos una fase móvil de polaridad intermedia, lo cual disminuye el efecto hidrofóbico modificando el coeficiente de partición de forma que el compuesto se mueve por la columna y eluye acortando así los tiempos de retención.<sup>(16)</sup>

**Alto poder solubilizante de las muestras:** En cromatografía de líquidos, la muestra a inyectar debe estar completamente disuelta. Es conveniente que el solvente de disolución de la muestra sea la misma fase móvil. Si esto no es posible debe tenerse en cuenta la miscibilidad entre el solvente de disolución y la fase móvil, como la precipitación de componentes de la muestra al estar en contacto con la fase móvil, también la aparición de picos extraños al cromatograma verdadero debidos a la señal del solvente, o bien a la elución de impurezas retenidas en la columna.<sup>(16)</sup>

Para nuestro caso la muestra (producto terminado) no contiene solo lidocaína base, también contiene excipientes cuyas solubilidades son un parámetro crítico para la elección de la fase móvil, un solvente apropiado es aquel que tenga un poder solubilizante de las muestras tanto de los excipientes como del principio activo.

El vehículo para nuestro principio activo es miscible en agua y metanol y por lo tanto dichos solventes pueden ser usados como fase móvil por su alto poder solubilizante.

**Baja reactividad:** Los solventes con un elevado grado de reactividad no se utilizan en HPLC, ya que pueden reaccionar con la muestra, la fase estacionaria, o los componentes del equipo cromatográfico.

**Compatibilidad con el detector utilizado:**

El detector de HPLC más difundido es el espectrofotométrico, es habitual elegir un solvente “transparente” a la longitud de onda de trabajo. Esa transparencia puede evaluarse por la longitud de onda de corte, es decir, la longitud de onda a la cual la absorbancia del solvente, en una cubeta de 10mm de paso óptico, es igual a la 1 unidad de absorbancia empleado aire como referencia

**Adecuado punto de ebullición:** Se prefiere los solventes de punto de ebullición intermedio. Si el solvente tiene bajo punto de ebullición, su volatilidad es alta y la composición de la fase móvil puede variar durante la jornada de trabajo. Por el contrario, un alto punto de ebullición se correlaciona, por lo general, con alta viscosidad. Esto último es sinónimo de alta presión (con ello menor vida media de los componentes del instrumento) y baja eficiencia. Otro aspecto importante a considerar en las fases móviles, es la viscosidad de las mezclas agua/modificador orgánico que, en caso de ser demasiado alta, puede dar lugar a problemas de presión elevado en cabeza de columna así como ensanchamiento de picos.

**Baja viscosidad:**

La viscosidad de los solventes está estrechamente relacionada con la presión del sistema. Con solventes viscosos, la eficiencia de la separación es menor debido a que el coeficiente de difusión de la muestra se reduce, y se dificulta la transferencia de masa del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria. El aumento de la viscosidad reduce la permeabilidad de la columna.

**Seguridad:**

En HPLC debe evitarse el empleo de solventes que, por sus características (en particular inflamabilidad y toxicidad), representan un serio riesgo para el operador. En general, se recomienda no utilizar solventes de alto grado de toxicidad como el sulfuro de carbono, benceno o tetracloruro de carbono y tomar precauciones durante la manipulación de los otros solventes.

**Alto grado de pureza:**

Los solventes deben cumplir ciertos requisitos de calidad. La presencia de impurezas puede, por un lado, inducir modificaciones de la selectividad de la fase móvil, y por otro contribuir a una señal de base importante en el detector (absorbancia, reacciones de oxidoreducción, etc.)

**Solventes y aditivos de fase reversa:**

Las fases móviles de fase reversa están constituidos por mezclas de solventes polares, en general agua, y un modificador orgánico (metanol, acetonitrilo, THF).

**Agua:**

El agua es, indudablemente, el solvente más utilizado en HPLC. Puede adquirirse comercialmente agua de calidad cromatográfica, o bien puede ser purificada por el mismo usuario. El agua destilada y desionizada que a los fines prácticos, es útil para muchas de las aplicaciones de laboratorio, puede encontrar serias limitaciones en

HPLC. La razón de ello reside en la presencia de sustancias orgánicas (ftalatos, cloraminas, etc.) que no se eliminan por el tratamiento aplicado. Las columnas de fase reversa, muy hidrofóbicas tienen afinidad por compuestos de baja polaridad. Como consecuencia, la operación con sistemas isocráticos con fases móviles muy polares, conduce a su retención en la fase estacionaria.

**Metanol:**

El metanol es el modificador orgánico más utilizado en fase reversa, en mezclas con agua o buffers. Por su mayor poder disolvente de sales se prefiere cuando es necesario utilizar altas concentraciones salinas. Es poco tóxico y fácil de purificar industrialmente, siendo el solvente orgánico de grado HPLC más barato.

Los modificadores orgánicos (metanol, acetonitrilo) actúan como inhibidores del crecimiento bacteriano.

El agua es el disolvente menos fuerte para la elución de solutos en cromatografía de fase reversa, dando origen a tiempos de retención muy elevados; por este motivo, se tiene la necesidad de utilizar modificadores orgánicos (los más usados son metanol y acetonitrilo) que deben cumplir las siguientes condiciones.

1. Ser compatible con el detector utilizado
2. Ser miscible con el agua en un amplio margen de proporciones.
3. No reaccionar ni con la fase estacionaria ni con la muestra a separar
4. Ser poco tóxico
5. Sus vapores no deben producir mezclas inflamables con el aire
6. No deben impedir la detección de los solutos. El caso más frecuente de interferencia se presenta cuando se utiliza un detector de UV, en el que muchos disolventes presentan una absorción excesiva a longitudes de onda baja (longitud de onda de corte).

### **Aditivos: Sales**

#### **Elección del Buffer:**

Numerosos métodos cromatográficos requieren el uso de sales en la fase móvil, generalmente para el control y regulación de pH o de la fuerza iónica, resisten cambios de pH y mantienen la retención, mejoran la forma de pico de los compuestos ionizables.

(16)

Estos aditivos, al igual que los solventes, deberán tener un alto grado de pureza. Los fosfatos son muy usados en cromatografía de fase reversa como sales de sodio o potasio debido a su baja absorción UV aún a longitudes de onda corta. Las soluciones que contienen aditivos deben prepararse el día de uso. <sup>(16)</sup>

La elección del buffer se determina a partir del pKa del compuesto sabiendo que a ese pH existe un alto porcentaje de forma no ionizada favoreciendo así su retención en la columna. <sup>(16)</sup>

Para nuestro caso el pKa de la lidocaína es de 7.9; a partir de ello la primera opción para modificador de la fase móvil a pH 7-8 suele ser el tampón fosfato, debido a su rango de tamponado de pH 6.2-8.2. <sup>(16)</sup>

Sin embargo las fases móviles con agregado de sales inorgánicas representan un buen medio para el crecimiento de microorganismos no deben almacenarse, ni dejarse durante mucho tiempo estancadas en el equipo. <sup>(16)</sup>

En la tabla N° 3.3 se muestran los tampones más usados en fase reversa

**Tabla N°3.3** Tampones más usados en fase reversa HPLC <sup>(24)</sup>

Buffer	pKa	Buffer Range	UV Cutoff (nm)
Phosphate	2.1	1.1-3.1	200
	7.2	6.2-8.2	
	12.3	11.3-13.3	
Formic acid	3.8	2.8-4.8	210

Acetic acid	4.8	3.8-5.8	210
Citrate	3.1	2.1-4.1	230
	4.7	3.7-5.7	
	5.4	4.4-6.4	
tris	8.3	7.3-9.3	205
triethylamine	11.0	10.0-12.0	200
pyrrolidine	11.3	10.3-12.3	200

FUENTE:Huber,L; Agilent Technologies

La capacidad de tamponamiento se da a un pH igual al pKa del tampón. La mayoría de tampones tienen una capacidad adecuada de tamponamiento para controlar el pH de la fase móvil solo en +/- 1 unidades de su pKa.

#### 1.4 MECANISMO DE INTERACCIÓN DE LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA CON EL COMPUESTO QUÍMICO

##### Regular o Cromatografía de Partición Simple

La retención está gobernada por la hidrofobicidad del soluto. A mayor polaridad del soluto, mayor predilección de este por la fase móvil y menor tiempo de retención, de tal manera que la polaridad del soluto frente a la fase estacionaria y móvil condiciona que los compuestos con polaridad semejante a la de la fase estacionaria presente mayor retención, necesitando fases móviles de mayor fuerza de elución (polaridad más semejante a la del soluto) para reducir el tiempo de retención y lograr que el compuesto salga de la columna.

##### Control de ionización:

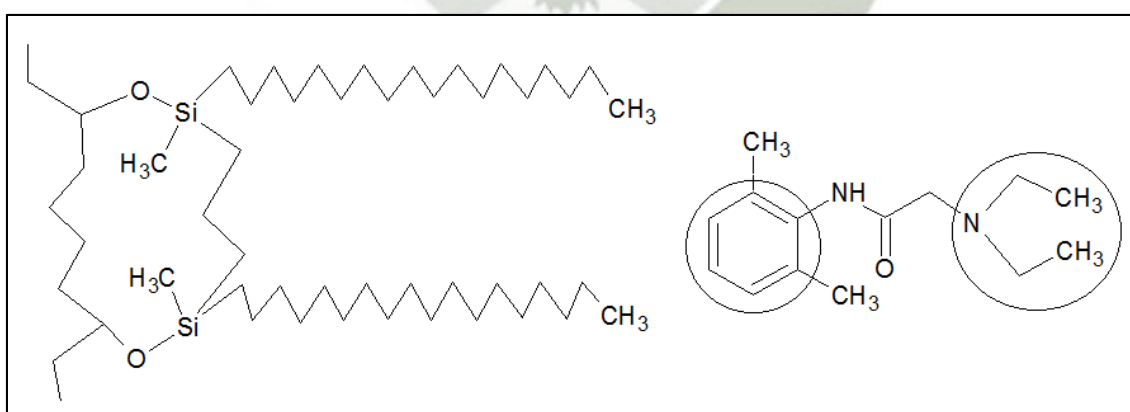
En la cromatografía en fase inversa es habitual que la fase móvil tenga un elevado contenido en agua, lo que da lugar a que compuestos cargados se disuelvan perfectamente en ella y no sean repelidos hacia la fase estacionaria (como dice la teoría del mecanismo de adsorción) con lo que no se producirá interacción ni, consecuentemente, retención. En estos casos, es necesario anular la carga del soluto

mediante la presencia de un modificador incluido en la fase móvil. La anulación de la carga se puede efectuar de tres maneras, lo que da origen a otros tipos de cromatografía de fase inversa.

Por acción del pH de la fase móvil: Aquellos solutos que presentan carga (ácidos, bases) dependiendo del pH de la disolución, pueden ser retenidos en su forma no cargada, siempre que se desplace el equilibrio ácido/base en el sentido de la forma no cargada mediante el pH de la fase móvil. Esta técnica recibe el nombre de cromatografía de supresión iónica:

A pH básico el equilibrio se desplaza hacia la especie no cargada. Se retendrá favorablemente la especie no iónica y lo hará mal la iónica, que resulta muy polar. Es decir, la retención de solutos no ionizables depende fuertemente de la posición que adopte el equilibrio entre ambas formas. Si el analito se encuentra dissociado, el equilibrio debe desplazarse hacia la forma no ionizada para lograr la retención. Los factores que modifican este equilibrio son el pH y la fuerza iónica. La base necesita un pH superior a 7-8 para impedir la ionización.<sup>(16)</sup>

El control adecuado del pH en función de los solutos y su pKa permite controlar y ajustar la separación. Los solutos en forma no ionizable son retenidos por la fase estacionaria. Al cambiar a su forma ionizable eluyen de la columna.



**Fig.Nº 3.5** Interacción de la columna L1 (octadecilsilano) con el compuesto químico lidocaína

En la **Fig. N° 3.5** podemos ver que la interacción de la columna L1 octadecilsilano con el compuesto químico se lleva a cabo por dos tipos de mecanismos, uno de partición simple cuya retención esta gobernada por la hidrofobicidad del soluto en este caso la porción lipofílica, hidrofóbica, no polar de la lidocaína correspondiente al anillo aromático con menor predilección por la fase móvil de polaridad intermedia y forzado a penetrar en la fase estacionaria no polar, el otro mecanismo de interacción es el control de ionización que se lleva a cabo con la amina terciaria que presenta la lidocaína cuyo amortiguamiento a pH 8 me permite que el equilibrio se desplace hacia la porción no ionizada de la amina favoreciendo su retención en la fase estacionaria.

## 2.0 ESPECIFICIDAD:

Este parámetro se refiere a la proporcionalidad del método de producir una señal medible, solo a la presencia del analito, libre de interferencias de otros componentes en la matriz de la muestra, evaluamos la especificidad, según metodología descrita en la (pág 58)

### 2.1 Determinación de interferencia del diluyente:

Evaluamos la posible interferencia del diluyente en la identificación del principio activo, el área del diluyente es cero por lo tanto no se detecta una posible interferencia.

Determinación de interferencia	Área	Interferencia
Análisis del blanco (diluyente)	0	No detectable

### 2.2 Determinación de interferencia de excipientes:

**Placebo solo:** Evaluamos la interferencia del placebo solo siendo el área de cero comprobando que no interfiere en la identificación del principio activo.

Determinación de interferencia	Área	Interferencia
Análisis de placebo solo (excipientes)	0	No detectable

**Recobro:** Determinamos la especificidad del método midiendo el grado de interferencia obtenida por la diferencia de resultados del análisis del principio activo

con y sin placebo se comprueba la recuperación del principio activo en su totalidad y la posible interferencia del placebo en su recobro y se corrobora si esta dentro de las especificaciones es decir  $\pm 2\%$  del valor teórico. La preparación del estándar y muestras se mencionan en la metodología (pág 59)

- En la prueba del recobro se prepara un estándar de Lidocaína base

**Datos del estándar:**

Estándar:	Lidocaína base
Peso (WSt) :	50.0 mg
Potencia (Pot):	99.10 %

- Las muestras en la prueba de recobro se preparan con el estándar de lidocaína más el placebo y se inyectan por duplicado.

**Datos de las muestras:**

MUESTRAS	Lidocaína Base ( mg)	Placebo( mg)
MUESTRA 1	50.0 mg (WM)	1002.3 mg
MUESTRA 2	50.1 mg (WM)	1005.8 mg

WSt: Peso del estándar                      WM: Peso de la muestra

Después de haberse realizado la preparación del estándar y muestras fueron inyectadas al equipo obteniéndose como respuestas las respectivas áreas las cuales se detallan en la **TABLA N° 3.4.**

**TABLA N° 3.4** Tabla resumen de las áreas obtenidas tanto para el estándar como para las muestras en la prueba del recobro.

	N° de inyecciones	Area del Estándar ÁSt	
<b>E S T Á N D A R</b>	1	1002.57971	$\bar{x}$ :1002.70752
	2	1002.59943	
	3	1002.12567	
	4	1002.93311	
	5	1002.78467	
	6	1003.22247	
		<b>Area de la muestra AM</b>	
<b>M U E S T R A S</b>	<b>Recobro 1</b>	1014.28278	$\bar{x}$ :1013.99479
		1013.41882	
	<b>Recobro 2</b>	1015.88275	$\bar{x}$ :1014.97734
		1015.63043	

**FUENTE:Elaboración propia**

En la **TABLA N° 3.4** vemos que las áreas del estándar y las áreas de la muestras para el recobro son muy parecidas. A partir de esto se puede determinar el porcentaje que se logra recuperar de lidocaína en las muestras de recobro mediante la siguiente fórmula.

$$\frac{AM \times WSt \times 5 \times Pot \times 50 \times 50}{ASt \times 50 \times 50 \times WM \times 5} \times 100$$

- AM : Área de la muestra
- ASt : Área del estándar
- WSt : Peso del estándar expresado en mg
- WM : Peso de la muestra expresado en mg

PotSt : Potencia de estándar expresado en fracción decimal como tal cual

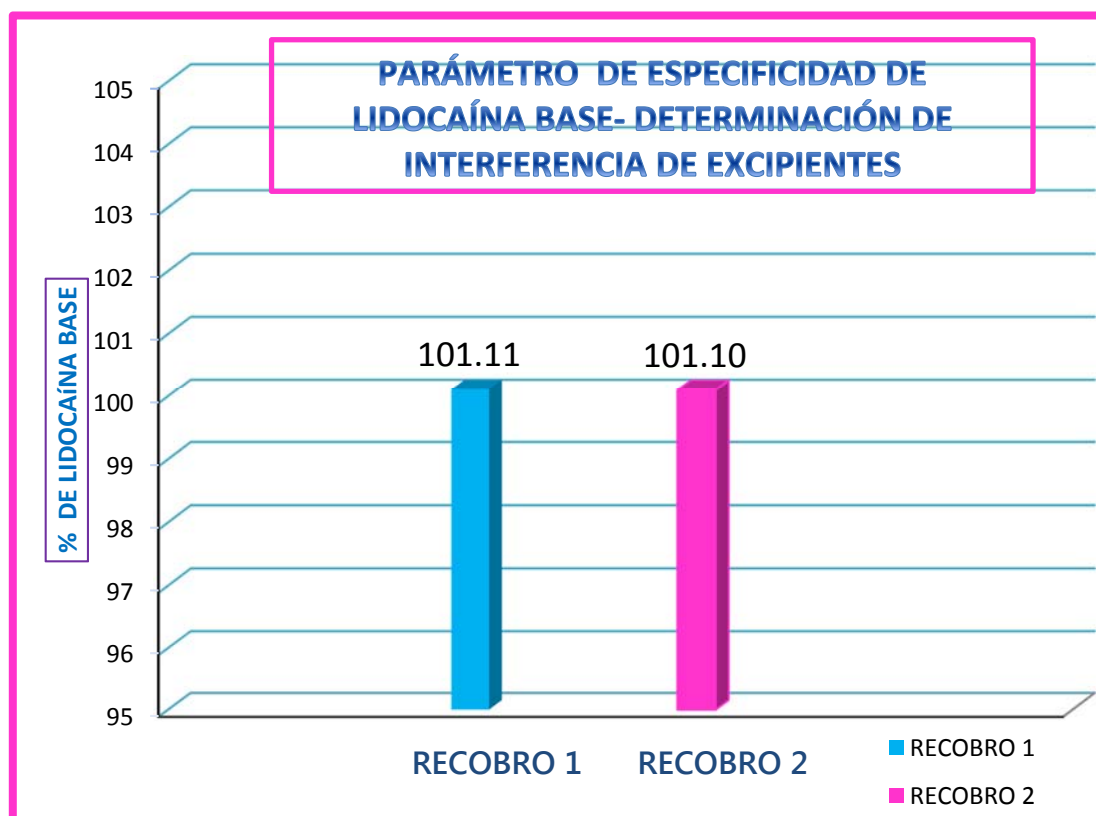
En la (pág 59) se detalla la preparación del estándar y muestras, las diluciones que se llevan a cabo en su preparación también se detallan en la fórmula.

Los resultados encontrados como resultado de la aplicación de la fórmula ya descrita se detallan en la **TABLA N° 3.5**

**TABLA N° 3.5**  
**ENSAYO DE ESPECIFICIDAD DE LIDOCAÍNA BASE POMADA Y SUS**  
**EXCIPIENTES COMO COMPONENTES DE SU FORMULACIÓN.**

MUESTRA	LIDOCAÍNA BASE
Recobro 1	101.11%
Recobro 2	101.10%
PROMEDIO	101.11%
CV (%)	0.01%

**FUENTE: Elaboración propia**



FUENTE:Elaboración propia

**Fig.Nº 3.6** Porcentaje de lidocaína base obtenido por el recobro 1 y por el recobro 2

Se trabajó con el diluyente, placebo, la solución estándar y el recobro ( placebo más estándar), no encontrándose picos que interfieran con el pico cromatográfico de la lidocaína base, es decir no hubo picos que eluyan al mismo tiempo de retención, comprobándose no influyen sobre el analito de interés. Como de puede observar en la **TABLA Nº 3.5** y en la **Fig.Nº 3.6** se obtiene un porcentaje de lidocaína base para el recobro 1 de 101.11% , para el recobro 2 de 101.10% y como promedio un recobro de 101.11 % de lidocaína base y un CV de 0.01%. El resultado obtenido deben concordar con  $\pm 2\%$  del valor teórico, estando dentro de las especificaciones.

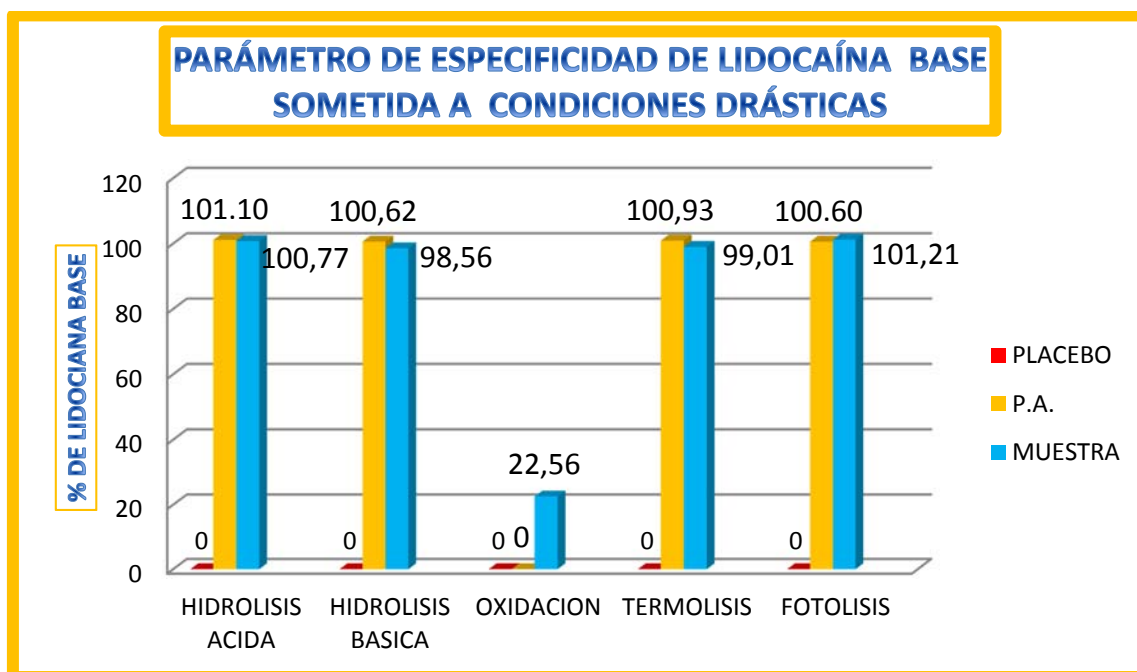
### 2.3 Determinación de interferencia de productos de degradación

En la **TABLA N° 3.6** podemos ver los porcentajes obtenidos del placebo, lidocaína base como principio activo, y la muestra (placebo más lidocaína base) después de haber sido sometidos a diversas condiciones drásticas de estrés fisicoquímico como la hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina, termólisis, fotólisis y oxidación, según metodología descrita en la (pág 60) y ver la posible interferencia de sus productos de degradación en la identificación y cuantificación de lidocaína.

**TABLA N° 3.6**  
**PORCENTAJE DE LIDOCAÍNA BASE SOMETIDA A CONDICIONES DRÁSTICAS.**

**FUENTE:Elaboración propia**

Degradaciones	Placebo (%)	P.A. (%)	Promedio (%)	CV (%)	Muestra (%) (p.a+placebo)	Promedio (%)	CV (%)
Hidrólisis Ácida	0.00	100.8169	101.10	0.4%	100.8944	100.77	0.2%
	0.00	101.3929			100.6410		
Hidrólisis Básica	0.00	100.5868	100.62	0.0%	99.0819	98.56	0.8%
	0.00	100.6490			98.0328		
Oxidación	0.00	0.00	0.00	0.0%	23.0811	22.95	0.8%
	0.00	0.00			22.8258		
Termólisis	0.00	101.0225	100.93	0.1%	98.9268	99.01	0.1%
	0.00	100.8288			99.0962		
Fotólisis	0.00	99.5381	100.60	1.5%	101.1811	101.21	0.0%
	0.00	101.6528			101.2414		



FUENTE:Elaboración propia

**Fig.Nº 3.7** Porcentaje de placebo, lidocaína base (principio activo) y muestra (lidocaína base más placebo) sometidos a condiciones drásticas.

La Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (A.E.F.I) hace mención que se puede lograr una degradación del 10 % al 20 %. Con la finalidad de evaluar la degradación o la interferencia de los excipientes, es de sumo interés superponer los distintos cromatogramas obtenidos.<sup>(17)</sup> Para nuestro caso en la determinación de interferencia de productos de degradación se encontró lo siguiente:

Como de puede observar en la **TABLA Nº 3.6** y en la **FIG.Nº 3.7**. El porcentaje para el placebo es de cero porque no produce ningún tipo de señal ni interferencia con el pico de lidocaína base.

- Al someter a la lidocaína base (principio activo) y muestra (lidocaína base más placebo) a la hidrólisis ácida el área del pico de lidocaína base no se ve disminuida por lo tanto el principio activo y la muestra, tienen resistencia a la hidrólisis ácida. Además no se sobrepone ningún tipo de degradación ni interferencia con el pico original.
- Al someter a la lidocaína base (principio activo) y muestra (lidocaína base más placebo) a la hidrólisis básica el área del pico de lidocaína base no se ve disminuida por lo tanto el principio activo y la muestra, tienen resistencia a la hidrólisis básica. Además no se sobrepone ningún tipo de degradación ni interferencia con el pico original.
- Al someter a la lidocaína base (principio activo) y muestra (lidocaína base más placebo) a la oxidación no se generan productos de degradación pero el área del pico de lidocaína base se ve disminuida considerablemente por lo cual el principio activo y la muestra no tienen resistencia a la oxidación.
- Al someter a la lidocaína base (principio activo) y muestra (lidocaína base más placebo) a la termólisis el área del pico de lidocaína base no se ve disminuida por lo cual el principio activo y la muestra, tienen resistencia a la termólisis. Además no se sobrepone ningún tipo de degradación ni interferencia con el pico original.
- Al someter a la lidocaína base (principio activo) y muestra (lidocaína base más placebo) a la fotólisis el área del pico de lidocaína base no se ve disminuida por lo cual el principio activo y la muestra, tienen resistencia a la fotólisis. Además no se sobrepone ningún tipo de degradación ni interferencia con el pico original.

### 3.0 LINEALIDAD

#### 3.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Es la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados para nuestro caso las áreas que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra, se realiza con el objetivo de obtener un modelo que describa con precisión la relación de la concentración versus respuesta.

Este parámetro se evaluó en un rango de 50-150 %, preparando 5 concentraciones crecientes del principio activo; se analizaron por triplicado con un total de 15 determinaciones, según metodología descrita en la (pág 61). Se construyó la recta de regresión lineal correspondiente a los resultados de los 15 puntos experimentales.

La evaluación estadística de la linealidad del sistema se realizó por medio:

#### A. CÁLCULO DE LA RECTA DE REGRESIÓN

Determinar la recta de regresión. Sobre los puntos individuales y sin promediar. Para el caso de una recta la función toma la forma

$$y = bx + a$$

Para hallarse los valores que corresponden al intercepto “a” y pendiente “b”, fue necesario establecer la recta de regresión a partir de los datos de la **TABLA N° 3.7**.

En la **TABLA N° 3.7** se muestran los resultados de la linealidad del sistema en el que trabajó con el estándar secundario de lidocaína base, se prepararon 3 soluciones stock a partir de las cuales se hicieron diluciones hasta obtener 5 concentraciones diferentes al 50%, 75%, 100%, 125% y 150% se trabajó por triplicado para cada nivel de concentración obteniéndose las áreas correspondientes como se puede observar en la siguiente tabla.

### LINEALIDAD DEL SISTEMA

TABLA N° 3.7 RESULTADOS DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA

Conc. (%)	Replica (n)	Peso (mg)	x (conc) (mg/mL)	y(áreas)	f(y/x)
50	1	62.7	0.04971	504.42119	10147.57197
	2	62.0	0.04915	505.14899	10276.94798
	3	62.5	0.04955	533.03971	10757.61261
75	1	62.7	0.07456	749.38990	10050.44731
	2	62.0	0.07373	764.26785	10365.70872
	3	62.5	0.07433	757.03211	10185.43027
100	1	62.7	0.09942	993.77167	9995.98123
	2	62.0	0.09831	1003.20282	10204.77462
	3	62.5	0.09910	1020.12137	10293.85843
125	1	62.7	0.12427	1267.02014	10195.58917
	2	62.0	0.12288	1249.10511	10164.91248
	3	62.5	0.12388	1260.32557	10174.17207
150	1	62.7	0.14913	1495.32147	10027.25667
	2	62.0	0.14746	1506.76990	10218.10474
	3	62.5	0.14865	1505.09186	10125.07138
SUMA	15		1.48412	15114.02963	153183.43965
					$sf = 180.39$
					$\bar{x}f = 10212.23$

FUENTE:Elaboración propia

Después de haberse establecido la recta de regresión , los valores que corresponden al intercepto “a” y pendiente “b” fueron hallados mediante las siguientes fórmulas:

$$b = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}} \quad a = \frac{\sum Y_i - b \sum X_i}{n}$$

n: Número de muestras para nuestro caso n:15

Correspondiendo a valores del intercepto “a” y pendiente “b” los siguientes:

a: 16.49

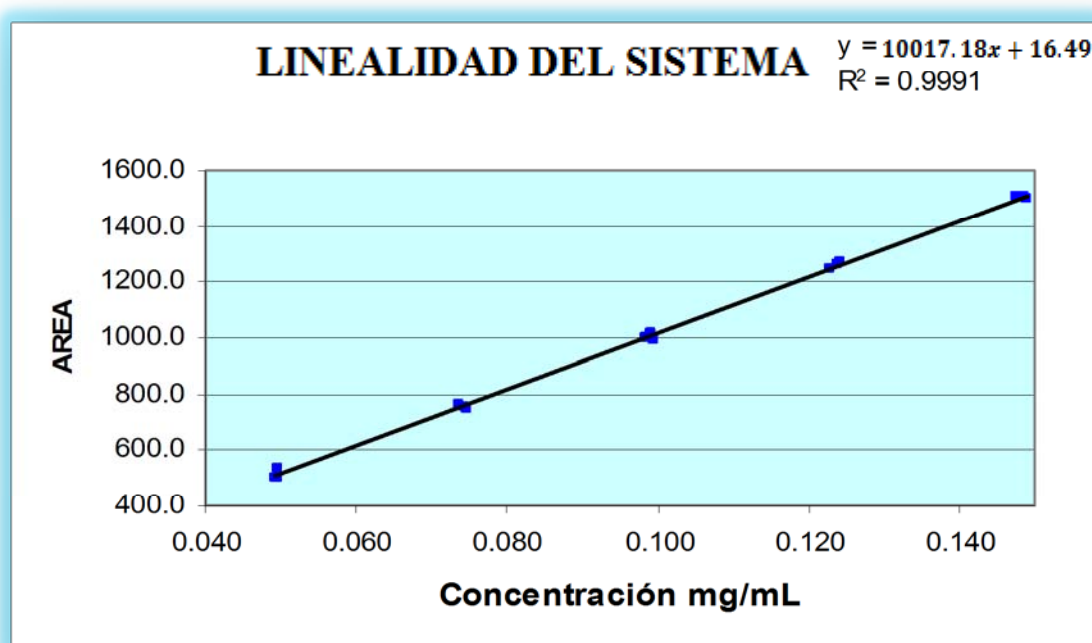
b: 10017.18

**ECUACIÓN DE LA RECTA :**

$$y = 10017.18 x + 16.49$$

La recta de regresión lineal, pudo graficarse a su vez, en la **FIGURA N° 3.8** a partir de la **TABLA N° 3.7** en la que se evidencia la linealidad del sistema, que fue construida con la concentración “x” de lidocaína en mg/mL versus “y” que son las áreas de lidocaína correspondientes a cada concentración “x”, en la que las áreas son dependientes de la concentración.

**FIGURA N°3.8 Linealidad del sistema**



Al observar la **FIGURA N° 3.8** nos percatamos que hay relación directa entre la señal instrumental y la concentración del producto analizado, siendo un método lineal.

## B. INTERPRETACIÓN ESTADÍSTICA DE LA REGRESIÓN LINEAL

Realizar la interpretación estadística de la regresión lineal, a través del cálculo de:

- a. Cálculo del coeficiente de correlación (  $r$  )
- b. Cálculo del coeficiente de determinación (  $r^2$  )
- c. Test estadístico del coeficiente de correlación (  $r$  )
- d. Test de linealidad:
  - d.1 Limite de confianza de la pendiente “  $b$  ”
  - d.2 Test estadístico de la pendiente o significancia estadística de la desviación estándar de la pendiente “  $b$  ”
  - d.3 Limite de confianza del intercepto “  $a$  ”
  - d.4 Test estadístico del intercepto “  $a$  ” o test de proporcionalidad
  - d.5 Coeficiente de variación de los factores de respuesta

### a. CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN ( $r$ )

Con la finalidad de poder conocer el grado de intensidad de la relación existente entre las variables “ $x$ ” e “ $y$ ”, se halla el valor del coeficiente de correlación lineal, el que puede adoptar distintos valores por consiguiente distintos indicadores como:

$r = 1$  indica una recta perfectamente lineal

$r = -1$  indica una recta perfectamente lineal negativa

$r = 0$  indica que no hay relación entre “ $x$ ” e “ $y$ ”

El coeficiente de correlación lineal se determino con los valores hallados en la **TABLA N° 3.7** y con la siguientes fórmula:

$$r = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sqrt{\left( \sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n} \right) \left( \sum Y_i^2 - \frac{(\sum Y_i)^2}{n} \right)}}$$

**RESULTADO:**

El coeficiente de correlación fue de 0.9995. Dicho valor indica que la recta de regresión es casi perfectamente lineal y que existe una correlación lineal positiva.

**CRITERIO DE ACEPTACIÓN:**  $\geq 0.9950$

**b. CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN ( $r^2$ )**

Indica el grado de ajuste de la ecuación

Se halló el coeficiente de determinación " $r^2$ " con la siguiente fórmula:

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

**RESULTADO:**

El coeficiente de determinación fue de 0.9991. El valor es muy cercano a uno, estableciéndose que el modelo lineal es adecuado para describir la relación que existe entre las variables "x" e "y". Pudiendo afirmar que el 99.91% de las variaciones se debe a influencia de la variable "x".

**CRITERIO DE ACEPTACIÓN:**  $\geq 0.9900$

Sin embargo el mejor indicativo de un modelo lineal no es "r" sino un test estadístico.

**c. TEST ESTADÍSTICO DEL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN(r) :**

Uno de los mejores indicadores del modelo lineal no es únicamente el coeficiente de correlación “r” sino un test estadístico basado en dos hipótesis, en el que se calcula el  $t_{\text{regresión}}$  (test de regresión) se compara con  $t_{\text{tabla}}$  (test tabulado) con n-2 grados de libertad y un intervalo de confianza del 95% ( $\alpha: 0.05$ ) valor que es encontrado en la tabla de distribución de t de Student.

$\alpha$ : probabilidad de cometer error (p)

$1-\alpha$  : grado de confianza

n: número de muestras: 15

**HIPÓTESIS NULA ( $H_0$ ):** no existe correlación significativa entre “x” y “y”(r = 0)

**HIPÓTESIS ALTERNATIVA( $H_1$ ):** “r” no debe ser significativamente diferente de uno ( $r \neq 0$ )

El  $t_{\text{regresión}}$  encontrado fue de : 117.68 calculado a partir de la siguiente prueba estadística:

$$t_r = \frac{[r]\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}.$$

**RESULTADO:**

$t_{\text{tabla}}$  : 2.16 Para  $15-2=13$  grados de libertad y ( $\alpha: 0.05$ )

$t_{\text{regresión}}$ : 117.68

$t_{\text{regresión}}$  117.68 >  $t_{\text{tabla}}$  2.16, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, es decir si hay correlación significativa entre las concentraciones y sus áreas.

**d. TEST DE LINEALIDAD**

#### d.1 LIMITE DE CONFIANZA DE LA PENDIENTE “b”:

Este valor se calcula en función de la **DESVIACIÓN ESTANDAR** de la pendiente “b” ( $S_b$ ) se debe hallar primero la **VARIANZA DEL ERROR EXPERIMENTAL TOTAL** (determinación de la varianza de X sobre Y) cuya fórmula es la siguiente:

$$S_{xy}^2 = \frac{\sum Y^2i - a \sum Yi - b \sum XiYi}{n-2} \quad S_{xy}^2 = 133.02$$

A partir de ello determina la **DESVIACIÓN ESTANDAR** de la pendiente “b” ( $S_b$ ) cuya fórmula es la siguiente:

$$S_b = \sqrt{\frac{S(xy)^2}{\sum X^2i - \frac{(\sum Xi)^2}{n}}} \quad S_b = 85.12$$

Fórmula para hallar los **LIMITES DE CONFIANZA** de la pendiente “b”

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

$t_{\text{tabla}}$  = Es el valor obtenido en la tabla de distribución de student, con las siguientes condiciones:

- n-2 grados de libertad, n: número de muestras
- Probabilidad de cometer error (p) de 0.05 , es decir un grado de confianza del 95%

#### RESULTADO:

Intervalo de confianza de la pendiente “b”

$t_{\text{tabla}}$  : 2.16 Para 15-2=13 grados de libertad y ( $\alpha$ : 0.05)

$$b = 10017.18 \pm 2.16 \times 85.12 =$$

$$b = 9833.32 \text{ hasta } 10201.04$$

#### d.2 TEST ESTADÍSTICO DE LA PENDIENTE “b”

Se trata de comprobar que existe una pendiente significativamente distinta de cero mediante una prueba de t de student.

Se realiza estableciendo una comparación entre “ $t_{exp}$ ” y “ $t_{tabla}$ ”

**HIPÓTESIS NULA ( $H_0$ )**= "b" es estadísticamente igual a cero ( $b=0$ )

**HIPÓTESIS ALTERNATIVA ( $H_1$ )**= "b" es estadísticamente diferente de cero ( $b \neq 0$ )

Fórmula para hallar **EL VALOR DE T EXPERIMENTAL** “ $t_{exp}$ ”

$$t_{exp} = \frac{|b|}{Sb} \quad t_{exp} = 117.68$$

#### RESULTADO:

$t_{tabla}$  : 2.16 Para  $15-2=13$  grados de libertad y ( $\alpha$ : 0.05)

$t_{exp}$ : 117.68

$t_{exp} > t_{tabla}$ , entonces se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ) y "b" es significativamente diferente de cero.

#### CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

Si  $t_{exp} > t_{tabla}$  para una probabilidad de cometer error (p) de 0.05, es decir un grado de confianza del 95% y (n-2) grados de libertad, se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ), entonces "b" es estadísticamente diferente de cero es decir el intervalo de confianza no incluye el cero.

#### d.3 LIMITE DE CONFIANZA DEL INTERCEPTO “a”:

Este valor se calcula en función de la **DESVIACIÓN ESTANDAR** del intercepto “a” ( $S_a$ ) cuya fórmula es la siguiente:

$$S_a = \sqrt{(Sb)^2 \frac{\sum X^2 i}{n}} \quad S_a = 8.93$$

Fórmula para hallar los **LIMITES DE CONFIANZA** del intercepto

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

$t_{\text{tabla}}$  = Es el valor obtenido en la tabla de distribución de student, con las siguientes condiciones:

- n-2 grados de libertad
- Probabilidad de cometer error (p) de 0.05 , es decir un grado de confianza del 95%

**RESULTADO:**

Intervalo de confianza del intercepto “a”

$t_{\text{tabla}}$  : 2.16 Para  $15-2=13$  grados de libertad y ( $\alpha$ : 0.05)

$$a = 16.49 \pm 2.16 \times 8.93$$

$$a = -2.80 \text{ hasta } 35.78$$

**d.4 TEST ESTADÍSTICO DEL INTERCEPTO “a” o TEST DE PROPORCIONALIDAD**

El test de proporcionalidad permite evaluar si la recta pasa por el origen de coordenadas determinando si el intercepto es distinto de cero o igual a cero.

Se realiza estableciendo una comparación entre “ $t_{\text{exp}}$ ” y “ $t_{\text{tabla}}$ ”

**HIPÓTESIS NULA ( $H_0$ ):** "a" es estadísticamente igual a cero

**HIPÓTESIS ALTERNATIVA ( $H_1$ ):** "a" es estadísticamente diferente de cero

Fórmula para hallar **EL VALOR DE T EXPERIMENTAL** “  $t_{\text{exp}}$ ”

$$t_{exp} = \frac{|a|}{s_a} \quad t_{exp} = 1.85$$

**RESULTADO:**

$t_{tabla}$  : 2.16 Para  $15-2=13$  grados de libertad y  $(\alpha: 0.05)$

$t_{exp}$ : 1.85

$t_{exp} < t_{tabla}$ , entonces se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ ), concluyendo que “a” es estadísticamente igual a cero su intervalo de confianza incluye el cero, el valor de “a” es aceptable.

**CRITERIO DE ACEPTACIÓN:**

Si  $t_{exp} < t_{tabla}$  para una probabilidad de cometer error ( $p$ ) de 0.05 , es decir un grado de confianza del 95% y  $(n-2)$  grados de libertad, se acepta la Hipótesis nula ( $H_0$ ), entonces "a" es estadísticamente igual a cero es decir el intervalo de confianza incluye el cero.

**d.5 COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE LOS FACTORES DE RESPUESTA (F):**

El factor de respuesta ( $f$ ) expresa la relación entre la lectura o respuesta (área) y la concentración y puede tomarse como una expresión aproximada de la sensibilidad de calibrado. En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre si y cercanos al valor de la pendiente.

El coeficiente de variación de los factores de respuesta se calcula a partir de la siguiente fórmula pero antes de calcular ello primero se debe calcular la desviación estándar de  $f$  ( $sf$ ):

$$CVf\% = \frac{sf}{xf} \times 100$$

$$CVf \% = 1.8\%$$

**RESULTADO:** Coeficiente de variación inferior al 2%, es decir que el conjunto de datos en relación a su media, se encuentran con un grado de 1.8 % de dispersión

**CRITERIO DE ACEPTACIÓN:**  $CV < 2.0\%$

### **C. ANÁLISIS DE LA VARIANZA:**

Para poder realizar un análisis de varianza se deben de cumplir con los siguientes supuestos:

**c.1 Homogeneidad de Varianzas**

**c.2 ANOVA:** Se realizó el análisis de varianza ANOVA, para demostrar la linealidad, bajo la evidencia muestral y un nivel de confianza de 95%

#### **c.1 Homogeneidad de Varianzas**

Para determinar la homogeneidad de varianzas se aplica el test de **COCHRAN (G<sub>exp</sub>)**, el cual indica si la concentración tiene alguna influencia en la variabilidad de los resultados. Para poder determinar la homogeneidad de las varianzas necesitamos determinar las varianzas de la  $f(y/x)$  para cada concentración lo cual se resume en la **TABLA N° 3.8**.

**TABLA N° 3.8:**Tabla resumen del cálculo de varianza para cada concentración a partir del cual se calcula el test de Cochran

Conc.	Datos(n)	x (mg/mL)	y(áreas)	f (y/x)	$\bar{x}$ de la f (y/x)	Varianza( s2 )
50	1	0.04971	504.42119	10147.57197	10394.04419	103321.03927
	2	0.04915	505.14899	10276.94798		
	3	0.04955	533.03971	10757.61261		
75	1	0.07456	749.38990	10050.44731	10200.52877	25018.41151
	2	0.07373	764.26785	10365.70872		
	3	0.07433	757.03211	10185.43027		
100	1	0.09942	993.77167	9995.98123	10164.87143	23376.90564
	2	0.09831	1003.20282	10204.77462		
	3	0.09910	1020.12137	10293.85843		
125	1	0.12427	1267.02014	10195.58917	10178.22457	247.58194
	2	0.12288	1249.10511	10164.91248		
	3	0.12388	1260.32557	10174.17207		
150	1	0.14913	1495.32147	10027.25667	10123.47760	9107.65156
	2	0.14746	1506.76990	10218.10474		
	3	0.14865	1505.09186	10125.07138		
SUMA	15			$\sum f : 153183.44$ $\sum f^2 : 1564799964$	Media de f : 10212.23	161071.59

**FUENTE:**Elaboración propia

En la **TABLA N° 3.8** podemos ver las varianzas calculadas a partir de la  $f(y/x)$  para cada concentración con las cuales podemos calcular el  $G_{exp}$ .

La homogeneidad de varianzas se realiza estableciendo una comparación entre “ $G_{exp}$ ” y “ $G_{tabla}$ ”, el análisis estadístico, estuvo basado en dos hipótesis detalladas a continuación

**HIPÓTESIS NULA ( $H_0$ ):**Las varianzas son semejantes

**HIPÓTESIS ALTERNATIVA( $H_1$ ):**Las varianzas son diferentes

El  $G_{exp}$  corresponde a la siguiente fórmula:

$$G_{exp} = \frac{s^2_{maxima}}{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2 + s_4^2 + s_5^2} = 0.64$$

$G_{tabla}$  = Es el valor obtenido en la tabla de homogeneidad de varianzas de Cochran con las siguientes condiciones:

- $K$ (número de grupos): 5,  $n$ (número de replicas por grupo): 3
- Probabilidad de cometer error ( $p$ ) de 0.05 , es decir un grado de confianza del 95%

### **RESULTADO:**

$G_{tablas}$ : 0.68  $K=5, n=3, (\alpha: 0.05)$

$G_{exp}$  : 0.64

$G_{exp} < G_{tablas}$  , se acepta la  $H_0$ ; las varianzas son homogéneas, las varianzas de las 3 concentraciones son equivalentes, o lo que es igual, el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

### **CRITERIO DE ACEPTACIÓN:**

Si  $G_{exp} < G_{tablas}$  para una probabilidad de cometer error ( $p$ ) de 0.05 , es decir un grado de confianza del 95%, se acepta la  $H_0$  demostrando que las varianzas no son estadísticamente diferentes entre sí.

**c.2 ANOVA:**

Para demostrar la regresión y la linealidad , se realizo un análisis de varianza ANOVA, utilizando el estadístico F de Fisher, con un nivel de confianza del 95%.

Para realizar el análisis de varianza , se realizan una serie de cálculos, expresados en la **TABLA N° 3.9** a partir de los datos de la **TABLA N° 3.7**. Con el objetivo de llegar al valor de “F”, obteniendose como valor para el estadístico F:13848.9749

**TABLA N° 3.9 Análisis de Varianza ANOVA**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fcal	Valor critico de F o valor p
Regresión	1	SSR 1842193.458	$CMR = \frac{SSR}{1}$ 1842193.46	$F_c = \frac{CMR}{CME}$ 13848.9749	4.52449E-21
Error	n-2 15-2	SSE 1729.262638	$CME = \frac{SSE}{n-2}$ 133.020203		
Total	n-1 15-1	SST 1843922.72			

**FUENTE:Elaboración propia**

En la **TABLA N°3.9** vemos que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que el nivel de significación  $\alpha = 0.05$  , existe una relación estadísticamente significativa es decir existe una alta correlación entre los datos de concentración y áreas con un nivel de confianza del 95.0%. Por lo que el método es lineal.

El análisis de varianzas **ANOVA** se realiza estableciendo una comparación entre “F<sub>exp</sub>” y “F<sub>tabla</sub>”, el análisis estadístico, estuvo basado en dos hipótesis detalladas a continuación.

**HIPÓTESIS NULA ( $H_0$ ):**  $b = 0$  El modelo lineal **NO** proporciona un buen ajuste a los datos es decir no existe una relación estadísticamente significativa entre “x” e “y”

**HIPÓTESIS ALTERNATIVA ( $H_1$ ):**  $b \neq 0$  El modelo lineal **SI** proporciona un buen ajuste a los datos es decir existe una relación estadísticamente significativa entre “x” e “y”

El  $F_{cal}$  o  $F_{exp}$  se calcula en la a partir de la siguiente fórmula:

$$F_c = \frac{CMR}{CME} = 13848.98$$

El  $F_{cal}$  se compara con el  $F_{tablas}$  0.05;  $v_1$  (grados de libertad en el numerador o grados de libertad de la regresión): 1;  $v_2$  (grados de libertad en el denominador o grados de libertad del error): 13 = 4.67

Por tanto cuanto mayor sea el  $F_{cal}$  mejor será la predicción mediante el modelo lineal. El “p” valor asociado a F es menor que el nivel de significación  $\alpha = 0.05$ , lo que conduce a rechazar la hipótesis nula, es decir existe una relación lineal significativa entre “x”e “y”. Esto indica que es válido el modelo de regresión considerado, en este caso el modelo lineal simple.

### RESULTADO

Como  $F_{exp}$  (13848.98) >  $F_{tablas}$  (4.67), no se acepta la  $H_0$ ; el modelo lineal SI proporciona un buen ajuste a los datos.

### CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

Si  $F_{exp} > F_{tabla}$  para una probabilidad de cometer error (p) de 0.05 , es decir un grado de confianza del 95% se rechaza la  $H_0$  desmostrando que el modelo lineal si proporciona un buen ajuste a los datos.

En la **TABLA N° 4.0** se muestran los resultados que se obtienen en el parámetro de linealidad del sistema.

**TABLA N ° 4.0**

**PARÁMETROS DE LINEALIDAD DEL SISTEMA PARA LA VALIDACIÓN  
LIDOCAÍNA BASE POMADA**

Linealidad del Sistema		Valor obtenido	Valor aceptable	Resultado
Coeficiente de Correlación ( r )		0.9995	$\geq 0.9950$	Conforme
Coeficiente de determinación ( r <sup>2</sup> )		0.9991	$\geq 0.9900$	Conforme
Análisis de la Varianza: ANOVA	Homogeneidad de Varianzas	$0.64 < 0.68$	$G_{exp} < G_{tabla}$ para $p = 0.05$	Conforme
	ANOVA	$13848.98 > 4.67$	$F_{exp} > F_{tabla}$	Conforme
Test de Linealidad	Coeficiente de variación de los factores de Respuesta	1.8%	$CV \leq 2 \%$	Conforme
	Significancia estadística de la desviación estándar de la pendiente	$117.68 > 2.16$	$t_{exp} > t_{tabla}$	Conforme
Test de Proporcionalidad		$1.85 < 2.16$	$t_{exp} < t_{tabla}$ para $p = 0.05$	Conforme

**FUENTE:Elaboración propia**

La **TABLA N° 4.0** muestra el parámetro evaluado, la linealidad del sistema, trabajados con tres soluciones stock, ya que así se elimina el posible error sistemático que se podría arrastrar en cada pesada y realizando diluciones; al analizar los resultados obtenidos se pudo constatar que el valor de coeficiente de correlación fue 0.9995; lo que indica la existencia de una proporcionalidad entre las concentraciones y las respuestas, señalando que el sistema conserva la linealidad esperada. De igual forma, en la homogeneidad de varianzas  $G_{exp} < G_{tabla}$  ( $0.64 < 0.68$ ), demostrando que las varianzas no son estadísticamente diferentes, siendo homogéneas entre sí; el análisis estadístico de regresión ofreció  $F_{exp} > F_{tabla}$  ( $13848.98 > 4.67$ ) para el  $p=0.05$  demostrando que el modelo lineal proporciona un buen ajuste a los datos; en el valor de t de Student experimental fue mayor que el t tabla ( $117.68 > 2.16$ ) para el  $p=0.05$  de confianza, por lo que el intercepto difiere significativamente de cero, lo que significa que el sistema a evaluar no está afectado por un error sistemático. Por otra parte, se mostraron pendientes próximas a la unidad, con t de Student  $t_{exp}$  ( $1.85 < 2.16$ ) y valores de probabilidad ( $p=0.05$ ) establecido como límite, por lo que deducimos que el valor observado es estadísticamente igual a cero, es decir este intervalo de confianza del intercepto incluye el cero.<sup>(17)</sup>

### 3.2 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Preparar soluciones de placebo enriquecidos con el principio activo en tres niveles de concentración que cubran el intervalo de trabajo, por pesadas independientes y por triplicado: 85%, 100% y 115% de la concentración nominal de trabajo en rango establecido. Se analizaron por triplicado con un total de 9 determinaciones, según metodología descrita en la (pág 62). Se construyó la recta de regresión lineal correspondiente a los resultados de los 9 puntos experimentales.

La evaluación estadística de la linealidad del sistema se realizó por medio:

### A. CÁLCULO DE LA RECTA DE REGRESIÓN

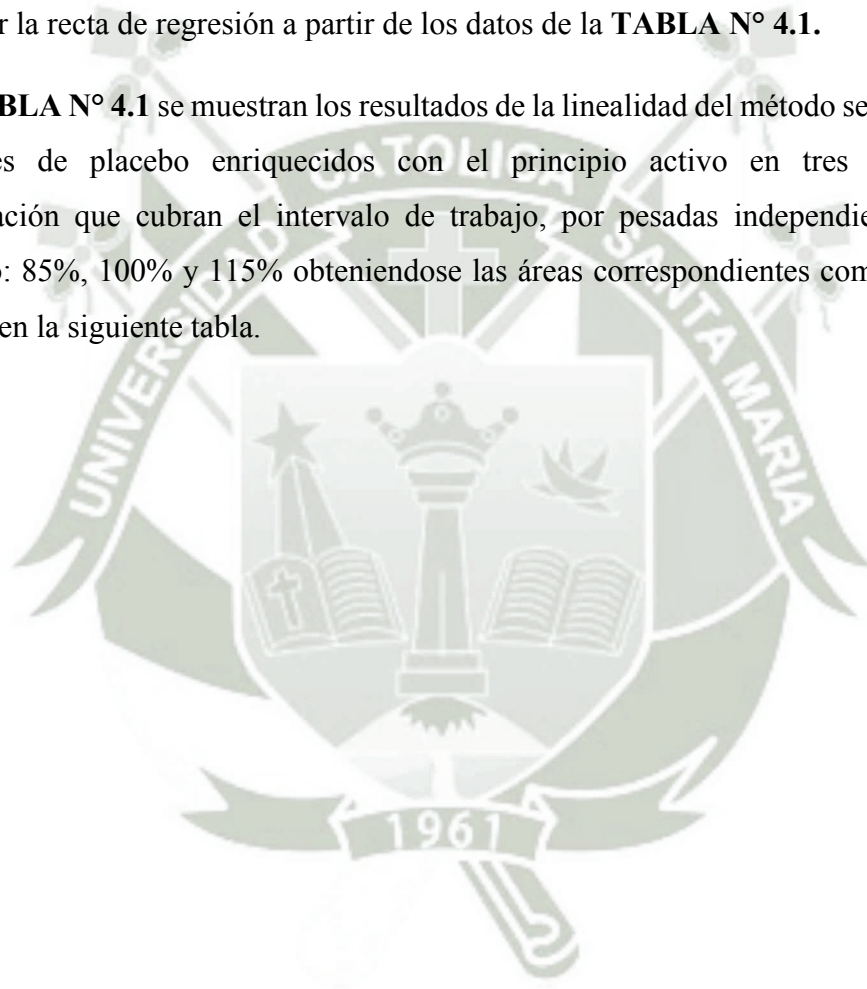
Determinar la recta de regresión. Sobre los puntos individuales y sin promediar.

Para el caso de una recta la función toma la forma:

$$y = bx + a$$

Para hallarse los valores que corresponden al intercepto “a” y pendiente “b”, fue necesario establecer la recta de regresión a partir de los datos de la **TABLA N° 4.1**.

En la **TABLA N° 4.1** se muestran los resultados de la linealidad del método se prepararon soluciones de placebo enriquecidos con el principio activo en tres niveles de concentración que cubran el intervalo de trabajo, por pesadas independientes y por triplicado: 85%, 100% y 115% obteniéndose las áreas correspondientes como se puede observar en la siguiente tabla.



### LINEALIDAD DEL MÉTODO

TABLA N° 4.1 RESULTADOS DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO

Conc. (%)	Dato (n)	Peso (mg)	x (mg/mL)	y (áreas)	f(y/x)
85	1	42.44	0.08412	862.49292	10253.60335
	2	42.35	0.08394	855.90674	10196.92861
	3	42.28	0.08380	849.84970	10141.53040
100	1	49.93	0.09896	1014.37207	10250.19356
	2	50.12	0.09934	1016.58924	10233.65552
	3	50.13	0.09936	1013.53147	10200.83872
115	1	57.25	0.11347	1166.65851	10281.69248
	2	57.35	0.11367	1189.98883	10469.01477
	3	57.16	0.11329	1161.82349	10255.20345
SUMA	9		0.88994	9131.21295	92282.66087
					$sf: 90.94$
					$\bar{x}f: 10253.63$

FUENTE: Elaboración propia

Después de haberse establecido la recta de regresión , los valores que corresponden al intercepto “a” y pendiente “b” fueron hallados mediante las siguientes fórmulas:

$$b = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}} \quad a = \frac{\sum Y_i - b \sum X_i}{n}$$

n: Número de muestras : 9

Correspondientes a valores del intercepto “a” y pendiente “b” los siguientes:

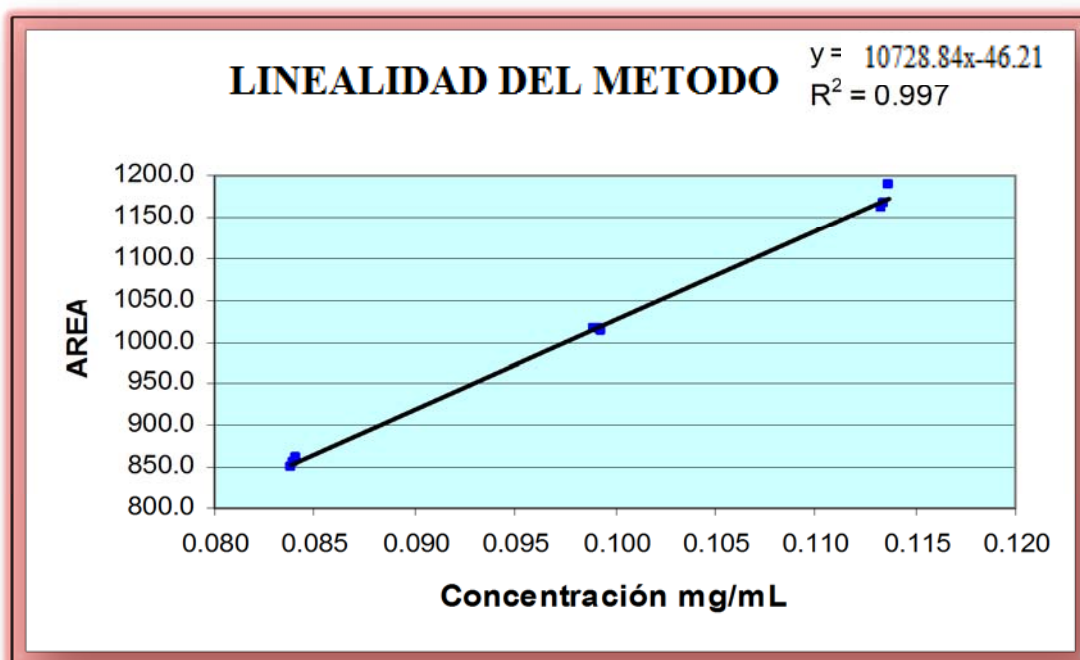
a: -46.21

b: 10727.84

**ECUACIÓN DE LA RECTA :**

$$y = 10727.84 x - 46.21$$

La recta de regresión lineal, pudo graficarse a su vez, en la **FIGURA N° 3.9** en la que se evidencia la linealidad del sistema, que fue construida con la concentración “x” de lidocaína en mg/mL versus “y” que son las áreas de lidocaína correspondientes a cada concentración “x”, en la que las áreas son dependientes de la concentración.



**FIGURA N° 3.9** Linealidad del método

Al observar la **FIGURA N° 3.9** nos percatamos que hay relación directa entre la señal instrumental y la concentración del producto analizado, siendo un método lineal.

## B. INTERPRETACIÓN ESTADÍSTICA DE LA REGRESIÓN LINEAL

Realizar la interpretación estadística de la regresión lineal, a través del cálculo de:

- a. Cálculo del coeficiente de correlación (  $r$  )
- b. Cálculo del coeficiente de determinación (  $r^2$  )
- c. Test estadístico del coeficiente de correlación (  $r$  )
- d. Test de linealidad:
  - d.1 Limite de confianza de la pendiente “  $b$ ”
  - d.2 Test estadístico de la pendiente o significancia estadística de la desviación estándar de la pendiente “ $b$ ”
  - d.3 Limite de confianza del intercepto “ $a$ ”
  - d.4 Test estadístico del intercepto “ $a$ ” o test de proporcionalidad
  - d.5 Coeficiente de variación de los factores de respuesta

### a. CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN ( $r$ )

Con la finalidad de poder conocer el grado de intensidad de la relación existente entre las variables “ $x$ ” e “ $y$ ”, se halla el valor del coeficiente de correlación lineal, el que puede adoptar distintos valores por consiguiente distintos indicadores como:

$r = 1$  indica una recta perfectamente lineal

$r = -1$  indica una recta perfectamente lineal negativa

$r = 0$  indica que no hay relación entre “ $x$ ” e “ $y$ ”

El coeficiente de correlación lineal se determino con los valores hallados en la **TABLA N° 4.1** y con la siguientes fórmula:

$$r = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sqrt{\left( \sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n} \right) \left( \sum Y_i^2 - \frac{(\sum Y_i)^2}{n} \right)}}$$

**CRITERIO DE ACEPTACIÓN:**  $\geq 0.9950$

**RESULTADO:**

El coeficiente de correlación fue de 0.9985. Dicho valor indica que la recta de regresión es casi perfectamente lineal y que existe una correlación lineal positiva.

**b. CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN ( $r^2$ )**

Indica el grado de ajuste de la ecuación

Se halló el coeficiente de determinación " $r^2$ " con la siguiente fórmula:

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

**CRITERIO DE ACEPTACIÓN:**  $\geq 0.9900$

**RESULTADO:**

El coeficiente de determinación fue de 0.9970. El valor es muy cercano a uno, estableciéndose que el modelo lineal es adecuado para describir la relación que existe entre las variables "x" e "y". Pudiendo afirmar que el 99.70% de las variaciones se debe a influencia de la variable "x".

Sin embargo el mejor indicativo de un modelo lineal no es "r" sino un test estadístico

**c. TEST ESTADÍSTICO DEL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN(r) :**

Uno de los mejores indicativos del modelo lineal no es únicamente el coeficiente de correlación "r" sino un test estadístico basado en dos hipótesis, en el que se calcula el t regresión (test de regresión) se compara con t tablas (test tabulado) con n-2 grados de libertad

y un intervalo de confianza del 95% ( $\alpha: 0.05$ ) valor que es encontrado en la tabla de distribución de t de Student.

$\alpha$ : probabilidad de cometer error (p)

$1-\alpha$  : grado de confianza

$n$ : número de muestras: 9

**HIPÓTESIS NULA ( $H_0$ ):** no existe correlación significativa entre “x” y “y” ( $r = 0$ )

**HIPÓTESIS ALTERNATIVA ( $H_1$ ):** “r” no debe ser significativamente de uno ( $r \neq 0$ )

El  $t_{\text{regresión}}$  encontrado fue de : 48.20 calculado a partir de la siguiente prueba estadística:

$$t_r = \frac{[r]\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

**RESULTADO:**

$t_{\text{tabla}}$  : 2.37 Para  $9-2=7$  grados de libertad y ( $\alpha: 0.05$ )

$t_{\text{regresión}}$ : 48.20

$t_{\text{regresión}} 48.20 > t_{\text{tabla}} 2.37$ , se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, es decir si hay correlación significativa entre las concentraciones y sus áreas

#### **d. TEST DE LINEALIDAD**

##### **d.1 LIMITE DE CONFIANZA DE LA PENDIENTE “b”:**

Para calcular la **DESVIACIÓN ESTANDAR** de la pendiente “b” ( $S_b$ ) se debe hallar primero la **VARIANZA DEL ERROR EXPERIMENTAL TOTAL** (determinación de la varianza de X sobre Y) cuya fórmula es la siguiente:

$$S_{xy}^2 = \frac{\sum Y^2i - a \sum Yi - b \sum XiYi}{n - 2}$$

$$S_{xy}^2 = 64.81$$

A partir de ello determina la **DESVIACIÓN ESTANDAR** de la pendiente “b” ( $S_b$ ) cuya fórmula es la siguiente:

$$S_b = \sqrt{\frac{S(xy)^2}{\sum X^2i - \frac{(\sum Xi)^2}{n}}}$$

$$S_b = 222.56$$

Fórmula para hallar los **LIMITES DE CONFIANZA** de la pendiente “b”

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

$t_{\text{tabla}}$  = Es el valor obtenido en la tabla de distribución de student, con las siguientes condiciones:

- n-2 grados de libertad
- Probabilidad de cometer error (p) de 0.05, es decir un grado de confianza del 95%

**RESULTADO:**

Intervalo de confianza de la pendiente “b”

$t_{\text{tabla}}$  : 2.37 Para  $9-2=7$  grados de libertad y ( $\alpha: 0.05$ )

$$b = 10727.84 \pm 2.37 \times 222.56 =$$

$$b = 10200.37 \text{ hasta } 11255.31$$

**d.2 TEST ESTADÍSTICO DE LA PENDIENTE “b”**

Se trata de comprobar que existe una pendiente significativamente distinta de cero mediante una prueba de t de student.

Se realiza estableciendo una comparación entre “ $t_{\text{exp}}$ ” y “ $t_{\text{tabla}}$ ”

**HIPÓTESIS NULA ( $H_0$ )**= "b" es estadísticamente igual a cero ( $b=0$ )

**HIPÓTESIS ALTERNATIVA ( $H_1$ )**= "b" es estadísticamente diferente de cero ( $b \neq 0$ )

Fórmula para hallar **EL VALOR DE T EXPERIMENTAL** “ t exp”

$$t \text{ exp} = \frac{|b|}{Sb} \quad t \text{ exp} = 48.20$$

**RESULTADO:**

t<sub>tabla</sub> : 2.37 Para 9-2=7 grados de libertad y (α: 0.05)

t<sub>exp</sub>: 48.20

t<sub>exp</sub> > t<sub>tabla</sub>, entonces se rechaza la hipótesis nula (H<sub>0</sub>) y "b" es significativamente diferente de cero.

**CRITERIO DE ACEPTACIÓN:**

Si t<sub>exp</sub> > t<sub>tabla</sub> para una probabilidad de cometer error (p) de 0.05 , es decir un grado de confianza del 95% y (n-2) grados de libertad, se rechaza la Hipótesis nula (H<sub>0</sub>), entonces "b" es estadísticamente diferente de cero es decir el intervalo de confianza no incluye el cero.

**d.3 LIMITE DE CONFIANZA DEL INTERCEPTO “a”:**

Este valor se calcula en función de la **DESVIACION ESTANDAR** del intercepto “a” (S<sub>a</sub>) cuya fórmula es la siguiente:

$$S_a = \sqrt{(Sb)^2 \frac{\sum X^2i}{n}} \quad S_a=22.17$$

Fórmula para hallar los **LIMITES DE CONFIANZA** del intercepto

$$a = a \pm t \text{ tabla} . Sa$$

t<sub>tabla</sub> = Es el valor obtenido en la tabla de distribución de student, con las siguientes condiciones:

- n-2 grados de libertad
- Probabilidad de cometer error (p) de 0.05 , es decir un grado de confianza del 95%

**RESULTADO:**

Intervalo de confianza del intercepto “a”

$t_{\text{tabla}} : 2.37$  Para  $9-2=7$  grados de libertad y  $(\alpha: 0.05)$

$$a = -46.21 \pm 2.37 \times 22.17$$

$a = -98.75$  hasta  $6.33$

#### **d.4 TEST ESTADÍSTICO DEL INTERCEPTO “a” o TEST DE PROPORCIONALIDAD**

El test de proporcionalidad permite evaluar si la recta pasa por el origen de coordenadas determinando si el intercepto es distinto de cero o igual a cero.

Se realiza estableciendo una comparación entre “ $t_{\text{exp}}$ ” y “ $t_{\text{tabla}}$ ”

**HIPÓTESIS NULA ( $H_0$ ):** “a” es estadísticamente igual a cero

**HIPÓTESIS ALTERNATIVA ( $H_1$ ):**  $H_1 =$  “a” es estadísticamente diferente de cero

Fórmula para hallar **EL VALOR DE T EXPERIMENTAL “ $t_{\text{exp}}$ ”**

$$t_{\text{exp}} = \frac{|a|}{S_a} \quad t_{\text{exp}} = -2.08$$

#### **RESULTADO:**

$t_{\text{tabla}} : 2.37$  Para  $9-2=7$  grados de libertad y  $(\alpha: 0.05)$

$t_{\text{exp}} : -2.08$

$t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$ , entonces se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ ), concluyendo que “a” es estadísticamente igual a cero su intervalo de confianza incluye el cero, el valor de “a” es aceptable.

**CRITERIO DE ACEPTACIÓN:**

Si  $t_{exp} < t_{tabla}$  para una probabilidad de cometer error (p) de 0.05, es decir un grado de confianza del 95% y (n-2) grados de libertad, se acepta la Hipótesis nula ( $H_0$ ), entonces "a" es estadísticamente igual a cero es decir el intervalo de confianza incluye el cero.

**d.5 COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE LOS FACTORES DE RESPUESTA (F):**

El factor de respuesta (f) expresa la relación entre la lectura o respuesta (área) y la concentración y puede tomarse como una expresión aproximada de la sensibilidad de calibrado. En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente.

El coeficiente de variación de los factores de respuesta se calcula a partir de la siguiente fórmula pero antes de calcular ello primero se debe calcular la desviación estándar de f (sf):

$$CVf\% = \frac{Sf}{xf} \times 100$$
$$CVf \% = 0.89\%$$

**RESULTADO:** Coeficiente de variación inferior al 2%, es decir que el conjunto de datos en relación a su media, se encuentran con un grado de 0.89% de dispersión.

**CRITERIO DE ACEPTACIÓN:**  $CV < 2.0\%$

## C. ANÁLISIS DE LA VARIANZA: ANOVA

Para poder realizar un análisis de varianza se deben de cumplir con los siguientes supuestos:

**c.1 Homogeneidad de Varianzas:**

**c.2 ANOVA:** : Se realizó el análisis de varianza ANOVA , para demostrar la linealidad, bajo la evidencia muestral y un nivel de confianza de 95%

**c.1 Homogeneidad de Varianzas**

Para determinar la homogeneidad de varianzas se aplica el test de **COCHRAN (G<sub>exp</sub>)**, el cual indica si la concentración tiene alguna influencia en la variabilidad de los resultados.

Para poder determinar la homogeneidad de las varianzas necesitamos determinar las varianzas de la  $f$  (y/x) para cada concentración lo cual se resume en la **TABLA N°4.2** que presentamos a continuación:

**TABLA N° 4.2** : Tabla resumen del cálculo de varianza de la  $f(y/x)$  a partir del cual se calcula el test de Cochran

Conc. (%)	Dato (n)	x conc (mg/mL)	y (áreas)	$f(y/x)$	$\bar{x}$ de $f(y/x)$	Varianza (s <sup>2</sup> )
85	1	0.08412	862.49292	10253.60335	10197.35412	3140.22276
	2	0.08394	855.90674	10196.92861		
	3	0.08380	849.84970	10141.53040		
100	1	0.09896	1014.37207	10250.19356	10228.22927	631.05833
	2	0.09934	1016.58924	10233.65552		
	3	0.09936	1013.53147	10200.83872		
115	1	0.11347	1166.65851	10281.69248	10335.30357	13584.43110
	2	0.11367	1189.98883	10469.01477		
	3	0.11329	1161.82349	10255.20345		
SUM	9			$\sum f : 92282.66$ $\sum f^2 : 946298326$ $sf : 90.94$	Media de $f$ 10253.63	17355.71219

**FUENTE:**Elaboración propia

En la **TABLA N° 4.2** podemos ver las varianzas calculadas a partir de la  $f(y/x)$  para cada concentración con las cuales podemos calcular el  $G_{exp}$ .

La homogeneidad de varianzas se realiza estableciendo una comparación entre “ $G_{exp}$ ” y “ $G_{tabla}$ ”, el análisis estadístico, estuvo basado en dos hipótesis detalladas a continuación.

**HIPÓTESIS NULA ( $H_0$ ):**Las varianzas son semejantes

**HIPÓTESIS ALTERNATIVA ( $H_1$ ):**Las varianzas son diferentes

El  $G_{exp}$  corresponde a la siguiente fórmula:

$$G_{exp} = \frac{s^2_{maxima}}{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2} = 0.78$$

$G_{tabla}$  = Es el valor obtenido en la tabla de homogeneidad de varianzas de Cochran con las siguientes condiciones:

- $K$ (número de grupos): 3,  $n$ (número de replicas por grupo): 3
- Probabilidad de cometer error (p) de 0.05 , es decir un grado de confianza del 95%

### RESULTADO:

$G_{tablas}$ : 0.87  $K=3$ ,  $n=3$ , ( $\alpha$ : 0.05)

$G_{exp}$  : 0.78

$G_{exp} < G_{tablas}$  , se acepta la  $H_0$ ; las varianzas son homogéneas, las varianzas de las 3 concentraciones son equivalentes, o lo que es igual, el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

### CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

Si  $G_{exp} < G_{tablas}$  para una probabilidad del 95%, se acepta la  $H_0$  demostrando que las varianzas no son estadísticamente diferentes entre sí.

### d.2 ANOVA:

Para demostrar la regresión y la linealidad, se realizó un análisis de varianza ANOVA, utilizando el estadístico F de Fisher, con un nivel de confianza del 95%.

Para realizar el análisis de varianza, se realizan una serie de cálculos, expresados en la TABLA N°4.3 a partir de los datos de la TABLA N° 4.1 Con el objetivo de llegar al valor de F, obteniéndose como valor para el estadística F: 2323.43

**TABLA N°4.3 Análisis de Varianza ANOVA**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fc	Valor critico de F o valor p
Regresión	1	SSR 150572.0685	$CMR = \frac{SSR}{1}$ 150572.0685	$F_c = \frac{CMR}{CME}$ 2323.432766	4.32768E-10
Error	n-2 9-2	SSE 453.6410499	$CME = \frac{SSE}{n-2}$ 64.80586427		
Total	n-1 9-1	SST 151025.7095			

**FUENTE:Elaboración propia**

En la TABLA N°4.3 vemos que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que el nivel de significación  $\alpha = 0.05$ , existe una relación estadísticamente significativa es decir existe una alta correlación entre los datos de concentración y áreas con un nivel de confianza del 95.0%. Por lo que el método es lineal.

El análisis de varianzas **ANOVA** se realiza estableciendo una comparación entre “ $F_{exp}$ ” y “ $F_{tabla}$ ”, el análisis estadístico, estuvo basado en dos hipótesis detalladas a continuación.

**HIPÓTESIS NULA ( $H_0$ )**  $b = 0$  El modelo lineal NO proporciona un buen ajuste a los datos

**HIPÓTESIS ALTERNATIVA( $H_1$ )**  $b \neq 0$  El modelo lineal SI proporciona un buen ajuste a los datos.

El  $F_{exp}$  o calculado se determina mediante la siguiente fórmula:

$$F_c = \frac{CMR}{CME} = 2323.43$$

El  $F_{calculado}$  o  $F_{exp}$  se compara con el  $F_{tablas}$  0.05;  $v_1$  (grados de libertad en el numerador o grados de libertad de la regresión):1;  $v_2$  (grados de libertad en el denominador o grados de libertad del error): 7 = 5.59

Por tanto cuanto mayor sea el  $F_c$  mejor será la predicción mediante el modelo lineal. El “p” valor asociado a  $F$  es menor que el nivel de significación  $\alpha = 0.05$ , lo que conduce a rechazar la hipótesis nula, es decir existe una relación lineal significativa entre “y” e “x”. Esto indica que es válido el modelo de regresión considerado, en este caso el modelo lineal simple.

#### **RESULTADO:**

Como  $F_{exp}$  (2323.43) >  $F_{tablas}$  (5.59), no se acepta la  $H_0$ ; el modelo lineal SI proporciona un buen ajuste a los datos.

#### **CRITERIO DE ACEPTACIÓN:**

Si  $F_{exp} > F_{tabla}$  para una probabilidad del 95%, se rechaza la  $H_0$  desmostrando que el modelo lineal si proporciona un buen ajuste a los datos

En la **TABLA N° 4.4** se muestran los resultados que se obtienen en el parametro de linealidad del método.

**TABLA N° 4.4**  
**PARÁMETROS DE LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA LA**  
**VALIDACIÓN LIDOCAÍNA BASE POMADA**

<b>Linealidad del Método</b>		<b>Valor obtenido</b>	<b>Valor aceptable</b>	<b>Resultado</b>
Coeficiente de Correlación ( r )		0.9985	$\geq 0.9950$	Conforme
Coeficiente de determinación ( r <sup>2</sup> )		0.9970	$\geq 0.9900$	Conforme
Análisis de la Varianza: ANOVA	Homogeneidad de Varianzas	$0.78 < 0.87$	$G_{exp} < G$ tabla para $p = 0.05$	Conforme
	ANOVA	$2323.43 > 5.59$	$F_{exp} > F$ tabla	Conforme
Test de Linealidad	Coeficiente de variación de los factores de Respuesta	0.9 %	$CV \leq 2 \%$	Conforme
	Significancia estadística de la desviación estándar de la pendiente	$48.20 > 2.37$	$t_{exp} > t$ tabla	Conforme
Test de Proporcionalidad		$2.08 < 2.37$	$t_{exp} < t$ tabla para $p = 0.05$	Conforme

**FUENTE : Elaboración propia**

La **TABLA N° 4.4** muestra el parámetro evaluado, la linealidad del método, se trabajó a 3 concentraciones diferentes: 85%, 100% y 115%, al analizar los resultados obtenidos se

pudo constatar que el valor de coeficiente de correlación fue 0,9950; lo que indica la existencia de una proporcionalidad entre las concentraciones y las respuestas, señalando que el sistema conserva la linealidad esperada. De igual forma, en la homogeneidad de varianzas  $G_{exp} < G_{tabla}$  ( $0.78 < 0.87$ ), demostrando que las varianzas no son estadísticamente diferentes, siendo homogéneas entre sí; el análisis estadístico de regresión ofreció  $F_{exp} > F_{tabla}$  ( $2323.43 > 5.59$ ) para el  $p=0.05$ , demostrando que el modelo lineal proporciona un buen ajuste a los datos; en el valor de t de Student experimental fue mayor que el t tabla ( $48.20 > 2.37$ ) para el  $p=0.05$  de confianza, por lo que el intercepto difiere significativamente de cero, lo que significa que el método a evaluar no está afectado por un error sistemático. Por otra parte, se mostraron pendientes próximas a la unidad, con t de Student  $t_{exp}$  ( $2.084 < 2.37$ ) y valores de probabilidad ( $p=0.05$ ) establecido como límite, por lo que deducimos que el valor observado es estadísticamente igual a cero, es decir este intervalo de confianza del intercepto incluye el cero.<sup>(17)</sup>

#### 4.0 EXACTITUD:

Expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o valor de referencia y el valor experimentalmente encontrado.

En la prueba de exactitud se trabaja con 3 niveles de concentración y cada nivel se analiza por triplicado determinando el % de recuperación para cada nivel de concentración.

- En la prueba de exactitud se prepara un estándar de lidocaina base cuyos datos se presentan a continuación.

#### Datos del estándar:

Estándar	Peso (mg)	Área
Std 1	49.86	1011.59735
Std 2	50.24	1031.02911
$\bar{x}$	50.05	1021.31323

- Para el estudio de la exactitud se trabaja con las mismas muestras preparadas para la determinación de la linealidad del método, según metodología descrita en la (pág 64)

Después de haberse realizado la preparación del estandar y muestras fueron inyectadas al equipo obteniéndose como respuestas las respectivas áreas para cada concentración, así como también la cantidad añadida de lidocaína base en mg y la cantidad que se logra hallar de lidocaína base también en mg, obteniéndose así el % de recuperación para cada nivel de concentración lo cual se detallan en la **TABLA N° 4.5**.

El procedimiento para el cálculo del porcentaje de recuperación de lidocaína base con respecto a la cantidad conocida de analito añadido a la muestra se halla descrito en el estudio de la exactitud.(pág 73)

**TABLA N° 4.5** Tabla resumen del porcentaje de recuperación obtenido en la prueba de exactitud para cada nivel de concentración

<b>Conc (%)</b>	<b>Ensayo</b>	<b>Áreas</b>	<b>Añadido (mg)</b>	<b>Hallado (mg)</b>	<b>Recuperación (%)</b>
85	1	862.49292	42.44	42.27	99.59
	2	855.90674	42.35	41.94	99.04
	3	849.84970	42.28	41.65	98.50
100	1	1014.37207	49.93	49.71	99.56
	2	1016.58924	50.12	49.82	99.40
	3	1013.53147	50.13	49.67	99.08
115	1	1166.65851	57.25	57.17	99.87
	2	1189.98883	57.35	58.32	101.69
	3	1161.82349	57.16	56.94	99.61

**FUENTE:Elaboración propia**

La evaluación de la exactitud mostró porcentajes de recuperación de lidocaína base dentro de las especificaciones para cada concentración, lo cual se evidencia en la **TABLA N° 4.5**

En la **TABLA N° 4.6** presentamos el porcentaje de recuperación promedio de lidocaína base en los 3 niveles de concentración, valor obtenido a partir de la **TABLA N° 4.5**.

**TABLA N° 4.6**  
**ENSAYOS ESTADÍSTICOS PARA EVALUAR EXACTITUD DEL MÉTODO PARA LA VALIDACIÓN DE LIDOCAÍNA BASE POMADA.**

Porcentaje de Recuperación	Valor obtenido	Valor normal	Resultado
Recuperación Promedio	99.59%	98% a 102%	Conforme
CV	0.9 %	CV < 2%	Conforme

**FUENTE : Elaboración propia**

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado, como se puede evidenciar en la **TABLA N° 4.6** el valor de los porcentaje promedio de muestra recuperada de lidocaína base fue 99.59 % calculado a partir de los porcentajes de recuperación obtenidos para cada nivel de concentración en la **TABLA N° 4.5**, el porcentaje promedio de muestra recuperada de lidocaína base está dentro de los límites de las especificaciones (98.0% - 102.0%) y tiene un CV menor de 2% (0.9%), por lo que la exactitud es correcta según sus respectivas especificaciones. Este resultado nos condujo a considerar que los errores sistemáticos del método no fueron significativos, por lo que puede considerarse exacto.

## 5.0 PRECISIÓN

### 5.1 PRECISIÓN INSTRUMENTAL

Este parámetro está relacionado al grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas a partir de la misma muestra homogénea. Es decir que podemos obtener mediciones muy precisas pero poco exactas; sin embargo para que un método sea exacto se requiere que sea preciso; lo cual nos asegura que el equipo empleado, cumple con el parámetro en estudio.<sup>(31)</sup>

- En la prueba de precisión instrumental se prepara un estándar de lidocaína base cuyos datos se presentan a continuación, según metodología descrita en la (pág 64)

#### **DATOS DEL ESTÁNDAR:**

<b>ESTÁNDAR:</b>	<b>LIDOCAÍNA BASE</b>
Peso :	50.0 mg
Lote proveedor :	ALC/LB/100902
Informe n° :	MDFR-1334/11

- La precisión instrumental es una prueba en la cual el estándar de Lidocaína base es inyectado 6 veces y por lo tanto tenemos 6 tiempos de retención (tr) con sus respectivas áreas, se determinará el promedio y coeficiente de variación de las áreas y tiempos de retención respectivamente, lo cual es resumido en la **TABLA N° 4.7.**

**TABLA N° 4.7**

#### **ENSAYO DE PRECISIÓN INSTRUMENTAL DE LIDOCAÍNA BASE**

**POMADA.**

LECTURA N°	T <sub>R</sub> (min)	AREA
1	4.22462	1003.28888
2	4.22794	1002.68298
3	4.22520	1003.27606
4	4.22347	1003.16248
5	4.22401	1003.67413
6	4.22529	1003.22961
PROM	4.22509	1003.21902
CV %	0.04%	0.03%

**FUENTE: Elaboración propia**

Tr: tiempo de retención

En la **TABLA N° 4.7**, se muestra el parámetro de la precisión instrumental, se debe determinar antes de iniciar el estudio de otros parámetros de validación, dado que así se conoce en que grado de respuesta del método es únicamente es proporcionada por el analito, obteniéndose un promedio de área 1003.21902 y un CV 0.03 %, promedio de Tiempos de Retención de 4.22509 y un CV 0.04% el cual para los dos casos es inferior al  $CV \leq 2\%$  teórica máxima por lo tanto la precisión del sistema (instrumental) es adecuada.

**5.2 REPETIBILIDAD DEL MÉTODO**

Estudia la variabilidad del método efectuando el análisis sobre las muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos, etc.), en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.

Evalúa la precisión del método (precisión intraensayo)

- En la prueba de repetibilidad del método se prepara un estándar de Lidocaína base cuyos datos se presentan a continuación:

**Datos del estándar:**

Estándar:	Lidocaína base
Peso (WSt) :	49.8 mg
Potencia (Pot):	99.10 %

- Las muestras en la prueba de repetibilidad del método se preparan con la pomada de lidocaína base es decir el producto terminado se preparan 6 muestras, se pesa aproximadamente 1g de las mismas que equivale a 50 mg de lidocaína base, según metodología descrita en la (pág 64).

Después de haberse realizado la preparación del estándar y muestras fueron inyectadas al equipo obteniéndose como respuestas las respectivas áreas las cuales se detallan en la **TABLA N° 4.8.**

**TABLA N° 4.8** Tabla resumen de las áreas obtenidas tanto para el estándar como para las muestras en la repetibilidad del método.

	N° de inyecciones	Área del Estándar ÁSt	
<b>E S T Á N D A R</b>	1	1006.50128	$\bar{x}$ :1007.59440
	2	1006.49658	CV%: 0.0011
	3	1007.40216	
	4	1007.49164	
	5	1008.40009	
	6	1009.27466	
		<b>Área de la muestra AM</b>	
<b>M U E S T R A S</b>	Muestra 1	1040.58441	
	Muestra 2	1040.74182	
	Muestra 3	1033.20563	
	Muestra 4	1034.30219	
	Muestra 5	1047.07691	
	Muestra 6	1034.91260	

**FUENTE:Elaboración propia**

En la **TABLA N° 4.8** vemos las áreas del estándar y las áreas de las muestras a partir de esto podemos determinar el contenido de lidocaína base en las mismas con la fórmula descrita en la (pág 75). y cuyos resultados se evidencian en la siguiente tabla. En la **TABLA N° 4.9** se obtuvieron las concentraciones de lidocaína base en g/100g que corresponden a cada muestra.

**TABLA N° 4.9**

**VARIABILIDAD DE LA CONCENTRACIÓN PROMEDIO PARA EL  
ENSAYO DE PRECISIÓN – REPETIBILIDAD DE LIDOCAÍNA BASE  
POMADA.**

<b>Muestra N°</b>	<b>Peso Muestra (mg)</b>	<b>g/100 g hallados</b>	<b>%</b>
1	1007.2	5.0603	101.21
2	1002.8	5.0833	101.67
3	1012.2	4.9996	99.99
4	1010.0	5.0158	100.32
5	999.3	5.1322	102.64
6	1005.7	5.0403	100.81
PROMEDIO		5.0553	101.11 %
(CV%)		0.9528	1.0 %
s		0.0482	

**FUENTE:Elaboración propia**

La precisión, evaluada como repetibilidad, mostró resultados satisfactorios, pues el coeficiente de variación (CV) determinado fue 1.0 % (Ver Tabla N° 4.9), el cual indica que el conjunto de datos en relación a su media, se encuentran con un grado de 1.0 % de dispersión. Según la AEFI recomienda introducir los intervalos de confianza en el estudio de precisión – repetibilidad. Se obtuvo el intervalo de confianza de la media de 100.11% a 102.11%; siendo nuestro resultado conforme por encontrarse dentro de la especificación.

Intervalo de Confianza Promedio: Se expresa de la siguiente manera

$$\bar{x} \pm \frac{t_{\text{tabla}} \times s}{\sqrt{n}}$$

Donde:

$\bar{x}$ : promedio del resultado de los ensayos

$t_{\text{tabla}}$ : Es el valor obtenido en la tabla de distribución de student para n-1 grados de libertad y una probabilidad de cometer error (p) de 0.05, es decir un grado de confianza del 95%

n: Número de muestras

s: desviación estandar

Que para el presente trabajo de acuerdo a **TABLA N°4.9**

$\bar{x}$ : 5.0553

s: 0.0481

n: 6

$t_{\text{tabla}}$ : 2.57 a un nivel de confianza del 95%

REEMPLAZANDO:

$$\text{Intervalo de Confianza Promedio} = 5.0553 \pm \frac{2.57 \times 0.0481}{\sqrt{6}}$$

$$\text{Intervalo de Confianza Promedio} = 5.0553 \pm 0.05$$

El análisis estadístico de los resultados obtenidos para la evaluación de la repetibilidad de la metodología analítica, demostró que el método es preciso.

Se evaluó el límite de confianza promedio, el cual nos permitió determinar la máxima variabilidad en la respuesta de las muestras consideradas idénticas.

### 5.3 PRECISIÓN INTERMEDIA

Evalúa la precisión frente a variaciones del analista, equipo y día (precisión intralaboratorio o precisión interensayo)

- En la prueba de precisión intermedia el analista A y el analista B preparan un estándar de lidocaína base en diferentes días, cuyos datos se presentan a continuación:

**Datos del estándar:**

Estándar:	Lidocaína base (Peso)
Peso(mg)	49.8 mg Analista A
Peso(mg)	50.1 mg Analista B
Potencia	99.10

- En la prueba de precisión intermedia las muestras preparadas por el analista A son las mismas de la prueba de repetibilidad del método. Un segundo analista es decir el analista B realizó otro día la preparación de las muestras usando el mismo método analítico pero diferente equipo. La preparación de estándar y muestras se realiza según metodología descrita en la (pág 65).

Después de haber realizado la preparación del estándar y muestras en diferentes días estas fueron inyectadas en equipos diferentes obteniéndose como respuestas las respectivas áreas las cuales se detallan en la **TABLA N° 5.0**.

**TABLA N° 5.0** : En la siguiente tabla tenemos las áreas del estándar y muestras obtenidas por el analista A y por el analista B en diferentes equipos y días.

ANALISTA A					ANALISTA B						
E S T Á N D A R	N° de inyecciones		Áreas			E S T Á N D A R	N° de inyecciones		Áreas		
	S	1	1006.50128				S	1	966.18329		
	T	2	1006.49658				T	2	966.41449		
	Á	3	1007.40216				A	3	966.18176		
	N	4	1007.49164				N	4	967.48865		
	D	5	1008.40009				D	5	968.61597		
	A	6	1009.27466				A	6	969.41071		
	R	$\bar{X}$	1007.59440				R	$\bar{X}$	967.38247		
		CV%	0.0011					CV%	0.0014		
M U E S T R A S	Mta N°	WM (mg)	g/100 g hallados	Áreas	M U E S T R A S	Mta N°	WM (mg)	g/100 g hallados	Áreas		
	1	1007.2	5.0603	1040.58441		1	1002.3	5.0983	995.65897		
	2	1002.8	5.0833	1040.74182		2	1007.8	5.0889	999.27729		
	3	1012.2	4.9996	1033.20563		3	1005.9	5.0465	989.08661		
	4	1010.0	5.0158	1034.30219		4	1012.6	5.0442	995.22007		
	5	999.3	5.1322	1047.07691		5	983.1	5.0345	964.35785		
	6	1005.7	5.0403	1034.91260		6	977.6	5.0282	957.77048		

**FUENTE:Elaboración propia**

En la **TABLA N° 5.0** vemos las áreas del estándar y las áreas de las muestras del analista **A** y del analista **B**, a partir de esto podemos determinar la cantidad hallada de lidocaína base en las muestras en g/100g con la fórmula descrita en la (pág 75). cuyos resultados se evidencian también en esta tabla y cuyo valor porcentual se evidencia en la **TABLA N° 5.1**.

En la **TABLA N° 5.1** se obtuvo el contenido de lidocaína base en porcentaje % tanto para el analista **A** como para el analista **B** determinando el coeficiente de variación entre ambos.

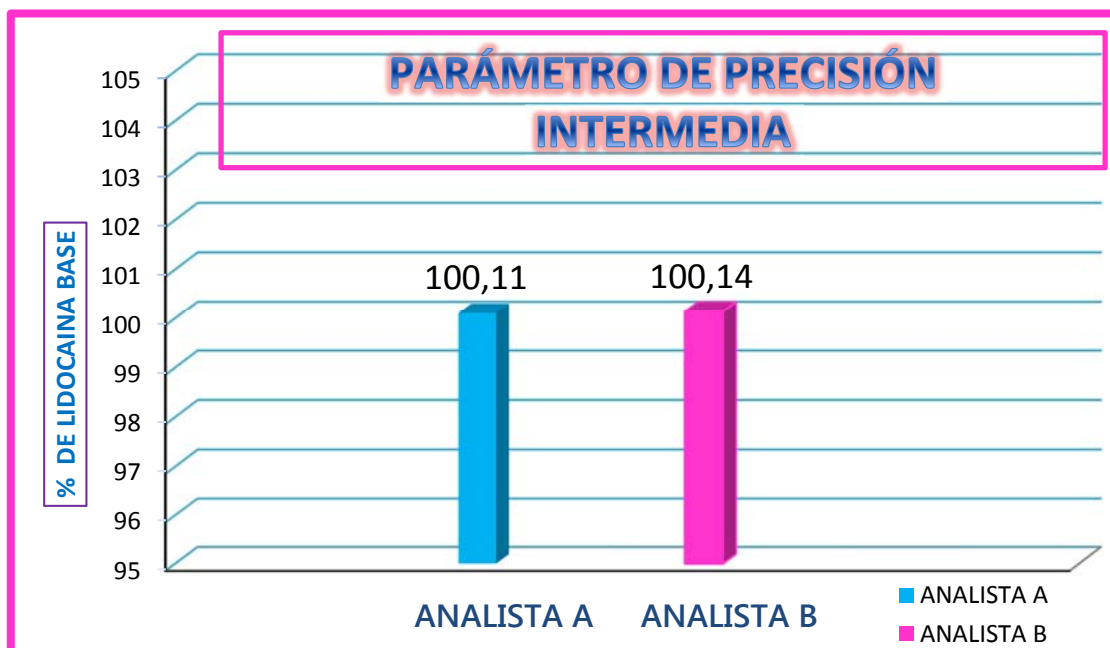
**TABLA N° 5.1**

**PARÁMETROS DE PRECISIÓN INTERMEDIA DE VALORACIÓN DE  
LIDOCAÍNA BASE POMADA REALIZADO POR DOS ANALISTAS.**

**ANÁLISIS T-PAREADO**

N°	ANALISTA A Cantidad en porcentaje %	ANALISTA B Cantidad en porcentaje %	Diferencia (d)	
1	101.21	101.97	-0.76	
2	101.67	101.78	-0.11	
3	99.99	100.93	-0.94	
4	100.32	100.89	-0.57	
5	102.64	100.69	1.95	
6	100.81	100.56	0.25	
	101.11	101.14	-0.03	$\bar{x}$
	0.96	0.59	1.1	s
	0.95 %	0.58 %		CV
	0.8 %			

**FUENTE: Elaboración propia**



FUENTE:Elaboración propia

Fig N°4.0 Porcentaje de lidocaína base obtenido por el analista “A” y por el analista “B”

Como se puede observar en la TABLA N° 5.1 y Fig.N° 4.0 se muestran los resultados de la precisión intermedia obtenidos a partir de la TABLA N° 5.0. Como se observa el coeficiente de variación total (0.8%) es menor del 4.0 % como criterio de aceptación en precisión intermedia. Además se comprobó que no existen diferencias significativas desde un punto de vista estadístico (análisis T-Pareado) entre los resultados obtenidos para ambos analistas. Con esto se comprobó el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones establecidas en la técnica analítica aplicada.<sup>(18)</sup>

El mejor test para establecer si hay diferencia significativa en los resultados obtenidos por el analista A y por el analista B es un **TEST T.PAREADO**

Se realiza estableciendo una comparación entre “ $t_{exp}$ ” y “ $t_{tabla}$ ”

El análisis estadístico de t-pareado, se basó en dos hipótesis detalladas a continuación:

**HIPÓTESIS NULA ( $H_0$ ):**No hay diferencia entre los resultados obtenidos por el analista A y el analista B

**HIPÓTESIS ALTERNATIVA ( $H_1$ ):**Si hay diferencia entre los resultados obtenidos por el analista A y el analista B

Se determina el valor de  $t_{\text{experimental}}$  hallado con la siguiente fórmula:

$$t : \frac{\bar{d} \cdot \sqrt{n}}{s} = \frac{-0.03 \cdot 2.45}{1.1} = -0.07$$

**RESULTADO:**

$t_{\text{tabla}} : 2.57$  Para  $6-1=5$  grados de libertad y ( $\alpha: 0.05$ )

$t_{\text{exp}} : -0.07$

$t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$ , entonces se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ ) es decir no existe diferencias significativas entre los resultados obtenidos por el analista A y el analista B.

## 6. ROBUSTEZ:

La robustez de un método analítico indica el grado de confiabilidad del ensayo para permanecer inalterado ante pequeñas variaciones.

- El estándar preparado en la prueba de repetibilidad del método es el mismo para el análisis inicial en la prueba de robustez, en el análisis final se corre con un estándar recientemente preparado.

### Datos del estándar:

Estándar:	Lidocaína base (Peso)	
Peso(mg)	49.8 mg	ANÁLISIS INICIAL
Peso(mg)	49.8 mg	ANÁLISIS FINAL
Potencia	99.11	

- En la preparación de las muestras se consideran las 3 primeras muestras de la prueba de repetibilidad del método como análisis inicial y estas mismas muestras permanecen aproximadamente 24 horas en refrigeración y se vuelven a correr con un estándar recientemente preparado. La preparación de estándar y muestras se realiza según metodología descrita en la (pág 66).

Después de haber realizado la preparación del estándar y muestras en el análisis inicial y final estas fueron inyectadas obteniéndose como respuestas las respectivas áreas las cuales se detallan en la **TABLA N° 5.2.**

**TABLA N° 5.2 :**Tabla resumen del estudio de robustez estudio inicial muestras corridas el mismo día de su preparación y final muestras corridas 24 horas después de haber sido almacenadas en refrigeración.

INICIAL					FINAL						
ESTÁNDAR	N° de inyecciones		Áreas			ESTÁNDAR	N° de inyecciones		Áreas		
	1		1006.50128				1		997.58215		
	2		1006.49658				2		998.57141		
	3		1007.40216				3		998.75043		
	4		1007.49164				4		999.34796		
	5		1008.40009				5		1000.27502		
	6		1009.27466				6		999.94464		
	$\bar{X}$		1007.59440				$\bar{X}$		999.07860		
CV%		0.0011			CV%		0.0010				
MUESTRAS	Mta	WM	g/100 g	Áreas	MUESTRAS	Mta	WM	g/100 g	Áreas		
	N°	(mg)	hallados			N°	(mg)	hallados			
	1	1007.2	5.0603	1040.58441		1	1007.2	5.0288	1025.35816		
	2	1002.8	5.0833	1040.74182		2	1002.8	5.0773	1030.73163		
3	1012.2	4.9996	1033.20563	3	1012.2	4.9906	1022.63236				

**FUENTE:Elaboración propia**

En la **TABLA N° 5.2** vemos las áreas del estándar y las áreas de las muestras del análisis inicial y del análisis final, a partir de esto podemos determinar la cantidad hallada de lidocaína base en las muestras en g/100g con la fórmula descrita en la (pág 75). cuyos resultados se evidencian también en esta tabla y cuyo valor porcentual se evidencia en la **TABLA N° 5.3**.

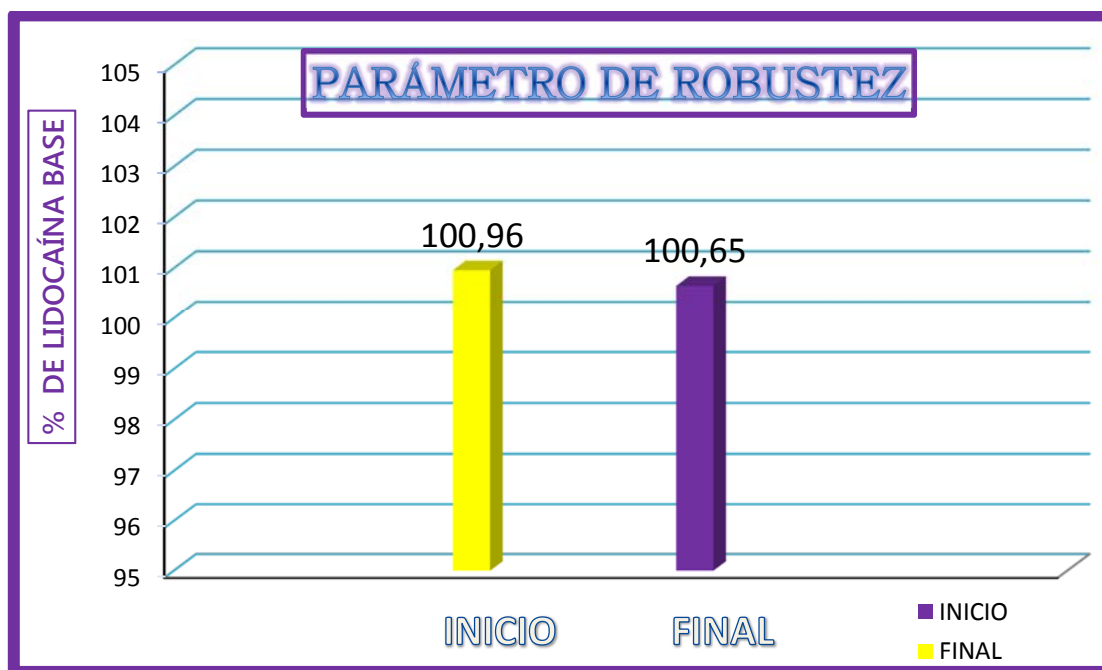
En la **TABLA N° 5.3** se obtuvo el contenido de lidocaína base en porcentaje % tanto para el análisis inicial como para el análisis final determinando el coeficiente de variación entre ambos.

**TABLA N° 5.3**

**PARÁMETRO DE ROBUSTEZ DE VALORACIÓN DE LIDOCAÍNA BASE  
POMADA DESPUÉS DE 24 HORAS DE REFRIGERACIÓN  
ANÁLISIS T-PAREADO**

MUESTRA	DOSAJE (%)		DIFERENCIA	
	INICIO	FINAL		
M1	101.21	100.58	0.63	
M2	101.67	101.55	0.12	
M3	99.99	99.81	0.18	
	100.96	100.65	0.31	$\bar{x}$
	0.87	0.87	0.28	s
	0.86%	0.87%		
	0.86%			CV

**FUENTE:Elaboración Propia**



FUENTE:Elaboración propia

**Fig.N° 4.1 Porcentaje de lidocaína base obtenido en el análisis inicial y en el análisis final**

El objetivo del estudio de la robustez es conocer la variabilidad del método, esta variación puede deberse a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Los factores susceptibles a influir sobre los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados como al analista, el equipo instrumental, los reactivos, el tiempo, etc., es por ello la importancia de este ensayo. <sup>(1,31)</sup>

En este estudio se evaluó la estabilidad de las muestras almacenadas 24 horas en refrigeración (TABLA N°5.3), donde se observa que los resultados de Lidocaína base cumplen con el criterio de aceptación siendo el promedio inicial 100.96 % y el promedio final 100.65 % como se observa en la TABLA N°5.3 y Fig.N° 4.1. El CV entre las primeras muestras de la repetibilidad y las muestras refrigeradas durante 24 horas es 0.86% estando dentro de la especificación permitida.<sup>(17,20)</sup>. Además se comprobó que no existen diferencias significativas desde un punto de vista estadístico (análisis T-Pareado) entre los resultados obtenidos en el análisis inicial y final.

El mejor test para establecer si hay diferencia significativa en los resultados obtenidos en el análisis inicial y final es un **TEST T.PAREADO**

Se realiza estableciendo una comparación entre “ $t_{exp}$ ” y “ $t_{tabla}$ ”

El análisis estadístico de t-pareado, se basó en dos hipótesis detalladas a continuación:

**HIPÓTESIS NULA ( $H_0$ ):**No hay diferencia significativa en los resultados obtenidos en el análisis inicial y final.

**HIPÓTESIS ALTERNATIVA ( $H_1$ ):**Si hay diferencia significativa en los resultados obtenidos en el análisis inicial y final.

Se determina el valor de  $t_{experimental}$  hallado con la siguiente fórmula:

$$t : \frac{\bar{d} \cdot \sqrt{n}}{s} = \frac{0.31 \cdot 1.73}{0.28} = 1.92$$

**RESULTADO:**

$t_{tabla}$  : 4.30 Para  $3-1=2$  grados de libertad y ( $\alpha$ : 0.05)

$t_{exp}$ : 1.92

$t_{exp} < t_{tabla}$ , entonces se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ ) es decir no existe diferencias significativas entre los resultados obtenidos en el análisis inicial y final. Es decir las muestras refrigeradas a 4°C durante 24 horas no muestran variación significativa.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que:

1. Se desarrollo una técnica analítica usando HPLC para la determinación de lidocaína en pomada, para esto se uso cromatografía de fase reversa con detección en la región UV.
2. Para la validación se desarrollo y evaluó los siguientes parametros:
  - **Especificidad:** el método es específico porque no se evidenciaron interferentes tanto de excipientes, diluyente como de productos degradados permitiendome cuantificar el principio activo; excepto cuando la muestra es sometida a oxidación en cuyo caso resulta ser susceptible y particularmente en este caso imposible de cuantificar.
  - **Linealidad:** el método cumple con los parámetros de Linealidad del sistema y Linealidad del método dado que se obtuvo un coeficiente de correlación  $r = 0.9995$  y  $r = 0.9985$  respectivamente.
  - **Precisión:** el coeficiente de variación (CV) de la precisión instrumental para las áreas y los tiempos de retención es  $\leq 2.0\%$ ; la repetibilidad del método tiene un CV = 1.00 %, la precisión intermedia tiene un CV = 0.8%
  - **Exactitud:** el método es exacto con una recuperación media de 99.59 % cuyo valor esta comprendido entre el 98 – 102 %.
  - **Robustez:** el método es robusto ya que la muestra después de haber sido refrigerada 24 horas no muestra variación significativa.
3. El método por Cromatografía Líquida de alta performance para la valoración de Lidocaína base pomada cumple con los Parámetros de Validación realizada. Dado que al ser evaluado y posteriormente contrastados con los criterios de aceptación establecidos según el Procedimiento Operativo Estándar (P.O.E) de Validación de métodos analíticos de Laboratorios Medifarma S.A. El método validado resulta ser confiable, consistente y puede emplearse en los análisis de rutina del Laboratorio.

### RECOMENDACIONES:

1. Es recomendable que antes de iniciar la validación se cumpla con la verificación de los materiales de referencia como son los estándares, la adecuada calificación de los instrumentos analíticos como el HPLC, balanzas, potenciometro, calificación de proveedores de materias primas, calificación del personal, las pruebas de aptitud de sistema y que se cumplan con las buenas prácticas de laboratorio todo esto es garantía de calidad y nos asegura la confiabilidad de nuestros resultados.
2. Se evidencio que el método resulta ser específico porque se puede cuantificar el analito sin interferencia de productos de degradación, excepto cuando se sometio la muestra en contacto directo con el peróxido de hidrogeno presentando una oxidación inminente por lo tanto es recomendable no exponer la muestra en contacto directo con el oxigeno o cualquier otro agente oxidante.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dalmau, R. “Control de Calidad en la industria farmacéutica: Concepto de validación. Industria Farmacéutica”. España 1989. Pp: 85-91.
2. Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas (DIGEMID). Ministerio de Salud. “Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Farmacéuticos”. Perú 1999. Pp: 9-11;13-17;19-25
3. A laboratory guide to method validation and related topics. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. Eurachem Guide. Guía para la validación de métodos de ensayo. OAA.DC-LE-05. 2009. Web disponible en: [http://www.suelos.org.ar/adjuntos/validacion\\_metodos\\_analiticos.pdf](http://www.suelos.org.ar/adjuntos/validacion_metodos_analiticos.pdf). [Con fecha de acceso el 10 de Marzo del 2013].
4. Ángulo, R. Sterilization of health care products-Moist heat- Part1: Requirements for the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices. [Con fecha de acceso el 26 de Marzo del 2013]. Web disponible en: <http://www.cemag.us/articles.asp?pid=709>
5. United States of Pharmacopeia 36/ National Formulary 31. Tomo 1, Tomo 4. Edición anual en español. 2012; 4116-4123.Disponible en: <http://127.0.0.1:35300/uspnf/pub/index?usp=35&nf=30&s=0>.
6. Bonet, R; “Anestésicos Locales”. Web disponible en: [http://www.dfarmacia.com/farma/ctl\\_servlet?\\_f=13&idContenido=90027659&idCategoria=3](http://www.dfarmacia.com/farma/ctl_servlet?_f=13&idContenido=90027659&idCategoria=3). [Con fecha de acceso el 10 de Abril del 2013].
7. Hurley, M; “Anestésicos Locales”. Web disponible en: <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/farmacologia/wp-content/uploads/2011/04/anest-loc.pdf>. [Con fecha de acceso el 5 de Abril del 2013].
8. Goodman, A; “Las bases Farmacológicas de la terapéutica”12°ed.Ed.Medica Panamericana. Argentina 2012, Pp: 303
9. Avendaño, C; “Introducción a la Química Farmacéutica” 2ª ed.Ed. McGraw Hill. España 2001, Pp: 327-328.

10. Rang, H; Dale, M; “Farmacología” 6° ed. Ed. Grafos S.A. España 2009, Pp: 189-200.
11. Palomino, E; “Formas Farmaceuticas Semisolidas”. Web disponible en: <http://es.calameo.com/read/000256586840fe406238d>. [Con fecha de acceso el 20 de Abril del 2013].
12. Vila,J; “Formas Farmaceuticas” Vol 1.Ed. Síntesis S.A. España 2001, Pp: 318
13. Remington. “Medicamentos de aplicación tópica”. Web disponible en: [http://books.google.com.pe/books?id=Av4IIsyHqcC&pg=PA980&lpg=PA980&dq=remington+-+pomadas&source=bl&ots=Vn9AY-Olhd&sig=l\\_wO3AQAdRARUL7\\_T\\_x4fdtw33U&hl=es-419&sa=X&ei=1PaWUefQPKO70gHx84DICg&ved=0CCgQ6AEwAA#v=onepage&q=remington%20-%20pomadas&f=false](http://books.google.com.pe/books?id=Av4IIsyHqcC&pg=PA980&lpg=PA980&dq=remington+-+pomadas&source=bl&ots=Vn9AY-Olhd&sig=l_wO3AQAdRARUL7_T_x4fdtw33U&hl=es-419&sa=X&ei=1PaWUefQPKO70gHx84DICg&ved=0CCgQ6AEwAA#v=onepage&q=remington%20-%20pomadas&f=false). [Con fecha de acceso el 20 de Abril del 2013].
14. Harvey, D; “Química Analítica Moderna” 1° ed. Ed. McGraw Hill. España 2002, Pp: 402-409.
15. Hitner, H; “Introducción a la Farmacología” 5ª ed.Ed.McGraw Hill. España 2007, Pp: 99-104
16. Quattrochi, O; Abelaira, S; et al, “Introducción a la HPLC” 1° ed. Ed. Artes Gráficas Farro S.A. Argentina 1992, Pp: 301-327.
17. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria; “Validación de Métodos Analíticos” 1° ed. Ed. GISPERT, S.A, Inc. España 2001, Pp: 42-130
18. International Conference on Armonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of Analytical procedures ICH-Q2B, Genova: 1996.
19. Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas (DIGEMID). Ministerio de Salud. “Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Farmacéuticos”. Perú 1999. Pp: 9-11;13-17;19-25
20. Aguilar, G; Alcántara, A; et al, “Validación de métodos analíticos” 1° ed. Ed. C.E.S.A. México 1992, Pp:354
21. Benitez, J. “Procedimiento a seguir para llevar a cabo la validación de técnicas analíticas”. 1° ed. España 1977. p:11

22. Betancourt, A. “Validación de Métodos analíticos”. Sitio en Internet: [http://www.calidad.org/public/articles/1100112105\\_mariad.htm\\_](http://www.calidad.org/public/articles/1100112105_mariad.htm_) [Con fecha de acceso el 21 de Abril del 2013].
23. García, C; “Determination of Diclofenac sodium by high-performance liquid chromatography”. Pp:1-10. Sitio en Internet: <http://scielo.sld.cu>. [Con fecha de acceso el 21 de Abril del 2013].
24. Huber L, A; “Good laboratory practice and current good manufacturing practice”. Copyright © Agilent Technologies. Printed in Germany. 2010; 36. guía de selección de columnas para HPLC Web disponible en: [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem). [Con fecha de acceso el 20 de Abril del 2013].
25. Karthik,B; “ANALYTICAL METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION OF LIDOCAINE IN OINTMENT FORMULATION BY U.V SPECTROPHOTOMETRIC METHOD”. Web disponible en: <http://www.ijppsjournal.com/Vol4Issue2/3568.pdf>. [Con fecha de acceso el 20 de Abril del 2013].
26. Olsen,E; “Métodos ópticos de análisis”. Web disponible en: <http://books.google.com.pe/books?id=gtRcq1g4DmYC&pg=PA100&lpg=PA100&dq=longitud+de+onda+del+benceno+monosustituidos&source=bl&ots=C4PI72Uxek&sig=VZXogAW6bWfB5amo8TVF81RxLII&hl=es&sa=X&ei=jsJ2UenLJ5HF4Aph3oDwDQ&ved=0CCoQ6AEwAA#v=onepage&q=longitud%20de%20onda%20del%20benceno%20monosustituidos&f=false>. [Con fecha de acceso el 12 de Abril del 2013].
27. Carey, F; “Elucidación estructural ultravioleta”. Web disponible en : <http://www.ugr.es/~quiored/espec/uv.htm>. [Con fecha de acceso el 15 de Abril del 2013].
28. Burdick, “UV cutoffs para disolventes comunes.”. Web disponible en : <http://macro.lsu.edu/HowTo/solvents/UV%20Cutoff.htm>. [Con fecha de acceso el 10 de Abril del 2013].
29. Morales de la Cruz, C.: “DESARROLLO Y VALIDACIÓN PROSPECTIVA DE UNA TÉCNICA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC) PARA ENALAPRIL 10 mg TABLETAS

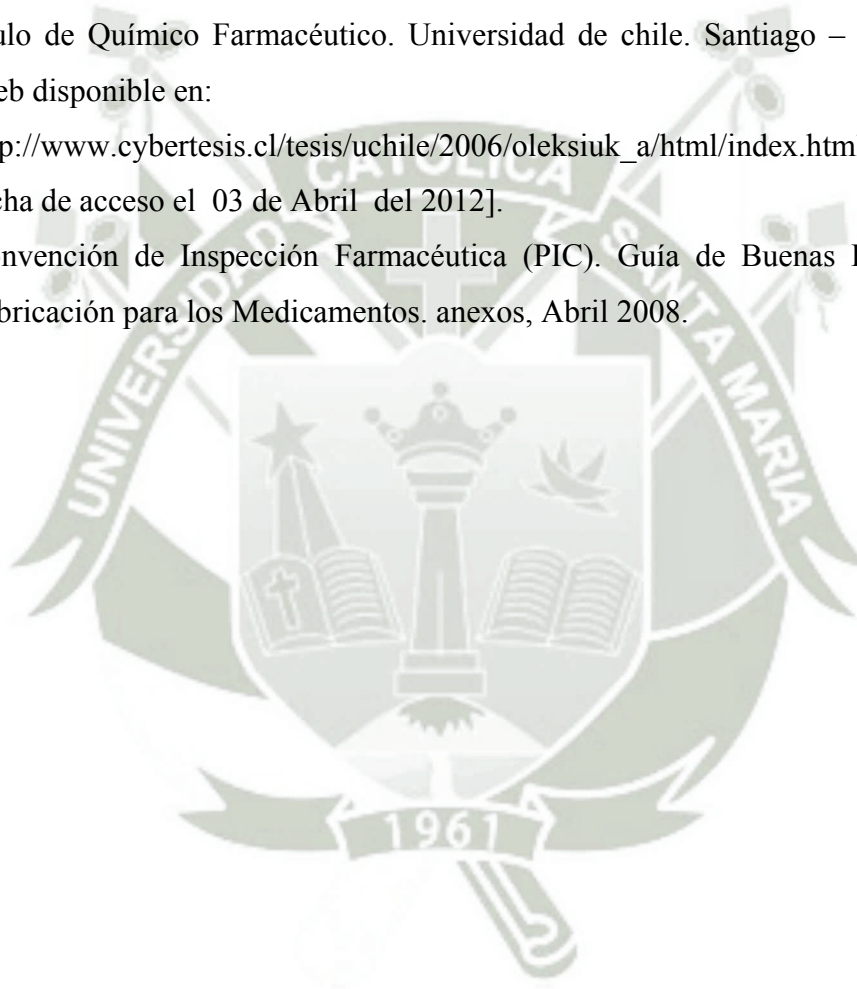
RECUBIERTAS”. Tesis de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú. 2008. Web disponible en:

<http://sisbib.unmsm.edu.pe/BibVirtual/bibvirtual.asp>. [Con fecha de acceso el 02 Abril del 2012

30. Oleksiuk, A.; “VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA POR HPLC PARA LA CUANTIFICACION DE LOSARTAN POTASICO EN COMPRIMIDOS RECUBIERTOS”. Unidad de práctica profesional para optar el título de Químico Farmacéutico. Universidad de Chile. Santiago – Chile. 2009 Web disponible en:

[http://www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2006/oleksiuk\\_a/html/index.html](http://www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2006/oleksiuk_a/html/index.html). [Con fecha de acceso el 03 de Abril del 2012].

31. Convención de Inspección Farmacéutica (PIC). Guía de Buenas Practicas de Fabricación para los Medicamentos. anexos, Abril 2008.



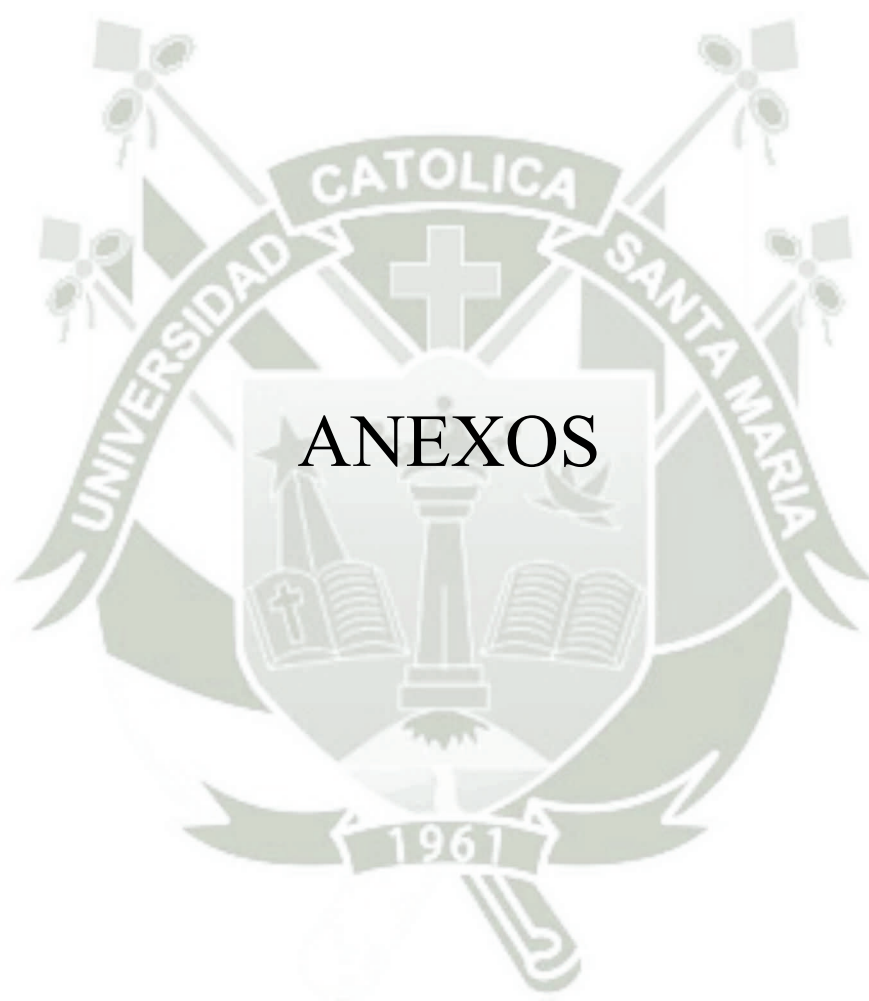


Table 10. Critical Values For The  $F$  Distribution

This table contains critical values  $F_{\alpha, \nu_1, \nu_2}$  for the  $F$  distribution defined by  $P(F \geq F_{\alpha, \nu_1, \nu_2}) = \alpha$ .

$\alpha = .05$

$\nu_2$	$\nu_1$																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	20	30	40	60	120	$\infty$
1	161.45	199.50	215.71	224.58	230.16	233.99	236.77	238.88	240.54	241.88	245.95	248.01	250.10	251.14	252.20	253.25	254.25
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.43	19.45	19.46	19.47	19.48	19.49	19.50
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.70	8.66	8.62	8.59	8.57	8.55	8.53
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.86	5.80	5.75	5.72	5.69	5.66	5.63
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.62	4.56	4.50	4.46	4.43	4.40	4.37
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	3.94	3.87	3.81	3.77	3.74	3.70	3.67
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.51	3.44	3.38	3.34	3.30	3.27	3.23
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.22	3.15	3.08	3.04	3.01	2.97	2.93
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.01	2.94	2.86	2.83	2.79	2.75	2.71
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.85	2.77	2.70	2.66	2.62	2.58	2.54
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.72	2.65	2.57	2.53	2.49	2.45	2.41
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.62	2.54	2.47	2.43	2.38	2.34	2.30
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.53	2.46	2.38	2.34	2.30	2.25	2.21
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.46	2.39	2.31	2.27	2.22	2.18	2.13
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.40	2.33	2.25	2.20	2.16	2.11	2.07
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.35	2.28	2.19	2.15	2.11	2.06	2.01
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.31	2.23	2.15	2.10	2.06	2.01	1.96
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.27	2.19	2.11	2.06	2.02	1.97	1.92
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.23	2.16	2.07	2.03	1.98	1.93	1.88
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.20	2.12	2.04	1.99	1.95	1.90	1.85
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.18	2.10	2.01	1.96	1.92	1.87	1.82
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.15	2.07	1.98	1.94	1.89	1.84	1.79
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.13	2.05	1.96	1.91	1.86	1.81	1.76
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.11	2.03	1.94	1.89	1.84	1.79	1.74
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.09	2.01	1.92	1.87	1.82	1.77	1.71
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.01	1.93	1.84	1.79	1.74	1.68	1.63
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	1.92	1.84	1.74	1.69	1.64	1.58	1.51
50	4.03	3.18	2.79	2.56	2.40	2.29	2.20	2.13	2.07	2.03	1.87	1.78	1.69	1.63	1.58	1.51	1.44
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.84	1.75	1.65	1.59	1.53	1.47	1.39
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.18	2.09	2.02	1.96	1.91	1.75	1.66	1.55	1.50	1.43	1.35	1.26
$\infty$	3.85	3.00	2.61	2.38	2.22	2.10	2.01	1.94	1.88	1.84	1.67	1.58	1.46	1.40	1.32	1.23	1.00

ANEXO N°2 TABLAS ESTADÍSTICA TEST DE COCHRAN

**Prueba de homogeneidad de varianzas de Cochran**

$\alpha = 0.05$

k	n													
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	17	37	145	1000
2	0.998	0.975	0.939	0.906	0.877	0.853	0.833	0.815	0.801	0.788	0.734	0.660	0.581	0.500
3	0.966	0.870	0.797	0.745	0.707	0.677	0.653	0.633	0.616	0.602	0.546	0.474	0.403	0.333
4	0.906	0.767	0.684	0.628	0.589	0.559	0.536	0.517	0.501	0.488	0.436	0.372	0.309	0.250
5	0.841	0.683	0.598	0.544	0.506	0.478	0.456	0.438	0.424	0.411	0.364	0.306	0.251	0.200
6	0.780	0.616	0.532	0.480	0.444	0.418	0.398	0.381	0.368	0.356	0.313	0.261	0.211	0.166
7	0.727	0.561	0.480	0.430	0.397	0.372	0.353	0.338	0.352	0.315	0.275	0.227	0.183	0.142
8	0.679	0.515	0.437	0.391	0.350	0.336	0.318	0.304	0.292	0.282	0.246	0.202	0.161	0.125
9	0.638	0.477	0.402	0.358	0.328	0.306	0.290	0.276	0.265	0.256	0.222	0.182	0.144	0.111
10	0.602	0.445	0.373	0.331	0.302	0.282	0.266	0.254	0.243	0.235	0.203	0.165	0.130	0.100

$\alpha = 0.01$

k	n													
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	17	37	145	1000
2	0.999	0.995	0.979	0.948	0.917	0.891	0.868	0.842	0.867	0.853	0.794	0.706	0.606	0.500
3	0.993	0.942	0.883	0.831	0.793	0.760	0.733	0.710	0.691	0.674	0.605	0.515	0.423	0.333
4	0.967	0.864	0.781	0.711	0.676	0.641	0.612	0.589	0.570	0.553	0.488	0.405	0.325	0.250
5	0.927	0.788	0.693	0.632	0.587	0.553	0.525	0.503	0.485	0.469	0.409	0.335	0.264	0.200
6	0.882	0.721	0.625	0.563	0.519	0.486	0.460	0.440	0.422	0.408	0.352	0.285	0.222	0.166
7	0.837	0.664	0.568	0.508	0.465	0.434	0.410	0.391	0.375	0.361	0.310	0.249	0.192	0.142
8	0.794	0.615	0.520	0.462	0.422	0.393	0.370	0.352	0.337	0.324	0.277	0.221	0.170	0.125
9	0.754	0.572	0.481	0.425	0.387	0.359	0.337	0.320	0.306	0.295	0.251	0.199	0.152	0.111
10	0.717	0.533	0.446	0.393	0.357	0.330	0.310	0.294	0.281	0.270	0.228	0.181	0.137	0.100

ANEXO N°3 TABLAS ESTADÍSTICA TEST DE STUDENT

**Tabla 3** Distribución de t de Student. Áreas de cola bilateral en función de los grados de libertad de la distribución.

v	$\alpha$							
	0.50	0.20	0.10	0.05	0.02	0.01	0.002	0.001
1	1.000	3.078	6.314	12.706	31.821	63.656	318.289	636.578
2	0.816	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	22.328	31.600
3	0.765	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.214	12.924
4	0.741	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173	8.610
5	0.727	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	5.894	6.869
6	0.718	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208	5.959
7	0.711	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.785	5.408
8	0.706	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	4.501	5.041
9	0.703	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.297	4.781
10	0.700	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.144	4.587
11	0.697	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.025	4.437
12	0.695	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.930	4.318
13	0.694	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.852	4.221
14	0.692	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.787	4.140
15	0.691	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.733	4.073
16	0.690	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.686	4.015
17	0.689	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.646	3.965
18	0.688	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.610	3.922
19	0.688	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.579	3.883
20	0.687	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.552	3.850
21	0.686	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.527	3.819
22	0.686	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.505	3.792
23	0.685	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.485	3.768
24	0.685	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.467	3.745
25	0.684	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.450	3.725
26	0.684	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.435	3.707
27	0.684	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.421	3.689
28	0.683	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.408	3.674
29	0.683	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.396	3.660
30	0.683	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.385	3.646
40	0.681	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.307	3.551
50	0.679	1.299	1.676	2.009	2.403	2.678	3.261	3.496
60	0.679	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.232	3.460
70	0.678	1.294	1.667	1.994	2.381	2.648	3.211	3.435
80	0.678	1.292	1.664	1.990	2.374	2.639	3.195	3.416
90	0.677	1.291	1.662	1.987	2.368	2.632	3.183	3.402
100	0.677	1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	3.174	3.390
$\infty$	0.675	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.090	3.290



## ANEXO N° 4: REPORT DE LAS CORRIDAS CROMATOGRAFICAS DE LA ESPECIFICIDAD-RECROBRO

Sequence File C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\TXILOPOV\6PRECIN3 2012-07-14 18-12-32V Sequence File C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\TXILOPOV\6PRECIN3 2012-07-14 18-12-32V\6PRECIN3.S

### Statistic Report

Sequence table: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\TXILOPOV\6PRECIN3 2012-07-14 18-12-32V\6PRECIN3.S  
18-12-32V\6PRECIN3.S

Data directory path: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\TXILOPOV\6PRECIN3 2012-07-14 18-12-32V  
18-12-32V

Operator: M.VALVERDE/K.COORDINARIA

Method file name: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\TXILOPOV\6PRECIN3 2012-07-14 18-12-32V\6PRECIN3.S

Run #	Location	Inj #	Date/Time	File Name	Sample Name
5	Vial 85	1	15/07/2012 12:12:22 a.m.	PRECIN3000030.D	ST
6	Vial 85	1	15/07/2012 12:20:40 a.m.	PRECIN3000031.D	ST
7	Vial 85	2	15/07/2012 12:28:58 a.m.	PRECIN3000032.D	ST
12	Vial 85	1	15/07/2012 01:10:29 a.m.	PRECIN3000037.D	ST
13	Vial 85	2	15/07/2012 01:18:48 a.m.	PRECIN3000038.D	ST
14	Vial 85	3	15/07/2012 01:27:03 a.m.	PRECIN3000039.D	ST
1	Vial 81	1	14/07/2012 11:39:06 p.m.	PRECIN3000026.D	Diluyente 1
2	Vial 82	1	14/07/2012 11:47:26 p.m.	PRECIN3000027.D	Diluyente 2
3	Vial 83	1	14/07/2012 11:55:46 p.m.	PRECIN3000028.D	Placebo 1
4	Vial 84	1	15/07/2012 12:00:02 a.m.	PRECIN3000029.D	Placebo 2
8	Vial 86	1	15/07/2012 12:37:16 a.m.	PRECIN3000033.D	Recobro 1
9	Vial 86	2	15/07/2012 12:45:34 a.m.	PRECIN3000034.D	Recobro 1
10	Vial 87	1	15/07/2012 12:53:53 a.m.	PRECIN3000035.D	Recobro 2
11	Vial 87	2	15/07/2012 01:02:09 a.m.	PRECIN3000036.D	Recobro 2

Compound: Lidocaina base (Signal: VWD1 A, Wavelength=230 nm)

Run #	Type	RetTime [min]	Amount [%]	Area [mAU *s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
5	BB	4.227	50.00000	1002.57971	106.97916	0.1428	0.82
6	BB	4.227	50.00049	1002.59943	106.94896	0.1414	0.82
7	BB	4.227	49.98457	1002.12567	106.95120	0.1414	0.82
12	BB	4.230	50.01863	1002.93311	106.96394	0.1414	0.81
13	BB	4.227	50.00898	1002.78467	107.02720	0.1428	0.81
14	BB	4.224	50.02568	1003.22247	106.97176	0.1429	0.81
-----							
Mean:		4.227	50.00639	1002.70751	106.97037	0.1421	0.82
S.D.:		2.00e-3	1.46986e-2	3.71102e-1	3.26903e-2	7.92e-4	6e-3
RSD :		0.047	2.93833e-2	3.70100e-2	3.05602e-2	0.5572	0.75
95% CI:		2.10e-3	1.54252e-2	3.89408e-1	3.43064e-2	8.31e-4	6e-3

Compound: Lidocaina base (Signal: VWD1 A, Wavelength=230 nm)

Run #	Type	RetTime [min]	Amount [%]	Area [mAU *s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
6	BB	4.226	101.18191	1014.28278	108.25431	0.1413	0.82
9	BB	4.228	101.09572	1013.41882	108.17104	0.1428	0.82
10	BB	4.226	101.13883	1015.88275	108.35902	0.1414	0.82
11	BB	4.228	101.11371	1015.63043	108.36491	0.1428	0.81
-----							
Mean:		4.227	101.13254	1014.80370	108.28732	0.1421	0.82
S.D.:		8.80e-4	3.75576e-2	1.16004	9.26861e-2	8.29e-4	3e-3
RSD :		0.021	3.69392e-2	1.14312e-1	8.55928e-2	0.5635	0.31
95% CI:		1.40e-3	5.94442e-2	1.84588	1.47484e-1	1.32e-3	4e-3

ANEXO N° 5: REPORT DE LAS CORRIDAS CROMATOGRÁFICAS DE LA ESPECIFICIDAD-DEGRADACIONES

Statistical Report

Sequence table: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VTX\LOPO\T2ESPECIIB 2012-07-27 22-48-41\T2ESPECIIB.S  
 Data directory path: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VTX\LOPO\T2ESPECIIB 2012-07-27 22-48-41  
 Operator: M.VALVERDE/K.CCORIMANYA

Method file name: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VTX\LOPO\T2ESPECIIB 2012-07-27 22-48-41

Run Location Inj #	Inj. Date/Time	File Name	Sample Name
5	Vial 25	1 27/07/2012 11:30:43 p.m.	ESPECIIB000005.D ST
6	Vial 25	1 27/07/2012 11:41:02 p.m.	ESPECIIB000006.D ST
7	Vial 25	2 27/07/2012 11:51:22 p.m.	ESPECIIB000007.D ST
16	Vial 25	1 28/07/2012 08:58:127 a.m.	ESPECIIB000060.D ST
17	Vial 25	2 28/07/2012 09:08:46 a.m.	ESPECIIB000061.D ST
18	Vial 25	3 28/07/2012 09:19:03 a.m.	ESPECIIB000062.D ST

Compound: Lidocaina base (Signal: WVD1 A, Wavelength=230 nm)

Run Type	RetTime [min]	Amount [mAU]	Area [µg]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.	
5	BB	3.695	49.70000	986.24594	116.31320	0.1280	0.71
6	BB	3.698	49.67979	985.41400	116.29247	0.1280	0.71
7	BB	3.696	49.69059	985.53510	116.32547	0.1280	0.71
16	BB	3.664	49.68691	985.37555	117.34127	0.1271	0.72
17	BB	3.664	49.68736	985.32184	117.21896	0.1272	0.72
18	BB	3.666	49.70998	985.80994	117.16248	0.1258	0.72

Mean: 3.680 49.69244 985.61206 116.77564 0.1273 0.71

S.D.: 0.017 1.08137e-2 3.43326e-1 5.13041e-1 8.55e-4 5e-3

RSD : 0.466 2.17612e-2 3.48273e-2 4.39339e-1 0.6717 0.71

95% CI: 0.018 1.13483e-2 3.60232e-1 5.38403e-1 8.98e-4 5e-3

Statistical Report

Sequence table: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VTX\LOPO\T2ESPECIIB 2012-07-27 22-48-41\T2ESPECIIB.S  
 Data directory path: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VTX\LOPO\T2ESPECIIB 2012-07-27 22-48-41  
 Operator: M.VALVERDE/K.CCORIMANYA

Method file name: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VTX\LOPO\T2ESPECIIB 2012-07-27 22-48-41

Run Location Inj #	Inj. Date/Time	File Name	Sample Name
1	Vial 21	1 27/07/2012 10:49:41 p.m.	ESPECIIB000001.D Diluyente 1
2	Vial 22	1 27/07/2012 10:59:44 p.m.	ESPECIIB000002.D Diluyente 2
3	Vial 23	1 27/07/2012 11:10:02 p.m.	ESPECIIB000003.D Placebo 1 - H+
4	Vial 24	1 27/07/2012 11:20:22 p.m.	ESPECIIB000004.D Placebo 2 - H+
8	Vial 26	1 28/07/2012 12:10:41 a.m.	ESPECIIB000008.D P.A. 1 - H+
10	Vial 27	1 28/07/2012 12:12:00 a.m.	ESPECIIB000009.D P.A. 1 - H+
10	Vial 27	1 28/07/2012 12:22:20 a.m.	ESPECIIB000010.D P.A. 2 - H+
11	Vial 27	2 28/07/2012 12:32:38 a.m.	ESPECIIB000011.D P.A. 2 - H+
12	Vial 28	1 28/07/2012 12:42:59 a.m.	ESPECIIB000012.D M 1 - H+
13	Vial 28	2 28/07/2012 12:53:18 a.m.	ESPECIIB000013.D M 1 - H+
14	Vial 29	1 28/07/2012 01:03:37 a.m.	ESPECIIB000014.D M 2 - H+
15	Vial 29	2 28/07/2012 01:13:58 a.m.	ESPECIIB000015.D M 2 - H+

Compound: Lidocaina base (Signal: WVD1 A, Wavelength=230 nm)

Run Type	RetTime [min]	Amount [mAU]	Area [µg]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.	
8	BB	3.698	100.74003	995.03027	117.90159	0.1276	0.71
9	BB	3.695	100.86816	996.29578	118.10316	0.1275	0.71
10	BB	3.694	101.34161	996.93256	118.67056	0.1274	0.71
11	BB	3.691	101.42439	999.74847	118.83010	0.1273	0.71
12	BB	3.690	100.90848	1000.68085	118.82635	0.1274	0.71
13	BB	3.691	100.85780	1000.17822	118.74889	0.1274	0.71
14	BB	3.664	100.64211	998.03931	118.32185	0.1275	0.71
15	BB	3.691	100.61759	997.79614	118.36980	0.1275	0.71

Mean: 3.692 100.92502 998.33770 118.45905 0.1274 0.71

S.D.: 2.83e-3 3.023035e-1 1.95349 3.45010e-1 1.03e-4 2e-3

RSD : 0.077 2.99534e-1 1.95674e-1 2.91248e-1 0.0807 0.27

95% CI: 2.36e-3 2.52733e-1 1.63316 2.86435e-1 8.55e-5 2e-3

Sequence File C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VVXILLOPO\ZESPECIIB 2012-07-27 22-48-41\ZESPECIIB.S

Statistical Report

Sequence table: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VVXILLOPO\ZESPECIIB 2012-07-27 22-48-41\ZESPECIIB.S  
 Data directory path: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VVXILLOPO\ZESPECIIB 2012-07-27 22-48-41  
 Operator: M.VALVERDE/K.COORIMANVA  
 Method file name: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VVXILLOPO\ZESPECIIB 2012-07-27

Run Location	Inj #	Inj.	Date/Time	File Name	Sample Name
1	Vial 21	1	27/07/2012 10:49:41 p.m.	ESPECIIB000001.D	Diluyente 1
2	Vial 22	1	27/07/2012 10:59:44 p.m.	ESPECIIB000002.D	Diluyente 2
6	Vial 30	1	28/07/2012 01:34:37 a.m.	ESPECIIB000017.D	Placebo 1 - OH-
7	Vial 31	1	28/07/2012 01:44:56 a.m.	ESPECIIB000018.D	Placebo 2 - OH-
8	Vial 32	1	28/07/2012 01:55:14 a.m.	ESPECIIB000019.D	P.A. 1 - OH-
9	Vial 32	2	28/07/2012 02:05:33 a.m.	ESPECIIB000020.D	P.A. 1 - OH-
10	Vial 33	1	28/07/2012 02:15:53 a.m.	ESPECIIB000021.D	P.A. 2 - OH-
11	Vial 33	2	28/07/2012 02:26:13 a.m.	ESPECIIB000022.D	P.A. 2 - OH-
12	Vial 34	1	28/07/2012 02:36:30 a.m.	ESPECIIB000023.D	M 1 - OH-
13	Vial 34	2	28/07/2012 02:46:47 a.m.	ESPECIIB000024.D	M 1 - OH-
14	Vial 35	1	28/07/2012 03:57:06 a.m.	ESPECIIB000025.D	M 2 - OH-
15	Vial 35	2	28/07/2012 03:07:25 a.m.	ESPECIIB000026.D	M 2 - OH-

Compound: Lidocaina base (Signal: VWD1 A, WaveLength=230 nm)

Run Type	RetTime [min]	Amount [mAU *s]	Area [mAU *s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
8	BB	3.686	100.52806	996.90833	118.49487	0.1273 0.71
9	BB	3.688	100.62313	997.85107	118.73724	0.1272 0.71
10	BB	3.686	100.51492	998.77557	118.72940	0.1273 0.71
11	BB	3.685	100.75985	1001.20935	119.22284	0.1256 0.71
12	BB	3.684	99.06815	984.39966	117.05977	0.1258 0.71
13	BB	3.682	99.07291	984.44696	117.21256	0.1271 0.71
14	BB	3.682	98.00987	971.93616	115.51799	0.1273 0.71
15	BB	3.685	98.03392	972.17468	115.56094	0.1273 0.71

Mean: 3.685 99.57635 988.46272 117.56820 0.1268 0.71  
 S.D.: 1.91e-3 1.17277 11.94648 1.46152 7.06e-4 2e-3  
 RSD: 0.052 1.17776 1.20879 1.24313 0.5569 0.22  
 95% CI: 1.60e-3 9.80460e-1 9.98918 1.22186 5.91e-4 1e-3

Sequence File C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VVXILLOPO\ZESPECIIB 2012-07-27 22-48-41\ZESPECIIB.S

Statistical Report

Sequence table: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VVXILLOPO\ZESPECIIB 2012-07-27 22-48-41\ZESPECIIB.S  
 Data directory path: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VVXILLOPO\ZESPECIIB 2012-07-27 22-48-41  
 Operator: M.VALVERDE/K.COORIMANVA  
 Method file name: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VVXILLOPO\ZESPECIIB 2012-07-27

Run Location	Inj #	Inj.	Date/Time	File Name	Sample Name
3	Vial 25	1	27/07/2012 11:30:43 p.m.	ESPECIIB000005.D	ST
4	Vial 25	1	27/07/2012 11:41:02 p.m.	ESPECIIB000006.D	ST
5	Vial 25	2	27/07/2012 11:51:22 p.m.	ESPECIIB000007.D	ST
16	Vial 25	1	28/07/2012 08:58:27 a.m.	ESPECIIB000060.D	ST
17	Vial 25	2	28/07/2012 09:08:46 a.m.	ESPECIIB000061.D	ST
18	Vial 25	3	28/07/2012 09:19:03 a.m.	ESPECIIB000062.D	ST

Compound: Lidocaina base (Signal: VWD1 A, WaveLength=230 nm)

Run Type	RetTime [min]	Amount [mAU *s]	Area [mAU *s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
3	BB	3.695	49.70000	986.21594	116.31320	0.1280 0.71
4	BB	3.688	49.67979	985.41400	116.29247	0.1280 0.71
5	BB	3.696	49.69059	985.53510	116.32547	0.1290 0.71
16	BB	3.664	49.68691	985.37555	117.34127	0.1271 0.72
17	BB	3.664	49.68736	985.32184	117.21894	0.1272 0.72
18	BB	3.666	49.70998	985.80994	117.16248	0.1258 0.72

Mean: 3.680 49.69244 985.61206 116.77564 0.1273 0.71  
 S.D.: 0.017 1.08137e-2 3.43262e-1 5.13041e-1 6.55e-4 5e-3  
 RSD: 0.466 2.17612e-2 3.48273e-2 4.39339e-1 0.6717 0.71  
 95% CI: 0.018 1.13483e-2 3.60232e-1 5.38403e-1 6.98e-4 5e-3

Sequence File C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\WXILOPO\T2ESPECIIB 2012-07-27 22-48-41\T2ESPECIIB.S

Statistic Report

Sequence table: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\WXILOPO\T2ESPECIIB 2012-07-27 22-48-41\T2ESPECIIB.S  
 Data directory path: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\WXILOPO\T2ESPECIIB 2012-07-27 22-48-41  
 Operator: M.VALTERDE/K.COORIMANVA

Method file name: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\WXILOPO\T2ESPECIIB 2012-07-

Run #	Location	Inj #	Date/Time	File Name	Sample Name
1	Vial 21	1	27/07/2012 10:49:41 p.m.	ESPECIIB000001.D	Diluyente 1
2	Vial 21	1	27/07/2012 10:59:44 p.m.	ESPECIIB000002.D	Diluyente 2
6	Vial 36	1	28/07/2012 03:28:05 a.m.	ESPECIIB000028.D	Placebo 1 - Ox
7	Vial 37	1	28/07/2012 03:38:26 a.m.	ESPECIIB000029.D	Placebo 2 - Ox
8	Vial 38	1	28/07/2012 03:48:44 a.m.	ESPECIIB000030.D	P.A. 1 - Ox
9	Vial 38	2	28/07/2012 03:59:03 a.m.	ESPECIIB000031.D	P.A. 1 - Ox
10	Vial 39	1	28/07/2012 04:09:24 a.m.	ESPECIIB000032.D	P.A. 2 - Ox
11	Vial 39	2	28/07/2012 04:19:45 a.m.	ESPECIIB000033.D	P.A. 2 - Ox
12	Vial 40	1	28/07/2012 04:30:05 a.m.	ESPECIIB000034.D	M 1 - Ox
13	Vial 40	2	28/07/2012 04:40:23 a.m.	ESPECIIB000035.D	M 1 - Ox
14	Vial 41	1	28/07/2012 04:50:42 a.m.	ESPECIIB000036.D	M 2 - Ox
15	Vial 41	2	28/07/2012 05:01:03 a.m.	ESPECIIB000037.D	M 2 - Ox

Compound: Lidocaina base (Signal: WVD1 A, Wavelength=230 nm)

Run #	Type	RetTime [min]	Amount	Area [mAU *s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
12	BB	3.677	23.09047	228.06937	27.17933	0.1270	0.72
13	BB	3.679	23.06587	227.82642	27.13306	0.1271	0.73
14	BB	3.679	22.81979	224.93054	26.74861	0.1272	0.73
15	BB	3.675	22.82728	225.01038	26.75150	0.1259	0.72

Mean: 3.678 22.95085 226.46067 26.95312 0.1268 0.73  
 S.D.: 1.95e-3 1.47387e-1 1.72042 2.35249e-1 6.63e-4 2e-3  
 RSD: 0.053 6.42187e-1 7.59698e-1 8.72809e-1 0.5233 0.22  
 95% CI: 3.11e-3 2.34526e-1 2.13757 3.74334e-1 1.06e-3 3e-3

Sequence File C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\WXILOPO\T2ESPECIIB 2012-07-27 22-48-41\T2ESPECIIB.S

Statistic Report

Sequence table: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\WXILOPO\T2ESPECIIB 2012-07-27 22-48-41\T2ESPECIIB.S  
 Data directory path: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\WXILOPO\T2ESPECIIB 2012-07-27 22-48-41  
 Operator: M.VALTERDE/K.COORIMANVA

Method file name: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\WXILOPO\T2ESPECIIB 2012-07-

Run #	Location	Inj #	Date/Time	File Name	Sample Name
3	Vial 25	1	27/07/2012 11:30:43 p.m.	ESPECIIB000005.D	ST
4	Vial 25	1	27/07/2012 11:41:02 p.m.	ESPECIIB000006.D	ST
5	Vial 25	2	27/07/2012 11:51:22 p.m.	ESPECIIB000007.D	ST
16	Vial 25	1	28/07/2012 08:58:27 a.m.	ESPECIIB000060.D	ST
17	Vial 25	2	28/07/2012 09:08:46 a.m.	ESPECIIB000061.D	ST
18	Vial 25	3	28/07/2012 09:19:03 a.m.	ESPECIIB000062.D	ST

Compound: Lidocaina base (Signal: WVD1 A, Wavelength=230 nm)

Run #	Type	RetTime [min]	Amount	Area [mAU *s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
3	BB	3.695	49.70000	986.21594	116.31320	0.1280	0.71
4	BB	3.698	49.67979	985.41400	116.29247	0.1280	0.71
5	BB	3.696	49.69059	985.53510	116.32597	0.1280	0.71
16	BB	3.664	49.68691	985.37555	117.34127	0.1271	0.72
17	BB	3.664	49.68736	985.32184	117.21894	0.1272	0.72
18	BB	3.666	49.70988	985.80994	117.16248	0.1258	0.72

Mean: 3.680 49.69244 985.61206 116.77564 0.1273 0.71  
 S.D.: 0.017 1.08137e-2 3.43262e-1 5.13041e-1 8.55e-4 5e-3  
 RSD: 0.466 2.17612e-2 3.48273e-2 4.39339e-1 0.6717 0.71  
 95% CI: 0.018 1.13483e-2 3.60232e-1 5.38403e-1 0.96e-4 5e-3

Sequence File C:\CHEM32\1\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VVXILLOPO\T2ESPECIIB 2012-07-27 22-48-41\T2ESPECIIB.S

Statistical Report

Sequence table: C:\CHEM32\1\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VVXILLOPO\T2ESPECIIB 2012-07-27 22-48-41\T2ESPECIIB.S  
 Data directory path: C:\CHEM32\1\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VVXILLOPO\T2ESPECIIB 2012-07-27 22-48-41\T2ESPECIIB.S  
 Operator: M.VALLVERDE/R.COORINANYA

Method file name: C:\CHEM32\1\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VVXILLOPO\T2ESPECIIB 2012-07-27 22-48-41\T2ESPECIIB.S

Run Location Inj #	Inj. Date/Time	File Name	Sample Name
1	27/07/2012 10:49:41 p.m.	ESPECIIB000091.D	Diluyente 1
2	27/07/2012 10:59:44 p.m.	ESPECIIB000092.D	Diluyente 2
6	28/07/2012 05:21:42 a.m.	ESPECIIB000039.D	Placebo 1 - T°
7	28/07/2012 05:32:01 a.m.	ESPECIIB000040.D	Placebo 2 - T°
8	28/07/2012 05:42:28 a.m.	ESPECIIB000041.D	P.A. 1 - T°
9	28/07/2012 05:52:42 a.m.	ESPECIIB000042.D	P.A. 1 - T°
10	28/07/2012 06:03:00 a.m.	ESPECIIB000043.D	P.A. 2 - T°
11	28/07/2012 06:13:20 a.m.	ESPECIIB000044.D	P.A. 2 - T°
12	28/07/2012 06:23:39 a.m.	ESPECIIB000045.D	M 1 - T°
13	28/07/2012 06:33:59 a.m.	ESPECIIB000046.D	M 1 - T°
14	28/07/2012 06:44:20 a.m.	ESPECIIB000047.D	M 2 - T°
15	28/07/2012 06:54:37 a.m.	ESPECIIB000048.D	M 2 - T°

Compound: Lidocaina base (Signal: VWD1 A, Wavelength=230 nm)

Run Type	RetTime [min]	Amount [mAU]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
8	BB	3.673	100.95010	995.07336	118.49154	0.1271 0.72
9	BB	3.674	101.07511	996.30566	118.69643	0.1270 0.72
10	BB	3.672	100.82422	993.83258	118.65066	0.1268 0.72
11	BB	3.671	100.81362	993.72809	118.42224	0.1256 0.72
12	BB	3.671	98.95563	977.40540	116.60557	0.1269 0.71
13	BB	3.672	98.87284	976.58765	116.49412	0.1269 0.71
14	BB	3.669	99.05487	978.38562	116.72697	0.1269 0.72
15	BB	3.671	99.11229	978.95276	116.68129	0.1255 0.72

Mean: 3.672 99.95734 986.28389 117.59610 0.1266 0.72  
 S.D.: 1.64e-3 1.03010 9.09523 1.04163 6.53e-4 1e-3  
 RSD: 0.045 1.03054 9.22172e-1 0.65787e-1 0.5155 0.21  
 95% CI: 1.37e-3 8.61187e-1 7.60380 9.70822e-1 5.46e-4 1e-3

Sequence File C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VVXILLOPO\T2ESPECIIB 2012-07-27 22-48-41\T2ESPECIIB.S

Statistical Report

Sequence table: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VVXILLOPO\T2ESPECIIB 2012-07-27 22-48-41\T2ESPECIIB.S  
 Data directory path: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VVXILLOPO\T2ESPECIIB 2012-07-27 22-48-41\T2ESPECIIB.S  
 Operator: M.VALLVERDE/R.COORINANYA

Method file name: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VVXILLOPO\T2ESPECIIB 2012-07-27 22-48-41\T2ESPECIIB.S

Run Location Inj #	Inj. Date/Time	File Name	Sample Name
3	27/07/2012 11:30:43 p.m.	ESPECIIB000005.D	ST
4	27/07/2012 11:41:02 p.m.	ESPECIIB000006.D	ST
5	27/07/2012 11:51:22 p.m.	ESPECIIB000007.D	ST
16	28/07/2012 09:58:27 a.m.	ESPECIIB000060.D	ST
17	28/07/2012 09:08:46 a.m.	ESPECIIB000061.D	ST
18	28/07/2012 09:19:03 a.m.	ESPECIIB000062.D	ST

Compound: Lidocaina base (Signal: VWD1 A, Wavelength=230 nm)

Run Type	RetTime [min]	Amount [mAU]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
3	BB	3.695	49.70000	986.21594	116.31320	0.1280 0.71
4	BB	3.698	49.67979	985.41400	116.29247	0.1280 0.71
5	BB	3.696	49.69059	985.53510	116.32547	0.1280 0.71
16	BB	3.664	49.68691	985.37555	117.34127	0.1271 0.72
17	BB	3.664	49.68736	985.32184	117.21894	0.1272 0.72
18	BB	3.666	49.70998	985.80994	117.16248	0.1258 0.72

Mean: 3.680 49.69244 985.61206 116.77564 0.1273 0.71  
 S.D.: 0.017 1.08137e-2 3.43262e-1 5.13041e-1 8.55e-4 5e-3  
 RSD: 0.466 2.17612e-2 3.48273e-2 4.39339e-1 0.6717 0.71  
 95% CI: 0.018 1.13483e-2 3.60232e-1 5.38403e-1 8.98e-4 5e-3

Statistical Report

Sequence table: C:\CHEM32\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\TKILOPO\TZESPECIIB 2012-07-27 22-48-41\TZESPECIIB.S  
 Data directory path: C:\CHEM32\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\TKILOPO\TZESPECIIB 2012-07-27 22-48-41\  
 Operator: M.VALVERDE/K.COORIMANYA  
 Method file name: C:\CHEM32\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\TKILOPO\TZESPECIIB 2012-07-27

Run #	Location	Inj #	Date/Time	File Name	Sample Name
3	Vial 25	1	27/07/2012 11:30:43 p.m.	ESPECIIB000005.D	ST
4	Vial 25	1	27/07/2012 11:41:02 p.m.	ESPECIIB000006.D	ST
5	Vial 25	2	27/07/2012 11:51:22 p.m.	ESPECIIB000007.D	ST
16	Vial 25	1	28/07/2012 08:58:27 a.m.	ESPECIIB000060.D	ST
17	Vial 25	2	28/07/2012 09:08:46 a.m.	ESPECIIB000061.D	ST
18	Vial 25	3	28/07/2012 09:19:03 a.m.	ESPECIIB000062.D	ST

Compound: Lidocaina base (Signal: WDI A, Wavelength=230 nm)

Run #	Type	RetTime [min]	Amount [mAU *s]	Area [mAU *s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
3	BB	3.695	49.70000	986.21594	116.31320	0.1280	0.71
4	BB	3.698	49.67979	985.41400	116.29247	0.1280	0.71
5	BB	3.696	49.69059	985.53510	116.32547	0.1280	0.71
16	BB	3.664	49.66691	985.37555	117.34127	0.1271	0.72
17	BB	3.664	49.68736	985.32184	117.21894	0.1272	0.72
18	BB	3.666	49.70998	985.80994	117.16248	0.1258	0.72

Mean: 3.680  
 S.D.: 0.017  
 RSD: 0.465  
 95% CI: 0.018

Statistical Report

Sequence table: C:\CHEM32\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\TKILOPO\TZESPECIIB 2012-07-27 22-48-41\TZESPECIIB.S  
 Data directory path: C:\CHEM32\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\TKILOPO\TZESPECIIB 2012-07-27 22-48-41\  
 Operator: M.VALVERDE/K.COORIMANYA  
 Method file name: C:\CHEM32\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\TKILOPO\TZESPECIIB 2012-07-27

Run #	Location	Inj #	Date/Time	File Name	Sample Name
1	Vial 21	1	27/07/2012 10:49:41 p.m.	ESPECIIB000001.D	Diluyente 1
2	Vial 22	1	27/07/2012 10:59:44 p.m.	ESPECIIB000002.D	Diluyente 2
6	Vial 48	1	28/07/2012 07:15:19 a.m.	ESPECIIB000050.D	Placebo 1 - UV
7	Vial 49	1	28/07/2012 07:25:36 a.m.	ESPECIIB000051.D	Placebo 2 - UV
8	Vial 50	1	28/07/2012 07:35:58 a.m.	ESPECIIB000052.D	P.A. 1 - UV
9	Vial 50	2	28/07/2012 07:46:15 a.m.	ESPECIIB000053.D	P.A. 1 - UV
10	Vial 51	1	28/07/2012 07:56:33 a.m.	ESPECIIB000054.D	P.A. 2 - UV
11	Vial 51	2	28/07/2012 08:06:52 a.m.	ESPECIIB000055.D	P.A. 2 - UV
12	Vial 52	1	28/07/2012 08:17:11 a.m.	ESPECIIB000056.D	M 1 - UV
13	Vial 52	2	28/07/2012 08:27:30 a.m.	ESPECIIB000057.D	M 1 - UV
14	Vial 53	1	28/07/2012 08:37:51 a.m.	ESPECIIB000058.D	M 2 - UV
15	Vial 53	2	28/07/2012 08:48:09 a.m.	ESPECIIB000059.D	M 2 - UV

Compound: Lidocaina base (Signal: WDI A, Wavelength=230 nm)

Run #	Type	RetTime [min]	Amount [mAU *s]	Area [mAU *s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
8	BB	3.665	99.50417	982.82336	117.16413	0.1270	0.72
9	BB	3.669	99.54676	983.24408	117.26204	0.1269	0.72
10	BB	3.668	101.47985	1000.29517	119.23772	0.1270	0.72
11	BB	3.666	101.80585	1003.50854	119.55832	0.1270	0.71
12	BB	3.663	101.17569	999.33337	119.23531	0.1269	0.72
13	BB	3.666	101.16073	999.18561	119.23407	0.1254	0.72
14	BB	3.662	101.15399	997.08313	119.20317	0.1267	0.72
15	BB	3.664	101.30902	998.61133	119.23534	0.1268	0.72

Mean: 3.665  
 S.D.: 2.24e-3  
 RSD: 0.061  
 95% CI: 1.88e-3



Compound: Lidocaína base (Signal: VWD1 A, Wavelength=230 nm)

Run #	Type	RetTime [min]	Amount [%]	Area [mAU *s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
1	BB	3.582	37.22605	504.63483	56.01074	0.1342	0.66
2	BB	3.582	37.20075	504.20755	55.91263	0.1343	0.66
3	BB	3.583	37.23053	504.65491	55.65804	0.1364	0.65
4	BB	3.580	37.29763	505.64307	55.89790	0.1361	0.65
5	BB	3.580	39.19975	532.84491	58.91582	0.1346	0.65
6	BB	3.583	39.16233	533.23450	58.99865	0.1360	0.65
7	BB	3.582	50.43161	749.53595	82.93649	0.1346	0.65
8	BB	3.580	50.41726	749.24384	82.90398	0.1360	0.65
9	BB	3.577	51.26957	763.91943	84.58947	0.1345	0.65
10	BB	3.582	51.24689	764.61627	84.70483	0.1344	0.65
11	BB	3.581	50.76717	757.01544	83.84395	0.1345	0.65
12	BB	3.578	50.77544	757.04977	83.81522	0.1360	0.65
13	BB	3.578	61.41396	92.96844	109.80453	0.1361	0.64
14	BB	3.580	61.48050	994.57489	109.99640	0.1346	0.64
15	BB	3.582	61.91279	1002.96320	110.81237	0.1347	0.65
16	BB	3.583	61.91038	1003.44244	110.98825	0.1361	0.64
17	BB	3.579	62.80174	1019.50769	112.70295	0.1361	0.64
18	BB	3.581	62.81242	1020.73505	112.79282	0.1347	0.64
19	BB	3.582	71.79433	1266.35730	139.79881	0.1363	0.64
20	BB	3.581	71.84043	1267.68298	139.95473	0.1348	0.64
21	BB	3.579	71.01857	1249.74976	137.76849	0.1364	0.64
22	BB	3.579	71.01950	1248.46045	137.62315	0.1364	0.64
23	BB	3.578	71.65815	1260.16077	138.93707	0.1364	0.64
24	BB	3.578	71.65946	1260.49036	139.05562	0.1363	0.64
25	BB	3.578	79.20508	1494.26074	164.93703	0.1348	0.64
26	BB	3.575	79.26952	1496.38220	165.04114	0.1364	0.64
27	BB	3.577	79.64198	1505.33704	166.13448	0.1348	0.64
28	BB	3.571	79.73797	1508.20276	166.52730	0.1348	0.64
29	BB	3.572	79.58446	1505.53589	166.41313	0.1347	0.64
30	BB	3.575	79.53401	1504.64783	166.13464	0.1362	0.64

Mean:	3.579	60.35134	1007.60197	111.32034	0.1354	0.65
S.D.:	3.00e-3	15.02136	356.60550	39.28062	8.33e-4	5e-3
RSD:	0.084	24.85985	35.39150	35.28612	0.6155	0.72
95% CI:	1.12e-3	5.60907	133.15866	14.66762	3.11e-4	2e-3

Statistic Report

Sequence table: C:\CHEM2\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\TXI\LOPOV\3\LINSISI 2012-07-11  
03-07-29\TXI\LINSISI.S

Date directory path: C:\CHEM2\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\TXI\LOPOV\3\LINSISI 2012-07-11  
03-07-29

Operator: M.VALTERDE/K.COORLENAYA

Method file name: C:\CHEM2\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\TXI\LOPOV\3\LINSISI 2012-07-11

Run Location	Inj #	Inj. Date/Time	File Name	Sample Name
1 Vial 61	1	18/07/2012 03:08:27 a.m.	LINSISI000001.D	50# - 1
2 Vial 61	2	18/07/2012 03:16:43 a.m.	LINSISI000002.D	50# - 1
3 Vial 62	1	18/07/2012 03:25:02 a.m.	LINSISI000003.D	50# - 2
4 Vial 62	2	18/07/2012 03:33:58 a.m.	LINSISI000004.D	50# - 2
5 Vial 63	1	18/07/2012 03:41:44 a.m.	LINSISI000005.D	50# - 3
6 Vial 63	2	18/07/2012 03:50:04 a.m.	LINSISI000006.D	50# - 3
7 Vial 64	1	18/07/2012 03:58:22 a.m.	LINSISI000007.D	75# - 1
8 Vial 64	2	18/07/2012 04:06:42 a.m.	LINSISI000008.D	75# - 1
9 Vial 65	1	18/07/2012 04:15:02 a.m.	LINSISI000009.D	75# - 2
10 Vial 65	2	18/07/2012 04:23:21 a.m.	LINSISI000010.D	75# - 2
11 Vial 66	1	18/07/2012 04:31:40 a.m.	LINSISI000011.D	75# - 3
12 Vial 66	2	18/07/2012 04:39:59 a.m.	LINSISI000012.D	75# - 3
13 Vial 67	1	18/07/2012 04:48:17 a.m.	LINSISI000013.D	100# - 1
14 Vial 67	2	18/07/2012 04:56:39 a.m.	LINSISI000014.D	100# - 1
15 Vial 68	1	18/07/2012 05:04:58 a.m.	LINSISI000015.D	100# - 2
16 Vial 68	2	18/07/2012 05:13:17 a.m.	LINSISI000016.D	100# - 2
17 Vial 69	1	18/07/2012 05:21:37 a.m.	LINSISI000017.D	100# - 3
18 Vial 69	2	18/07/2012 05:29:56 a.m.	LINSISI000018.D	100# - 3
19 Vial 70	1	18/07/2012 05:38:15 a.m.	LINSISI000019.D	125# - 1
20 Vial 70	2	18/07/2012 05:46:35 a.m.	LINSISI000020.D	125# - 1
21 Vial 71	1	18/07/2012 05:54:52 a.m.	LINSISI000021.D	125# - 2
22 Vial 71	2	18/07/2012 06:03:10 a.m.	LINSISI000022.D	125# - 2
23 Vial 72	1	18/07/2012 06:11:30 a.m.	LINSISI000023.D	125# - 3
24 Vial 72	2	18/07/2012 06:19:52 a.m.	LINSISI000024.D	125# - 3
25 Vial 73	1	18/07/2012 06:28:11 a.m.	LINSISI000025.D	150# - 1
26 Vial 73	2	18/07/2012 06:36:28 a.m.	LINSISI000026.D	150# - 1
27 Vial 74	1	18/07/2012 06:44:50 a.m.	LINSISI000027.D	150# - 2
28 Vial 74	2	18/07/2012 06:53:09 a.m.	LINSISI000028.D	150# - 2
29 Vial 75	1	18/07/2012 07:02:05 a.m.	LINSISI000029.D	150# - 3
30 Vial 75	2	18/07/2012 07:09:51 a.m.	LINSISI000030.D	150# - 3

**ANEXO N° 7: REPORT DE LAS CORRIDAS CROMATOGRÁFICAS DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO -  
EXACTITUD**



Run #	Location	Inj #	Date/Time	File Name	Sample Name
7	Vial 33	1	19/07/2012 11:31:24 p.m.	EXACTI1000011.D	85# - 1
8	Vial 33	2	19/07/2012 11:38:13 p.m.	EXACTI1000012.D	85# - 1
9	Vial 34	1	19/07/2012 11:46:05 p.m.	EXACTI1000013.D	85# - 2
10	Vial 34	2	19/07/2012 11:52:52 p.m.	EXACTI1000014.D	85# - 2
11	Vial 35	1	20/07/2012 12:00:39 a.m.	EXACTI1000015.D	85# - 3
12	Vial 35	2	20/07/2012 12:07:27 a.m.	EXACTI1000016.D	85# - 3
15	Vial 36	1	20/07/2012 12:29:53 a.m.	EXACTI1000019.D	100# - 1
16	Vial 36	2	20/07/2012 12:36:43 a.m.	EXACTI1000020.D	100# - 1
17	Vial 37	1	20/07/2012 12:44:34 a.m.	EXACTI1000021.D	100# - 2
18	Vial 37	2	20/07/2012 12:51:23 a.m.	EXACTI1000022.D	100# - 2
19	Vial 38	1	20/07/2012 12:59:13 a.m.	EXACTI1000023.D	100# - 3
20	Vial 38	2	20/07/2012 01:06:03 a.m.	EXACTI1000024.D	100# - 3
23	Vial 39	1	20/07/2012 01:27:58 a.m.	EXACTI1000027.D	115# - 1
24	Vial 39	2	20/07/2012 01:35:45 a.m.	EXACTI1000028.D	115# - 1
25	Vial 40	1	20/07/2012 01:42:35 a.m.	EXACTI1000029.D	115# - 2
26	Vial 40	2	20/07/2012 01:50:23 a.m.	EXACTI1000030.D	115# - 2
27	Vial 41	1	20/07/2012 01:57:13 a.m.	EXACTI1000031.D	115# - 3
28	Vial 41	2	20/07/2012 02:04:58 a.m.	EXACTI1000032.D	115# - 3

Compound: Lidocaina base (Signal: VWD1 A, Wavelength=230 nm)

Run #	Type	RetTime [min]	Amount [%]	Area [mAU *s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
7	BB	3.693	98.80855	862.93237	103.98876	0.1274	0.78
8	BB	3.694	98.70791	862.05347	103.83633	0.1274	0.78
9	BB	3.692	98.27946	856.49438	103.57926	0.1256	0.78
10	BB	3.695	98.14459	855.31909	103.29510	0.1272	0.78
11	BB	3.691	97.72642	850.27069	102.38280	0.1260	0.78
12	BB	3.691	97.52965	849.42871	102.31282	0.1260	0.78
15	BB	3.689	98.93580	1013.69727	122.23768	0.1273	0.78
16	BB	3.693	98.96739	1015.04687	123.44186	0.1263	0.78
17	BB	3.691	98.76602	1016.84015	122.45035	0.1275	0.78
18	BB	3.690	98.71728	1016.33832	122.36562	0.1274	0.77
19	BB	3.689	98.41307	1013.40961	122.06952	0.1274	0.77
20	BB	3.689	98.43674	1013.85332	122.01283	0.1275	0.77
23	BB	3.691	99.28664	1166.89592	140.45525	0.1260	0.77
24	BB	3.692	99.29027	1166.62109	140.27243	0.1261	0.77
25	BB	3.687	101.08261	1190.84216	143.24612	0.1260	0.77
Mean:		3.691	98.90281	1014.57922	122.27860	0.1268	0.78
S.D.:		2.42e-3	9.22678e-1	133.29636	15.97295	7.38e-4	4e-3
RSD :		0.066	9.32914e-1	13.13809	13.06276	0.5817	0.54
95% CI:		1.20e-3	4.58837e-1	66.28669	7.94316	3.67e-4	2e-3

Run #	Location	Inj #	Date/Time	File Name	Sample Name
1	Vial 31	1	19/07/2012 10:47:30 p.m.	EXACTI1000005.D	ST1
2	Vial 31	1	19/07/2012 10:54:18 p.m.	EXACTI1000006.D	ST1
3	Vial 31	2	19/07/2012 11:02:07 p.m.	EXACTI1000007.D	ST1
4	Vial 32	1	19/07/2012 11:08:54 p.m.	EXACTI1000008.D	ST2
5	Vial 32	1	19/07/2012 11:16:42 p.m.	EXACTI1000009.D	ST2
6	Vial 32	2	19/07/2012 11:23:33 p.m.	EXACTI1000010.D	ST2
13	Vial 31	1	20/07/2012 12:15:17 a.m.	EXACTI1000017.D	ST1
14	Vial 32	1	20/07/2012 12:22:05 a.m.	EXACTI1000018.D	ST2
21	Vial 31	1	20/07/2012 01:13:49 a.m.	EXACTI1000025.D	ST1
22	Vial 32	1	20/07/2012 01:20:40 a.m.	EXACTI1000026.D	ST2
29	Vial 31	1	20/07/2012 02:11:49 a.m.	EXACTI1000033.D	ST1
30	Vial 31	2	20/07/2012 02:19:36 a.m.	EXACTI1000034.D	ST1
31	Vial 31	3	20/07/2012 02:26:23 a.m.	EXACTI1000035.D	ST1
32	Vial 32	1	20/07/2012 02:34:12 a.m.	EXACTI1000036.D	ST2
33	Vial 32	2	20/07/2012 02:40:59 a.m.	EXACTI1000037.D	ST2
34	Vial 32	3	20/07/2012 02:48:44 a.m.	EXACTI1000038.D	ST2

Compound: Lidocaina base (Signal: VWD1 A, Wavelength=230 nm)

Run #	Type	RetTime [min]	Amount [%]	Area [mAU *s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
1	BB	3.696	49.62079	1011.88226	121.73652	0.1261	0.78
2	BB	3.695	49.59377	1011.15057	121.98644	0.1273	0.78
3	BB	3.698	49.62845	1011.92531	121.92834	0.1274	0.78
4	BB	3.699	50.05072	1029.35107	123.98458	0.1274	0.78
5	BB	3.696	50.11970	1031.24109	124.47436	0.1258	0.78
6	BB	3.693	50.10750	1031.12842	124.55441	0.1272	0.78
13	BB	3.694	49.26771	1011.51050	122.14098	0.1272	0.78
14	BB	3.692	50.13696	1031.11926	124.39333	0.1258	0.78
21	BB	3.688	49.29136	1011.23920	121.75648	0.1275	0.77
22	BB	3.691	50.23155	1031.00903	124.29032	0.1274	0.78
29	BB	3.688	49.32132	1011.48315	121.74657	0.1275	0.77
30	BB	3.690	49.36783	1011.79761	121.88652	0.1274	0.77
31	BB	3.688	49.32427	1011.79041	121.75904	0.1275	0.77
32	BB	3.686	50.32340	1031.32275	124.22057	0.1274	0.77
33	BB	3.685	50.30871	1031.41052	124.21301	0.1275	0.77
34	BB	3.685	50.30393	1031.65076	124.24118	0.1275	0.77
Mean:		3.691	49.82039	1021.31323	123.08142	0.1271	0.78
S.D.:		4.68e-3	4.17260e-1	10.04817	1.26475	6.12e-4	4e-3
RSD :		0.127	8.37529e-1	9.83848e-1	1.02757	0.4918	0.59
95% CI:		2.49e-3	2.22342e-1	5.35429	6.73939e-1	3.26e-4	2e-3

ANEXO N° 8: REPORT DE LAS CORRIDAS CROMATOGRÁFICAS DE ROBUSTEZ

ANEXO N° 9: REPORT DE LAS CORRIDAS CROMATOGRÁFICAS DE REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

Sequence File C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VVXILLOFO\7ROBUSIB 2012-07-21 21-21-35\VI

Statist ic Report

Sequence table: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VVXILLOFO\7ROBUSIB 2012-07-21  
21-21-35\7ROBUSIB.S  
Data directory path: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VVXILLOFO\7ROBUSIB  
21-21-35\  
Operator: K CCOORIMANVA/M.VALVERDE  
Method file name: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VVXILLOFO\7ROBUSIB

Run Location	Inj #	Inj. Date/Time	File Name	Sample Name
1 Vial 1	1	21/07/2012 09:22:20 p.m.	ROBUSIB000001.D	ST
2 Vial 1	1	21/07/2012 09:29:40 p.m.	ROBUSIB000002.D	ST
3 Vial 1	2	21/07/2012 09:37:28 p.m.	ROBUSIB000003.D	ST
4 Vial 1	1	21/07/2012 10:28:16 p.m.	ROBUSIB000010.D	ST
11 Vial 1	1	21/07/2012 11:19:35 p.m.	ROBUSIB000017.D	ST
12 Vial 1	2	21/07/2012 11:27:21 p.m.	ROBUSIB000018.D	ST

Compound: Lidocaina base (Signal: WVD1 A, Wavelength=230 nm)

Run Type	RetTime [min]	Amount [pg/100g]	Area [mAU *s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
1 BB	3.743	49.35180	997.58215	115.95376	0.1310	0.72
2 BB	3.727	49.37626	998.57141	116.30096	0.1293	0.71
3 BB	3.706	49.37400	998.75043	117.04513	0.1287	0.71
4 BB	3.638	49.39060	999.34796	118.97095	0.1271	0.70
11 BB	3.635	49.41947	1000.27502	119.15843	0.1270	0.70
12 BB	3.637	49.39458	999.96464	119.16341	0.1270	0.70

Mean: 3.601 49.38445 999.07860 117.75127 0.1284 0.71  
S.D.: 0.050 2.28426e-2 9.85729e-1 1.52799 1.62e-3 6e-3  
RSD: 1.352 4.6247e-2 9.96638e-2 1.29764 1.2635 0.85  
95% CI: 0.052 2.39719e-2 1.03446 1.60353 1.70e-3 6e-3

Sequence File C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VVXILLOFO\7ROBUSIB 2012-07-21 21-21-35\VI

Statist ic Report

Sequence table: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VVXILLOFO\7ROBUSIB 2012-07-21  
21-21-35\7ROBUSIB.S  
Data directory path: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VVXILLOFO\7ROBUSIB  
21-21-35\  
Operator: K CCOORIMANVA/M.VALVERDE  
Method file name: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\VVXILLOFO\7ROBUSIB

Run Location	Inj #	Inj. Date/Time	File Name	Sample Name
5 Vial 5	1	21/07/2012 10:36:05 p.m.	ROBUSIB000011.D	M1 Lote: 1057652
6 Vial 5	2	21/07/2012 10:42:57 p.m.	ROBUSIB000012.D	M1 Lote: 1057652
7 Vial 6	1	21/07/2012 10:50:43 p.m.	ROBUSIB000013.D	M2 Lote: 1057652
8 Vial 6	2	21/07/2012 10:57:35 p.m.	ROBUSIB000014.D	M2 Lote: 1057652
9 Vial 7	1	21/07/2012 11:05:25 p.m.	ROBUSIB000015.D	M3 Lote: 1057652
10 Vial 7	2	21/07/2012 11:12:15 p.m.	ROBUSIB000016.D	M3 Lote: 1057652

Compound: Lidocaina base (Signal: WVD1 A, Wavelength=230 nm)

Run Type	RetTime [min]	Amount [pg/100g]	Area [mAU *s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
5 BB	3.637	5.07384	1026.61841	122.26653	0.1271	0.70
6 BB	3.637	5.07746	1027.35046	122.20689	0.1272	0.70
7 BB	3.639	5.08196	1031.35645	122.84483	0.1271	0.71
8 BB	3.638	5.08075	1031.11047	122.82642	0.1271	0.70
9 BB	3.636	5.04890	1022.59467	121.89861	0.1270	0.71
10 BB	3.635	5.04499	1021.80408	121.79204	0.1270	0.70

Mean: 3.619 5.06198 1026.80576 122.30589 0.1271 0.70  
S.D.: 1.69e-3 1.65844e-2 4.05762 4.47815e-1 7.43e-5 2e-3  
RSD: 0.047 3.27239e-1 3.95169e-1 3.66143e-1 0.0584 0.30  
95% CI: 1.78e-3 1.74044e-2 4.25821 4.69952e-1 7.79e-5 2e-3

Sequence table: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\TXILOPO\T4\EXACTI1 2012-07-1; 22-16-57\T4EXACTI1.S  
 Data directory path: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\TXILOPO\T4\EXACTI1 2012-07-1; 22-16-57\T4EXACTI1.S  
 Operator: M.VALVERDE/K.COORIMANYA

Method file name: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\TXILOPO\T4\EXACTI1 2012-07-1; 22-16-57\T4EXACTI1.S

Run #	Location	Inj #	Date/Time	File Name	Sample Name
4	Vial 43	1	20/07/2012 03:17:28 a.m.	EXACTI1000043.D	M1 Lote: 1057652
5	Vial 43	2	20/07/2012 03:25:16 a.m.	EXACTI1000043.D	M2 Lote: 1057652
6	Vial 44	1	20/07/2012 03:32:03 a.m.	EXACTI1000044.D	M1 Lote: 1057652
7	Vial 44	2	20/07/2012 03:39:49 a.m.	EXACTI1000044.D	M2 Lote: 1057652
8	Vial 45	1	20/07/2012 03:46:38 a.m.	EXACTI1000045.D	M1 Lote: 1057652
9	Vial 45	2	20/07/2012 03:54:26 a.m.	EXACTI1000045.D	M2 Lote: 1057652
11	Vial 46	1	20/07/2012 04:09:03 a.m.	EXACTI1000049.D	M1 Lote: 1057652
12	Vial 46	2	20/07/2012 04:15:52 a.m.	EXACTI1000050.D	M4 Lote: 1057652
13	Vial 47	1	20/07/2012 04:23:38 a.m.	EXACTI1000051.D	M5 Lote: 1057652
14	Vial 47	2	20/07/2012 04:30:29 a.m.	EXACTI1000052.D	M5 Lote: 1057652
15	Vial 48	1	20/07/2012 04:37:45 a.m.	EXACTI1000053.D	M6 Lote: 1057652
16	Vial 48	2	20/07/2012 04:45:32 a.m.	EXACTI1000054.D	M6 Lote: 1057652

Compound: Lidocaína base (Signal: VMD1 A, Wavelength=230 nm)

Run #	Type	RetTime [min]	Amount [g/100 g]	Area [mAU *s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
4	BB	3.685	5.06403	1040.36853	124.79516	0.1278	0.77
5	BB	3.683	5.06613	1040.80029	124.76645	0.1279	0.77
6	BB	3.683	5.08451	1040.38525	124.85773	0.1278	0.77
7	BB	3.682	5.08800	1041.09839	124.77659	0.1265	0.77
8	BB	3.680	5.00580	1033.61108	123.99561	0.1278	0.77
9	BB	3.682	5.00198	1032.80017	123.79859	0.1265	0.77
11	BB	3.679	5.01949	1034.52087	124.05521	0.1279	0.77
12	BB	3.679	5.01737	1034.06350	123.96049	0.1279	0.77
13	BB	3.683	5.13481	1046.67932	125.54354	0.1278	0.77
14	BB	3.682	5.13881	1047.47449	125.69998	0.1263	0.77
15	BB	3.682	5.03954	1034.47375	123.92475	0.1265	0.77
16	BB	3.680	5.04382	1035.35144	124.13106	0.1279	0.77

Mean: 3.682 5.05869 1038.47059 124.52526 0.1274 0.77  
 S.D.: 1.78e-3 4.64122e-2 5.08050 6.45895e-1 6.98e-4 10e-4  
 RSD: 0.048 9.17475e-1 4.89614e-1 5.18686e-1 0.5483 0.13  
 95% CI: 1.13e-3 2.94689e-2 3.23054 4.10382e-1 4.44e-4 6e-4

Sequence table: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\TXILOPO\T4\EXACTI1 2012-07-1; 22-16-57\T4EXACTI1.S  
 Data directory path: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\TXILOPO\T4\EXACTI1 2012-07-1; 22-16-57\T4EXACTI1.S  
 Operator: M.VALVERDE/K.COORIMANYA

Method file name: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\TXILOPO\T4\EXACTI1 2012-07-1; 22-16-57\T4EXACTI1.S

Run #	Location	Inj #	Date/Time	File Name	Sample Name
1	Vial 42	1	20/07/2012 02:55:35 a.m.	EXACTI1000039.D	ST
2	Vial 42	1	20/07/2012 03:02:51 a.m.	EXACTI1000040.D	ST
3	Vial 42	2	20/07/2012 03:10:38 a.m.	EXACTI1000041.D	ST
10	Vial 42	1	20/07/2012 04:01:14 a.m.	EXACTI1000048.D	ST
17	Vial 42	1	20/07/2012 04:52:21 a.m.	EXACTI1000055.D	ST
18	Vial 42	2	20/07/2012 05:00:10 a.m.	EXACTI1000056.D	ST

Compound: Lidocaína base (Signal: VMD1 A, Wavelength=230 nm)

Run #	Type	RetTime [min]	Amount [g/100 g]	Area [mAU *s]	Height [mAU]	Width [min]	Symm.
1	BB	3.686	49.35180	1006.50128	120.74968	0.1278	0.77
2	BB	3.682	49.35148	1006.49658	120.84547	0.1277	0.77
3	BB	3.682	49.39132	1007.40216	120.83253	0.1264	0.77
10	BB	3.680	49.37722	1007.49164	120.75430	0.1279	0.77
17	BB	3.679	49.40774	1008.40009	120.87298	0.1279	0.77
18	BB	3.679	49.43410	1009.27466	120.93311	0.1279	0.77

Mean: 3.681 49.38398 1007.59440 120.83151 0.1276 0.77  
 S.D.: 2.62e-3 3.22730e-2 1.06812 7.05669e-2 6.09e-4 1e-3  
 RSD: 0.071 6.53512e-2 1.07992e-1 5.84011e-2 0.4769 0.18  
 95% CI: 2.75e-3 3.38689e-2 1.14191 7.40554e-2 6.33e-4 1e-3

## ANEXO N° 10: REPORT DE LAS CORRIDAS CROMATOGRÁFICAS DE PRECISIÓN INSTRUMENTAL

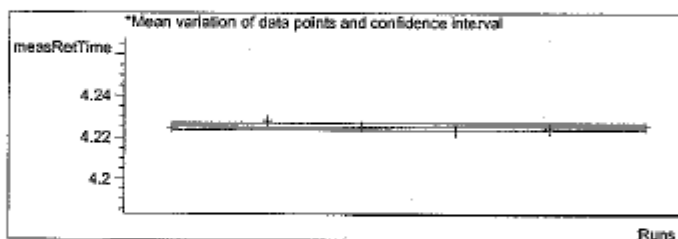
Sequence table: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\TVX... \JPO\T6PRECIN3 2012-07-14  
18-12-32\T6PRECIN3.S  
Data directory path: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\TVXILOPO\T6PRECIN3 2012-07-14  
18-12-32\  
Operator: M.VALVERDE/K.CCORIMANYA  
Method file name: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION DE TECNICAS\TVXILOPO\T6PRECIN3 2012-07-14

Run #	Location #	Inj #	Inj. Date/Time	File Name	Sample Name
1	Vial 85	1	15/07/2012 01:35:23 a.m.	PRECIN3000040.D	ST
2	Vial 85	1	15/07/2012 01:43:40 a.m.	PRECIN3000041.D	ST
3	Vial 85	2	15/07/2012 01:52:33 a.m.	PRECIN3000042.D	ST
4	Vial 85	3	15/07/2012 02:00:16 a.m.	PRECIN3000043.D	ST
5	Vial 85	4	15/07/2012 02:08:34 a.m.	PRECIN3000044.D	ST
6	Vial 85	5	15/07/2012 02:16:52 a.m.	PRECIN3000045.D	ST

Compound: Lidocaina base (Signal: VWD1 A, Wavelength=230 nm)

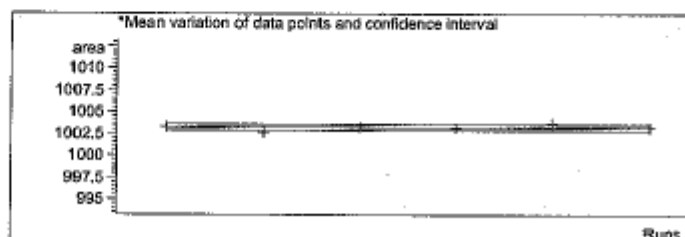
Run #	RetTime [min]
1	4.22462
2	4.22794
3	4.22520
4	4.22347
5	4.22401
6	4.22529

Mean: 4.22509  
S.D.: 0.00156  
RSD: 0.03699  
95% CI: 0.00164



Run #	Peak area [mAU *s]
1	1003.28988
2	1002.68298
3	1003.27606
4	1003.16248
5	1003.67413
6	1003.22961

Mean: 1003.21902  
S.D.: 0.31809  
RSD: 0.03171  
95% CI: 0.33382



ANEXO N° 11: REPORT DE LAS CORRIDAS CROMATOGRÁFICAS DE PRECISI3N INTERMEDIA

Statistic Report

Sequence table: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION TECNICAS\WXILOPO\6PRECINI 2012-07-20  
 21-16-29\6PRECINI.S  
 Data directory path: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION TECNICAS\WXILOPO\6PRECINI 2012-07-20  
 21-16-29\6PRECINI.S  
 Operator: M.VALVERDE

Method file name: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION TECNICAS\WXILOPO\6PRECINI 2012-07-20 21

Run Location	Inj #	Inj. Date/Time	File Name	Sample Name
1 Vial 11	1	20/07/2012 09:34:56 p.m.	PRECINI000003.D	ST
2 Vial 11	1	20/07/2012 09:43:39 p.m.	PRECINI000004.D	ST
3 Vial 11	2	20/07/2012 09:52:22 p.m.	PRECINI000005.D	ST
10 Vial 11	1	20/07/2012 10:53:27 p.m.	PRECINI000012.D	ST
17 Vial 11	1	20/07/2012 11:54:33 p.m.	PRECINI000019.D	ST
18 Vial 11	1	21/07/2012 12:03:17 a.m.	PRECINI000020.D	ST

Compound: Lidocaina base (Signal: DADI A, Sig=230,4 Ref=off)

Run Type	RetTime [min]	Amount [g/100g]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Width [min]	Width Symm.
1 BB	3.760	49.65910	966.18329	121.89228	0.1205	0.81
2 BB	3.759	49.65504	966.41449	121.91924	0.1205	0.81
3 BB	3.759	49.64509	966.18176	121.77953	0.1206	0.81
10 BB	3.754	49.68644	967.48865	121.96334	0.1225	0.80
17 BB	3.751	49.73326	968.61597	122.09050	0.1206	0.80
18 BB	3.752	49.75320	969.41071	122.22562	0.1205	0.80

Mean: 3.756 49.68869 967.38248 121.97842 0.1209 0.81  
 S.D.: 3.91e-3 4.64938e-2 1.37574 1.57119e-1 8.28e-4 5e-3  
 RSD: 0.104 9.35703e-2 1.42212e-1 1.29301e-1 0.6850 0.67  
 95% CI: 4.116e-3 4.87923e-2 1.44375 1.63516e-1 8.69e-4 6e-3

Statistic Report

Sequence table: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION TECNICAS\WXILOPO\6PRECINI 2012-07-20  
 21-16-29\6PRECINI.S  
 Data directory path: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION TECNICAS\WXILOPO\6PRECINI 2012-07-20  
 21-16-29\6PRECINI.S  
 Operator: M.VALVERDE

Method file name: C:\CHEM32\2\DATA\VALIDACION TECNICAS\WXILOPO\6PRECINI 2012-07-20 21

Run Location	Inj #	Inj. Date/Time	File Name	Sample Name
4 Vial 12	1	20/07/2012 10:01:06 p.m.	PRECINI000006.D	M1 Lote: 1057652
5 Vial 12	2	20/07/2012 10:09:49 p.m.	PRECINI000007.D	M1 Lote: 1057652
6 Vial 13	1	20/07/2012 10:18:33 p.m.	PRECINI000008.D	M2 Lote: 1057652
7 Vial 13	2	20/07/2012 10:27:16 p.m.	PRECINI000009.D	M2 Lote: 1057652
8 Vial 14	1	20/07/2012 10:36:00 p.m.	PRECINI000010.D	M3 Lote: 1057652
9 Vial 14	2	20/07/2012 10:44:44 p.m.	PRECINI000011.D	M3 Lote: 1057652
11 Vial 15	1	20/07/2012 11:02:11 p.m.	PRECINI000013.D	M4 Lote: 1057652
12 Vial 15	2	20/07/2012 11:10:55 p.m.	PRECINI000014.D	M4 Lote: 1057652
13 Vial 16	1	20/07/2012 11:19:39 p.m.	PRECINI000015.D	M5 Lote: 1057652
14 Vial 16	2	20/07/2012 11:28:22 p.m.	PRECINI000016.D	M5 Lote: 1057652
15 Vial 17	1	20/07/2012 11:37:06 p.m.	PRECINI000017.D	M6 Lote: 1057652
16 Vial 17	2	20/07/2012 11:45:50 p.m.	PRECINI000018.D	M6 Lote: 1057652

Compound: Lidocaina base (Signal: DADI A, Sig=230,4 Ref=off)

Run Type	RetTime [min]	Amount [g/100g]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Width [min]	Width Symm.
4 BB	3.755	5.10504	995.52307	125.21888	0.1228	0.81
5 BB	3.755	5.10644	995.79486	125.23373	0.1228	0.81
6 BB	3.754	5.10608	1000.73938	125.80936	0.1228	0.81
7 BB	3.755	5.09116	997.81519	125.53639	0.1227	0.81
8 BB	3.753	5.04935	988.62610	124.36833	0.1207	0.81
9 BB	3.752	5.05406	989.54712	124.37067	0.1208	0.81
11 BB	3.753	5.04933	994.94147	125.46974	0.1205	0.80
12 BB	3.753	5.05216	995.49666	125.49716	0.1205	0.80
13 BB	3.753	5.03552	963.92749	121.50123	0.1206	0.80
14 BB	3.752	5.04002	964.78921	121.63668	0.1205	0.80
15 BB	3.752	5.03355	957.69777	120.76965	0.1205	0.80
16 BB	3.752	5.03221	957.64319	120.70048	0.1206	0.80

Mean: 3.753 5.06291 983.56187 123.84227 0.1215 0.81  
 S.D.: 1.29e-3 3.01088e-2 17.03679 2.04839 1.09e-3 3e-3  
 RSD: 0.034 5.91694e-1 1.73215 1.65403 0.8944 0.41  
 95% CI: 8.18e-4 1.91302e-2 10.82466 1.30148 6.90e-4 2e-3