

Validación de la Prueba de Disolución de Isotretinoína en Cápsula Blanda

Daniel Alejandro Eraso Delgado

Universidad de Nariño

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Programa de Química

San Juan de Pasto, Colombia

2020

Validación de la Prueba de Disolución de Isotretinoína en Cápsula Blanda

Daniel Alejandro Eraso Delgado

Directora:

Viviana Cristina Morales Andrade

B. Sc., de Química

Co-director:

Juan Camilo Vargas Gallego

M. Sc., Ciencias Químicas

Universidad de Nariño

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Programa de Química

San Juan de Pasto, Colombia

2020

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva del autor”

Artículo 1º del acuerdo No 324 de octubre de 1966, emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

Viviana Cristina Morales Andrade

Director

Juan Camilo Vargas Gallego

Codirector

Dairo Andrés Portillo Estrada

Jurado 1

Henry Escobar Pérez

Jurado 2

San Juan de Pasto, 22 de febrero de 2020

AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia por el apoyo incondicional, en especial a mi mamá por siempre confiar en mí y a mi tía Diana Lorena por todos sus consejos a lo largo de este proceso y toda mi vida.

Agradezco a todos los profesores que ayudaron en mi proceso de aprendizaje y en el entendimiento de esta extraordinaria ciencia, pero sobre todo, agradezco a quienes desde su discurso motivaron en mí el deseo de ser una mejor persona.

Agradezco a todas las personas con quienes tuve el placer de compartir durante estos años.

Agradezco de manera especial a Carolina, por todo el apoyo y compañía brindados tanto en mi vida académica como personal.

Agradezco a mis compañeros Carlos y Andrés, con quienes compartí muy buenos momentos y fueron de gran importancia a lo largo de mi estancia en la universidad, sin ellos esto no habría sido lo mismo.

DEDICATORIA

A mi madre con todo mi amor, quien me ha apoyado incondicionalmente en todas mis decisiones y ha depositado su entera confianza en mí. Esto es por ti.

RESUMEN

En el presente estudio se realizó el desarrollo y la validación del ensayo de disolución para el producto “isotretinoína 20 mg” en cápsula blanda siguiendo los lineamientos de la USP/ICH. El ensayo de disolución se realizó en un disolutor VANKEL VK-700 y el análisis de las muestras se hizo mediante RP-HPLC.

Se realizó el desarrollo de la prueba de disolución bajo las especificaciones descritas en la monografía de la isotretinoína y en los capítulos 711 (disolución) y 1092 (procedimiento de disolución: desarrollo y validación) de la USP 41; las condiciones cromatográficas se obtuvieron para el cumplimiento de los parámetros establecidos por el laboratorio (platos teóricos, asimetría, RSD de las respuestas y factor de capacidad) con el fin de satisfacer el alcance requerido.

Para el método descrito se evaluó selectividad en condiciones normales y en condiciones de estrés; la linealidad del sistema y del método en el rango de 50% hasta el 150% (11,1 - 33,3 µg/mL) de activo disuelto, obteniendo una relación lineal significativa ($R^2 > 0,99$); la exactitud se evaluó desde el 75% hasta el 125% (16,25 - 17,65 µg/mL) de activo disuelto, demostrando que no existe una diferencia significativa entre el porcentaje de activo recuperado y el 100%, por lo tanto, no existe efecto matriz; para la precisión intermedia se realizó un ANOVA factorial para demostrar que los factores (día y analista) no influyen en los resultados.

La robustez fue evaluada usando el diseño de Placket y Burman, demostrando que el método es robusto para cambios en el medio de disolución y en las condiciones del análisis cromatográfico. Además, se avaluó el filtrado de las muestras y se demostró la estabilidad de las soluciones (estándar y muestra) durante un periodo de 24 horas.

Palabras Clave: ensayo de disolución, isotretinoína, validación, HPLC, USP, ICH.

ABSTRACT

Dissolution test development and validation to soft capsule “isotretinoin 20 mg” following USP and ICH guidelines was done. Dissolution test was carried out using a dissolution apparatus VANKEL VK – 700 and a RP-HPLC for samples analysis.

The dissolution test was developed according to USP specifications in the isotretinoin monograph, chapter 711 (dissolution) and chapter 1092 (dissolution procedure: development and validation); The chromatographic conditions were set to fulfill laboratory parameters (theoretical plates, asymmetry, RSD of responses (areas) and capacity factor) in order to satisfy the required scope.

For method, selectivity in normal and stress conditions were evaluated, system and method linearity were tested from 50 % to 150 % range (11.1 – 33.1 µg/mL dissolved active), a significant linear relationship was obtained ($R^2 > 0.99$); accuracy was tested from 75 % to 125 % range (16.25 - 17.65 µg/mL dissolved active) it showed there is no significant difference between recovery percentages and 100 %, therefore, there's no matrix effect; to intermediate precision, a factorial ANOVA was performed for demonstrate factors both day and analyst do not influence into results.

Using a Placket and Burman design, robustness was proven. Results showed that method is robust for changes both dissolution medium and chromatographic conditions. In addition, filtered suitability, stability for both standard and sample solution were demonstrated for 24 hours.

Key words: dissolution testing, isotretinoin, validation, HPLC, USP, ICH.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción	19
Objetivos	20
Objetivo General	20
Objetivos Específicos.....	20
Marco referencial	21
Isotretinoína	21
Disolución <i>in vitro</i>	21
Disolutor	22
Prueba de disolución	22
Medio de disolución.....	23
Cromatografía	24
Cromatografía de líquidos (HPLC).....	25
Cromatografía de fase reversa (RP-HPLC)	28
Cromatografía en fase normal (NP-HPLC)	29
Cuantificación en HPLC	30
Antecedentes	31
Validación de métodos analíticos	32
Idoneidad del sistema (System Suitability Test).....	34
Selectividad.....	34
Rango	35
Linealidad	35
Límite de detección y cuantificación	38
Exactitud / Recuperación	39
Efecto matriz	39
Precisión.....	40
Robustez.....	41
Incertidumbre	42

Detección de valores atípicos usando el rango intercuartil (IQR)	43
Materiales y métodos	44
Valoración del lote granel isotretinoína 20 mg.....	44
Equipos, sustancias de referencia y reactivos utilizados para la prueba de disolución	45
Sistema cromatográfico	46
Disolutor	47
Métodos.....	48
Obtención de las condiciones de la prueba de disolución.....	48
Condiciones de la prueba de disolución y el análisis cromatográfico	49
Criterios estadísticos de los parámetros de validación	50
Idoneidad del Sistema (SST)	51
Selectividad.....	51
Linealidad	53
Límite de detección y límite de cuantificación	53
Exactitud	53
Efecto matriz	54
Precisión.....	54
Robustez.....	55
Resultados y Discusión	56
Obtención de las condiciones de la prueba de disolución.....	56
Condiciones cromatográficas.....	56
Condiciones de la prueba de disolución.....	57
Ensayo de disolución	58
Análisis por HPLC.....	60
Valoración del lote granel isotretinoína 20 mg.....	61
Validación del ensayo de disolución.....	62
Idoneidad del sistema (SST)	62
Selectividad.....	63
Linealidad	72

Exactitud	78
Efecto matriz	81
Precisión (Repetibilidad)	81
Precisión intermedia.....	82
Robustez.....	84
Incertidumbre	88
Detección de datos atípicos IQR.....	93
Conclusiones	94
Recomendaciones	95
Referencias.....	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular de la isotretinoína	21
Figura 2. Esquema de vaso y paleta en ensayo de disolución	22
Figura 3. Estructura química de la sílice.....	25
Figura 4. Esquema de HPLC	26
Figura 5. Separación cromatográfica de dos sustancias.....	27
Figura 6. Pico cromatográfico asimétrico	28
Figura 7. Solventes utilizados en RP-HPLC.....	29
Figura 8. Tipos de efecto matriz	39
Figura 9. Diagrama de espina de pescado de las diferentes contribuciones de la incertidumbre total	43
Figura 10. HPLC HITACHI L-7000 Series.....	46
Figura 11. Disolutor VANKEL VK-700	47
Figura 12. Estructura química de la cadena polipeptídica de la gelatina presente en el envoltente de las unidades de dosificación.....	59
Figura 13. Ataque nucleofílico de los aminoácidos presentes en los sitios activos de las proteasas a los carbonos carbonílicos de enlaces peptídicos	59
Figura 14. Estructura ionizada de la isotretinoína y Estructura del surfactante CTAB.....	60
Figura 15. Isotretinoína, tretinoína y octadecilsilano (fase estacionaria).	61
Figura 16. Selectividad en condiciones normales - Cromatogramas superpuestos de estándar isotretinoína, estándar tretinoína, medio de disolución y fase móvil.....	63
Figura 17. Selectividad en condiciones normales – Cromatograma de solución estándar combinado isotretinoína-tretinoína.	63
Figura 18. Cromatograma de la solución placebo-envoltente.....	64
Figura 19. Degradaciones de la solución placebo: ácida, básica, oxidativa y fotolítica.....	65
Figura 20. Degradación ácida de la solución producto.....	66
Figura 21. Degradación básica de la solución producto	66
Figura 22. Degradación oxidativa de la solución producto	67
Figura 23. Degradación fotolítica de la solución producto.....	67
Figura 24. Isomerización de la isotretinoína para producir tretinoína.	69
Figura 25. Reacción de “physical quenching” que produce la conversión de isómeros cis-trans del analito, mediante una reacción de transferencia de energía entre el ion radical oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y el analito	69
Figura 26. Producción de radicales hidroxilo mediante la ruptura homolítica del enlace oxígeno-oxígeno de la molécula de peróxido de hidrógeno	70

Figura 27. Algunas de las reacciones en cadena que pueden presentarse vía radicales libres	70
Figura 28. Reacción de formación de epóxidos a partir del radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$)	71
Figura 29. Algunos productos de degradación de la autooxidación del β -caroteno	71
Figura 30. Curva de calibración de la linealidad del sistema correspondiente al promedio de las áreas obtenidas para cada nivel	75
Figura 31. Curva de calibración de la linealidad del método correspondiente al promedio de las áreas obtenidas para cada nivel	78
Figura 32. Intervalos de confianza para la media en los niveles de concentración evaluados	80
Figura 33. Diagrama de espina de pescado con las diferentes contribuciones de incertidumbre al valor del mesurando (porcentaje de activo disuelto)	89
Figura 34. Contribución de los factores: balanza (masa), pureza del estándar, balón 10 mL, balón 50 mL, pipeta 1 mL, probeta 1L; al valor de incertidumbre $u(\text{recuperación})$	91
Figura 35. Contribución del sesgo, precisión intermedia y $u(\text{recuperación})$ al valor de la incertidumbre combinada (u_c)	92

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Enzimas y sus condiciones de uso para el ensayo de disolución.	24
Tabla 2. Ejemplos de surfactantes utilizados en el ensayo de disolución.	24
Tabla 3. Serie eluotrópica.	30
Tabla 4. Parámetros a ser validados en el ensayo de disolución.	33
Tabla 5. Contraste e hipótesis de las pruebas t-student para la recta de regresión.	37
Tabla 6. Diseño experimental para 7 variables en un estudio según Placket y Burman.	41
Tabla 7. Sustancias de referencia y reactivos utilizados en la validación.	45
Tabla 8. Equipos utilizados en la validación.	45
Tabla 9. Descripción del cromatógrafo utilizado para la validación.	46
Tabla 10. Características del disolutor VANKEL VK – 700.	47
Tabla 11. Condiciones cromatográficas y de la prueba de disolución.	49
Tabla 12. Criterios estadísticos de los parámetros de validación.	50
Tabla 13. Fórmula del producto isotretinoína 20 mg en cápsula blanda.	51
Tabla 14. Resultados de la idoneidad del sistema.	62
Tabla 15. Criterios para la idoneidad del sistema (SST).	62
Tabla 16. Criterios de aceptación de la selectividad en condiciones normales.	64
Tabla 17. Criterios para la selectividad en condiciones de estrés.	65
Tabla 18. Porcentajes de degradación de la isotretinoína en condiciones de estrés.	68
Tabla 19. Daño de acuerdo al porcentaje de analito alterado (degradado).	68
Tabla 20. Niveles de concentración y las respectivas áreas promedio para cada una de las curvas.	72
Tabla 21. Coeficientes de correlación, determinación y sus respectivos criterios.	72
Tabla 22. Análisis de residuos de la recta de regresión lineal del sistema.	73
Tabla 23. Prueba t-student, intervalos de confianza de la pendiente e intercepto y sus respectivos criterios de aceptación.	74
Tabla 24. Análisis de residuos de la recta de regresión lineal del método.	76
Tabla 25. Resultados de las pruebas de verificación de la linealidad del método y su respectivo criterio de aceptación.	77
Tabla 26. Resultados del análisis de la exactitud y test t-student.	79
Tabla 27. Intervalos de confianza al 95% para los niveles evaluados en la exactitud.	80
Tabla 28. Resultado y criterio de aceptación de la repetibilidad del sistema.	81
Tabla 29. Resultados de repetibilidad del método.	82
Tabla 30. Resultados de la precisión intermedia para diferente día y diferente analista en términos de porcentaje de recuperación.	83

Tabla 31. Resultados del análisis de varianza ANOVA para evaluar la precisión intermedia.	84
Tabla 32. Condiciones normales y modificadas de análisis para evaluar la robustez.	84
Tabla 33. Diseño de Placket y Burman para evaluar la robustez del método.	85
Tabla 34. Resultados del análisis de las muestras para evaluar robustez.	85
Tabla 35. Cálculo de la influencia de los parámetros seleccionados para evaluar robustez.	86
Tabla 36. Resultados de la evaluación del filtrado en las muestras.	87
Tabla 37. Resultados de la estabilidad de la solución estándar.	87
Tabla 38. Resultados de la estabilidad de la muestra.	88
Tabla 39. Cálculo de u (recuperación).	90
Tabla 40. Cálculo de la incertidumbre combinada u_c e incertidumbre expandida (U).	91
Tabla 41. Prueba IQR para detección de datos atípicos.	93

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Calculo de valoración del lote M0879 de isotretinoína 20 mg en cápsula blanda.	98
Anexo B. Certificados del material de referencia USP: isotretinoína y tretinoína.	100
Anexo C. Certificados de calibración de la balanza analítica y el material volumétrico.	108

GLOSARIO

The International Council for Harmonisation (ICH): En español, consejo internacional de armonización, es un proyecto que reúne a las autoridades reguladoras de medicamentos en Europa, Japón, Estados Unidos de América y las farmacéuticas para discutir aspectos científicos y técnicos del registro de productos farmacéuticos (International Council of Harmonisation s/f).

Ensayo de disolución: prueba de disolución.

Excipiente: sustancia inactiva que incorpora el activo en una forma farmacéutica (United States Pharmacopeial Convention 2018).

Fármaco, principio activo o activo (API): Es cualquier componente que proporciona actividad farmacológica u otro efecto directo en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedades, o para afectar la estructura o cualquier función del cuerpo del hombre o los animales (U.S. Food and drug administration 2017).

Food and Drug Administration (FDA): Es la agencia del gobierno de los Estados Unidos responsable de la regulación de alimentos, medicamentos, cosméticos, aparatos médicos, productos biológicos y derivados sanguíneos (U.S. Food and drug administration 2018).

Forma farmacéutica o forma de dosificación: es una combinación de uno o más fármacos y/o excipientes para facilitar la dosificación, administración y liberación del medicamento en el paciente (United States Pharmacopeial Convention 2018).

Materias primas: en este documento, el término se refiere a las sustancias que componen los excipientes y envoltorio de una forma farmacéutica.

Método del placebo adicionado: Método usado para la preparación de muestras de manera artificial a partir de la mezcla de las materias primas y los activos presentes en el producto terminado ().

Placebo: en este documento, el término se refiere a los excipientes.

Solución estándar: Solución preparada utilizando sustancias de referencia (o estándares).

Solución placebo-envoltorio: Solución preparada utilizando las materias primas que constituyen el producto terminado excluyendo el principio activo.

Solución producto: Solución preparada a partir del contenido de las cápsulas de un lote específico de producto.

Solución Stock: Solución de mayor concentración a partir de la cual se hacen las diluciones correspondientes para alcanzar la concentración del analito de interés.

Sustancia de referencia o estándar: Es aquella sustancia que es empleada como referencia para efectuar una determinación cuantitativa o cualitativa. Son aquellos materiales que han sido sometidos a una serie de pruebas analíticas extensas, siendo éstos un material auténtico de pureza conocida (United States Pharmacopeial Convention 2018).

United States Pharmacopeia (USP): Farmacopea de los Estados Unidos. Es la farmacopea oficial de los Estados Unidos, publicada junto con el National Formulary (formulario nacional de medicamentos) como la USP-NF. La USP establece por escrito normas de referencia para los medicamentos, los ingredientes alimentarios, suplementos dietéticos y sus ingredientes. Estas normas son utilizadas por los organismos reguladores y fabricantes para ayudarles a garantizar que estos productos son de la identidad adecuada, así como la fuerza, calidad, pureza y consistencia (United States Pharmacopeial Convention 2018).

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ACN	Acetonitrilo
AEFI	Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria
As	Asimetría
BPL	Buenas prácticas de laboratorio
Conc.	Concentración
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
FDA	Food and Drug Administration
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
Ho	Hipótesis nula
Hi	Hipótesis alterna
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
ICH	International Council on Harmonisation
k'	Factor de capacidad
n	Número total de datos
N	Platos teóricos (teorical plates)
NaOH	Hidróxido de sodio
NP-HPLC	Normal phase - high performance liquid chromatography
MeOH	Metanol
mL/min	Mililitros por minuto
POE	Procedimiento operativo estándar
ROS	Reactive Oxygen Species
RP-HPLC	Reverse phase – high performance liquid chromatography
RPM	Revoluciones por minuto
Rs	Resolución

RSD	Relative Standard Deviation - Desviación estándar relativa
S	Desviación estándar
Sa	Desviación estándar del intercepto
Sb	Desviación estándar de la pendiente
Sy,x	Estadístico estimador de errores aleatorios en la dirección Y.
SST	System Suitability Test (Idoneidad del sistema)
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta
VIS	Visible
$\bar{X}$	Media aritmética
Σ	Sumatoria

INTRODUCCIÓN

La calidad de un producto farmacéutico y el hecho de que genere un efecto terapéutico adecuado, se encuentra ligado directamente a su comportamiento farmacocinético, que a su vez depende de los aspectos fisicoquímicos de las formas de dosificación (cápsulas, tabletas, etc.), es por ello que es de especial importancia realizar pruebas como identificación, valoración y ensayo de disolución al producto, para poder demostrar durante su tiempo de vida útil un grado de calidad y desempeño adecuados (dentro de las especificaciones requeridas) (Talevi, Quiroga, y Ruiz 2016).

El ensayo de disolución es el análisis más ampliamente utilizado en los laboratorios de productos farmacéuticos; mediante el, se determina la liberación de un principio activo en un medio de prueba (cuantificando la cantidad de activo disuelto) a partir de la forma de dosificación que lo contiene (Cordoba y Arriola 2011). Los resultados obtenidos mediante el ensayo de disolución se relacionan directamente con la velocidad de absorción del activo en el organismo y por lo tanto evalúa el desempeño biofarmacéutico del producto (Talevi et al. 2016). Además, si a la relevancia de los resultados se le suma el bajo coste del análisis, se entiende por qué el ensayo de disolución es en una herramienta irremplazable en la actualidad.

Al momento de establecer una metodología analítica para realizar el ensayo de disolución del medicamento isotretinoína 20 mg en cápsula blanda, se presentan algunos inconvenientes: la isotretinoína (el principio activo del medicamento) tiene una solubilidad muy baja en agua, lo que dificulta su disolución durante el ensayo; el envoltente del medicamento presenta el fenómeno de entrecruzamiento, con lo cual la cubierta se hace virtualmente insoluble en un medio acuoso. A lo anterior, se suma el hecho de que la metodología debe ser lo suficientemente robusta como para analizar muestras que se encuentren en estudios de estabilidad, los cuales consisten en someter las muestras a altas temperaturas y altos niveles de humedad durante largos periodos de tiempo (meses e incluso años), lo que conlleva (en la mayoría de los casos) a la formación de otros compuestos en la muestra que pueden interferir con la cuantificación del activo al momento del análisis.

Con base en lo anterior, el presente proyecto planteó establecer las condiciones del ensayo de disolución del medicamento isotretinoína 20 mg, haciendo uso de surfactantes, enzimas y técnicas cromatográficas (RP-HPLC) para resolver los inconvenientes de la metodología; además, evaluar los resultados obtenidos por la metodología mediante principios estadísticos adecuados. Todo lo anterior, siguiendo los lineamientos descritos por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) y las guías de validación de métodos analíticos publicadas por la International Council for Harmonisation (ICH).

OBJETIVOS

Objetivo General

Validar un método para la prueba de disolución de isotretinoína 20 mg en cápsula blanda bajo los requerimientos del laboratorio Quality Farma Análisis SAS.

Objetivos Específicos

- Establecer las condiciones de análisis para la prueba de disolución de isotretinoína 20 mg en cápsula blanda para la realización del método en el laboratorio Quality Farma Análisis SAS.
- Documentar un protocolo de validación para el laboratorio Quality Farma Análisis SAS, en el que se describa el procedimiento de la validación de la prueba de disolución de isotretinoína 20 mg en cápsula blanda.
- Validar los parámetros de idoneidad del sistema (SST), selectividad, linealidad, exactitud, repetibilidad, precisión intermedia, robustez e incertidumbre de la prueba de disolución de isotretinoína en cápsula blanda según los requerimientos establecidos por el laboratorio Quality Farma Análisis SAS.
- Documentar un procedimiento operativo estándar (POE) para el laboratorio Quality Farma Análisis SAS, en el que se describa los pasos necesarios para realizar la prueba de disolución de isotretinoína 20 mg en cápsula blanda en los ensayos de rutina del laboratorio.

MARCO REFERENCIAL

Isotretinoína

Es el ácido 13-cis-retinoico (Figura 1), el cual se encuentra relacionado con el ácido retinoico y el retinol (vitamina A). Es un polvo cristalino de color amarillo a naranja, su peso molecular es 300,44 u (U.S. Food and drug administration 2010).

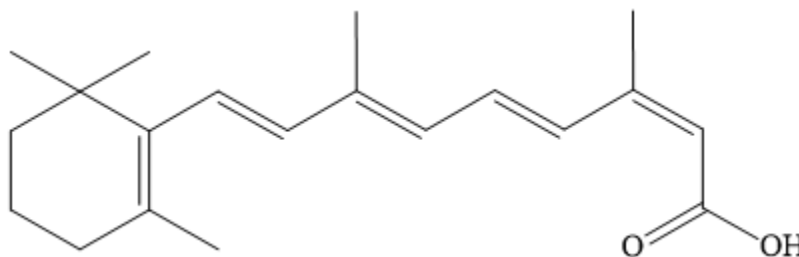


Figura 1. Estructura molecular de la isotretinoína. Tomado de: U.S. Food and drug administration 2010.

La isotretinoína es un retinoide que, cuando se administra en dosis farmacológicas de 0,5 a 1,0 mg / kg / día, inhibe la función de las glándulas sebáceas y la queratinización, este mecanismo exacto de acción es desconocido. La mejoría clínica en pacientes con acné nodular ocurre en asociación con una reducción en la secreción de sebo, que se encuentra relacionada con la dosis y la duración del tratamiento con isotretinoína, reflejando una reducción en el tamaño de las glándulas sebáceas y una inhibición de la diferenciación de las mismas. (U.S. Food and drug administration 2010).

La isotretinoína fue sintetizada en 1955, sin embargo solo hasta 1973 fue usada para tratar la psoriasis en Europa (Li et al. 2012); aparte del tratamiento de enfermedades en el campo de la dermatología, la isotretinoína se ha utilizado para combatir diferentes tipos de cáncer utilizando una terapia de combinación con interferón α -2a para tratar con éxito el carcinoma de células renales, el cáncer de próstata metastásico, el carcinoma recurrente de la cabeza y cuello, y el carcinoma de células escamosas recurrente del cuello uterino (Ellis y Krach 2001).

Disolución *in vitro*

La disolución es uno de los ensayos realizados para el control de calidad de un producto farmacéutico, ya que la velocidad de disolución de un principio activo contenido en una forma de dosificación sólida (comprimido o cápsula) se encuentra relacionada directamente con el desempeño biofarmacéutico del producto. Salvo contadas excepciones, todo principio activo debe disolverse para poder presentar absorción, puesto que antes de cruzar una membrana biológica deberá ser solubilizado en los líquidos que la recubren. En consecuencia, la velocidad a la que el

principio activo se disuelve en el tracto gastrointestinal a partir de la forma dosificación frecuentemente se correlaciona con la velocidad de su absorción sistémica, por lo que el ensayo *in vitro* se encuentra fuertemente relacionado a la biodisponibilidad *in vivo* de dicho medicamento (Talevi et al. 2016).

Muchos métodos e instrumentos han sido reportados para la realización de la disolución *in vitro* de las diferentes formas de dosificación, todos implican proporcionar una interfaz renovable sólido-líquido entre la forma de dosificación y el fluido de disolución, garantizando que pueda definirse, controlarse y, por lo tanto, sea repetible. El equipo comúnmente utilizado se conoce como disolutor (Talevi et al. 2016).

Disolutor

El equipo consta comúnmente de seis vasos, con o sin tapa de vidrio u otro material inerte; un motor; un eje propulsor metálico y una paleta (Figura 2) (compuesta por un aspa metálica o de cualquier material inerte) que forman una unidad, se encuentra parcialmente sumergido en un baño de agua, cuyo vaso es cilíndrico y de fondo semiesférico (aparato 2 USP - paletas) (United States Pharmacopeial Convention 2018).

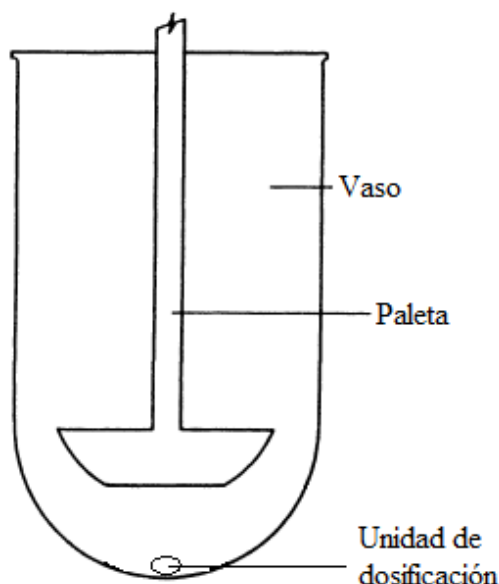


Figura 2. Esquema de vaso y paleta en ensayo de disolución. Tomado de: United States Pharmacopeial Convention 2018.

Prueba de disolución

El vaso contiene el medio de disolución, el cual es una solución con características definidas (con cierto pH, concentración de enzimas, concentración de surfactantes o bien con una concentración

establecida de un ácido o base fuerte) que ayuda a la disolución del principio activo de la unidad de dosificación. Durante el transcurso de la prueba, el baño de agua mantiene la temperatura del medio de disolución en el interior del vaso a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se deja que la unidad de dosificación baje hasta el fondo del vaso (en el caso de utilizar paletas, Figura 2) antes de empezar la rotación. Se enciende el motor que gira la paleta, la cual garantiza que el fluido del baño se mantenga en movimiento suave, constante y sin fluctuaciones significativas que pudieran afectar los resultados. Se emplea un dispositivo para regular y mantener la velocidad de rotación del eje propulsor con una aproximación de $\pm 4\%$, las velocidades por fuera del intervalo 25 – 150 rpm no son apropiadas debido a la falta de uniformidad en el mezclado ocasionadas por un mezclado demasiado rápido o demasiado lento (United States Pharmacopeial Convention 2018).

Después de transcurrido un tiempo determinado en el disolutor, se retiran alícuotas de cada uno de los vasos, de las que posteriormente se analiza la concentración del principio activo disuelto en el medio, mediante un espectrofotómetro UV/VIS o mediante HPLC (United States Pharmacopeial Convention 2018).

Medio de disolución

Los medios típicos para disolución pueden incluir los siguientes elementos (no se mencionan en orden de preferencia): ácido clorhídrico diluido, soluciones amortiguadoras (fosfato o acetato) en el rango de pH fisiológico de 1,2 - 7,5 unidades de pH, fluido gástrico o intestinal simulados (con o sin enzimas) y agua. Para algunos fármacos, la incompatibilidad del fármaco con algunas soluciones amortiguadoras o sales puede influir en la selección de la solución amortiguadora (United States Pharmacopeial Convention 2018).

Las soluciones acuosas (soluciones ácidas o amortiguadoras) pueden contener un porcentaje de un surfactante para aumentar la solubilidad del fármaco, por ejemplo: dodecilsulfato de sodio, polisorbato u óxido de lauril dimetilamina (United States Pharmacopeial Convention 2018).

Uso de enzimas en el medio de disolución

Cuando se observa en el ensayo de disolución que la forma farmacéutica que contiene gelatina en el envoltorio presenta dificultad en su disolución o no se disuelve (y por lo tanto afecta el porcentaje de activo disuelto durante el ensayo), se debe a que el envoltorio presenta un fenómeno conocido como entrecruzamiento. El entrecruzamiento es una serie de enlaces químicos más fuertes que los encontrados habitualmente en las cadenas polipeptídicas de la gelatina (enlaces peptídicos) (Figura 12) (United States Pharmacopeial Convention 2018).

Para contrarrestar el fenómeno del entrecruzamiento, pueden utilizarse diferentes enzimas dependiendo del pH al que se encuentre el medio de disolución (Tabla 1).

Tabla 1. Enzimas y sus condiciones de uso para el ensayo de disolución. Tomado de: United States Pharmacopeial Convention 2018.

Enzima	Rango de pH	Concentración límite establecida por la USP
Pepsina	Menor o igual a 4,0	Actividad no mayor a 750 000 Unidades/L
Papaína	Entre 4,0 y 6,8	Actividad no mayor a 550 000 unidades/L
Pancreatina	Mayor o igual a 6,8	Actividad de proteasa no mayor a 2000 unidades/L

Uso de surfactantes en el medio de disolución

Se pueden usar en el medio agentes tensoactivos, agentes de dispersión o mejoradores de la solubilidad cuando el relleno de la cápsula, el ingrediente activo, o ambos, sean hidrófobos o insolubles en agua (United States Pharmacopeial Convention 2018). Se muestran ejemplos de estas sustancias en la siguiente tabla.

Tabla 2. Ejemplos de surfactantes utilizados en el ensayo de disolución. Modificado de: United States Pharmacopeial Convention 2018.

Característica	Surfactante
Aniónicos	Dodecil sulfato de sodio (SDS) Sales biliares
Catiónicos	Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) Cloruro de metilbencetonio (Hyamine™)
No iónicos	Polisorbatos (Tween™) N-óxido de N,N-dimetildodecilamina Ciclodextrinas
Zwitterión	Óxido de lauril dimetil amina (DDAO) Lecitina

Al seleccionar el surfactante se debe tener en cuenta que puede afectar la solubilidad de la gelatina e incluso inhibir enzimas (United States Pharmacopeial Convention 2018).

Cromatografía

Las técnicas cromatográficas son métodos de separación en las cuales una mezcla de analitos es distribuida en dos fases, una de las cuales es la estacionaria y la otra móvil. La fase estacionaria puede ser sólida, porosa, o un material con superficie activa en partículas pequeñas. La fase estacionaria puede estar empacada en una columna o extendida como una capa. La fase móvil puede ser gaseosa o líquida o un fluido supercrítico (Meyer 2010).

Cromatografía de líquidos (HPLC)

Actualmente conocida como cromatografía líquida de alta resolución o alta eficiencia (High Performance Liquid Chromatography), es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida (empacada en una columna de acero inoxidable) y una fase móvil líquida. Esta técnica ha tenido una gran difusión desde comienzos de la década de los 70's y hoy representa una de las herramientas más empleadas en el laboratorio analítico moderno, ya sea para investigación o para análisis en la industria (Quattrocchi, Abelaira, y Laba 1992).

El proceso de separación puede basarse en procesos fisicoquímicos como la adsorción, partición, intercambio iónico, afinidad o tamaño molecular. Las fases estacionarias más comunes son la sílice modificada, las cuales consisten en reemplazar los grupos hidroxilo (-O-H) en la superficie de la sílice por otros sustituyentes mediante reacciones químicas para obtener fases estacionarias con propiedades específicas (Figura 3). La fase móvil es un disolvente o mezcla de disolventes (United States Pharmacopeial Convention 2018). Según la naturaleza de la fase móvil y los disolventes usados, las técnicas más conocidas de cromatografía líquida son: la cromatografía en fase reversa (RP-HPLC) y la cromatografía en fase normal (NP-HPLC).

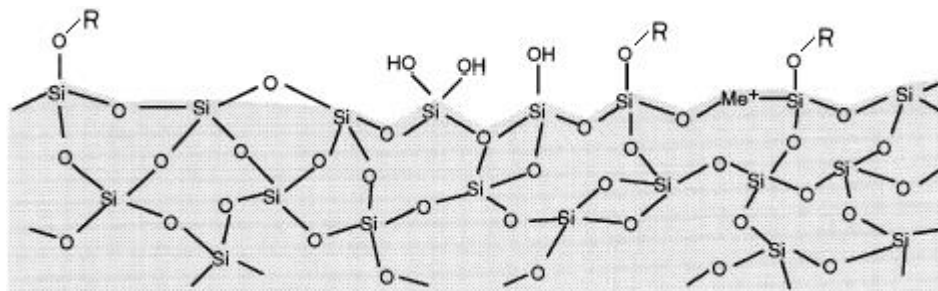


Figura 3. Estructura química de la sílice. Grupos silanol sin sustituir (-Si-OH) y otros sustituidos (-Si-OR). Modificado de: Meyer 2010.

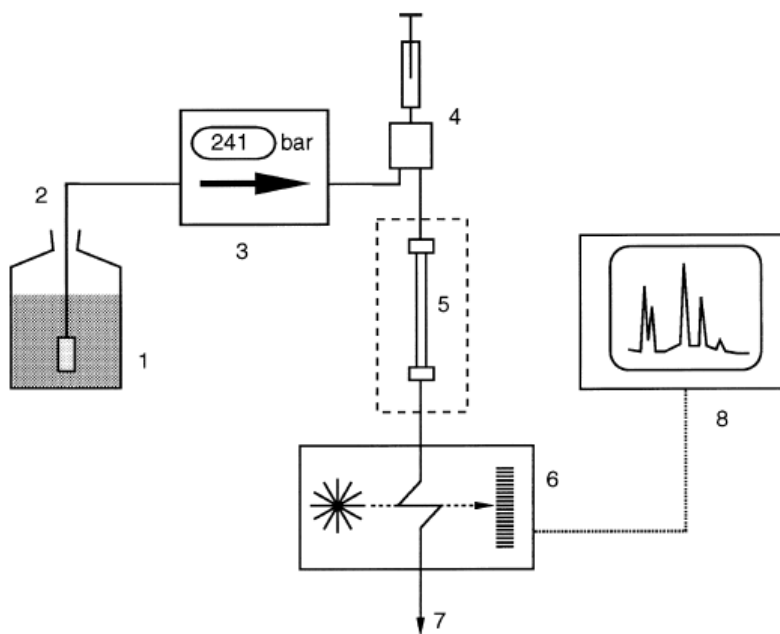


Figura 4. Esquema de HPLC. 1. Reservorio de solvente. 2. Línea de solvente con filtro. 3. Bomba con manómetro. 4. Inyección de muestra. 5. Columna. 6. Detector. 7. Residuos. 8. Adquisición de datos. Tomado de: Meyer 2010.

En la Figura 5 se representa una separación cromatográfica de dos sustancias, 1 y 2. t_{r1} y t_{r2} son los tiempos de retención respectivos; h es la altura, $h/2$ es la mitad de la altura y $W_{h/2}$ es el ancho a la mitad de la altura. W_1 y W_2 con los correspondientes anchos de los picos y t_m el tiempo muerto (United States Pharmacopeial Convention 2018).

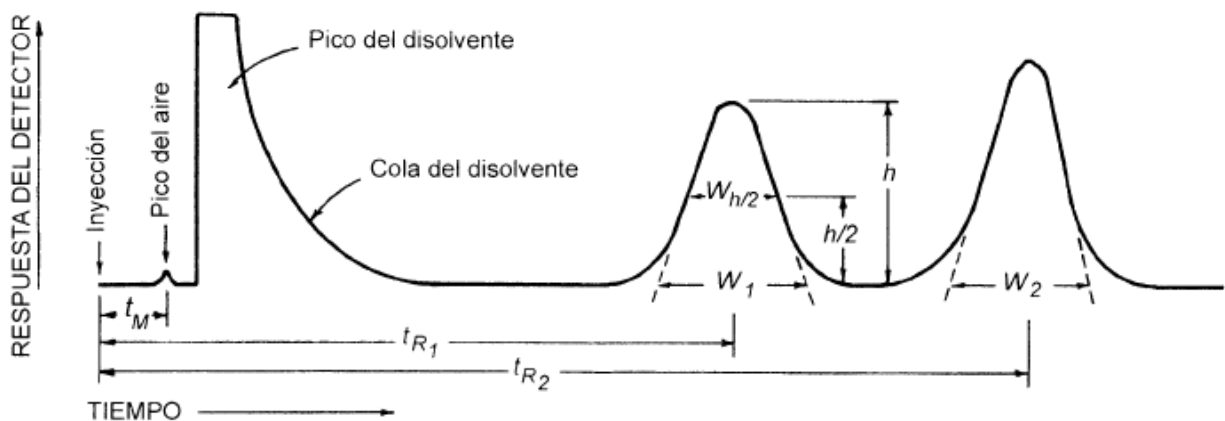


Figura 5. Separación cromatográfica de dos sustancias. Tomado de: United States Pharmacopeial Convention 2018.

Número de platos teóricos (N)

Es una medida de eficiencia de la columna. Para los picos gaussianos se calcula con la siguiente ecuación.

$$N = 16 * \left(\frac{t_r}{W} \right)^2 \quad (1)$$

Donde t_r es el tiempo de retención del pico y W es el ancho del pico en su base (United States Pharmacopeial Convention 2018).

Factor de retención o factor de capacidad (k')

El factor de retención también se conoce como el factor de capacidad (k'). Se define como el cociente entre el tiempo de la sustancia en la fase estacionaria y el tiempo de la sustancia en la fase móvil, se puede calcular mediante la siguiente expresión (United States Pharmacopeial Convention 2018).

$$k' = \frac{(t_r - t_M)}{t_M} \quad (2)$$

Resolución (Rs)

La resolución es la separación de dos componentes en una mezcla, calculada (en integradores electrónicos) por:

$$R_s = 1,18 * \frac{(t_{r2} - t_{r1})}{(W_{1,h/2} + W_{2,h/2})} \quad (3)$$

Para los componentes 1 y 2, t_{r1} y t_{r2} son sus respectivos tiempos de retención y $W_{1,h/2}$ y $W_{2,h/2}$ son los anchos de los picos en la mitad de la altura del pico (United States Pharmacopeial Convention 2018).

Asimetría (As)

El factor de simetría (también conocido como factor de asimetría o factor de cola, “tailing factor” en inglés) se utiliza para saber que tanto difiere un pico de uno gaussiano (siendo igual cuando el valor de asimetría es 1). Se calcula por:

$$A_s = \frac{W_{0,05}}{2f} \quad (4)$$

Donde $W_{0,05}$ es el ancho del pico al 5% de la altura y f es la distancia del máximo pico hasta el borde inicial del pico, midiendo la distancia en un punto ubicado al 5% de la altura desde la línea base (ver Figura 6) (United States Pharmacopeial Convention 2018).

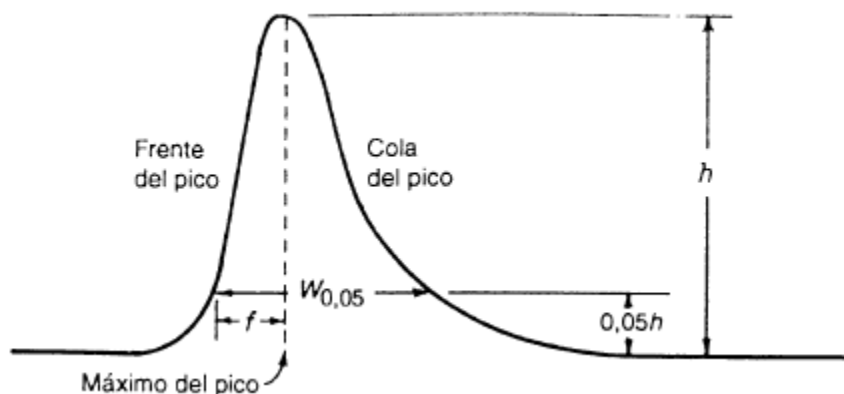


Figura 6. Pico cromatográfico asimétrico. Tomado de: United States Pharmacopeial Convention 2018.

Cromatografía de fase reversa (RP-HPLC)

Es el término usado para describir el estado en el que la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. El octadecilsilano unido químicamente, un n-alcano con 18 átomos de carbono (Figura 3, $R=C_{18}H_{37}$) es la fase estacionaria más utilizada, el sustituyente también puede ser cadenas de alquilo C8 (Figura 3, $R=C_8H_{17}$) o más cortas y también los grupos ciclohexilo o fenilo proporcionan otras alternativas. En el proceso de producción de algunas columnas, luego de unir químicamente el sustituyente requerido a la sílice (C18, C8, etc.), esta puede someterse a un tratamiento con trimetilclorosilano ($(CH_3)_3SiCl$) para reducir la cantidad de grupos silanol que

permanecen sin reaccionar por razones estéricas, lo que se conoce como *encapado* (*end-capping* en inglés) (Meyer 2010).

En este caso el agua no puede humedecer los grupos alquilo no polares de la fase estacionaria (hidrófobos) y no interactúa con ellos de ninguna manera. Por lo tanto, es la fase móvil más débil de todas y proporciona la tasa de elución de la muestra más lenta. Cuanto mayor sea la cantidad de agua en el eluyente, mayor será el tiempo de retención. La fase móvil generalmente consiste en mezclas de agua o soluciones tampón acuosas con varios solventes miscibles en agua que pueden llegar a ser altamente no polares (Meyer 2010). En seguida se muestran unos de los solventes más utilizados en fase reversa, ordenados según su polaridad:

Metanol – acetonitrilo – isopropanol – N,N-dimetilformamida – dioxano – tetrahidrofurano

Decrece en polaridad – incrementan su poder de elución

Figura 7. Solventes utilizados en RP-HPLC. Modificado de: Meyer 2010.

Cromatografía en fase normal (NP-HPLC)

La cromatografía en fase normal se realiza sobre fases estacionarias hidrofílicas como la sílice o alúmina microporosa y con solventes de mediana o baja polaridad como fase móvil. Es un método apropiado para la separación de solutos de polaridad mediana a alta. La separación en este tipo de cromatografía se basa en que la estructura de sílice está saturada con grupos silanol en los extremos. Estos grupos hidroxilo (-O-H) están distribuidos estadísticamente en toda la superficie (Figura 3, R=H). Los grupos silanol representan los sitios activos en la fase estacionaria, los cuales forman un tipo débil de "enlace" con cualquier molécula que se encuentre lo suficientemente cerca cuando cualquiera de las siguientes interacciones está presente: dipolo inducido por dipolo; dipolo-dipolo; enlaces de hidrógeno; π -complejo de unión (Meyer 2010).

Estas interacciones surgen cuando la molécula tiene uno o varios átomos con pares de electrones solitarios o un enlace doble (para la interacción del complejo π), en otras palabras, cuando está insaturada o lleva el grupo funcional alqueno. Esta débil "formación de enlaces" se llama adsorción y su disolución, que es tan rápida, se conoce como desorción. Por otra parte, los alcanos no pueden interactuar con la columna, debido a que se encuentran saturados (formados solamente de átomos de carbono e hidrógeno) y no tienen pares de electrones libres (Meyer 2010).

La serie eluotrópica

Lloyd R. Snyder clasificó empíricamente los solventes empleados en cromatografía en orden creciente de fuerza de elución (ϵ^0) (Tabla 3). La fuerza de un solvente está relacionada con su polaridad, y permite controlar el valor del factor de capacidad (k') de los diferentes analitos de una muestra (Quattrocchi et al. 1992).

De lo anterior se desprende claramente que no todos los disolventes eluyen las moléculas de una muestra a la misma velocidad. Por ejemplo: Para cromatografía en fase normal, si un hidrocarburo alifático constituye la fase móvil, se vuelve muy difícil desplazar las moléculas de una muestra polar (por ejemplo, ácido ascórbico) de los sitios adsorbentes activos y el disolvente se clasifica como débil. El metanol, por otro lado, compite fuertemente por los sitios activos, dejando menos tiempo para que las moléculas de la muestra polar se adsorban y, por lo tanto, se eluyan rápidamente. Siendo el metanol un solvente comparativamente fuerte (Meyer 2010).

Tabla 3.

Serie eluotrópica. Modificado de: Quattrocchi, Abelaira, y Laba 1992.

Solventes	Fuerza de elución (ϵ^0)
n-pentano	0,00
Éter etílico	0,38
Cloruro de metileno	0,42
Tetrahidrofurano	0,45
Acetato de etilo	0,58
Acetonitrilo	0,65
Etanol	0,88
Metanol	0,95

Los valores indicados de ϵ^0 para los distintos solventes fueron obtenidos sobre alúmina.

Cuantificación en HPLC

Los procesos de cuantificación pueden llevarse a cabo por varios métodos: adición estándar, por interpolación utilizando una curva de calibración, estándar interno o estándar externo (utilizado en el presente estudio). Este último consiste en la preparación de un estándar de concentración semejante al analito en la muestra y en el ensayo cromatográfico de ambas, en las mismas condiciones operativas. La concentración de analito en la muestra se determina comparando el área del pico en cuestión con el área correspondiente al estándar de referencia, esto se realiza reemplazando los datos de preparación de las soluciones estándar y muestra (peso del estándar (activo), potencia del estándar, factor de dilución del estándar, peso activo en muestra y factor de dilución de la muestra) y los valores de área obtenidos al analizar la solución estándar y la solución muestra en la (ecuación 5), obteniendo así el porcentaje de recuperación del activo o la concentración en términos de porcentaje de activo en la muestra:

$$\% \text{ Recuperado activo} = \frac{\text{Área mta} \cdot \text{Peso std} \cdot \text{potencia estándar} \cdot \text{FD std}}{\text{Área std} \cdot \text{peso mta (activo adicionado)} \cdot \text{FD mta}} * 100 \quad (5)$$

Donde: "mta" es muestra, "std" es estándar y "FD" es factor de dilución.

La ecuación también puede expresarse como:

$$\% \text{ Recuperado activo} = \frac{\text{Área muestra} * \text{Concentración estándar}}{\text{Área estándar} * \text{Concentración muestra}} * 100 \quad (6)$$

El área de la muestra o del estándar puede corresponder al promedio de las respuestas (áreas) del analito o a una sola respuesta (área) en las diferentes soluciones (solución muestra o solución estándar) dependiendo del procedimiento realizado (Quattrocchi et al. 1992).

Antecedentes

Son escasos los artículos científicos o trabajos de grado que hablan sobre la validación de métodos de disolución de isotretinoína debido a que la mayoría de estos estudios se realizan a la par del desarrollo del producto y la información obtenida acerca del método de disolución generalmente termina siendo de uso exclusivo del laboratorio que lo desarrolla. También se debe tener en cuenta que muchos laboratorios únicamente utilizan las metodologías descritas en las farmacopeas (por ejemplo, la USP), ya que en esos casos no se exige la validación de exactitud y confiabilidad de los métodos, sino que solamente comprueben su aptitud bajo las condiciones concretas de uso (United States Pharmacopeial Convention 2018).

La USP 41 describe seis pruebas distintas de disolución. La primera utiliza como aparato un desintegrador y el análisis se lleva a cabo en un espectrofotómetro UV/VIS midiendo la absorbancia a un máximo de 343 nm; Las cuatro pruebas siguientes se realizan en disolutor, ya sea utilizando paletas o canastilla, haciendo uso de técnicas cromatográficas como HPLC en fase reversa para la cuantificación del principio activo. La sexta prueba de disolución utiliza un disolutor con paletas y la cuantificación se hace por medio de UV/VIS midiendo la absorbancia a 348 nm (United States Pharmacopeial Convention 2018).

Todos los métodos cromatográficos de la USP realizan el análisis en columnas que clasifica la farmacopea como L1 (en cuya clasificación entran las columnas de octadecilsilano (C18) unido químicamente a micropartículas de sílice o cerámica porosas o no porosas, de 1,5 µm a 10 µm de diámetro) de diferentes longitudes (100 mm - 250 mm) y tamaños de partícula (3 µm – 10 µm). Las fases móviles reportadas constan de un alto porcentaje de metanol acidificado (del 71 % hasta el 81 %) y un menor porcentaje agua acidificada (del 29 % hasta el 19 %), también se reporta un método con un alto porcentaje de acetonitrilo: Acetonitrilo, agua y ácido acético glacial (85: 15: 0,5) (United States Pharmacopeial Convention 2018).

Los medios de disolución en las pruebas USP son soluciones buffer fosfato o borato entre 6,8 y 8 unidades de pH, y como surfactantes utilizan oxido de lauril dimetil amina (DDAO) o bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) en concentraciones que van desde 0,5 % a 5,4 % (%p/v) (g/mL) (United States Pharmacopeial Convention 2018).

En los siguientes estudios citados se investigó el efecto de algunos surfactantes en la solubilidad de isotretinoína, en estos, los ensayos se realizaron utilizando el compuesto con una pureza elevada.

Yap et al. 2005, compararon el uso de las ciclodextrinas hiroxipropil- β -cicloextrina (HP- β -CD) y α -ciclodextrina (α -CD) como surfactantes para la isotretinoína. Sus estudios arrojaron que el uso de HP- β -CD es más efectivo incrementando la solubilidad de Isotretinoína debido a la formación de un complejo de inclusión con la HP- β -CD. La cuantificación se llevó a cabo mediante HPLC en fase reversa usando una columna Hewlett Packard Hypersil, 5 μ m, 250 $\times$ 4 mm y acetonitrilo: metanol 2%: acetato de amonio (55:25:20, v/v) como fase móvil.

En el trabajo realizado por Ghorab y Babiker 2012 se investigó la influencia de diferentes surfactantes (lauril sulfato de sodio, tween 20 y HP- β -CD) en la solubilidad de Isotretinoína midiendo la concentración micelar crítica para cada surfactante, analizando las muestras en un espectrofotómetro UV/VIS (UV-6705, Jenway, Barlo world scientific Ltd., UK) a una longitud de onda de 344nm. En este trabajo se comprobó que cuando las unidades de dosificación poseen dichos surfactantes, la disolución del principio activo aumenta; obteniéndose mejores resultados cuando se encuentran presentes el lauril sulfato de sodio y el HP- β -CD en las formas de dosificación de isotretinoína.

Validación de métodos analíticos

Según la USP la validación de un procedimiento analítico es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas (United States Pharmacopeial Convention 2018). Otros autores también lo definen como el establecimiento de la 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 (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) 2001).

Entre las razones que justifican la validación, se encuentran:

- Demostrar que los métodos son adecuados a los análisis propuestos en las condiciones descritas. La validación permite obtener las pruebas documentales de lo anterior.
- Trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados.

- Permite no solo el conocimiento del método analítico sino también cumplir con las exigencias legales, en este caso, la resolución 3619 de 2013 (BPL), expedida por el Ministerio de Salud y Protección Social.
- Permite la transferencia de métodos analíticos.

Dependiendo del método analítico a validar, se seleccionan los parámetros a evaluar. Los parámetros necesarios al validar el ensayo de disolución se muestran en la Tabla 4.

Documentación

El procedimiento de validación de un método analítico debe contar con diversos documentos que soporten todo el proceso de validación, dentro de ellos se encuentran:

- Protocolo de validación: Documento que describe a detalle todos los procedimientos realizados para validar el método analítico.
- Informe de validación: Documento que presenta los resultados de la validación.
- Procedimiento operativo estándar (POE): Documento que suministra las instrucciones específicas para realizar el método analítico en los análisis de rutina del laboratorio.

La documentación anteriormente mencionada fue escrita y anexada al sistema de gestión de calidad del laboratorio Quality Farma Análisis SAS, pero no se anexa al presente documento por cuestiones de confidencialidad, dado que hace parte de la documentación interna del laboratorio.

Tabla 4. Parámetros a ser validados en el ensayo de disolución. Fuente: United States Pharmacopeial Convention 2018, Ermer y Miller 2005, International Council of Harmonisation 2005.

Parámetro	Debe ser validado
Idoneidad del sistema (SST)	Si
Selectividad	Si
Rango	Si
Linealidad	Si
Exactitud / Recuperación	Si
Precisión	Si
Repetibilidad (repetitividad)	Si

Precisión intermedia	Si
Reproducibilidad	En este caso, No
Límite de detección y cuantificación	No
Robustez	Si
Incertidumbre	Si

Idoneidad del sistema (System Suitability Test)

Esta prueba está basada en el concepto de que el equipo, el sistema electrónico, las operaciones analíticas y las muestras a analizar constituyen un sistema integral que puede evaluarse como tal. Los parámetros son establecidos para el procedimiento en particular (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) 2001).

La prueba de la idoneidad del sistema es susceptible de emplearse en cualquier procedimiento de medida en el que las condiciones analíticas puedan estar sometidas a variación de las condiciones operacionales. Por ejemplo, en procedimientos analíticos volumétricos o que implican el análisis de la muestra mediante un espectrofotómetro, se incluye la evaluación del blanco y de la precisión de los resultados obtenidos. Sin embargo, es en las técnicas cromatográficas donde este tipo de pruebas se emplean con mayor asiduidad, en este caso se fijan parámetros cromatográficos como la precisión de las áreas respuesta obtenidas de medidas repetitivas, asimetría, platos teóricos y factor de capacidad. Estos parámetros aseguran la idoneidad del sistema cromatográfico al momento de realizar el análisis de las muestras (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) 2001).

Selectividad

Es la capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultánea o separadamente los analitos de interés de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que puedan estar presentes en la muestra (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) 2001). Se puede probar que un método cromatográfico es selectivo si se demuestra que ninguna sustancia presente en la muestra genera una señal o pico que eluya en el mismo tiempo de retención que el analito (United States Pharmacopeial Convention 2018).

Análisis en condiciones normales

El análisis debe demostrar que el método es capaz de discriminar sin interferencias entre el analito, sustancias de composición similar, impurezas y los demás productos que se encuentren en la muestra al momento de llevar a cabo el análisis (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) 2001).

Análisis en condiciones de estrés para estudios de estabilidad

Si el análisis tiene como finalidad llevarse a cabo en estudios de estabilidad, el análisis debe demostrar que el método evita las interferencias de productos de degradación que se puedan generar en la muestra debido al paso del tiempo. Estas pruebas se realizan mediante el estudio de muestras sometidas a estrés mediante la adición de un ácido diluido, una base diluida, un oxidante diluido y exponiendo a la luz natural o UV a diferentes muestras para comprobar que los productos formados en cada tratamiento no interfieren en el análisis (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) 2001).

Rango

El rango de un procedimiento analítico es el intervalo entre la concentración más baja y alta del analito en la muestra (incluyendo estas concentraciones) en el cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) 2001).

La ICH recomienda establecer un rango para todos los métodos requeridos en el ámbito del análisis fisicoquímico de medicamentos (Cuantificación de activo en producto terminado, impurezas, uniformidad de contenido, prueba de disolución, etc.) a excepción de los ensayos de identificación de sustancias, debido a que la validación de este tipo de métodos solo requiere demostrar el parámetro de selectividad (International Council of Harmonisation 2005).

Linealidad

La linealidad de un procedimiento analítico es su habilidad (dentro de un rango dado) de obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) 2001; International Council of Harmonisation 2005).

Según lo establecido por la USP e ICH, el parámetro de linealidad debe validarse para la prueba de disolución independientemente del método de cuantificación que vaya a utilizarse al momento al realizar el método analítico en los ensayos de rutina en el laboratorio, puesto que es necesario demostrar que las respuestas (en este caso áreas) que proporciona el analito son directamente proporcionales a la concentración dentro del rango especificado (United States Pharmacopeial Convention 2018; International Council of Harmonisation 2005).

En este caso se utiliza el valor promedio de la concentración ($\bar{X}$) y el valor promedio de las áreas respuesta ($\bar{Y}$) para el cálculo de la pendiente (ecuación 7) y el intercepto (ecuación 8) de la ecuación de la recta (Miller y Miller 2002).

$$b = \frac{\sum\{(x_i - \bar{X}) * (y_i - \bar{Y})\}}{\sum(x_i - \bar{X})^2} \quad (7)$$

$$a = \bar{Y} - b * \bar{X} \quad (8)$$

Errores en la pendiente y la ordenada en el origen de la recta de regresión

Es importante calcular los errores aleatorios en los valores de la pendiente y la ordenada en el origen. En primer lugar debe calcularse el estadístico $S_{y,x}$, que estima los errores aleatorios en la dirección Y (Miller y Miller 2002).

$$S_{y,x} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (9)$$

Esta ecuación utiliza los residuos de y, $y_i - \hat{y}_i$, donde los valores de $\hat{y}_i$ son los puntos sobre la recta de regresión calculada correspondientes a los valores individuales de x, es decir, los valores de y “ajustados”.

Una vez obtenido $S_{y,x}$, se calcula S_b y S_a , las desviaciones estándar de la pendiente (b) y la ordenada en el origen (a).

Desviación estándar de la pendiente:

$$S_b = \frac{S_{y,x}}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad (10)$$

Desviación estándar de la ordenada en el origen:

$$S_a = S_{y,x} * \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad (11)$$

Pruebas t-student e intervalos de confianza para la pendiente y la ordenada en el origen de la recta de regresión

Se realiza para demostrar con un alto grado de confianza que la recta de regresión posee una pendiente significativamente distinta de cero y que el intercepto no difiere significativamente del mismo (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) 2001).

El valor t calculado para la pendiente:

$$t_b = \frac{|b|}{S_b} \quad (12)$$

El valor t calculado para el intercepto:

$$t_a = \frac{|a|}{S_a} \quad (13)$$

Los valores obtenidos para t_a y t_b se contrastan con el valor tabulado de t de la distribución de Student para n-2 grados de libertad y un grado de significación de α igual a 0,05 (Tabla 5).

Tabla 5. Contraste e hipótesis de las pruebas t-student para la recta de regresión. Fuente: Miller y Miller 2002, Quattrocchi, Abelaira, y Laba 1992.

Parámetro	Contraste	hipótesis aceptada
Pendiente (b)	$t_b > t$ tabulada	Hi: la pendiente difiere significativamente de cero
	$t_b < t$ tabulada	Ho: la pendiente NO difiere significativamente de cero
Intercepto (a)	$t_a > t$ tabulada	Hi: el intercepto difiere significativamente de cero
	$t_a < t$ tabulada	Ho: el intercepto NO difiere significativamente de cero

Los valores de S_b y S_a también se utilizan para estimar los límites de confianza de la pendiente y de la ordenada en el origen. Los límites de confianza de la pendiente vienen dados por:

$$b \pm t_{(n-2)} * S_b \quad (14)$$

Los límites de confianza para la ordenada en el origen se calculan mediante la expresión:

$$a \pm t_{(n-2)} * S_a \quad (15)$$

El demostrar que la pendiente obtenida difiere significativamente de cero (el intervalo no incluye el cero) confirma la existencia de la misma. El obtener un intervalo de confianza para el intercepto que incluya el cero permite asegurar que el método carece de sesgo, debido a que a concentración

cero del analito se espera una respuesta igual a cero (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) 2001).

El cálculo del intervalo de confianza de la pendiente (ecuación 14) puede ser usado para demostrar que no existen diferencias significativas entre los valores de la pendiente de la linealidad del sistema y la del método, aportando información sobre la ausencia de efecto matriz multiplicativo (Figura 8).

Límite de detección y cuantificación

El límite de detección es la cantidad mínima de analito que puede detectarse en una muestra, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas. El límite de cuantificación es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas (United States Pharmacopeial Convention 2018).

Para la determinación de dichos valores puede utilizarse el método de extrapolación de la curva de calibración a concentración cero. El método requiere la realización de una curva de calibración a niveles de concentración cercanos a los límites esperados. Se construyen dos curvas con los resultados obtenidos: Concentración versus área respuesta y concentración versus desviación estándar de las áreas respuesta. Se obtienen dos ecuaciones, de las cuales se utilizan sus términos para calcular los límites utilizando la siguiente ecuación (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) 2001).

$$L_{DC} = \frac{Y_{bl} + (k * S_{bl})}{b * \sqrt{n}} \quad (16)$$

Donde:

L_{DC} : Límite de detección o cuantificación.

Y_{bl} : Intercepto de la curva de calibración de concentración versus área.

S_{bl} : Intercepto de la curva de calibración de concentración versus desviación estándar

k : Constante con un valor de 3 para límite de detección y 10 para límite de cuantificación.

b : Pendiente de la curva de calibración de concentración versus área.

n : Número de datos obtenidos en cada uno de los niveles de concentración.

Exactitud / Recuperación

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre los valores obtenidos mediante ese procedimiento y el valor de referencia aceptado (verdadero). La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de analito añadida a la muestra (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) 2001).

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Peso de activo valorado (calculado)}}{\text{Peso de activo añadido a la muestra}} * 100\% \quad (17)$$

Para evaluar la exactitud se puede utilizar pruebas de equivalencia, las cuales consisten en definir un rango aceptable en el cual deben encontrarse los valores obtenidos (tabla 12). También son comúnmente usadas las pruebas de significancia estadística t-student para determinar que con un cierto nivel de confianza (usualmente 95 %) que la media de los resultados incluye un valor objetivo (target) (ecuación 27 y ecuación 28) (Ermer y Miller 2005).

Efecto matriz

La FDA lo define como la influencia de uno o más componentes de la matriz de la muestra en la medición de la concentración o masa del analito. El efecto matriz se puede evaluar comparando los resultados de la recta de regresión obtenida sobre el analito puro (sustancia de referencia, estándar) con la correspondiente a la de analito más matriz (Figura 8). La no correspondencia de las rectas indica problemas por efecto matriz (Quattrocchi et al. 1992).

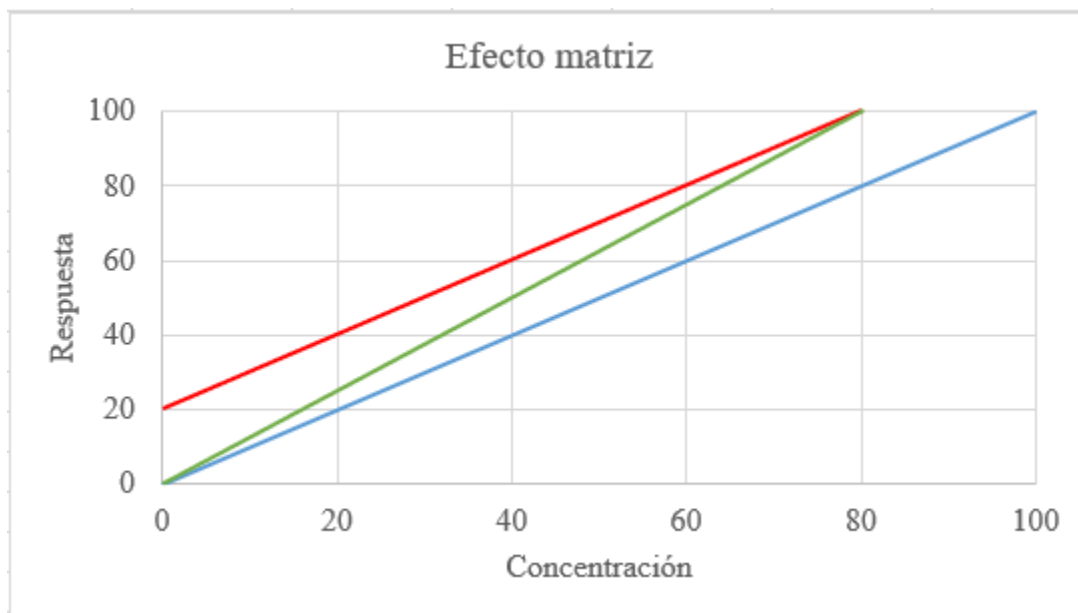


Figura 8. Tipos de efecto matriz: Efecto matriz aditivo (rojo), efecto matriz multiplicativo (verde). Adaptado de: Quattrocchi, Abelaira, y Laba 1992.

El efecto matriz está ligado directamente con la exactitud del método. Estos efectos de matriz pueden clasificarse de acuerdo a su naturaleza en *aditivos* y *multiplicativos*. Los aditivos se refieren a un desplazamiento positivo del cero (de la respuesta) en presencia de la matriz, representados en la curva roja y los efectos multiplicativos muestran un cambio en la pendiente, como puede observarse en la curva verde (Figura 8) (Quattrocchi et al. 1992).

Para descartar que no hay desviación de la curva en el origen, o del cero (efecto matriz aditivo), es posible realizar la prueba t-student al intercepto de la curva de la linealidad del método. Para demostrar que no existen cambios en el valor de la pendiente, se evalúa la exactitud en un rango de concentración, lo cual debe demostrar que no hay diferencias significativas en el porcentaje recuperado en cada uno de los puntos escogidos (no existe efecto matriz multiplicativo).

Precisión

La precisión de un procedimiento analítico es el grado de concordancia (grado de dispersión) entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. La precisión se puede considerar en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad (International Council of Harmonisation 2005).

La repetibilidad, también llamada precisión intra ensayo (intra-assay), expresa la precisión bajo las mismas condiciones operativas en un corto intervalo de tiempo. La precisión intermedia (tolerancia o fortaleza) expresa la variación dentro de un laboratorio, por ejemplo: diferentes días, diferentes analistas, diferente equipamiento, etc. La reproducibilidad se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios, por ejemplo, estudios colaborativos (International Council of Harmonisation 2005).

Los análisis de este contexto son análisis independientes de las muestras, las cuales se han llevado a cabo mediante el procedimiento analítico completo, desde la preparación de las muestras hasta el resultado final de las pruebas (International Council of Harmonisation 2005).

La precisión de un método analítico usualmente se expresa como la varianza, desviación estándar o la desviación estándar relativa RSD (también conocido como coeficiente de variación). Dependiendo del nivel de precisión que se esté evaluando, la variación en los resultados se calcula con base a una población o a una muestra. Para evaluar la repetibilidad del sistema se evalúa la variación para una muestra, en cambio para la repetibilidad del método, precisión intermedia y reproducibilidad se evalúa para poblaciones, las cuales tienen sus características definidas dependiendo del nivel de precisión al que correspondan (International Council of Harmonisation 2005).

$$RSD = \frac{S}{\bar{X}} * 100\% \quad (18)$$

Donde S es la desviación estándar de las áreas respuesta y $\bar{X}$ el promedio de las mismas.

Robustez

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para no ser afectado por pequeñas, pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y proporciona una indicación de su fiabilidad durante su uso normal (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) 2001; United States Pharmacopeial Convention 2018; International Council of Harmonisation 2005).

En un diseño normal para evaluar la influencia de las variables en “una variable por vez”, el estudio de n variables, resultaría en 2ⁿ ensayos. Por eso, cuando los factores a evaluar en la robustez son muchos, se recurre a un diseño global que permite agruparlos, reduciendo el número de ensayos.

Un diseño muy utilizado es el de Plackett y Burman 1946, que permite estudiar el efecto de n variables en n+1 ensayos. En la Tabla 6 se ejemplifica el estudio de 7 variables en 8 ensayos, las letras de la “a” a la “g” corresponden al factor a evaluar, siendo las letras mayúsculas el valor modificado y las letras minúsculas el nivel normal del factor, si se quieren evaluar menos de 7 factores, los factores restantes se pueden completar mediante valores ficticios, llamados comúnmente como “dummys” que no tienen sentido ni relevancia analítica (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) 2001; Quattrocchi, Abelaira, y Laba 1992).

Tabla 6. Diseño experimental para 7 variables en un estudio según Plackett y Burman. Tomado de: Plackett y Burman 1946.

Factor	Muestra							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado (φ)	s	t	u	v	w	x	y	z

Calculando la influencia del factor mediante la siguiente ecuación:

$$V_i = \frac{\sum \varphi^*}{4} - \frac{\sum \varphi}{4} \quad (19)$$

Siendo V_i el valor de la influencia del factor, φ^* el resultado del análisis de las muestras con el nivel modificado del factor evaluado y φ el resultado del análisis de las muestras con el nivel normal del factor. Se afirma que la influencia del factor es significativa si el valor absoluto de V_i es mayor al valor obtenido del producto entre la desviación estándar del método y raíz de 2 (ecuación 20) (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) 2001; Quattrocchi, Abelaira, y Laba 1992).

$$|V_i| > S * \sqrt{2} \quad (20)$$

Incertidumbre

Es el parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mensurando. Para evaluarla se utiliza un enfoque estadístico y de medición, donde las diferentes fuentes de incertidumbre se estiman y combinan en un solo valor (Magnusson et al. 2003).

La estimación de la incertidumbre se basa en el conocimiento existente sobre el método y los datos experimentales existentes (gráficos de control de calidad, validación, comparaciones interlaboratorios, etc.). Una forma común de presentar las diferentes contribuciones a la medición de la incertidumbre total es usar un diagrama de espina de pescado (fish-bone, en inglés) (Figura 9) (Magnusson et al. 2003).

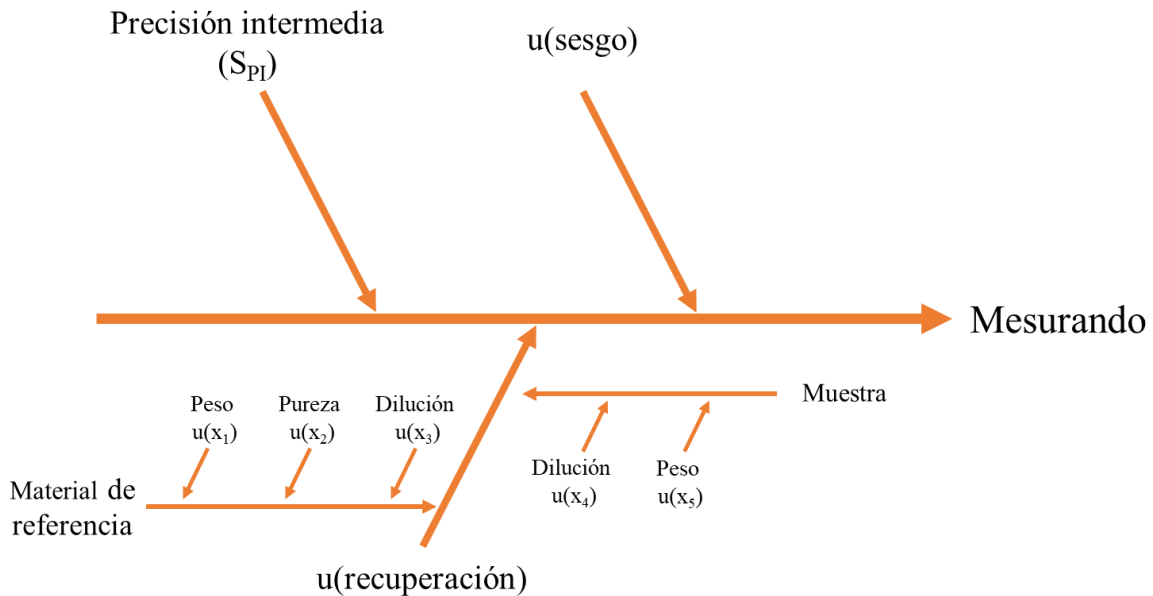


Figura 9. Diagrama de espina de pescado de las diferentes contribuciones de la incertidumbre total. Modificado de: Meyer 2003.

Las fuentes de incertidumbre presentadas en la Figura 9 se estiman y combinan utilizando las siguientes ecuaciones (Magnusson et al. 2003; Meyer 2003), donde: $u(x_i)$ son las incertidumbres de los diferentes parámetros o factores y x el valor medido o utilizado en cada uno de ellos; $S_{exactitud}$ es la desviación estándar obtenida del parámetro de exactitud, n el número de determinaciones realizadas en exactitud y S_{PI} corresponde a la desviación estándar obtenida en la precisión intermedia.

$$u(recuperación) = \sqrt{\sum_{i=1}^N \left(\frac{u(x_i)}{x_i}\right)^2} \quad (21)$$

$$u(sesgo) = \frac{S_{exactitud}}{\sqrt{n}} \quad (22)$$

$$u_c = \sqrt{(S_{PI})^2 + (u(sesgo))^2 + (u(recuperación))^2} \quad (23)$$

La incertidumbre de medición normalmente debe expresarse como U (incertidumbre expandida), para calcularla usualmente se utiliza un factor de cobertura de $k=2$ que proporciona un nivel de confianza de aproximadamente el 95 % (Magnusson et al. 2003).

$$U = 2 * u_c \quad (24)$$

Detección de valores atípicos usando el rango intercuartil (IQR)

Se utiliza para identificar valores atípicos en un conjunto de datos. Este método se basa en los cuartiles de los datos (Q_1 , Q_2 , Q_3) y el rango intercuartil (IQR). El IQR corresponde a $Q_3 - Q_1$. Los valores atípicos son valores: menores a $1,5 * IQR$ veces el valor del primer cuartil (Q_1), mayores a $1,5 * IQR$ veces el valor del tercer cuartil (Q_3) (Tukey 1977).

$$valor\ atípico \begin{cases} dato < Q_1 - 1,5 * IQR \\ dato > Q_3 + 1,5 * IQR \end{cases} \quad (25)$$

MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio se desarrolló y validó el método para el ensayo de disolución de isotretinoína 20 mg en capsula blanda, se utilizó un disolutor VANKEL VK-700 con paletas para la disolución y un HPLC HITACHI L-7000 Series para llevar a cabo la cuantificación del activo.

Las concentraciones presentadas como porcentaje, toman el 100% como la concentración de producto o activo correspondiente a la isotretinoína en el momento del análisis, es decir, 22,2 µg/mL (20 mg de isotretinoína en 900 mL de medio de disolución).

Debido a la casi nula solubilidad de la isotretinoína en agua o en un medio acuoso, el estándar se disuelve adicionando inicialmente 2 mL de MeOH en el balón donde se prepara, para luego llevarlo a volumen y hacer las respectivas diluciones usando medio de disolución.

Todas las soluciones muestras y estándar antes de ser inyectadas se filtraron a través de membranas de nylon de 0,45 µm.

Valoración del lote granel isotretinoína 20 mg

Antes de llevar a cabo la validación del ensayo de disolución, se realizó la valoración del lote granel M0879 de isotretinoína 20 mg. La valoración se hizo siguiendo el método interno del laboratorio “Valoración del producto isotretinoína 20 mg en cápsula blanda – CF-P-046” y los cálculos se realizaron en el formato CF-F-034.

El método interno del laboratorio para la cuantificación de isotretinoína 20 mg en cápsula blanda consiste inicialmente en calcular el contenido promedio de suspensión dentro de cada cápsula. Para realizarlo, se eligen 10 cápsulas al azar, las cuales se pesan individualmente, se abren con un objeto cortante para extraer manualmente el contenido; luego, se realiza un lavado de las cubiertas (exterior de las cápsulas) utilizando un solvente adecuado y se deja evaporar el solvente; por último, se pesan las cubiertas vacías (envolvente) de las unidades de dosificación.

El contenido promedio es el valor promedio de la diferencia de las cápsulas completas menos las cubiertas vacías (envolvente), a partir del contenido promedio se obtiene la siguiente relación: 20 mg isotretinoína/ X contenido promedio. Se prepara una solución estándar USP de isotretinoína (material de referencia) y dos soluciones muestra (con concentraciones similares del activo en la solución estándar, utilizando la relación obtenida a partir del contenido promedio), se analizan mediante RP-HPLC y con los datos obtenidos se calcula la cantidad de isotretinoína por cápsula.

Equipos, sustancias de referencia y reactivos utilizados para la prueba de disolución

Tabla 7. Sustancias de referencia y reactivos utilizados en la validación. Fuente: esta investigación.

Sustancia de referencia o reactivo	Marca	Lote	Pureza / Grado
Isotretinoína (material de referencia)	USP	R017X0	99,7%
Isotretinoína (material de referencia)*	USP	R09860	99,9%
Tretinoína (material de referencia)	USP	R004Y0	99,6%
Isotretinoína 20 mg cápsula blanda	No reporta	M0879	18,414 mg isotretinoína / 310,46 mg contenido
Agua Tipo I	No reporta	No reporta	HPLC
Acetonitrilo	Sharlau	15498603	HPLC
Metanol	Panreac	1352552	HPLC
Ácido acético glacial	BioPharmaChem	17427	99,5%
Ácido clorhídrico	Merk	709478	37%
Peróxido de hidrógeno	BioPharmaChem	17551	99%
Hidróxido de sodio	BioPharmaChem	17445	99,9%
Pancreatina	Sigma-Aldrich	SLBR5608V	Especificación 4xUSP
CTAB	Sigma-Aldrich	SLBT7250	≥ 98%

*Utilizado para evaluar el parámetro de exactitud.

Nota: El agua fue obtenida del equipo purificador de agua MERK Milli-Q Academic en las instalaciones del laboratorio. El agua posee un valor de conductividad menor o igual a 0,05 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a la salida del equipo (conductividad reportada por MERK Milli-Q) y una conductividad menor a 1 $\mu\text{S}/\text{cm}$ al momento de preparar las fases móviles o los medios de disolución (verificado mediante medición con multiparámetro HANNA HI 2020).

Tabla 8. Equipos utilizados en la validación. Fuente: esta investigación.

Equipos	Marca	Modelo
Cromatógrafo	HITACHI	L-7000
Disolutor	VANKEL	VK-700
Ultrasonido	ELMA	LC60H
Balanza analítica	OHAUS	PA224
Multiparámetro	HANNA	HI 2020

Sistema cromatográfico

Tabla 9. Descripción del cromatógrafo utilizado para la validación. Fuente: esta investigación.

Equipo HITACHI L-7000 Series	
Detector	UV Detector de longitud de Onda variable L7400
Automuestreador	Inyector automático estándar L7200
Bomba	L7100
Software	D-7000 HPLC system manager

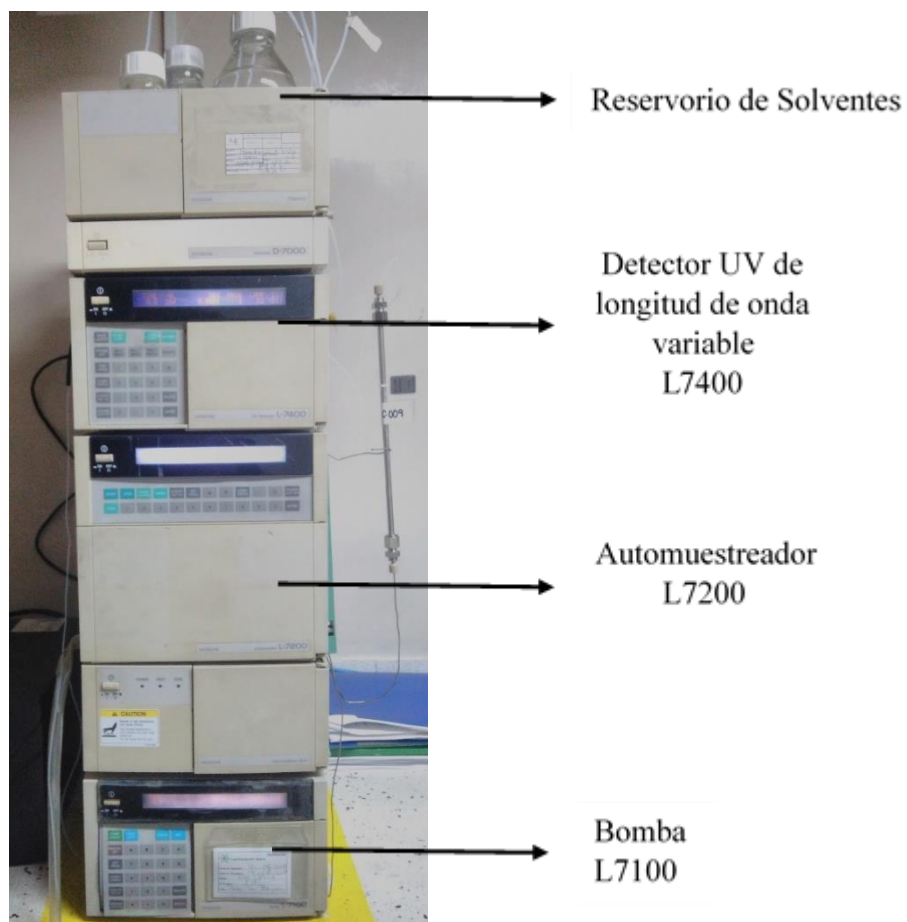


Figura 10. HPLC HITACHI L-7000 Series. Fuente: Esta investigación.

Disolutor

Tabla 10. Características del disolutor VANKEL VK – 700. Fuente: esta investigación.

Característica	Especificación
Vasos	6
Temperatura	20 °C – 45 °C
Rango de temperatura	± 0,1 °C
Rango de velocidad	20 rpm a 200 rpm

Estas especificaciones corresponden a las reportadas por el manual del equipo, el aseguramiento de estas se realizó mediante la calificación operacional del equipo.



Figura 11. Disolutor VANKEL VK-700. Fuente: esta investigación.

Métodos

Obtención de las condiciones de la prueba de disolución

Condiciones cromatográficas

Para establecer las condiciones del ensayo cromatográfico, se preparó las siguientes soluciones: solución estándar isotretinoína 22,2 µg/mL, solución estándar tretinoína 22,2 µg/mL, solución estándar combinado isotretinoína – tretinoína (1:1), ambos activos a 22,2 µg/mL y solución placebo-envolvente (a la concentración esperada al momento del análisis). Lo anterior con el fin de identificar la señal del activo (isotretinoína) y de su impureza más común (tretinoína); verificar la no elusión de picos en el tiempo de retención de los activos (debido al placebo-envolvente) y además, que la señal del activo cumpliera los criterios fijados para la idoneidad del sistema cromatográfico (Tabla 12).

Las pruebas se realizaron utilizando columnas con relleno L1 puesto que se sabe de antemano que funcionan para la separación de la isotretinoína y tretinoína (United States Pharmacopeial Convention 2018). La longitud de onda y el volumen de inyección se ajustan teniendo en cuenta los métodos reportados en la USP.

Las pruebas de las fases móviles se realizaron con proporciones altas de metanol (aproximadamente 80%) y soluciones acuosas acidificadas con ácido acético (aproximadamente 1% v/v), al no obtenerse los criterios especificados para la idoneidad del sistema se procedió a modificar la fase móvil: cambiando la proporción de metanol o sustituyendo gradualmente el metanol con acetonitrilo.

Condiciones de la prueba de disolución

El uso se paletas (aparato 2 USP), la velocidad (RPM), volumen, tiempo y temperatura se fijaron teniendo en cuenta lo reportado en la monografía de isotretinoína de la USP. La concentración de sal y el pH del medio de disolución en los ensayos preliminares se seleccionaron según los métodos reportados con anterioridad.

Con las condiciones establecidas anteriormente se realizaron pruebas con producto terminado para verificar si era necesario el uso de enzimas. Se hizo la prueba de disolución con cápsulas en medio de disolución en ausencia de pancreatina, dado que la cubierta de la cápsula no se disolvió a lo largo de la prueba de disolución, se realizaron pruebas en medio de disolución con pancreatina. La cantidad de pancreatina se estableció en base al criterio fijado por la USP (Tabla 1).

Se realizaron pruebas de disolución con medios de disolución que contengan surfactantes de diferente naturaleza: dodecil sulfato de sodio (aniónico), Tween 80 (no iónico), CTAB (catiónico). Las muestras se analizaron con las condiciones cromatográficas establecidas para el método y se cuantificaron por el método del estándar externo para obtener el porcentaje de activo disuelto en

los medios con diferentes surfactantes. Una vez seleccionado el surfactante se fijó su concentración teniendo en cuenta la monografía de isotretinoína en la USP.

Condiciones de la prueba de disolución y el análisis cromatográfico

Tabla 11. Condiciones cromatográficas y de la prueba de disolución. Fuente: esta investigación.

Condiciones Cromatográficas	
Longitud de onda	353 nm – Detector UV de longitud de onda variable
Volumen de inyección	20,0 µL
Flujo	1,5 mL/minuto
Columna	Shodex C18 encapsada, 250 mm x 4,6 mm, 5µm, 120 Å
Temperatura	Ambiente
Fase móvil	MeOH : ACN : Solución A (10:75:15) Solución A - Agua: Ácido acético glacial (100:1)
Condiciones de disolución	
Equipo	Disolutor VANKEL VK-700 con paletas (aparato 2 USP)
Velocidad	100 RPM
Volumen	900 mL
Tiempo	120 min
Temperatura	37 °C ± 0,5 °C
Tolerancia	No menos del 90% de la cantidad declarada de isotretinoína
Medio de disolución	Buffer de fosfato monobásico de potasio 50 mM a pH 6,8 1750 unidades USP de actividad de proteasa por litro (17,5 mg/L de pancreatina equivalente a cuatro veces las especificaciones de la USP) 1% (p/v) de CTAB

Criterios estadísticos de los parámetros de validación

Tabla 12. Criterios estadísticos de los parámetros de validación. Fuente: United States Pharmacopeial Convention 2018, Ermer y Miller 2005, International Council of Harmonisation 2005.

Parámetro	Criterio
Idoneidad del sistema	RSD < 2% para 6 áreas obtenidas de la solución estándar isotretinoína Asimetría entre 0,8 - 2,0 Platos teóricos > 2000 Factor de capacidad > 2
Selectividad	No eluyen picos en el tiempo de retención de la isotretinoína Resolución entre la isotretinoína y cualquier pico adyacente > 3,0
Linealidad	R > 0,99 $R^2 > 0,98$ t calculada para R > t tabulada t calculada para la Pendiente > t tabulada t calculada para el intercepto < t tabulada El intervalo de confianza para la pendiente no incluye el cero El intervalo de confianza para el intercepto incluye el cero
Exactitud	Porcentajes de recuperación de las muestras entre el 97 % - 103 % t calculada < t tabulada (Los resultados no difieren significativamente del 100 %) Los intervalos de confianza al 95 % para los niveles de concentración incluyen el 100 %
Precisión	
Repetibilidad sistema	RSD < 2% para 6 áreas obtenidas de la solución estándar isotretinoína
Repetibilidad método	RSD < 2% para los porcentajes de recuperación de 6 muestras preparadas al 100 % por el mismo analista el mismo día
Precisión intermedia	RSD < 4% para los porcentajes de recuperación de las muestras preparadas por dos analistas en días diferentes ANOVA factorial: $p > 0,05$
Robustez	Influencia de los factores: $V_i < S^* \sqrt{2}$ La diferencia entre los resultados de las muestras filtradas y sin filtrar < 1% RSD < 2% para las áreas obtenidas durante el estudio de estabilidad

Idoneidad del Sistema (SST)

Una vez el sistema cromatográfico se encontró estable, se procedió a inyectar por sextuplicado la solución de estándar isotretinoína al 100% (22,2 µg/mL).

Selectividad

Para realizar la preparación de las soluciones muestra por el método de placebo adicionado y las soluciones placebo-envolvente se utilizó la fórmula del producto isotretinoína 20 mg.

Tabla 13. Fórmula del producto isotretinoína 20 mg en cápsula blanda. Fuente: Quality Farma Análisis SAS.

Contenido	
Materia prima	mg por cápsula
isotretinoína	20,00
aditivo 1	233,60
aditivo 2	46,40
aditivo 3	9,60
aditivo 4	8,00
aditivo 5	2,40
Peso de llenado de cápsula	320,00
Envolvente	
Materia prima	mg por cápsula
Gelatina	122,40
aditivo 6	45,72
aditivo 7	3,81
aditivo 8	0,04
aditivo 9	2,64
Peso del envolvente	174,61
Peso total Cápsula (mg)	494,61

Los valores reportados corresponden a las cantidades declaradas del producto. Debido a las variaciones que se generan durante el proceso de producción de las cápsulas los valores difieren ligeramente de lote a lote.

Todas las muestras para evaluar la selectividad (condiciones normales y condiciones de estrés) se analizan durante un tiempo más prolongado que el análisis de rutina (tres veces el tiempo de retención del último pico obtenido), lo anterior para demostrar que no eluyen otros compuestos (picos) que hayan sido retenidos de manera más fuerte por la columna cromatográfica. Además, las muestras se analizan por duplicado para asegurar que la elución de otros compuestos (picos) sea debido a sustancias presentes en la muestra y no por la posible elusión de un pico fantasma.

Análisis en condiciones normales

Para comprobar que ninguno de los componentes y/o impurezas comunes del producto interfiere en el método, se lleva a cabo el análisis de solución estándar isotretinoína, solución estándar tretinoína (impureza), solución de estándar combinado isotretinoína – tretinoína (1:1), la isotretinoína y la tretinoína a una concentración de 22,2 µg/mL; además se analizó solución placebo-envolvente (a la concentración esperada al momento del análisis), medio de disolución y fase móvil. Cada una de las soluciones se inyectó por duplicado y dejando correr cada muestra 3 veces el tiempo de retención del último pico obtenido. El análisis de las muestras se realiza por duplicado para verificar que las señales (picos) evidenciadas en el cromatograma no corresponden a picos fantasma.

Análisis en condiciones de estrés para estudios de estabilidad

Degradación del producto y del placebo-envolvente

Se prepararon soluciones de placebo-envolvente al 100% y soluciones muestra al 100% utilizando el método de placebo adicionado. Las soluciones se sometieron a degradaciones ácida, básica y oxidativa, haciendo uso de HCl 0,1N, NaOH 0,1N y H₂O₂ 3% respectivamente, las soluciones se calentaron a 40°C durante media hora y se inyectaron inmediatamente. También se realizó una degradación fotolítica exponiendo solución muestra y solución placebo-envolvente a luz UV (254 nm) durante ocho horas. Las condiciones de degradación se fijaron a partir de lo reportado por la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) 2001, en donde recomienda los reactivos, concentraciones y condiciones utilizados con el fin de generar compuestos potencialmente interferentes al degradar el activo en un porcentaje considerable, pero sin afectarlo completamente. Estas condiciones se utilizan solamente para simular la degradación del activo por diferentes factores, generando unos compuestos que podrían encontrarse en muestras que están en estudio de estabilidad; lo anterior con el fin de demostrar que dichos compuestos (producto de la degradación) no interfieren en el análisis cromatográfico de las muestras.

Las soluciones resultantes se inyectaron por duplicado y dejando correr cada muestra tres veces el tiempo de retención del último pico obtenido. El análisis de las muestras se realiza por duplicado para verificar que las señales evidenciadas (picos) en el cromatograma no corresponden a picos fantasma.

Se realiza el cálculo del porcentaje de degradación de isotretinoína en las muestras utilizando el método de estándar externo, obteniendo inicialmente el porcentaje de recuperación de cada una de las muestras (ecuación 6), para luego calcular la diferencia entre el porcentaje de recuperación y el 100 %, obteniendo el porcentaje de degradación del activo en cada uno de los tratamientos.

Linealidad

El rango sugerido por la ICH para la prueba de disolución es entre el 75 % hasta el 125 % de isotretinoína (International Council of Harmonisation 2005). Se estableció un rango del 50 % hasta el 150 % para que incluyera el valor sugerido por la ICH y se fijaron los niveles de la linealidad de tal manera que permitieran la preparación de las soluciones a partir de alícuotas de volúmenes enteros (2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL y 6 mL) con el fin de obtener resultados más precisos y exactos.

Establecer un rango más amplio disminuye el riesgo de que el intercepto, obtenido por la extrapolación de la curva de calibración, arroje resultados poco veraces e incluso no cumpla con los criterios establecidos (Ermer y Miller 2005).

Linealidad del sistema

A partir de una solución estándar stock isotretinoína al 250 % (55,5 µg/mL), se realizó la preparación de la curva de calibración de 5 niveles por triplicado, tomando como límite inferior 50 % y como límite superior 150 %. Los niveles de concentración fueron 50 % (11,1 µg/mL), 75 % (16,65 µg/mL), 100 % (22,2 µg/mL), 125 % (27,75 µg/mL) y 150 % (33,3 µg/mL).

Linealidad del método

A partir de una solución stock de producto (preparada mediante el método de placebo adicionado) al 250 % (55,5 µg/mL) se realizó la preparación de la curva de calibración de 5 niveles por triplicado. Los niveles de concentración fueron los mismos utilizados en la linealidad del sistema 50 %, 75 %, 100 %, 125 % y 150 %.

Límite de detección y límite de cuantificación

Estos parámetros no se evaluaron debido a que la señal de la concentración más baja analizada en la linealidad (50 % - 11,1 µg/mL) reportaba datos de aproximadamente 1.000.000 de unidades de área, y para este caso no se presenta ningún tipo de dificultad en cuanto a la detección o cuantificación del analito. Cabe resaltar que las concentraciones esperadas al momento del análisis se sitúan por sobre el 75 % para la marca específica del medicamento (para el que se planteó la presente validación), lo cual justifica el hecho de no evaluarlos. Además, estos parámetros no se encuentran reportados por la USP, ICH y otros autores como usualmente evaluados para la prueba de disolución (Tabla 4).

Exactitud / Recuperación

Se pesaron individualmente cantidades de estándar, placebo y envoltente para preparar 9 muestras en 3 diferentes niveles de concentración. Las muestras se adicionaron a diferentes vasos del disolutor que contenían 900 mL del medio de disolución para obtener concentraciones en los niveles del 75 % (16,65 µg/mL), 100 % (22,2 µg/mL) y 125 % (27,75 µg/mL). Las muestras se sometieron a las condiciones del ensayo de disolución, se filtraron y analizaron por HPLC; se

utilizó el método del estándar externo para calcular el porcentaje de recuperación en cada una de las muestras (ecuación 6).

Efecto matriz

Para demostrar que no exista efecto matriz se analizan los resultados de las pruebas realizadas a los parámetros: linealidad del método y exactitud. La prueba t-student de la linealidad del método debe indicar que el intercepto no difiere significativamente de cero para descartar un efecto matriz aditivo (Figura 8). Para descartar un posible efecto matriz multiplicativo (Figura 8) se debe cumplir que el intervalo de confianza de la pendiente del método incluya el valor de la pendiente de la linealidad del sistema, además, los porcentajes de recuperación obtenidos en exactitud no deben diferir significativamente del 100 % en ninguno de los niveles evaluados (los intervalos de confianza deben incluir el 100 %).

Precisión

Debido a que el laboratorio solo cuenta con una sede, para esta validación solo se evalúa precisión en sus dos primeros niveles: repetibilidad y precisión intermedia.

Repetibilidad

Repetibilidad del sistema

Se evaluó inyectando estándar de isotretinoína al 100% seis veces consecutivamente (requisito establecido por la USP 41 para evaluar la idoneidad (aptitud) del sistema cromatográfico a partir de la solución del material de referencia).

Repetibilidad del método

Se evaluó analizando seis muestras diferentes preparadas por un analista el mismo día, agregando la cantidad de contenido (de las capsulas del producto “isotretinoína 20mg”) equivalente a 20 mg de isotretinoína (el número de muestras se estableció bajo los requisitos establecidos por la ICH para evaluar el parámetro de *repetibilidad*).

Precisión intermedia

Dos analistas en diferentes días realizaron la preparación del medio de disolución, solución estándar isotretinoína al 100 % y el ensayo de disolución agregando a tres vasos la cantidad de contenido (de las capsulas del producto “isotretinoína 20mg”) equivalente a 20 mg de isotretinoína.

Reproducibilidad

No se evaluó la precisión en el nivel de reproducibilidad debido a que el laboratorio solo cuenta con una sede, lo que impidió evaluar dicho parámetro al menos con ensayos interlaboratorio de la misma empresa Quality Farma Análisis SAS. Además, al no tener implementados los ensayos interlaboratorios (con laboratorios externos) hasta la fecha en que se realizó la validación, la

decisión de no evaluar dicho parámetro fue tomada por Quality Farma Análisis SAS y por ende queda fuera del alcance del presente proyecto.

Robustez

Evaluación del cambio en el porcentaje de CTAB, cambio de pH en el medio de disolución, flujo y proporción de solventes en la fase móvil en el análisis cromatográfico

Se realizó utilizando un diseño de Placket y Burman, preparando y analizando 8 muestras de disolución según lo descrito en la matriz proporcionada por los autores. Escogiendo como los factores a evaluar, el cambio en la concentración de CTAB en el medio de disolución, el cambio de pH del medio de disolución, cambio de flujo y en la proporción de solvente en el análisis cromatográfico.

El laboratorio estableció evaluar dos factores para la prueba de disolución y dos factores para el análisis cromatográfico de las muestras. Para el ensayo de disolución se decidió evaluar la concentración de CTAB y el cambio de pH debido a que en estos factores se puede presentar una mayor variación al momento de la preparación del medio de disolución; como factores para el análisis cromatográfico se fijó el cambio de flujo y la proporción de solvente con el fin de prever una posible pérdida de selectividad debido al envejecimiento de la columna, en dicho caso estos factores podrían modificarse con el fin de recuperar la selectividad en el método (siempre y cuando se demuestre que no influyen significativamente en los resultados).

Evaluación del filtrado de las muestras

Se compararon los valores obtenidos de 3 muestras preparadas y filtradas en la precisión intermedia, con los resultados de las mismas muestras sin filtrar y centrifugadas.

Estabilidad de las soluciones preparadas durante la prueba de disolución

Dado que es necesario demostrar la estabilidad de las soluciones preparadas al llevar a cabo la prueba de disolución, esto se evalúa calculando la variación acumulada de los valores de área a lo largo de un periodo de 24 horas. Las soluciones se inyectan por triplicado luego de transcurrido un cierto intervalo de tiempo para evaluar el RSD y así verificar la variación de los valores a lo largo del estudio de la estabilidad.

Las soluciones fueron almacenadas en la gradilla del automuestreador (vial rack) en donde se mantuvieron protegidas de la luz directa y en las condiciones ambientales del laboratorio: temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa menor a 70 %.

Estabilidad de la solución estándar

Se inyectó por triplicado una solución estándar isotretinoína al 100 % durante un periodo de 24 horas.

Estabilidad de la solución muestra

Se inyectó por triplicado una de las soluciones muestra preparadas para evaluar la precisión intermedia durante un periodo de 24 horas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de las condiciones de la prueba de disolución

Condiciones cromatográficas

Las longitudes de onda reportadas para detectar el activo en los métodos espectrofotométricos y cromatográficos de la USP abarcan un rango desde los 343 nm hasta los 358 nm, siendo la más común 353 nm (reportada en tres de los métodos que realizan el análisis de las muestras por HPLC) (United States Pharmacopeial Convention 2018). Por lo tanto, se fijó 353 nm como longitud de onda en el detector para llevar a cabo los ensayos.

El laboratorio tiene a disposición 2 columnas que cumplen con la clasificación L1: una columna Waters Nova-Pak C18 150 mm x 3,9 mm, 4 μ m, 60Å y una columna Shodex C18 encapsada, 250 mm x 4,6 mm, 5 μ m, 120 Å. Ninguna de las dos columnas cumple exactamente con las especificaciones de los métodos reportados USP pero se utilizaron para el desarrollo del método debido a que tienen el mismo tipo de relleno reportado en la farmacopea (United States Pharmacopeial Convention 2018).

Como primera opción se utilizó la columna Waters (150 mm) realizando los análisis con fase móvil de ácido acético al 0,5% en metanol y ácido acético al 0,5% en agua (71:29) a un flujo de aproximadamente 1,2 mL/min; de estos ensayos no se obtuvieron resultados favorables para los

criterios: platos teóricos (N) (para isotretinoína) y resolución (entre isotretinoína y tretinoína). Posteriormente, se realizaron variaciones en el flujo y la composición de la fase móvil: modificando los porcentajes de metanol, adicionando acetonitrilo y sustituyendo el metanol por acetonitrilo, pero ninguno de estos cambios mejoró significativamente los valores de platos teóricos y resolución. Es muy probable que el bajo valor de los platos teóricos, y por ende de la resolución, haya sido producto de un alto desgaste en la columna (Meyer 2010); la resolución también pudo verse afectada por la longitud de la columna (Meyer 2010).

Se realizaron ensayos con la columna Shodex (250 mm), inicialmente con fases móviles con un alto porcentaje de metanol (aproximadamente 80 %) y agua acidificada (utilizando ácido acético), con flujos de aproximadamente 1,2 mL/min. Las corridas cromatográficas de los análisis iniciales no mostraron la elución de ningún pico, aún y cuando se utilizaran flujos más altos y tiempos de corrida que superaran los 25 minutos, por lo que se planteó la posibilidad que los activos se estuvieran reteniendo de manera muy fuerte por la columna (debido al encapado) (Meyer 2010). Se decidió realizar las siguientes pruebas sustituyendo de manera gradual el metanol con acetonitrilo con el fin de darle más fuerza a la fase móvil, este cambio resultó en la elución de los activos. Se procedió a ajustar el flujo, las proporciones de los solventes y la solución acuosa para obtener un tiempo de corrida no tan extenso con el cual se cumplieran los criterios establecidos para la idoneidad del sistema (Tabla 12). Las condiciones cromatográficas establecidas se muestran en la Tabla 11.

Condiciones de la prueba de disolución

Al momento de realizar los ensayos preliminares, se tuvo en cuenta las pruebas de disolución reportadas por la USP para fijar las condiciones del disolutor. Así, se fijó la velocidad a 100 rpm, el volumen del medio en 900 mL; a pesar de que hay reportadas pruebas con paletas (aparato 2, USP) y con canastillas (aparato 1, USP), se decidió utilizar el aparato de paletas debido a que las cápsulas no presentaban flotabilidad en el medio de disolución, además de facilitar la limpieza y el montaje/desmontaje del equipo.

El uso de pancreatina se hizo indispensable al momento de realizar la prueba de disolución dado que los ensayos realizados en el laboratorio mostraron que la cubierta de las cápsulas es virtualmente insoluble en medios acuosos. La concentración de pancreatina se fijó teniendo en cuenta las recomendaciones de la USP (Tabla 1). A pesar de que la mayoría de las monografías USP presentan la concentración de las enzimas en miligramos por litro, la concentración de la pancreatina se definió en términos de actividad de proteasa por litro, lo anterior, dado a que en el mercado se comercializa pancreatina con diferentes niveles de actividad y definir la concentración en miligramos de pancreatina por litro podría ocasionar que se realice de forma incorrecta el procedimiento si en algún momento se utiliza pancreatina con actividad diferente a la usada en la validación.

Las monografías de la USP reportan solución fosfato 50 mM con 6,8 hasta 7,8 unidades de pH como solución tampón, teniendo en cuenta esto, se realizaron ensayos utilizando dicha solución a 7,2 unidades de pH, y haciendo uso de diferentes surfactantes a diferentes concentraciones: dodecil sulfato de sodio (SDS) (surfactante aniónico) y Tween 80 (surfactante no iónico). Estos ensayos mostraron una solubilidad muy baja de la isotretinoína en dichos medios, obteniendo en el mejor de los casos aproximadamente un 7 % de activo disuelto (cuantificado utilizando el método de estándar externo y en las condiciones cromatográficas establecidas anteriormente (Tabla 11)). Por lo anterior, se decidió utilizar uno de los surfactantes reportados en la USP, se eligió el CTAB para no generar sobre costo en la prueba de disolución.

Teniendo en cuenta que la concentración de surfactante (CTAB), la concentración de la sal en la solución tampón (KH_2PO_4) y el pH son factores determinantes en la velocidad de disolución del activo, se decidió tomar estos valores de la prueba seis de la USP (United States Pharmacopeial Convention 2018) (Tabla 11).

Ensayo de disolución

Los ensayos preliminares mostraron que el uso de la pancreatina se hace indispensable al establecer la metodología, ya que sin las enzimas es virtualmente imposible disolver el envoltorio de las cápsulas debido al fenómeno de entrecruzamiento que se presenta en estas, y por lo tanto el contenido de las mismas no habría podido disolverse.

Se denomina entrecruzamiento (Cross-linking, en inglés) a una serie de enlaces que se forman entre los aminoácidos presentes en las cadenas polipeptídicas de la gelatina (del envoltorio), dichos enlaces son más fuertes que los enlaces peptídicos entre los aminoácidos, lo que produce una solubilidad muy baja en el medio de disolución (Figura 12) (Digenis, G. A.; Gold, T. B.; Shah 1994).

Los aminoácidos presentes en los sitios activos de las proteasas (de la pancreatina) realizan un ataque nucleofílico al carbono carbonílico de los enlaces peptídicos, para llevar a cabo la hidrólisis de los dichos enlaces, produciendo péptidos más pequeños y aminoácidos (Figura 12 y Figura 13) (Erez, Fass, y Bibi 2009).

También se realizaron ensayos con diferentes surfactantes, al utilizar dodecil sulfato de sodio (SDS) (surfactante aniónico) y Tween 80 (surfactante no iónico), los porcentajes de activo disuelto (isotretinoína) no superaron el 7% en dichas pruebas (la cuantificación se llevó a cabo por el método de estándar externo y con las condiciones cromatográficas previamente establecidas en el desarrollo (Tabla 11)). Se optó por realizar el ensayo utilizando CTAB (surfactante catiónico reportado en unas de las pruebas de la monografía de isotretinoína de la USP), con el cual se obtuvieron porcentajes de activo disuelto que cumplen la especificación de la farmacopea.

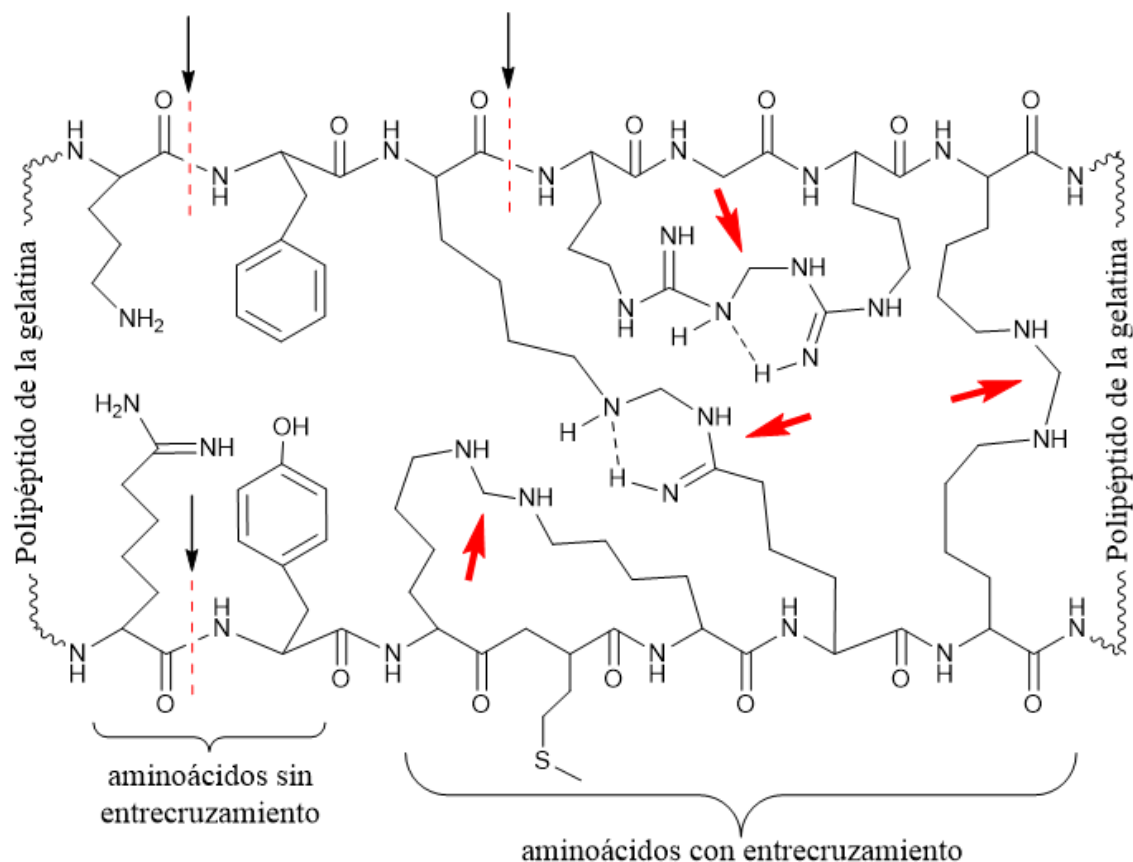


Figura 12. Estructura química de la cadena polipeptídica de la gelatina presente en el envoltorio de las unidades de dosificación. Las flechas rojas muestran el entrecruzamiento de aminoácidos. Las líneas rojas punteadas muestran algunos de los enlaces que pueden hidrolizar las proteasas presentes en la pancreatina. Modificado de: Digenis, G. A.; Gold, T. B.; Shah 1994.

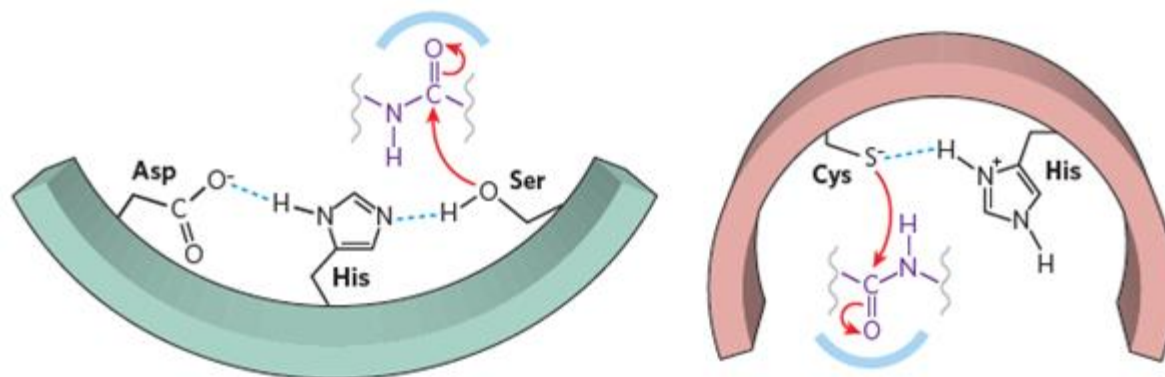


Figura 13. Ataque nucleofílico de los aminoácidos presentes en los sitios activos de las proteasas a los carbonos carbonílicos de enlaces peptídicos (Asp: ácido aspártico; His: Histidina; Ser: Serina; Cys: Cisteína). Tomado de: Erez, Fass, y Bibi 2009.

La buena solubilidad de la isotretinoína en el medio de disolución con CTAB puede deberse a que el activo podría disociarse en su forma aniónica antes de ser solubilizado en micelas formadas por el surfactante catiónico (CTAB) (Figura 14). La isotretinoína (activo ácido) puede interactuar fácilmente con el surfactante catiónico, el cual facilita la partición en micelas e incrementa su solubilidad en comparación con la obtenida en medios que contengan surfactantes iónicos o no iónicos (Park y Choi 2006).

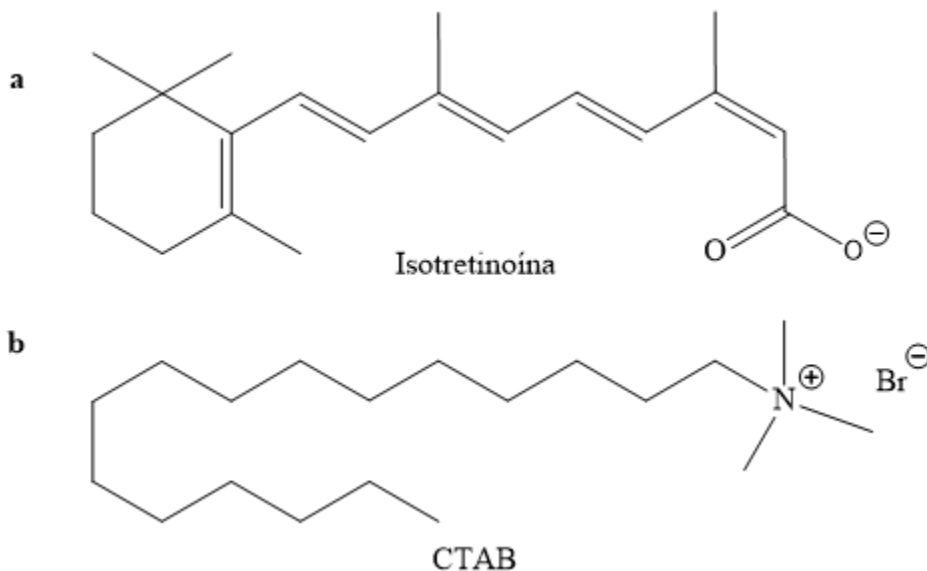


Figura 14. a) Estructura ionizada de la isotretinoína. b) Estructura del surfactante CTAB.

La concentración de pancreatina y CTAB, las RPM, el tiempo y el pH, se fijaron teniendo como referencia los valores reportados en las pruebas de la monografía de isotretinoína en la USP 41.

Se estableció el ensayo de disolución lo más semejante posible a los procedimientos descritos en farmacopea debido a que estos se encuentran aprobados y además apoyados por diversos soportes que irían más allá de las capacidades que tiene el laboratorio, por ejemplo, correlaciones del ensayo *in vitro* con pruebas *in vivo*, lo cual consigue que los resultados del ensayo de disolución reflejen mejor el desempeño *in vivo* del medicamento y justifica el hecho de fijar condiciones de tiempo y RPM que podrían considerarse altos si se comparan con los utilizados para unidades de dosificación que contienen activos con una solubilidad elevada en agua.

Análisis por HPLC

El análisis tiene como objetivo la cuantificación de la isotretinoína, por lo tanto debe asegurarse el cumplimiento de los parámetros establecidos en la idoneidad del sistema para asegurar la

obtención de una señal (pico) adecuada para los fines requeridos. Además de las condiciones cromatográficas adecuadas para este caso es necesario tener en cuenta la resolución del pico de isotretinoína y su impureza más común la tretinoína (su isómero geométrico) (Figura 17), esta separación se realiza de manera satisfactoria utilizando una columna C18, que proporciona una alta retención de los analitos gracias a sus características apolares. Las fuerzas de Van Der Waals entre las cadenas de 18 carbonos del octadecilsilano (fase estacionaria) y la tretinoína son más fuertes debido a que la molécula tiene una disposición espacial lineal (E) (Meyer 2010) (Figura 15), lo que ocasiona un mayor tiempo retención (Figura 16).

La resolución de los activos utilizando un alto porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil (75%) puede deberse al carácter dipolar (π^*) del solvente (Meyer 2010), que interacciona de manera diferente con los activos debido a la diferencia en momentos dipolares en las moléculas, causado por la isomería geométrica Z y E (Figura 15).

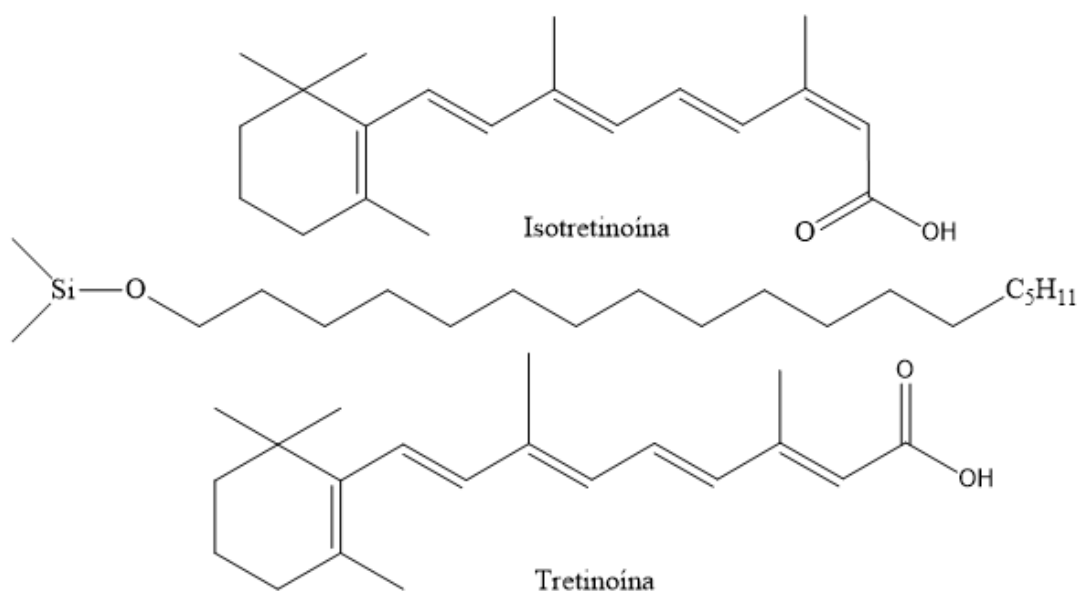


Figura 15. Isotretinoína, tretinoína y octadecilsilano (fase estacionaria).

Valoración del lote granel isotretinoína 20 mg

El resultado de la valoración (formato CF-F-034) presenta 18,414 mg de isotretinoína por cápsula, es decir, por cada 310,46 mg de contenido (contenido calculado a partir del procedimiento descrito en *materiales y métodos – valoración del lote granel isotretinoína 20 mg*). A partir de la relación obtenida anteriormente, se realizaron los cálculos necesarios para la preparación de las muestras y las soluciones producto necesarias para la validación del ensayo de disolución.

Validación del ensayo de disolución

Debido a que se tiene que comprobar periódicamente la aptitud del sistema cromatográfico, los criterios de aceptación para la idoneidad del sistema se evaluaron en cada uno de los días que se realizaron los análisis para la validación del método. Los datos obtenidos del estándar analizado cada día para la idoneidad del sistema se utilizaron para realizar los cálculos respectivos de los porcentajes de recuperación cuando estos fueron necesarios.

Idoneidad del sistema (SST)

A continuación se muestran los valores de los parámetros de asimetría, platos teóricos (N) y factor de capacidad (k') de las seis inyecciones sucesivas de solución estándar isotretinoína 100%.

Tabla 14. Resultados de la idoneidad del sistema. Fuente: esta investigación.

Inyección	Área	Asimetría	N	k'	Tiempo de retención
1	1990552	1,06	7441	984,67	9,86
2	2004475	1,16	7009	984,67	9,86
3	2013110	1,18	6812	986,33	9,87
4	2010998	1,22	6411	985,67	9,87
5	2007045	1,26	6347	984,00	9,85
6	2014037	1,25	6108	987,33	9,88
X	2006703	1,19	6688	985,40	9,86
S	8708,85				
RSD (%)	0,434				
Rango del tiempo de retención				9,86 ± 0,986	
Límite superior				10,851	
Límite inferior				8,878	

El rango del tiempo de retención del principio activo, dado por el tiempo de retención promedio $\pm 10\%$, es el intervalo de tiempo que define el software para identificar el activo.

Tabla 15. Criterios para la idoneidad del sistema (SST). Fuente: United States Pharmacopeial Convention 2018, Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) 2001.

Criterios de aceptación
Platos teóricos (N) mayor a 2000
Asimetría (As) entre 0,8 y 2,0
RSD menor al 2,0%
Factor de capacidad mayor al 2

Para las seis inyecciones del estándar se obtuvo un coeficiente de variación de 0,434 % y el valor promedio de los siguientes parámetros: asimetría (tailing factor) de 1,188, platos teóricos de 6688

y k' de 985,4. Por lo tanto cumple con los criterios establecidos de idoneidad del sistema cromatográfico (SST) (Tabla 15).

Selectividad

Análisis en condiciones normales

Las Figura 16, Figura 17 y Figura 18 muestran los cromatogramas de las soluciones analizadas para evaluar la selectividad en condiciones normales de análisis.

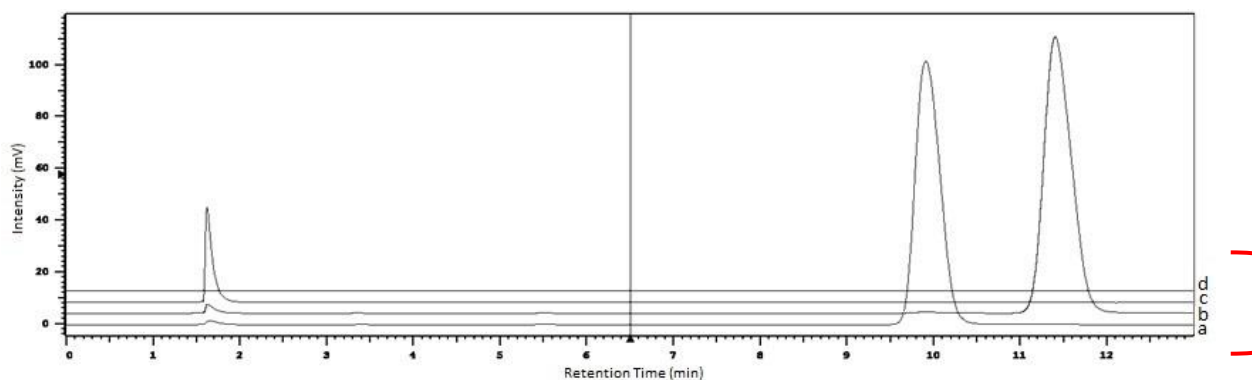
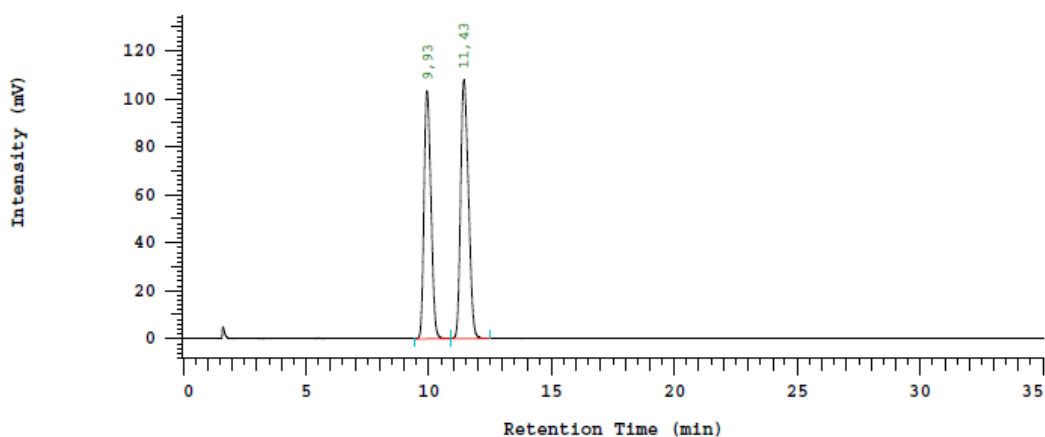


Figura 16. Selectividad en condiciones normales - Cromatogramas superpuestos de estándar isotretinoína tr:9,93 (a), estándar tretinoína tr:11,40 (b), medio de disolución (c) y fase móvil (d). Fuente: esta investigación.



No.	Name	RT			Area			
1	ISOTRETINOINA	9,93			1994733			
2	TRETINOINA	11,43			2354070			
RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
9,93	ISOTRETINOINA	992,33	1,22	5777	---	---	---	---
11,43	TRETINOINA	1142,33	1,23	---	3,49	1,15	---	---

Figura 17. Selectividad en condiciones normales – Cromatograma de solución estándar combinado isotretinoína-tretinoína. En rojo: Resolución de los picos. Fuente: esta investigación.

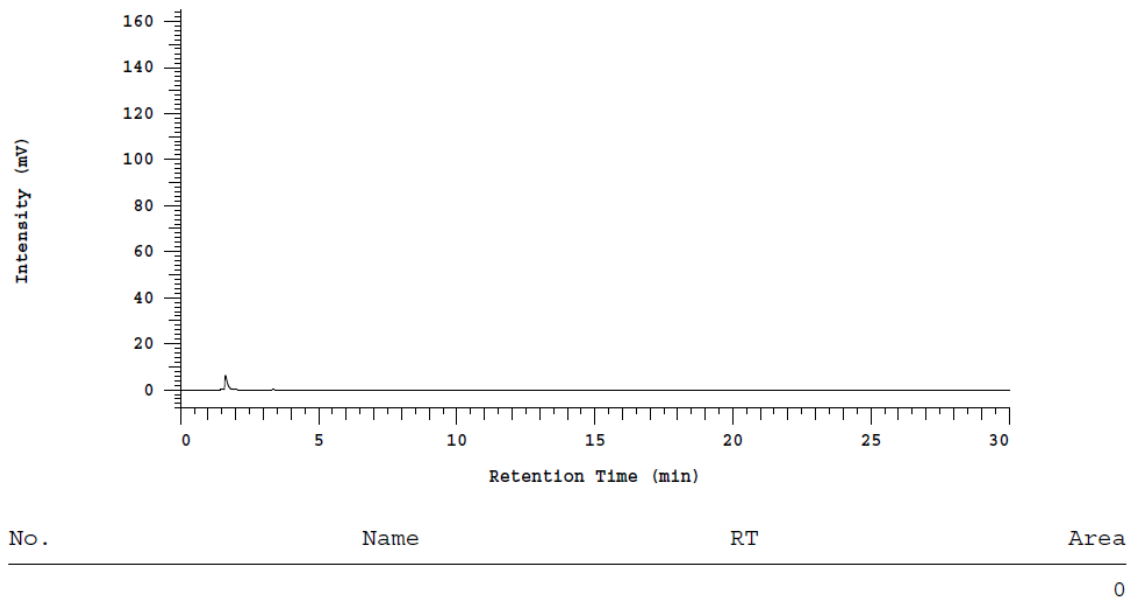


Figura 18. Cromatograma de la solución placebo-envolvente. Fuente: esta investigación.

Tabla 16. Criterios de aceptación de la selectividad en condiciones normales. Fuente: United States Pharmacopeial Convention 2018, Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) 2001.

Criterios de aceptación
No deben aparecer picos en el rango del tiempo de retención de la isotretinoína.
La resolución entre el pico de isotretinoína y tretinoína no debe ser menor a 3,0.

En los cromatogramas del estándar combinado de isotretinoína-tretinoína, la resolución para la isotretinoína (en rojo, Figura 17) no aparece reportada, debido a que el software calcula la resolución de un pico con los valores del pico anterior (que haya eluido antes) (Figura 5). La isotretinoína al no tener ningún pico a su izquierda, no reporta valor de resolución, por lo tanto, para el análisis de los resultados se tendrá en cuenta el valor de resolución de la tretinoína.

La Figura 18 muestra el cromatograma de la solución placebo-envolvente, la cual se analiza con el fin de descartar la posible co-elución del activo con otra sustancia que se encuentre presente en la solución muestra al momento del análisis.

En las muestras analizadas se evidencia que no aparecen picos en el rango del tiempo de retención definido para el pico de isotretinoína (9,86 minutos $\pm$ 0,986 minutos) (Tabla 14) y además, la

resolución entre los picos de isotretinoína y tretinoína cumple el criterio establecido (Tabla 16), por lo que se asegura la selectividad en condiciones normales de análisis.

Selectividad en condiciones de estrés para estudios de estabilidad

Se analizó las soluciones de las degradaciones ácida, básica, oxidativa y fotolítica del placebo (Figura 19) y producto (Figura 20, Figura 21, Figura 22 y Figura 23) a las concentraciones de análisis. En los cromatogramas se evidencia que no aparecen picos en el rango del tiempo de retención del pico de isotretinoína o que la resolución entre el pico del activo y otro que eluya cercano siempre es mayor a 3,0 (Tabla 17), por lo que se demuestra la selectividad en condiciones de estrés.

Tabla 17. Criterios para la selectividad en condiciones de estrés. Fuente: United States Pharmacopeial Convention 2018, Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) 2001.

Criterios de aceptación
No deben aparecer picos en el rango del tiempo de retención de la isotretinoína.
La resolución entre el pico de isotretinoína y tretinoína no debe ser menor a 3,0.

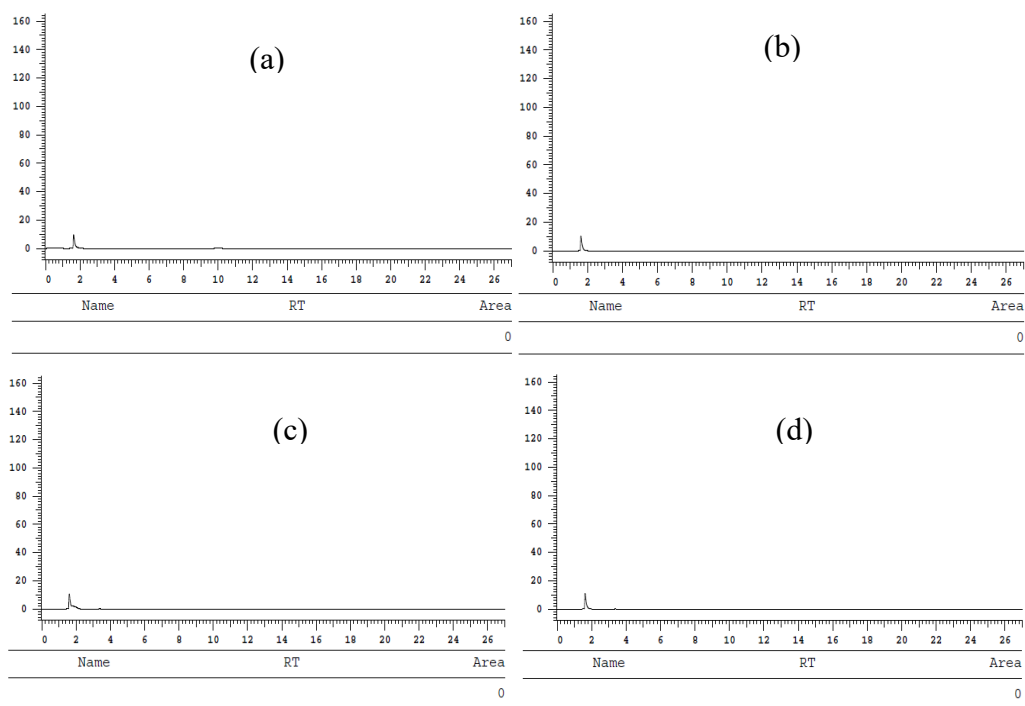


Figura 19. Degradaciones de la solución placebo: ácida (a), básica (b), oxidativa (c) y fotolítica (d). Fuente: esta investigación.

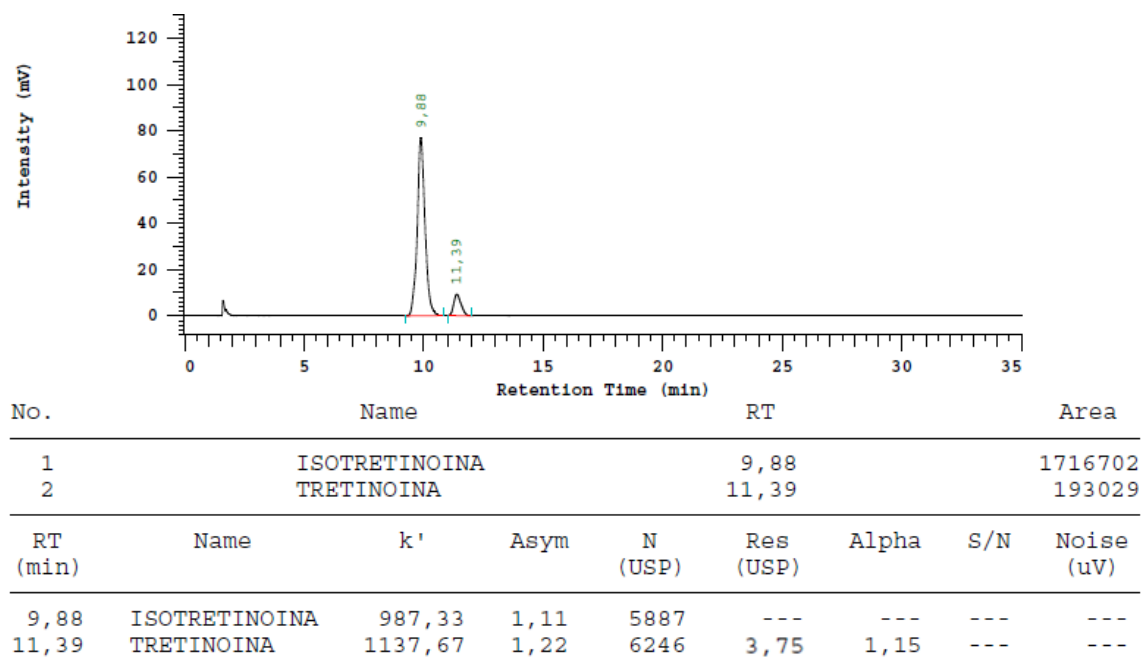


Figura 20. Degradación ácida de la solución producto. Fuente: esta investigación.

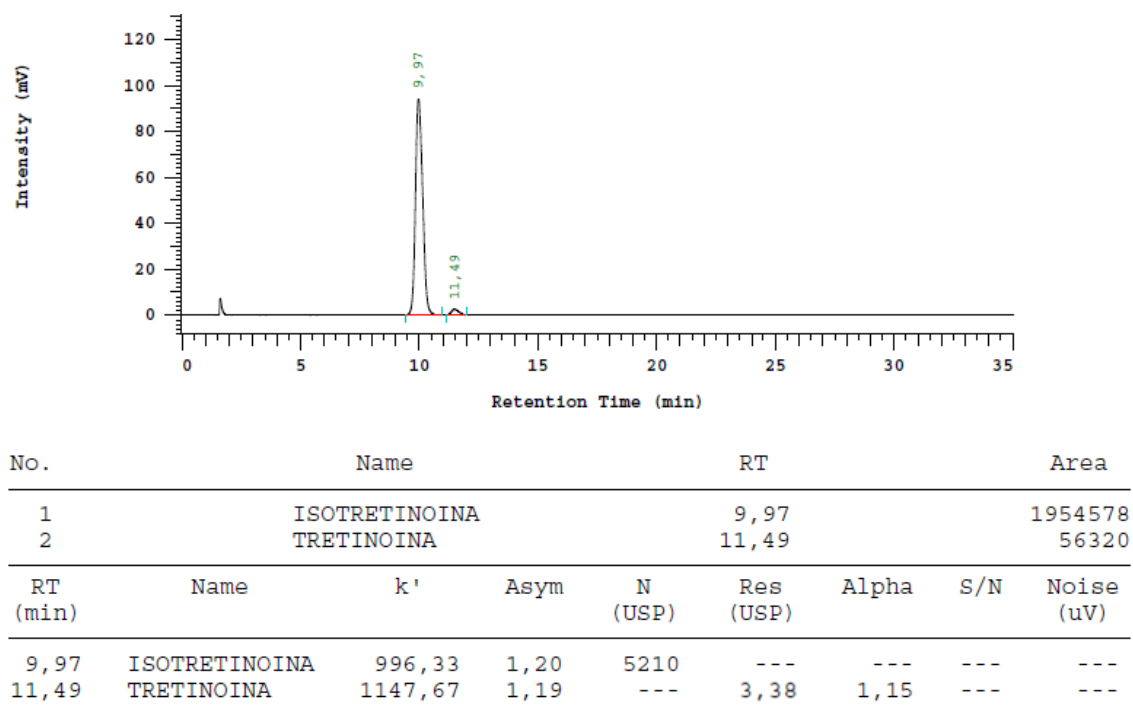
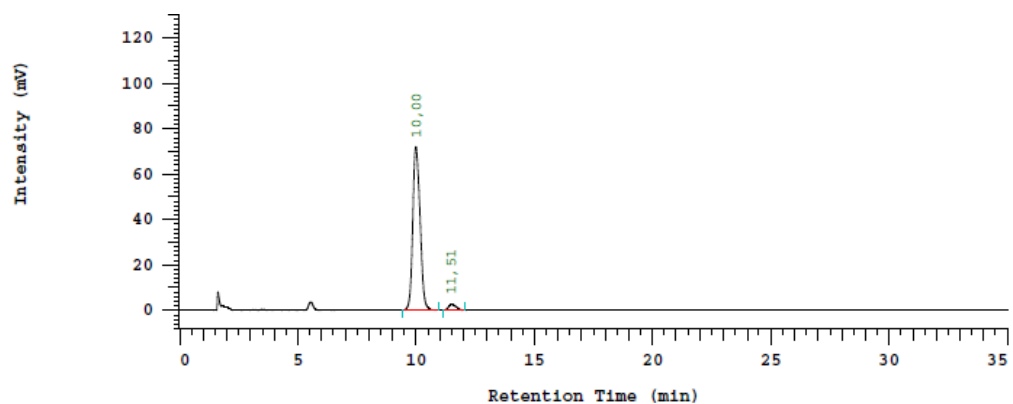


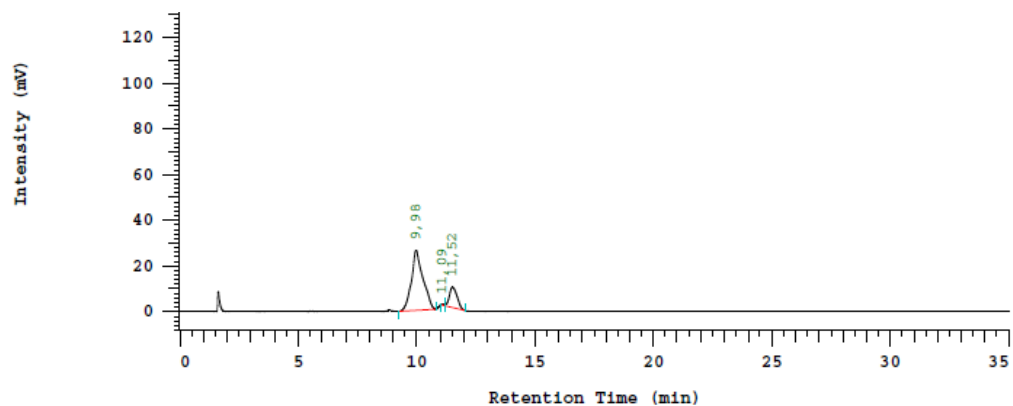
Figura 21. Degradación básica de la solución producto. Fuente: esta investigación.



No.	Name	RT	Area
1	ISOTRETINOINA	10,00	1522227
2	TRETINOINA	11,51	57260

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
10,00	ISOTRETINOINA	998,67	1,17	5118	---	---	---	---
11,51	TRETINOINA	1150,33	1,17	5539	3,58	1,15	---	---

Figura 22. Degradación oxidativa de la solución producto. Fuente: esta investigación.



No.	Name	RT	Area
1	ISOTRETINOINA	9,98	878373
2		11,09	4634
3	TRETINOINA	11,52	198856

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
9,98	ISOTRETINOINA	997,33	1,22	2597	---	---	---	---
11,52	TRETINOINA	1151,00	---	---	3,70	1,15	---	---

Figura 23. Degradación fotolítica de la solución producto. Fuente: esta investigación.

Para evaluar las degradaciones, se analizan los resultados del porcentaje de activo recuperado luego de someterlo a las condiciones de estrés.

Tabla 18. Porcentajes de degradación de la isotretinoína en condiciones de estrés. Fuente: esta investigación.

		Peso (mg)	Concentración (µg/mL)		Área Promedio	
Estándar		11,1	22,13		1997514	
Degradación	Muestra	Concentración (µg/mL)	Área	Recobro (%)	Degradación (%)	Degradación promedio (%)
Ácida	1	22,13	1716702	85,942	14,058	13,815
	2	22,13	1726416	86,428	13,572	
Básica	1	22,13	1954578	97,851	2,149	2,029
	2	22,13	1959391	98,092	1,908	
Oxidativa	1	22,13	1522227	76,206	23,794	23,767
	2	22,13	1523307	76,26	23,74	
Fotolítica	1	22,13	878373	43,973	56,027	56,710
	2	22,13	851062	42,606	57,394	

El cálculo de la concentración del estándar incluye la corrección de pureza.

El porcentaje de recuperación o recobro de las muestras se calculó utilizando la (ecuación 6). El porcentaje de degradación es la diferencia entre el porcentaje de recobro y el 100 %.

Tabla 19. Daño de acuerdo al porcentaje de analito alterado (degradado). Fuente: Quality Farma Análisis SAS.

Porcentaje de analito recuperado	Daño
100 - 80%	Leve
80 - 50%	Moderado
50 - 1%	Severo
<1%	Total

En los resultados presentados en la Tabla 19 se evidencia que hay un daño severo para el analito debido a la degradación fotolítica, presentando un promedio de degradación superior al 50%. Una degradación moderada para la degradación oxidativa y degradaciones leves para las degradaciones ácida y básica.

Es muy probable que en las degradaciones se esté presentando la isomerización de la isotretinoína en tretinoína, ya que en los cromatogramas de todas las degradaciones aparecen picos con tiempos de retención similares a la tretinoína (Figura 20, Figura 21, Figura 22 y Figura 23). La isomerización de compuestos ha sido estudiada y es conocido que puede darse por tratamiento térmico o mediante la interacción con radicales libres (Marx et al. 2003) (Stahl y Sies 1993).

La isomerización mediante radicales libres se da por la interacción de la isotretinoína y el ion radical oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) en una reacción de intercambio de energía (Stahl y Sies 1993).

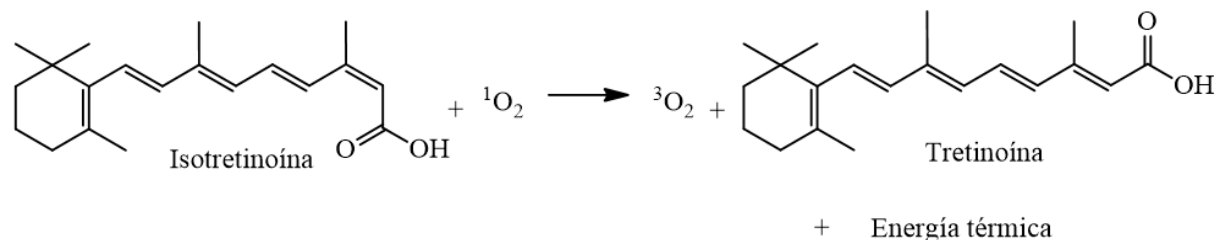


Figura 24. Isomerización de la isotretinoína para producir tretinoína.

La conversión sucede mediante un mecanismo conocido como “physical quenching”, este proceso involucra la transferencia de energía entre el $^1\text{O}_2$ y la molécula que posea dobles enlaces conjugados, para producir oxígeno en estado fundamental ($^3\text{O}_2$) y una molécula triplete excitada ($^3\text{C}^*$). La energía de la molécula excitada se disipa a través de la interacción rotacional y vibracional entre la molécula y el solvente para recuperar la molécula en estado fundamental (Stahl y Sies 1993).

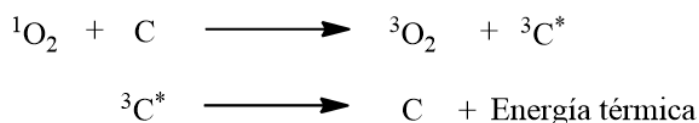


Figura 25. Reacción de “physical quenching” que produce la conversión de isómeros cis-trans del analito, mediante una reacción de transferencia de energía entre el ion radical oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y el analito. Modificado de: Stahl y Sies 1993.

La gran diferencia entre los porcentajes de activo degradado del tratamiento ácido y básico, con el oxidativo y la degradación fotolítica se presenta debido a que en estas dos últimas ocurren con mayor facilidad la producción de radicales libres, estos producen reacciones en cadena que se propagan mediante la formación constante de otros radicales libres y son capaces de continuar degradando la isotretinoína; de hecho, este tipo de reacciones son tan eficientes para degradar compuestos orgánicos, que actualmente se estudia la síntesis de nuevos materiales que catalizan la formación y reacción de radicales libres para realizar la degradación de contaminantes en agua y lograr su descontaminación (Muños et al. 2018) (De la Cruz et al. 2012).

Puede observarse que la degradación oxidativa presenta un 23,77 % de activo degradado, el cual puede explicarse mediante la formación de radicales hidroxilo (Figura 26) (De la Cruz et al. 2012),

los cuales son capaces de generar reacciones en cadena con la isotretinoína para producir una gran variedad de compuestos (Figura 27) (Voeikov 2001).

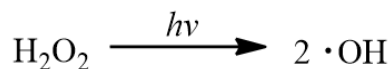


Figura 26. Producción de radicales hidroxilo mediante la ruptura homolítica del enlace oxígeno-oxígeno de la molécula de peróxido de hidrógeno. Tomado de: De la Cruz et al. 2012.

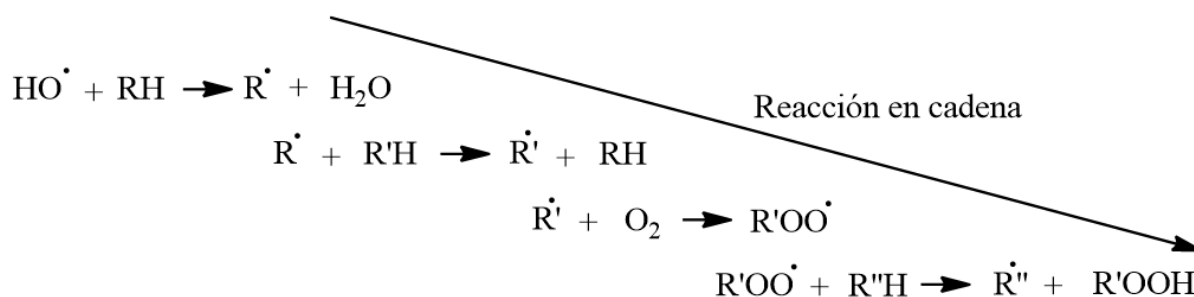


Figura 27. Algunas de las reacciones en cadena que pueden presentarse vía radicales libres. Modificado de: Voeikov 2001.

La degradación severa del activo en las condiciones de degradación fotolítica (56,71 %) se da debido a que la luz UV aporta la energía necesaria para la formación constante de radicales libres, entre los que se encuentran las especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS son especies muy reactivas que oxidan la isotretinoína para producir una gran variedad de compuestos (De la Cruz et al. 2012).

No se mencionan productos específicos de la oxidación de la isotretinoína porque hasta la fecha no se han reportado estudios que caractericen los productos de dicha reacción, pero es posible suponer la formación algunos productos de degradación, puesto que la isotretinoína al ser un derivado de la vitamina A (que puede producirse a partir de los carotenos), cabría esperar que algunos de los productos de degradación reportados para los carotenos también se hayan generado durante el tratamiento utilizado para evaluar la selectividad en condiciones de estrés.

Una de las reacciones de degradación mediante radicales libres más estudiadas en carotenos, es la formación de epóxidos mediante la adición de oxígeno a los dobles enlaces presentes en la molécula. La oxidación inicia mediante la formación del ion radical oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) el cual produce radicales peroxilo ($\text{ROO} \cdot$) que reaccionan con los dobles enlaces de la molécula para

producir diferentes epóxidos (Kennedy y Liebler 1991). Los radicales producidos en esta reacción siguen reaccionando con las sustancias presentes en la solución.

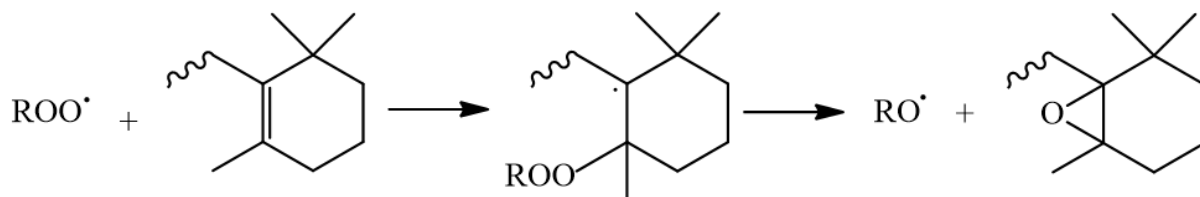


Figura 28. Reacción de formación de epóxidos a partir del radical peroxilo ($\text{ROO}^\bullet$). Modificado de: Kennedy y Liebler 1991.

Se han reportado reacciones de autooxidación (reacciones no catalizadas entre un compuesto y oxígeno molecular O_2) en carotenos a una temperatura de 30°C , en las que se da la ruptura de los dobles enlaces de la molécula y se producen aldehídos o cetonas como por ejemplo la β -ionona (1) o el β -ionilideno acetaldehído (2); Sin embargo, la mezcla de sustancias puede llegar a ser mucho más compleja a medida que la oxidación progresa, llegando a obtener productos como la dihidroactinidiolida (3) o la 5,8-epoxi- β -ionona (4) (Figura 29), entre otros (Mordi et al. 1991).

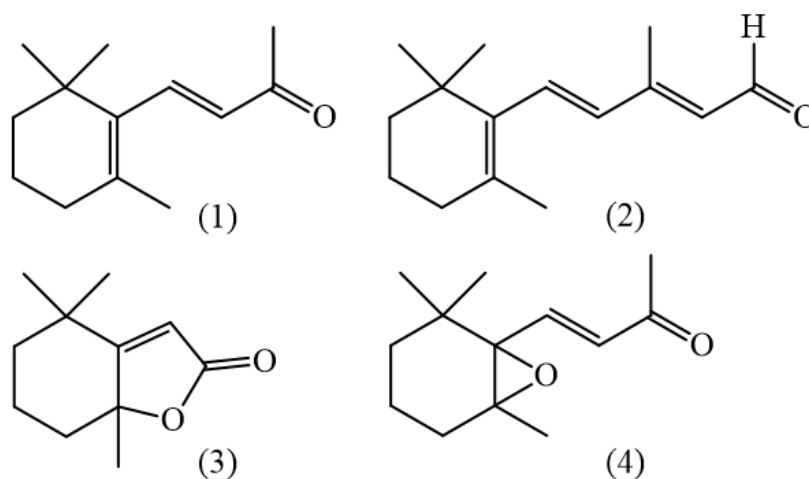


Figura 29. Algunos productos de degradación de la autooxidación del β -caroteno. Modificado de: Mordi et al. 1991.

Debido a que no se tuvo la precaución de realizar la reacción ácida, básica y oxidativa en material de protección actínica, en estas soluciones pudieron presentarse (en mayor o menor medida) reacciones por radicales libres. Los resultados más veraces en cuanto a la degradación de la isotretinoína serían los reportados por el tratamiento fotolítico, dado que se realizó bajo condiciones más controladas que promueven la degradación del activo específicamente por la incidencia de luz UV (254 nm).

Linealidad

Linealidad del sistema

En la siguiente tabla se muestra los resultados obtenidos al evaluar la linealidad.

Tabla 20. Niveles de concentración y las respectivas áreas promedio para cada una de las curvas. Fuente: esta investigación.

Nivel		50%	75%	100%	125%	150%
Concentración (µg/mL)		11,07	16,60	22,13	27,67	33,20
Área promedio	Curva 1	997600	1501817	1988615	2483449	2928150
	Curva 2	984686	1507570	1991830	2496054	2973005
	Curva 3	999127	1496604	1990071	2483748	2973488
Ecuación de la recta		$y = 88817 \cdot x + 20558$				

Para evaluar la relación lineal entre la concentración del activo en la solución y el área respuesta, se determinó ecuación de regresión lineal, calculando la pendiente (b), el intercepto (a) (ecuación de la forma $y = bx + a$), el coeficiente de correlación (R) y el coeficiente de determinación (R^2). Como primera prueba para la linealidad se verificó que el coeficiente de correlación (R) y el coeficiente de determinación (R^2) sean mayores al criterio de aceptación (Tabla 21) obtenido de la literatura (United States Pharmacopeial Convention 2018, Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) 2001), lo cual se cumple y por lo tanto verifica en primera instancia la linealidad del sistema (véase Tabla 21).

Tabla 21. Coeficientes de correlación, determinación y sus respectivos criterios. Fuente: United States Pharmacopeial Convention 2018, Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) 2001.

	Experimental	Criterio de aceptación
Coeficiente de correlación (R)	0,9998	0,99
Coeficiente de determinación (R^2)	0,9996	0,98

Tabla 22. Análisis de residuos de la recta de regresión lineal del sistema. Fuente: esta investigación.

Nivel	Concentración μg/mL	Área (Promedio)	xy	x ²	y ²	Yi (*) (Área corregida)
50%	11,07	997600	11040134	1,22E+2	9,95E+11	1003472
	11,07	984686	10897219	1,22E+2	9,70E+11	1003472
	11,07	999127	11057033	1,22E+2	9,98E+11	1003472
75%	16,60	1501817	24930237	2,76E+2	2,26E+12	1494930
	16,60	1507570	25025729	2,76E+2	2,27E+12	1494930
	16,60	1496604	24843693	2,76E+2	2,24E+12	1494930
100%	22,13	1988615	44014811	4,90E+2	3,95E+12	1986387
	22,13	1991830	44085959	4,90E+2	3,97E+12	1986387
	22,13	1990071	44047037	4,90E+2	3,96E+12	1986387
125%	27,67	2483449	68708949	7,65E+2	6,17E+12	2477845
	27,67	2496054	69057688	7,65E+2	6,23E+12	2477845
	27,67	2483748	68717221	7,65E+2	6,17E+12	2477845
150%	33,20	2928150	97214873	1,10E+3	8,57E+12	2969302
	33,20	2973005	98704063	1,10E+3	8,84E+12	2969302
	33,20	2973488	98720099	1,10E+3	8,84E+12	2969302
Σ	332,00	29795810	741064747	8,27E+3	6,64E+13	29795810
$\bar{X}$	22,13	1986387	49404316	5,51E+2	8,30E+12	1986387
n	15					
Sb	483,11			Sa	11342	
Sy,x	214385246					

(*) Valores de área obtenidos a partir de la ecuación de la recta.

Para verificar la correlación entre “x” e “y” mostrada por los coeficientes de correlación y determinación, se realiza un test de t-student para el R², comparando el t calculado (ecuación 26) con el t tabulado para un nivel de 95% de confianza y n-2 grados de libertad. En este caso la hipótesis nula (Ho) es la no correlación entre “x” e “y”. Dado que el t calculado es mayor que el t tabulado (Tabla 23), se rechaza la hipótesis nula, siendo la correlación lineal significativa con la probabilidad calculada (95%).

$$t = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (26)$$

Se realiza el análisis de residuos para obtener los parámetros S_{y,x}, S_b y S_a (Tabla 22), los cuales son necesarios para llevar a cabo las pruebas t-student y el cálculo de los intervalos de confianza para la pendiente (b) y el intercepto (a).

La prueba t-student para la pendiente (b) e intercepto (a), las cuales cumplen el criterio y se demuestra que la pendiente difiere significativamente de cero (se acepta H_1 ; existe una pendiente, Tabla 5) y el intercepto NO difiere significativamente de cero (se acepta H_0 ; ausencia de sesgo, Tabla 5) (Quattrocchi et al. 1992).

Se realizó un test de significación estadística de la desviación estándar de la pendiente (ecuación 14) y un test de proporcionalidad (ecuación 15). El test de significación estadística de la pendiente cumple el criterio ya que está dentro de los intervalos de confianza para la pendiente (b) no se incluye el cero (Tabla 23), comprobando así que existe una pendiente significativamente distinta de cero. Para el test de proporcionalidad del intercepto (a) es necesario que el intervalo de confianza incluya el cero, lo cual se cumple (Tabla 23) y comprueba que la ordenada en el origen es estadísticamente igual a cero (si la concentración del activo es cero la respuesta esperada debería ser cero) y el método carece de un sesgo (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) 2001).

Tabla 23. Prueba t-student, intervalos de confianza de la pendiente e intercepto y sus respectivos criterios de aceptación. Fuente: United States Pharmacopeial Convention 2018, Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) 2001.

Parámetro	t calculada	t tabulada	Criterio de aceptación
R	183,84	2,16	t calculada > t tabulada
Pendiente (b)	183,84	2,16	t calculada > t tabulada
Intercepto (a)	1,81	2,16	t calculada < t tabulada
Intervalos de confianza			
88817 +/- 1043			
Pendiente (b)	Inferior	Superior	No debe incluir el cero
	87774	89860	
20558 +/- 24498			
Intercepto (a)	Inferior	Superior	Debe incluir el cero
	-3940	45056	

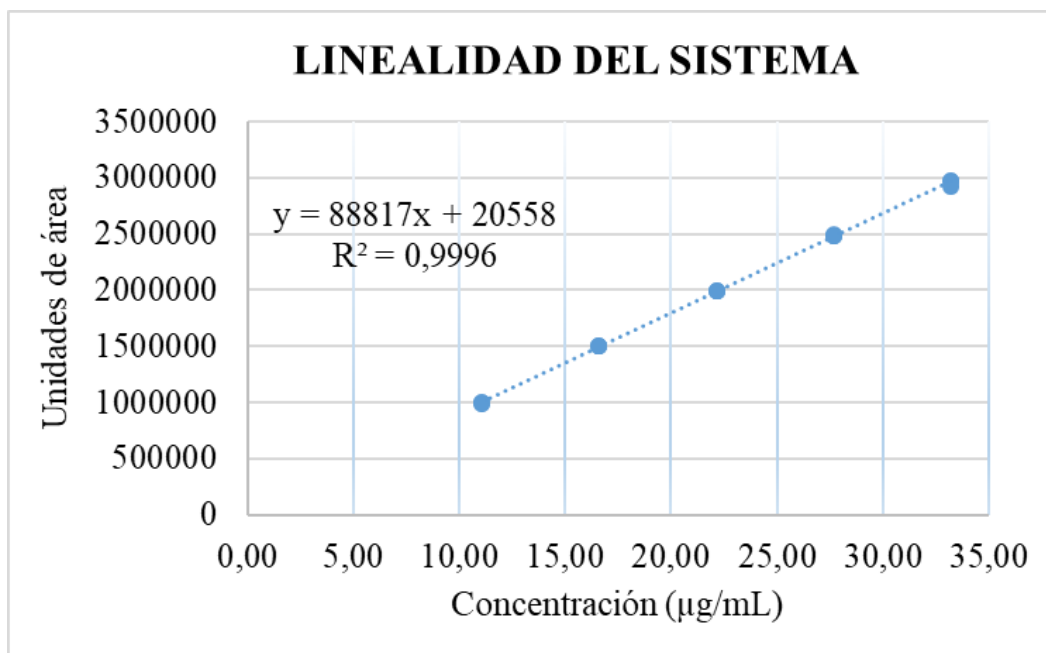


Figura 30. Curva de calibración de la linealidad del sistema correspondiente al promedio de las áreas obtenidas para cada nivel. Fuente: esta investigación.

Linealidad del método

Se realizó el mismo tratamiento y las mismas pruebas a los datos obtenidos para la linealidad del método. Se obtuvo la ecuación de regresión lineal, se calculó los coeficientes de correlación (R) y de determinación (R^2), se realizó un test t-student para corroborar la correlación entre “x” e “y” para un nivel de 95% de confianza y n-2 grados de libertad, se calcularon y analizaron los intervalos de confianza para la pendiente (b) y el intercepto (a). Los resultados se muestran en la Tabla 25.

Tabla 24. Análisis de residuos de la recta de regresión lineal del método. Fuente: esta investigación.

Nivel	Concentración µg/mL	Área (Respuesta)	xy	x ²	y ²	Yi (*) (Área corregida)
50%	11,07	991373	10971222	1,22E+2	9,83E+11	987997
	11,07	983229	10881095	1,22E+2	9,67E+11	987997
	11,07	981246	10859155	1,22E+2	9,63E+11	987997
75%	16,60	1496000	24833666	2,76E+2	2,24E+12	1477753
	16,60	1464084	24303859	2,76E+2	2,14E+12	1477753
	16,60	1485980	24667334	2,76E+2	2,21E+12	1477753
100%	22,13	1971485	43635655	4,90E+2	3,89E+12	1967509
	22,13	1962020	43426162	4,90E+2	3,85E+12	1967509
	22,13	1963970	43469323	4,90E+2	3,86E+12	1967509
125%	27,67	2458602	68021513	7,65E+2	6,04E+12	2457265
	27,67	2451806	67833490	7,65E+2	6,01E+12	2457265
	27,67	2465658	68216743	7,65E+2	6,08E+12	2457265
150%	33,20	2951426	97987638	1,10E+3	8,71E+12	2947020
	33,20	2946811	97834403	1,10E+3	8,68E+12	2947020
	33,20	2938947	97573334	1,10E+3	8,64E+12	2947020
Σ	332,00	29512632	734514594	8,27E+3	6,53E+13	29512632
$\bar{X}$	22,13	1967509	48967640	5,51E+2	8,16E+12	1967509
n=	15					
Sb	276,41			Sa	6489	
Sy,x	70177984					

(*) Valores de área obtenidos a partir de la ecuación de la recta.

Tabla 25. Resultados de las pruebas de verificación de la linealidad del método y su respectivo criterio de aceptación. Fuente: United States Pharmacopeial Convention 2018, Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) 2001.

Ecuación de la recta			
y= 88510*x + 8485			
		Experimental	Criterio de aceptación
Coeficiente de correlación (R)		0,9999	0,990
Coeficiente de determinación (R ²)		0,9999	0,980
Prueba t-student			
Parámetro	t calculada	t tabulada	Criterio de aceptación
R	320,21	2,16	t calculada > t tabulada
Pendiente (b)	320,21	2,16	t calculada > t tabulada
Intercepto (a)	1,31	2,16	t calculada < t tabulada
Parámetro	Intervalos de confianza		Criterio de aceptación
Pendiente (b)	88510 +/- 597		No debe incluir el cero
	Inferior	Superior	Debe incluir el valor de la pendiente de la linealidad del sistema
	87913	89107	
Intercepto (a)	8485 +/- 14016		Debe incluir el cero
	Inferior	Superior	
	-5531	22501	

El coeficiente de correlación (R), el coeficiente de determinación (R^2) y la prueba t-student para el coeficiente de correlación cumplen los criterios establecidos, por lo cual se verifica la correlación entre “x” e “y” (Tabla 25).

Con los parámetros $S_{y,x}$, S_b y S_a obtenidos del análisis de residuos (Tabla 24), se realizaron las pruebas t-student y se calcularon los intervalos de confianza para la pendiente (b) y el intercepto (a). La pendiente (b) cumple con la prueba t-student (se acepta H_1 , Tabla 5) y su intervalo de confianza no incluye el cero (Tabla 25), lo cual demuestra que difiere significativamente de cero y efectivamente existe una pendiente. El intercepto (a) cumple con la prueba t-student (se acepta H_0 , Tabla 5) y el intervalo de confianza incluye el cero, por lo tanto, se demuestra que el valor es estadísticamente igual a cero y el método carece de sesgo.

El hecho de que el intercepto (a) no difiera significativamente de cero demuestra la ausencia de efecto matriz aditivo en el método analítico. La pendiente de la linealidad del método posee un criterio adicional: el intervalo de confianza de la pendiente de la linealidad del método debe incluir

el valor de la pendiente obtenida en la linealidad del sistema (Tabla 25). El anterior criterio se cumple y prueba que las pendientes NO difieren significativamente entre sí, por consiguiente, se demuestra (en una primera instancia) que no existe un efecto matriz multiplicativo (este análisis se complementa con los resultados obtenidos en exactitud).

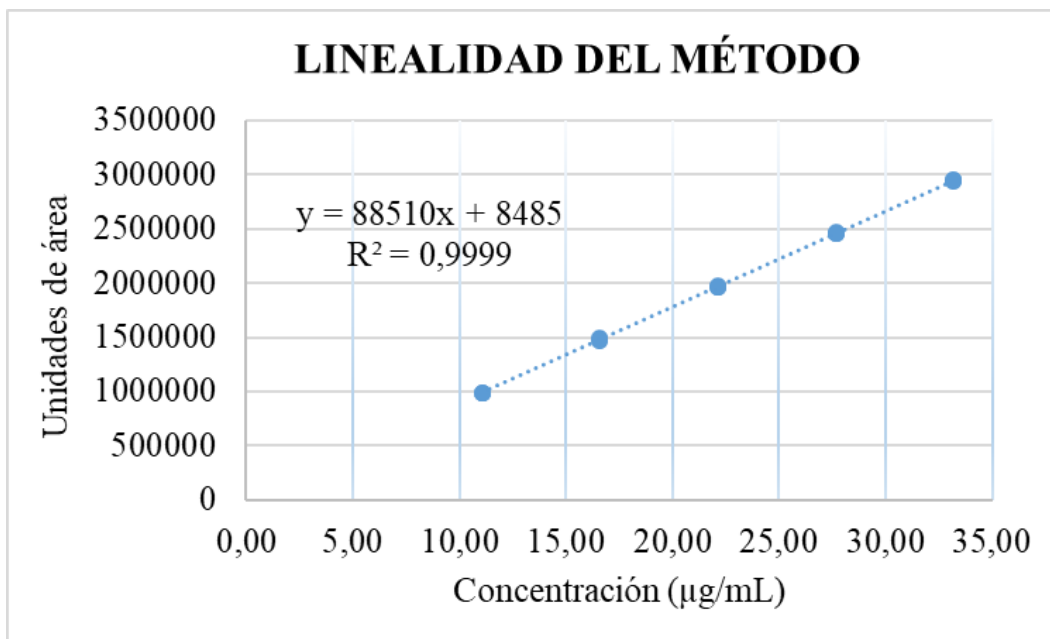


Figura 31. Curva de calibración de la linealidad del método correspondiente al promedio de las áreas obtenidas para cada nivel. Fuente: esta investigación.

Exactitud / Recuperación

La recuperación de activo se evaluó a los niveles de 75 %, 100 % y 125 % (Tabla 26). El cálculo del porcentaje de recuperación se realizó mediante el método del estándar externo (ecuación 6) (el cálculo de la concentración en la Tabla 26 de la solución estándar incluye la corrección por la pureza del mismo (99,9%) - Tabla 7).

Tabla 26. Resultados del análisis de la exactitud y test t-student. Fuente: Este estudio.

	Peso (mg)	Concentración (µg/mL)	Área Promedio			
Estándar	11,4	22,78	2011016			
	Nivel	Peso (mg)	Concentración (µg/mL)	Muestra	Área promedio	% Recuperado
Muestras	75%	15,1	16,76	1	1471829	99,459
		14,9	16,54	2	1467959	100,529
		15,0	16,65	3	1476567	100,444
	100%	20,1	22,31	1	1946940	98,837
		20,2	22,42	2	1968098	99,416
		19,8	21,98	3	1949833	100,483
	125%	24,9	27,64	1	2464804	101,005
		25,3	28,08	2	2478085	99,944
		25,2	27,97	3	2471293	100,066
					$\bar{X}$	100,020
				S	0,681	
				RSD (%)	0,681	
Test	t calculada	t tabulada	Criterio de aceptación			
t-student	0,227	2,306	t calculada < t tabulada			

En la Tabla 26 se observa que el porcentaje recuperado para cada una de las muestras se encuentra en el intervalo 97 al 100%, el cual es el rango aceptado por la industria farmacéutica (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) 2001).

Se realizó un test t-student mediante la cual comprobamos que la recuperación media del analito no difiera significativamente del 100%, este se realiza comparando el t calculado (ecuación 27) con el t tabulado para un nivel de confianza del 95% y n-1 grados de libertad. Dado que el resultado obtenido cumple el criterio de aceptación (Tabla 26), se comprueba que no existe una diferencia significativa entre la recuperación media y el 100%.

$$t = \frac{|100 - \bar{X}| * \sqrt{n}}{RSD} \quad (27)$$

Como último análisis para la evaluar la exactitud, se calcularon los intervalos de confianza al 95% para cada uno de los niveles evaluados en la exactitud (75 %, 100 % y 125) (ecuación 28). Los resultados se muestran a continuación (Ermer y Miller 2005).

$$\bar{X} \pm t_{0,05} * \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (28)$$

Tabla 27. Intervalos de confianza al 95% para los niveles evaluados en la exactitud. Fuente: Ermer y Miller 2005.

Nivel	Intervalo de confianza		Criterio de aceptación
	100,144 ± 0,595		
75%	Inferior	Superior	
	98,666	101,621	
	99,579 ± 0,835		
100%	Inferior	Superior	Los intervalos deben incluir el 100%
	97,504	101,654	
	100,338 ± 0,581		
125%	Inferior	Superior	
	98,896	101,781	

El cumplimiento del criterio para los intervalos de confianza y de los anteriores criterios demuestran una correcta exactitud del método.

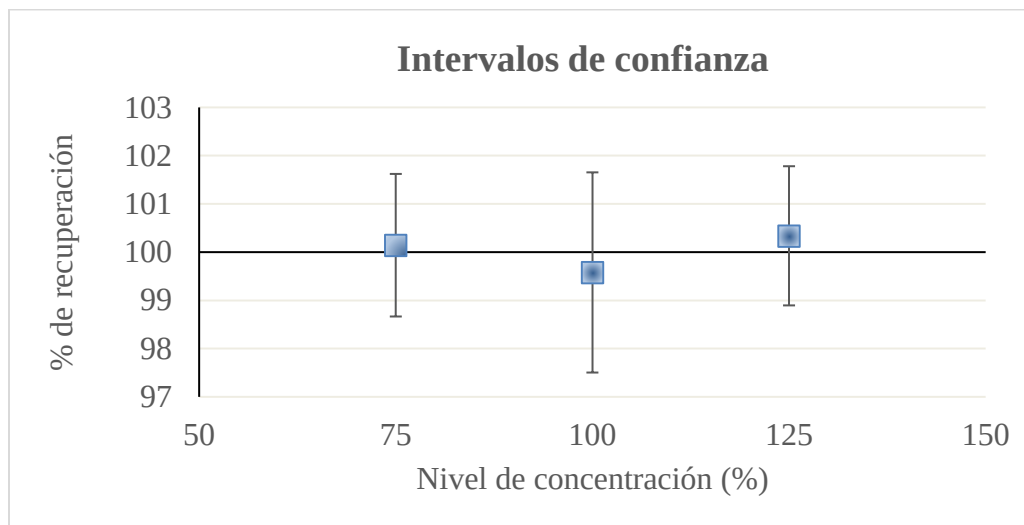


Figura 32. Intervalos de confianza para la media en los niveles de concentración evaluados. Fuente: esta investigación.

Efecto matriz

Para comprobar que no existe efecto matriz en las muestras preparadas según la metodología establecida, es necesario analizar los resultados obtenidos en la linealidad del método y la exactitud.

La prueba t-student realizada para el intercepto de la linealidad del método, nos muestra que la recta no difiere significativamente de cero (8485 +/- 14016, el intervalo de confianza incluye el cero) (Tabla 25) y se descarta un efecto matriz aditivo.

Para descartar un posible efecto matriz multiplicativo es necesario evaluar los resultados obtenidos para la pendiente de la curva de la linealidad del método y complementamos el análisis con los resultados obtenidos en la exactitud. En la Tabla 25 se tiene como criterio adicional que el intervalo de confianza de la pendiente para la curva de la linealidad del método (88510 +/- 597) incluya el valor de la pendiente de la curva de la linealidad del sistema (88817), lo cual se cumple, y comprueba que la pendiente la linealidad del método no difiere significativamente de la obtenida para la linealidad del sistema; para complementar la afirmación anterior, es importante remitirse a la exactitud y analizar los intervalos de confianza del 95% obtenidos para los tres niveles evaluados de concentración de activo (75%, 100% y 125%), los cuales incluyen al 100% de activo, lo que confirma que las curvas de calibración de la linealidad del sistema y la linealidad del método no difieren significativamente, dado que si lo hicieran, se apreciaría una diferencia significativa en los porcentajes de activo recuperado mostrando una tendencia creciente (mayor recuperación de activo) a medida que aumentamos el nivel de concentración, (efecto matriz multiplicativo) (Figura 8).

Las pruebas realizadas para la linealidad del método y la exactitud demuestran que no existe efecto matriz en la metodología utilizada.

Precisión (Repetibilidad)

Repetibilidad del sistema

Debido a que la repetibilidad del sistema consiste al evaluar la variación de las respuestas causada únicamente por el equipo, es posible evaluarla al calcular el RSD de las seis inyecciones de estándar realizadas al evaluar la idoneidad del sistema (SST) (Tabla 14).

Tabla 28. Resultado y criterio de aceptación de la repetibilidad del sistema. Fuente: esta investigación, United States Pharmacopeial Convention 2018.

RSD de las 6 inyecciones sucesivas de estándar	Criterio de aceptación
0,43%	Menor al 2%

Dado a que el RSD cumple el criterio de aceptación se afirma que el sistema tiene una repetibilidad adecuada para el análisis realizado.

Repetibilidad del método

Tabla 29. Resultados de repetibilidad del método. Fuente: esta investigación.

	Peso de estándar o muestra (mg)	Peso equivalente en isotretinoína (mg)	concentración (µg/mL)	Área	% Recuperado
Estándar	11,2	11,17	22,33	1989002*	No aplica
Muestra 1	332,5	19,72	21,91	1942152	99,518
Muestra 2	337,0	19,99	22,21	1991114	100,664
Muestra 3	337,4	20,01	22,24	1986922	100,333
Muestra 4	336,5	19,96	22,18	1983556	100,431
Muestra 5	334,5	19,84	22,04	1970076	100,345
Muestra 6	333,8	19,80	22,00	1969076	100,504
				$\bar{X}$	100,299
				S	0,402
				RSD	0,400

*Área promedio de seis inyecciones de estándar.

Debido a que este nivel de precisión busca evaluar la variación de los resultados obtenidos provocada por el método, la preparación de las muestras se realiza en un intervalo corto de tiempo y por el mismo analista. La variación se midió a través del cálculo del RSD para el porcentaje recuperado de las seis muestras analizadas, el cual tiene un valor de 0,400% inferior al valor máximo aceptado del 2% (Tabla 29), por lo tanto, se afirma que el método posee una repetibilidad adecuada.

Precisión intermedia

La precisión intermedia se evaluó realizando el ensayo de disolución en diferente día y por diferente analista, cada análisis se realizó por triplicado y se calculó el porcentaje de recuperación para cada muestra.

Tabla 30. Resultados de la precisión intermedia para diferente día y diferente analista en términos de porcentaje de recuperación. Fuente: esta investigación.

% Recuperación		
	Analista 1	Analista 2
Dia 1	99,854	99,593
	99,980	99,547
	99,934	100,126
RSD	0,0638	0,323
Dia 2	99,612	99,352
	99,592	99,147
	99,196	100,496
RSD	0,236	0,729
	$\bar{X}$	99,702
	S	0,394
	RSD total	0,395

Para evaluar la variación entre los porcentajes de activo recuperado variando día y analista se calcula un RSD total, el cual no debe ser mayor al doble del criterio establecido para la repetibilidad del método, es decir, no debe superar el 4% (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) 2001). El valor obtenido es 0,395%, por lo que se cumple el criterio establecido.

Para analizar si los resultados del ensayo de disolución difieren significativamente dependiendo del analista y el día, se realizó una ANOVA factorial para evaluar la existencia del efecto en el análisis debido a esos factores (día o analista) o la interacción entre ellos. Los resultados se muestran en la siguiente tabla. El ANOVA se realiza para un α de 0,05.

Tabla 31. Resultados del análisis de varianza ANOVA para evaluar la precisión intermedia. Fuente: esta investigación.

Fuente de la variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Estimador	F experimental	Probabilidad (p)
Analista	0,224	1	0,224	1,294	0,288
Día	0,001	1	0,001	0,004	0,950
Interacción (analista-día)	0,100	1	0,100	0,579	0,469
Residuales	1,382	8	0,173	-	-
Hipótesis				Criterio de aceptación	
Ho: No existe efecto debido al factor o a la interacción entre ellos				Probabilidad > $\alpha=0,05$	
Hi: existe efecto debido al factor o a la interacción entre ellos				Probabilidad < $\alpha=0,05$	

Con los resultados obtenidos del ANOVA factorial se comprueba que no hay diferencias significativas en los resultados del ensayo de disolución debido a los factores (día y analista) o a la interacción entre ellos, ya que para todos los casos se acepta la hipótesis nula. No existe efecto debido al analista ($p=0,288$), no existe efecto debido al día ($p=0,950$) y además no hay diferencias significativas debido a la interacción de los dos factores ($p=0,469$) (Montgomery 2004).

Robustez

Evaluación del cambio en el porcentaje de CTAB, cambio de pH en el medio de disolución, flujo y proporción de solventes en la fase móvil en el análisis cromatográfico

Las modificaciones para los factores escogidos se presentan a continuación.

Tabla 32. Condiciones normales y modificadas de análisis para evaluar la robustez. Fuente: esta investigación.

Factor	Condición normal	Condición modificada
CTAB	1%	0,90%
pH	6,8	6,9
Flujo	1,5 mL/min	1,25 mL/min
Fase móvil	MeOH:ACN: Solución A (10:75:15)	MeOH:ACN: Solución A (15:70:15)

En la siguiente tabla se muestra la manera en la que fueron preparadas y analizadas las 8 muestras para evaluar la robustez según el diseño de Plackett y Burman, donde α denota a la condición normal del factor y β la condición modificada.

Tabla 33. Diseño de Plackett y Burman para evaluar la robustez del método. Fuente: Plackett y Burman 1946.

Factor	Muestra							
	1	2	3	4	5	6	7	8
CTAB	β	β	β	β	α	α	α	α
pH	β	β	α	α	β	β	α	α
Flujo	β	α	β	α	β	α	β	α
Fase móvil	β	β	α	α	α	α	β	β
Dummy	β	α	β	α	α	β	α	β
Dummy	β	α	α	β	β	α	α	β
Dummy	β	α	α	β	α	β	β	α

La Tabla 34 muestra los resultados de los análisis de las muestras expresados en porcentaje de recuperación. Las concentraciones se presentan en $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 34. Resultados del análisis de las muestras para evaluar robustez. Fuente: esta investigación.

	Muestra							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Conc. estándar	22,2	22,2	22,2	22,8	22,2	22,8	22,2	22,2
Área estándar*	2496724	2060627	2502088	2056753	2502088	2056753	2496726	2064637
Conc. muestra	22,209	22,209	22,229	22,294	22,229	22,189	22,209	22,229
Área Muestra	2497004	2071999	2497086	2037260	2502850	1971393	2506416	2070653
Porcentaje de recuperación	99,97	100,51	99,67	101,30	99,90	98,49	100,35	100,16

*Área promedio de 3 inyecciones de estándar.

Con los resultados obtenidos del porcentaje de recuperación de las 8 muestras se calculó la influencia de los 4 factores evaluados utilizando la (ecuación 19).

Tabla 35. Cálculo de la influencia de los parámetros seleccionados para evaluar robustez. Fuente: esta investigación.

	CTAB	pH	Flujo	Fase móvil
Influencia del factor calculada $ V_i $	0,638	0,651	0,143	0,408
La influencia es significativa	NO	NO	NO	NO
La influencia del factor (V_i) es significativa si			$ V_i > S \cdot \sqrt{2}$ $ V_i > 0,882$	

S es la desviación estándar de la repetibilidad del método, con un valor de 0,624.

La variación de los porcentajes de recuperación de las muestras (Tabla 34), incluso cuando la concentración del estándar y la muestra son iguales, se debe a que cada una está preparada y/o analizada bajo las modificaciones consideradas. Dichas modificaciones influyen el resultado (porcentaje de recuperación) obtenido de cada una de las muestras.

Para evaluar si la influencia de cada factor es significativa, se compara el valor absoluto del resultado obtenido (V_i) con el producto de la desviación estándar del método S (ver repetibilidad del método) por raíz de 2. Los resultados muestran que la influencia de ninguno de los factores es significativa, por lo tanto, se asegura que el método es robusto dentro de las variaciones evaluadas.

Demostrada la no influencia significativa de los factores evaluados en la preparación del medio de disolución, el procedimiento operativo estándar (POE) del laboratorio comprenderá que la concentración de CTAB en el medio será de $0,95\% \pm 0,05\%$ y el pH de $6,85 \pm 0,05$ unidades de pH. El demostrar que los factores cromatográficos no influyen significativamente en los resultados, brinda la posibilidad de que el laboratorio ajuste las condiciones del flujo (1,25 mL/min – 1,5 mL/min) y proporciones de fase móvil (Tabla 32) del análisis cromatográfico si en algún momento se llegara a presentar algún inconveniente con la selectividad (resolución) de isotretinoína y tretinoína.

Evaluación del filtrado

Se evaluó la diferencia entre el porcentaje recuperado de las muestras con y sin filtrado (Tabla 36). Obtener diferencias en el porcentaje no mayores al 1% se asegura que no hay diferencias en la exactitud del porcentaje recuperado debido a la filtración de las muestras a través de membranas de nylon de $0,45 \mu\text{m}$ (United States Pharmacopeial Convention 2018).

Tabla 36. Resultados de la evaluación del filtrado en las muestras. Fuente: esta investigación.

Muestra	Peso (mg)	% Recuperado		Diferencia de % recuperado
		Muestras filtradas	Muestras sin filtrar	
1	19,917	99,620	99,222	0,398
2	19,840	99,600	99,566	0,033
3	19,911	99,204	99,185	0,019
			$\bar{X}$	0,150

Estabilidad de la solución estándar

Se inyectó por triplicado la solución estándar isotretinoína 100% nueve veces a lo largo de 24 horas. El RSD acumulativo del promedio de las inyecciones a lo largo de las 24 horas no supera el 2%, por lo que se asegura la estabilidad de la solución del estándar en condiciones de almacenamiento ambiente y en material con protección actínica durante las primeras 24 horas después de su preparación (Tabla 37).

Tabla 37. Resultados de la estabilidad de la solución estándar. Fuente: esta investigación.

Tiempo	Área promedio de las inyecciones	Promedio acumulativo	Desviación estándar acumulativa	RSD acumulativo
SST (0)	1986687	-	-	-
1	1988653	1987670	1390,643	0,070
2	1979963	1985101	4556,998	0,230
3	1981636	1984235	4104,493	0,207
4	1982355	1983859	3652,631	0,184
5	1981058	1983392	3461,399	0,175
6	1981654	1983144	3227,405	0,163
7	1977658	1982458	3562,277	0,180
8	1981440	1982345	3349,440	0,169
9	1978318	1981942	3405,051	0,172

Estabilidad de la muestra

Se inyectó por triplicado la solución muestra de isotretinoína siete veces a lo largo de 24 horas.

Tabla 38. Resultados de la estabilidad de la muestra. Fuente: esta investigación.

Tiempo	Área promedio inyecciones	Promedio acumulativo	Desviación estándar acumulativa	RSD acumulativo
0	1985432	-	-	-
1	1983040	1984236	1691,399	0,085
2	2023128	1997200	22485,944	1,126
3	1977268	1992217	20890,232	1,049
4	1962296	1986233	22502,280	1,133
5	1965941	1982851	21764,872	1,098
6	1973666	1981531	20169,533	1,018
7	1971780	1980319	18989,438	0,959

El RSD acumulativo del promedio de las inyecciones a lo largo de las 24 horas no supera el 2%, por lo que se asegura la estabilidad de la solución muestra durante las primeras 24 horas después del ensayo de disolución, en condiciones de almacenamiento ambiente y en envases de protección actínica.

Incertidumbre

En la Figura 33 muestra las diferentes fuentes de incertidumbre que contribuyen al valor total de la incertidumbre del mesurando (Activo disuelto (%)), $u(\text{recuperación})$ combina las incertidumbres de la preparación de la muestra y el estándar, $u(\text{sesgo})$ es la incertidumbre debida a la exactitud del método y S_{PI} la incertidumbre debida a la precisión intermedia.

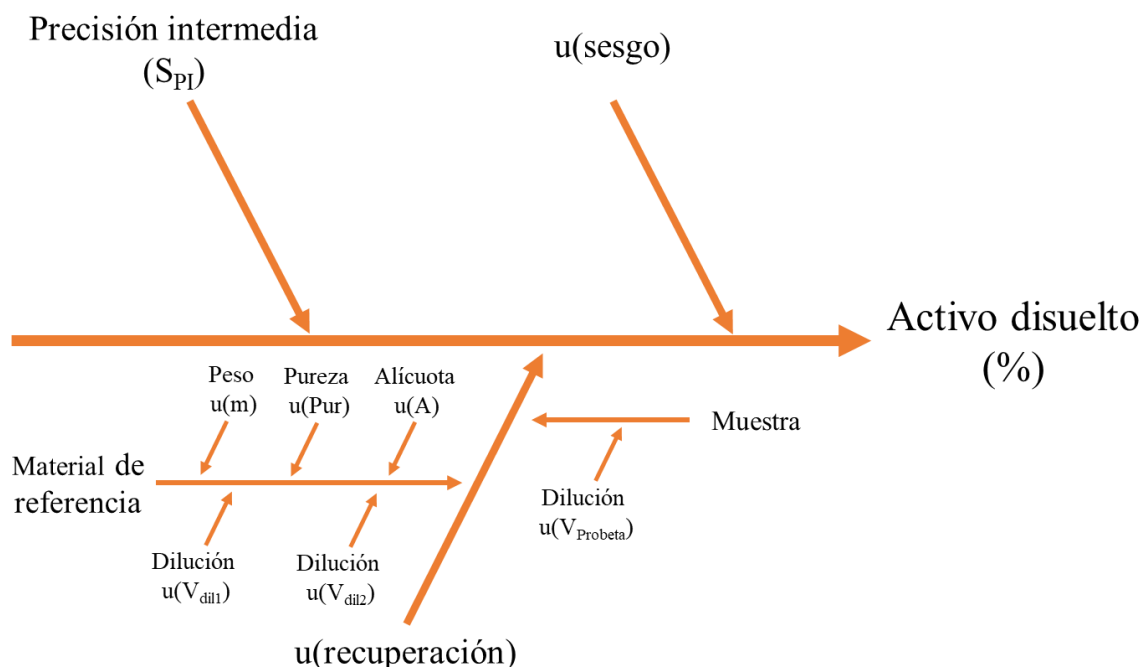


Figura 33. Diagrama de espina de pescado con las diferentes contribuciones de incertidumbre al valor del mesurando (porcentaje de activo disuelto). Fuente: esta investigación.

La ecuación 29 es la expresión matemática para el cálculo de activo disuelto (concentración de isotretinoína en la muestra), en ella se pueden apreciar los diferentes factores que contribuyen al valor de $u(\text{recuperación})$ (errores sistemáticos): la corrección de pureza del estándar (Pur), la balanza (la masa pesada (m)), la pipeta con la que se realiza la dilución del estándar (A), los balones para la dilución del estándar (balón de 10 mL (V_{dil1}); balón de 50 mL (V_{dil2}), y la probeta con la que se mide el medio de disolución ($V_{probeta}$).

$$\text{activo disuelto (\%)} = \frac{\text{Area Muestra} * 50 * m * Pur * A * V_{probeta}}{\text{Area estándar} * V_{dil1} * V_{dil2}} \quad (29)$$

La incertidumbre del estándar se calcula a partir del valor de pureza (potencia) reportado en el certificado de análisis expedido por la USP (0,997 por miligramo de material - 99,7%), tratando el rango que resta hasta el 100% como una distribución rectangular. Por lo tanto, la incertidumbre del estándar queda definida mediante la siguiente ecuación (Meyer 2003):

$$u(Pur) = \frac{100 - 99,7}{2 * \sqrt{3}} \quad (30)$$

La incertidumbre de la balanza y el material volumétrico se obtuvieron de los correspondientes certificados de calibración. Los valores reportados en los certificados de calibración corresponden a las incertidumbres expandidas (U), por lo tanto, debe dividirse ese valor entre 2 para obtener las incertidumbres estándar ($u(x)$), para luego combinarlas utilizando la ecuación 31 (véase que las unidades de los diferentes factores se cancelan al dividir la incertidumbre por el valor medido o utilizado). El cálculo de $u(\text{recuperación})$ se muestra en la Tabla 39.

$$u_{\text{recuperación}} = \sqrt{\left(\frac{u(m)}{\text{masa}}\right)^2 + \left(\frac{u(Pur)}{Pur}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{dil1})}{V_{dil1}}\right)^2 + \left(\frac{u(A)}{A}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{dil2})}{V_{dil2}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{probeta})}{V_{probeta}}\right)^2} \quad (31)$$

En la Figura 34 se puede apreciar la contribución de cada uno de los factores al valor de $u(\text{recuperación})$. La mayor contribución es debido a la incertidumbre de la balanza al momento de pesar el estándar.

Tabla 39. Cálculo de $u(\text{recuperación})$. Fuente: esta investigación.

Fuente	valor (x)	Incertidumbre estándar $u(x)$	Incertidumbre estándar relativa $u(x)/x$	$(u(x)/x)^2$
m	11,1 mg	7,45E-02	6,71E-03	4,50E-05
pureza	0,997	8,66E-04	8,69E-04	7,54E-07
balón 10 mL	10 mL	4,70E-04	4,70E-05	2,21E-09
Alícuota de 1 mL	1 mL	2,35E-04	2,35E-04	5,52E-08
balón 50 mL	50 mL	6,40E-04	1,28E-05	1,64E-10
probeta 1L	900 mL	2,46E-01	2,73E-04	7,47E-08
Σ				4,59E-05
$u(\text{recuperación})$				6,78E-03

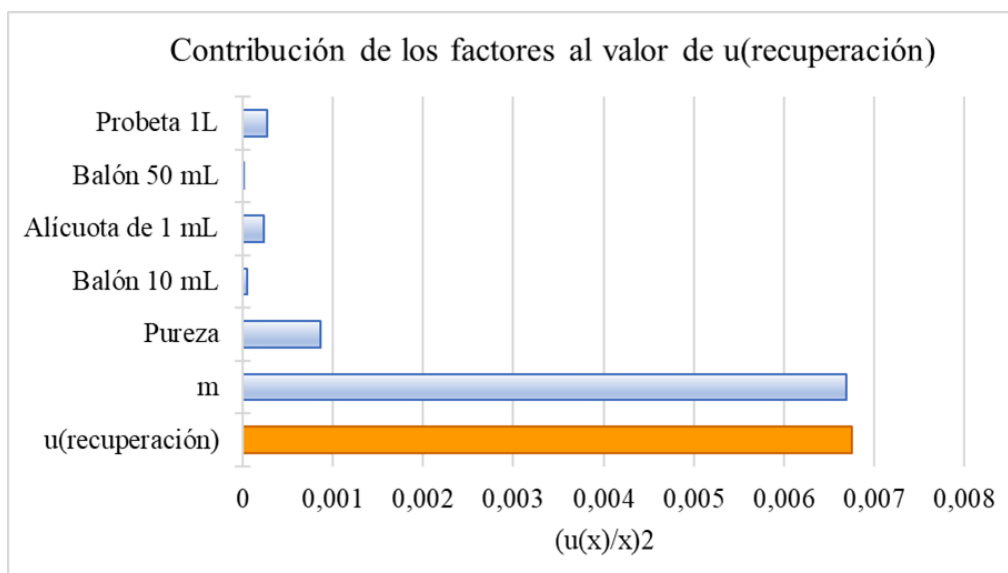


Figura 34. Contribución de los factores: balanza (masa), pureza del estándar, balón 10 mL, balón 50 mL, pipeta 1 mL, probeta 1L; al valor de incertidumbre $u(\text{recuperación})$. Fuente: esta investigación.

Para obtener la incertidumbre combinada, se usa la ecuación 23 para combinar las diferentes fuentes de incertidumbre del método: el valor de la incertidumbre debida al sesgo (ecuación 22), la desviación estándar de la precisión intermedia y la incertidumbre de $u(\text{recuperación})$ (la incertidumbre de $u(\text{recuperación})$ se expresa en términos de porcentaje para poder operarla con las otras fuentes de incertidumbre). El cálculo de la incertidumbre combinada se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 40. Cálculo de la incertidumbre combinada u_c e incertidumbre expandida (U). Fuente: esta investigación.

Fuente	Incertidumbre $u(x)$ (%)	$u(x)^2$
Precisión Intermedia	0,394	0,155
sesgo	0,227	0,052
u (recuperación)	0,675	0,456
	Σ	0,662
	u_c (%)	0,814
	U (%)	1,628

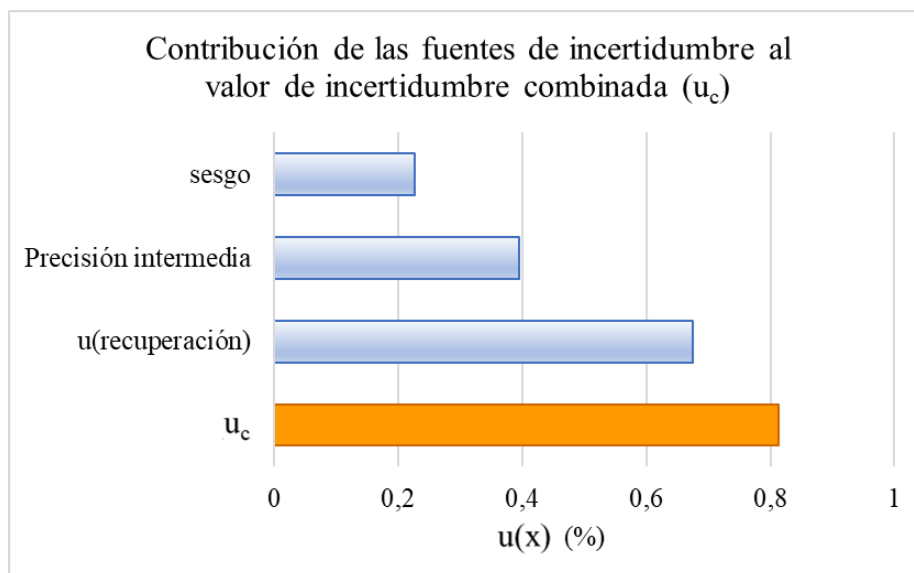


Figura 35. Contribución del sesgo, precisión intermedia y $u(\text{recuperación})$ al valor de la incertidumbre combinada (u_c). Fuente: esta investigación.

La mayor contribución a la incertidumbre combinada (u_c) es por parte de $u(\text{recuperación})$, aunque la precisión intermedia también presenta una contribución importante (Figura 35). Este resultado puede parecer contrario a lo que se esperaría si se tiene en cuenta que la variación en el pesaje del estándar $u(m)$ (mayor contribución de $u(\text{recuperación})$) debería estar incluido en la variación de la precisión intermedia ($u(\text{recuperación})$ debería presentar una contribución menor de incertidumbre que la precisión intermedia), no obstante, se debe tener en cuenta que la contribución de incertidumbre de la balanza fue obtenida de su calibración, y en dicho procedimiento se tiene en cuenta la excentricidad, lo cual aumenta el valor de incertidumbre de $u(m)$; sin embargo, la calibración y la verificación de la balanza realizada en el laboratorio (pesa 5 mg) muestran que la repetibilidad de las mediciones usando cargas bajas es muy buena, siempre y cuando el peso se disponga en el centro del receptor de carga de la balanza (lo comúnmente realizado en el laboratorio), lo cual justificaría que la precisión intermedia presente una contribución de incertidumbre menor a la de $u(\text{recuperación})$.

La incertidumbre expandida reportada (1,628) (Tabla 40), fue calculada utilizando un factor de cobertura de $k=2$, para obtener un nivel de confianza aproximado del 95%. Los resultados obtenidos a partir del uso de la metodología descrita en el presente documento se reportarían utilizando la siguiente expresión:

$$\text{Resultado} = \text{activo disuelto (\%)} \pm 1,628 \% \quad (32)$$

Detección de datos atípicos IQR

Se realizó la prueba IQR (ecuación 25) para los parámetros de exactitud (Tabla 26) y precisión intermedia (Tabla 30). Ninguno de los datos se encuentra por fuera del límite inferior o superior establecido por la prueba (Tabla 41).

Tabla 41. Prueba IQR para detección de datos atípicos. Fuente: esta investigación.

	Exactitud	Precisión intermedia
Cuartil 1 (Q_1)	99,459	99,498
Cuartil 2 (Q_2)	100,066	99,603
Cuartil 3 (Q_3)	100,483	99,946
IQR	1,024	0,447
Superior ($Q_3 + 1,5 \cdot \text{IQR}$)	102,019	100,616
Inferior ($Q_1 - 1,5 \cdot \text{IQR}$)	97,923	98,827

CONCLUSIONES

Se implementó satisfactoriamente la metodología analítica para la prueba de disolución del producto isotretinoína 20 mg en cápsula blanda, la cual cumple con las necesidades requeridas del laboratorio Quality Farma Análisis SAS.

La validación realizada en el presente trabajo permite asegurar que la metodología analítica desarrollada para el ensayo de disolución del producto isotretinoína 20 mg en cápsula blanda presenta una selectividad, linealidad, exactitud (recuperación) y precisión adecuados, según lo establecido por la USP e ICH.

La metodología analítica es robusta dentro de las modificaciones evaluadas de CTAB, pH para el medio de disolución, flujo y fase móvil. Además, permite realizar el análisis cromatográfico 24 horas después de haberse realizado el ensayo de disolución, siempre y cuando las muestras se mantengan a temperaturas entre $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$, humedad relativa menor a 70 % y protegidas de la luz directa.

Se generó un protocolo de validación en el cual se describe de manera detallada la metodología con la cual se llevó a cabo la evaluación de todos los parámetros requeridos para la validación del ensayo de disolución del producto “isotretinoína 20 mg” en cápsula blanda.

Se generó un informe de validación con todo el análisis estadístico requerido por las normas ICH para el ensayo de disolución del producto isotretinoína 20 mg en cápsula blanda.

Se realizó un procedimiento operativo estándar (POE) para el laboratorio, en el cual se describe a detalle la realización del ensayo de disolución del producto “isotretinoína 20 mg” en cápsula blanda para su posterior realización por el personal encargado en el laboratorio.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar las degradaciones ácida, básica y oxidativa (selectividad en condiciones de estrés) en material con protección actínica, con el fin de obtener productos de degradación más específicos en cuanto a cada tipo de tratamiento utilizado.

Se recomendó realizar la evaluación de la robustez de futuras metodologías según lo reportado por Placket y Burman, ya que ellos presentan un ensayo sencillo con un número de muestras reducido en comparación a un análisis de “una variable por vez”, y lo más importante, es estadísticamente correcto.

Se recomendó implementar el cálculo de incertidumbre como parámetro de validación en futuras validaciones.

Se recomendó implementar la prueba IQR para la detección de datos atípicos durante el desarrollo de futuras validaciones.

REFERENCIAS

- Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). 2001. “Validación de métodos analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria.” 23–113.
- Cordoba, J. A., y M. A. Arriola. 2011. “Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos”.
- Digenis, G. A.; Gold, T. B.; Shah, V. P. 1994. “Cross-linking of gelatin capsules and its relevance to their in vitro-in vivo performance.” *Journal of pharmaceutical sciences* 83(7):915–21.
- Ellis, Charles N., y Kent J. Krach. 2001. “Uses and complications of isotretinoin therapy”. *Journal of the American Academy of Dermatology* 45(5):S150–57.
- Erez, Elinor, Deborah Fass, y Eitan Bibi. 2009. “How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane”. *Nature* 459(7245):371–78.
- Ermer, Joachim, y John Miller. 2005. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice*.
- Ghorab, M. M., y Mayada Elhadi Babiker. 2012. “Formulation and In-vitro -evaluation of Isotretinoin Tablets”. *Journal of chemical pharmaceutical research* 4(5):2817–31.
- International Council of Harmonisation. 2005. *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)*. Geneva, Switzerland.
- International Council of Harmonisation. s/f. “ICH Official web site : ICH”. Recuperado el 12 de abril de 2019 (<https://www.ich.org/>).
- Kennedy, T. A., y D. C. Liebler. 1991. “Peroxyl radical oxidation of β -carotene: formation of β -carotene epoxides”. *Chemical research in toxicology* 4(3):290–95.
- De la Cruz, N., J. Giménez, S. Esplugas, D. Grandjean, L. F. De Alencastro, y C. Pulgarín. 2012. “Degradation of 32 emergent contaminants by UV and neutral photo-fenton in domestic wastewater effluent previously treated by activated sludge”. *Water Research* 46(6):1947–57.
- Li, Wei, Ying Liu, Quan Luo, Xue-mei Li, y Xi-bao Zhang. 2012. “Off-label uses of retinoids in dermatology”. 259–78.
- Magnusson, Bertil, Teemu Näykki, Håvard Hovind, y Mikael. Krysell. 2003. *Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories*.
- Marx, Michaela, Monika Stuparic, Andreas Schieber, y Reinhold Carle. 2003. “Effects of thermal processing on trans – cis- isomerization of β -carotene in carrot juices and carotene-containing preparations”. *Food Chemistry* 83(4):609–17.
- Meyer, Veronika R. 2003. “Measurement Uncertainty of Liquid Chromatographic Analyses Visualized by Ishikawa Diagrams”. *Journal of Chromatographic Science* 41:439–43.
- Meyer, Veronika R. 2010. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. 5a ed.

- Miller, James N., y Jane C. Miller. 2002. *Estadística y quimiometria para química analítica*. 4a ed. Madrid.
- Montgomery, Douglas C. 2004. *Diseño y análisis de experimentos*. 2a ed. Ciudad de México.
- Mordi, R. C., J. C. Walton, G. W. Burton, L. Hughes, K. U. Ingold, y D. A. Lindsay. 1991. “Exploratory study of β -carotene autoxidation”. *Tetrahedron Letters* 32(33):4203–6.
- Muños, H. J., C. Vallejo, C. Blanco, A. Gil, M. Á. Vicente, J. H. Ramírez, y L. A. Galeano. 2018. “10 kg scaled-up preparation of Al/Fe-pillared clay CWPO catalysts from concentrated precursors”. *Green Chemistry* 20(22):5196–5208.
- Park, Sung-hyun, y Hoo-kyun Choi. 2006. “The effects of surfactants on the dissolution profiles of poorly water-soluble acidic drugs”. *International journal of pharmaceutics* 321:35–41.
- Plackett, R. L., y J. P. Burman. 1946. “The design of optimum multifactorial experiments”. *Biometrika* 33(4):305–25.
- Quattrocchi, O. A., S. Abelaira, y R. Laba. 1992. *Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica*. Buenos Aires, Argentina.
- Stahl, W., y H. Sies. 1993. “Physical quenching of singlet oxygen and cis-trans isomerization of carotenoids”. *Annals of the New York Academy of Sciences* 691(1):10–19.
- Talevi, A., P. Quiroga, y M. E. Ruiz. 2016. *Procesos biofarmacéuticos*. 1a ed. La plata, Argentina.
- Tukey, J. W. 1977. *Exploratory Data Analysis*. Vol 2.
- U.S. Food and drug administration. 2010. *US label (PDF)*.
- U.S. Food and drug administration. 2017. “Drugs@FDA Glossary of Terms | FDA”. Recuperado el 12 de abril de 2019 (<https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/drugsfda-glossary-terms>).
- U.S. Food and drug administration. 2018. “The History of FDA’s Fight for Consumer Protection and Public Health”. Recuperado el 12 de abril de 2019 (<https://www.fda.gov/about-fda/history-fdas-fight-consumer-protection-and-public-health>).
- United States Pharmacopeial Convention. 2018. *United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 41-NF 36)*. Rockville.
- Voeikov, Vladimir. 2001. “Reactive Oxygen Species, Water, Photons, and Life”. *Rivista di Biologia / Biology Forum* 94(2):193–214.
- Yap, K. L., X. Liu, J. C. Thenmozhiyal, y P. C. Ho. 2005. “Characterization of the 13- cis -retinoic acid / cyclodextrin inclusion complexes by phase solubility , photostability , physicochemical and computational analysis”. *European journal of pharmaceutical sciences* 25(1):49–56.

ANEXOS

Anexo A. Calculo de valoración del lote M0879 de isotretinoína 20 mg en cápsula blanda.

IDENTIFICACIÓN

MUESTRA		ESTÁNDAR	
N° DE ANÁLISIS	-	CÓDIGO	STD-P-013
NOMBRE	ISOTRETINOINA 20 mg	NOMBRE	ISOTRETINOINA
LOTE	M0879	LOTE	R017X0
CANTIDAD DECLARADA	20,00 mg/cápsula	POTENCIA B.H.	99,70%
ESPECIFICACIÓN	90,0% - 110,0%	PESO MOLECULAR	300,44
CONTENIDO PROMEDIO	310,46 mg/cápsula	VENCIMIENTO	10/2019
FECHA DE ANÁLISIS	-		

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR
ESTÁNDAR

PESO	10,90 mg
DILUCIÓN 1	25,00 mL
ALICUOTA 1	1,00 mL
DILUCIÓN 2	10,00 mL
CONCENTRACIÓN	0,043 mg/mL

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES MUESTRA

MUESTRA 1		MUESTRA 2	
PESO	77,87 mg	PESO	78,05 mg
DILUCIÓN 1	200,00 mL	DILUCIÓN 1	200,00 mL
ALICUOTA 1	1,00 mL	ALICUOTA 1	1,00 mL
DILUCIÓN 2	10,00 mL	DILUCIÓN 2	10,00 mL
CONCENTRACIÓN	0,039 mg/mL	CONCENTRACIÓN	0,039 mg/mL

RESULTADOS ESTÁNDAR

RESPUESTAS	ESTÁNDAR
ÁREA 1	3543700
ÁREA 2	3538358
ÁREA 3	3532260
ÁREA 4	3525201
ÁREA 5	3516715
PROMEDIO	3531247
RSD	0,30%

RESULTADOS MUESTRA

RESPUESTAS	MUESTRA 1	MUESTRA 2
ÁREA 1	2911413	2926157
ÁREA 2	2901575	2921698
PROMEDIO	2906494	2923928
RSD	0,2%	0,1%

CÁLCULOS

	PORCENTAJE	mg/cápsula
MUESTRA 1	91,90%	18,380
MUESTRA 2	92,24%	18,447
PROMEDIO	92,07%	18,414
RSD	0,26%	0,26%
CRITERIO	Cumple	

BASE DE CÁLCULO

$$\% = \frac{\text{Área muestra} \times \text{Concentración final Estándar (mg/mL)} \times \text{peso promedio (mg/cápsula)} \times 100}{\text{Área Estándar} \times \text{Concentración final muestra (mg/mL)} \times \text{Cantidad declarada (mg/cápsula)}}$$

$$\text{mg/cápsula} = \frac{\text{Porcentaje Activo (\%)} \times \text{Cantidad Declarada}}{100}$$

ANALIZÓ
REVISÓ

Firma

Fecha

Firma

Fecha

Anexo B. Certificados del material de referencia USP: isotretinoína y tretinoína.

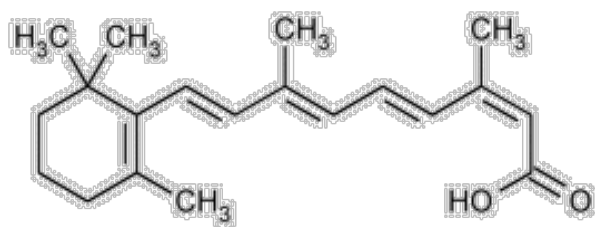
Certificate

ISOTRETINOIN

(3,7-Dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2-*cis*-4-*trans*-6-*trans*-8-*trans*-nonatetraenoic acid)

USP Catalog No.: 1353500

USP Lot No.: R017X0



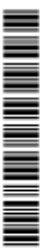
CAS No.: 4759-48-2

Molecular Formula: C₂₀H₂₈O₂

Molecular Weight: 300.44

LABEL TEXT

For use with specified USP compendial tests.
Not for use as a drug. See SDS prior to use
at www.usp.org/ids.



Lot: R017X0

USP REFERENCE STANDARD

ISOTRETINOIN 200 mg

Danger! May damage fertility or the unborn child.

Do not dry. For quantitative applications, use a value of 0.997 mg of isotretinoin per mg of material on the as is basis. Keep container tightly closed. Store in a freezer. Before opening vial, allow to reach room temperature. After opening, use contents promptly and protect from air and light.

USP, 12601 Twinbrook Pkwy, Rockville, MD, +1-301-881-0666
CAT No 1353500 Material mfd. in Germany

Obtain special instructions before use. Do not handle until all safety precautions have been read and understood. Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. If exposed or concerned: Get medical advice/attention. Store locked up. Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

Jeri L. Joth

Quality Assurance

Calculation Value

If a value is not provided on the label or accompanying documentation and the Reference Standard has a quantitative USP compendial application, a value of 100.0% is used. The purity value is not applicable for qualitative uses. Please refer to the specific Reference Standard label for further information.

Expiration

Current lots are identified in the current USP Catalog. In some cases, the previous lot may still be considered valid for use. If so, it is identified in the column marked "Previous Lot/Valid Use Date."

It is the responsibility of each user to determine that this lot is current or valid when used. For the most up-to-date information, please refer to the USP Store at www.usp.org.

Instructions for Use

Follow the instructions on the label of the USP Reference Standard and in the appropriate USP documentary standard(s).

Non-Monograph Use

The suitability of this Reference Standard for use in non-compendial applications is solely the responsibility of the user.

LEGAL NOTICE

USP WARRANTS GOOD TITLE TO USP REFERENCE STANDARDS ON DISPATCH FROM USP. THE FOREGOING WARRANTY IS IN LIEU OF ANY OTHER WARRANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION ANY WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, OR ANY WARRANTY THAT THE PRODUCTS, INCLUDING THIS CERTIFICATE, ARE OF MERCHANTABILITY QUALITY. USP'S LIABILITY ARISING OUT OF OR RELATING TO THE SUPPLY OF USP REFERENCE STANDARDS AND THIS CERTIFICATE SHALL IN NO EVENT INCLUDE LOSS OF PROFITS, COST OF PROCURING SUBSTITUTE GOODS OR SERVICES, OR ANY INCIDENTAL, INDIRECT, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES OF ANY KIND, EVEN IF USP IS AWARE OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. WITHOUT LIMITING THE GENERALITY OF THE FOREGOING, USP DOES NOT WARRANT THAT THE USE OR RESALE OF USP REFERENCE STANDARDS, INCLUDING THEIR USE TO PERFORM TESTS AND ASSAYS PUBLISHED BY USP, WILL NOT INFRINGE UNITED STATES OR ANY OTHER PATENTS.

USP Reference Standards are not intended for use as drugs, dietary supplements, or as medical devices.

This certificate may not be reproduced without the express written permission of USP.



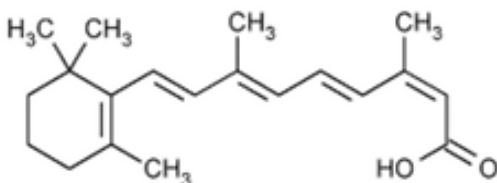
Certificate

ISOTRETINOIN

(3,7-Dimethyl-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)2-*cis*-4-*trans*-6-*trans*-8-*trans*-nonatetraenoic acid)

USP Catalog No.: 1353500

USP Lot No.: R09860

	CAS No.:	4759-48-2
	Molecular Formula:	C ₂₀ H ₂₈ O ₂
	Molecular Weight:	300.44

**LABEL TEXT**

For use with specified USP compendial tests. Not for use as a drug. See SDS prior to use at www.usp.org/sds.



Lot: R09860

**USP REFERENCE STANDARD****ISOTRETINOIN 200 mg**

Danger! May damage fertility or the unborn child.

For quantitative applications, use a value of 0.999 mg of isotretinoin per mg of material on the as is basis. Keep container tightly closed. Store in a freezer. Before opening vial, allow to reach room temperature. After opening, use contents promptly and protect from air and light.

USP, 12601 Twinbrook Pkwy, Rockville, MD, +1-301-881-0666
Cat. No. 1353500 Material mfd. in Germany

Obtain special instructions before use. Do not handle until all safety precautions have been read and understood. Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. If exposed or concerned: Get medical advice/attention. Store locked up. Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

Jeri L. Joth

Quality Assurance

**Assigned Value**

Please refer to the USP Reference Standard label for the assigned value of the specific lot. If the lot was developed for qualitative use, it will not have an assigned value.

Valid Use Date

It is the responsibility of the user to ascertain that a particular lot of a USP Reference Standard has official status either as a "Current lot" or as a "Previous lot" within the assigned valid use date. The online USP Reference Standards Catalog and the online USP Store at www.usp.org are updated daily. USP recommends referring to one of these sources prior to using a USP Reference Standard to make sure the lot is valid for use.

Storage

Storage conditions are lot-specific and may change from one lot to another. If no specific directions or limitations are provided on the USP Reference Standard label, the conditions of storage shall include storage at room temperature and protection from moisture, light, freezing, and excessive heat.

Instructions for Use

Follow the instructions provided on this Certificate, on the label of the USP Reference Standard, and in the associated USP documentary standard(s). Please refer to General Chapter <11> for additional information.

Non-USP Compendial Use

USP Reference Standards are for use in analytical or laboratory applications as specified in USP compendia. They are not for use in humans or animals as drugs or medical devices. It is the responsibility of the user to determine the suitability of the USP Reference Standard for non-USP compendial uses.

LEGAL NOTICE

USP WARRANTS GOOD TITLE TO USP REFERENCE STANDARDS ON DISPATCH FROM USP. THE FOREGOING WARRANTY IS IN LIEU OF ANY OTHER WARRANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION ANY WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, OR ANY WARRANTY THAT THE PRODUCTS, INCLUDING THIS CERTIFICATE, ARE OF MERCHANTABLE QUALITY. USP'S LIABILITY ARISING OUT OF OR RELATING TO THE SUPPLY OF USP REFERENCE STANDARDS AND THIS CERTIFICATE SHALL IN NO EVENT INCLUDE LOSS OF PROFITS, COST OF PROCURING SUBSTITUTE GOODS OR SERVICES, OR ANY INCIDENTAL, INDIRECT, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES OF ANY KIND, EVEN IF USP IS AWARE OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. WITHOUT LIMITING THE GENERALITY OF THE FOREGOING, USP DOES NOT WARRANT THAT THE USE OR RESALE OF USP REFERENCE STANDARDS, INCLUDING THEIR USE TO PERFORM TESTS AND ASSAYS PUBLISHED BY USP, WILL NOT INFRINGE UNITED STATES OR ANY OTHER PATENTS.

USP Reference Standards are not intended for use as drugs, dietary supplements, or as medical devices.

This certificate may not be reproduced without the express written permission of USP.

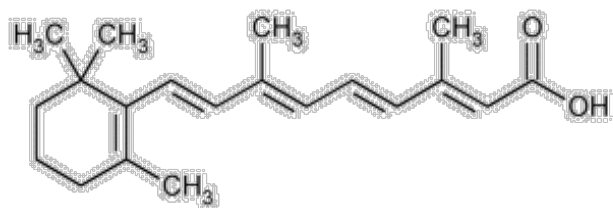
Certificate

TRETINOIN

(all trans-Retinoic acid)

USP Catalog No.: 1674004

USP Lot No.: R004Y0



CAS No.: 302-79-4

Molecular Formula: $C_{20}H_{28}O_2$

Molecular Weight: 300.44

USP REFERENCE STANDARD

TRETINOIN 5 x 30 mg

For use with specified USP compendial tests.
Not for use as a drug. See SDS prior to use at www.usp.org/sds.



Do not dry. For quantitative applications, use a value of 0.996 mg of tretinoin per mg of material on the as is basis. Protect from light. Store in a freezer. Allow to reach room temperature before opening. Use contents promptly after opening.

Danger! Harmful if swallowed. Causes skin irritation. Causes serious eye irritation. May damage fertility or the unborn child.
Obtain special instructions before use. Do not handle until all safety precautions have been read and understood. Wash thoroughly after handling. Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. If swallowed: Call a poison center/doctor if you feel unwell. Rinse mouth. If on skin: Wash with plenty of water. If skin irritation occurs: Get medical advice/attention. Take off contaminated clothing and wash before reuse. If in eyes: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: Get medical advice/attention. If exposed or concerned: Get medical advice/attention. Store locked up. Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

KEEP AMPULES IN SECONDARY CONTAINER!

USP, 12601 Twinbrook Pkwy, Rockville, MD, +1-301-881-0666
CAT. NO. 1674004 Material mfd. in Germany

LOT: R004Y0



Jeri L. Joth
Quality Assurance

Calculation Value

If a value is not provided on the label or accompanying documentation and the Reference Standard has a quantitative USP compendial application, a value of 100.0% is used. The purity value is not applicable for qualitative uses. Please refer to the specific Reference Standard label for further information.

Expiration

Current lots are identified in the current USP Catalog. In some cases, the previous lot may still be considered valid for use. If so, it is identified in the column marked "Previous Lot/Valid Use Date."

It is the responsibility of each user to determine that this lot is current or valid when used. For the most up-to-date information, please refer to the USP Store at www.usp.org.

Instructions for Use

Follow the instructions on the label of the USP Reference Standard and in the appropriate USP documentary standard(s).

Non-Monograph Use

The suitability of this Reference Standard for use in non-compendial applications is solely the responsibility of the user.

LEGAL NOTICE

USP WARRANTS GOOD TITLE TO USP REFERENCE STANDARDS ON DISPATCH FROM USP. THE FOREGOING WARRANTY IS IN LIEU OF ANY OTHER WARRANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION ANY WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, OR ANY WARRANTY THAT THE PRODUCTS, INCLUDING THIS CERTIFICATE, ARE OF MERCHANTABILITY QUALITY. USP'S LIABILITY ARISING OUT OF OR RELATING TO THE SUPPLY OF USP REFERENCE STANDARDS AND THIS CERTIFICATE SHALL IN NO EVENT INCLUDE LOSS OF PROFITS, COST OF PROCURING SUBSTITUTE GOODS OR SERVICES, OR ANY INCIDENTAL, INDIRECT, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES OF ANY KIND, EVEN IF USP IS AWARE OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. WITHOUT LIMITING THE GENERALITY OF THE FOREGOING, USP DOES NOT WARRANT THAT THE USE OR RESALE OF USP REFERENCE STANDARDS, INCLUDING THEIR USE TO PERFORM TESTS AND ASSAYS PUBLISHED BY USP, WILL NOT INFRINGE UNITED STATES OR ANY OTHER PATENTS.

USP Reference Standards are not intended for use as drugs, dietary supplements, or as medical devices.

This certificate may not be reproduced without the express written permission of USP.

Anexo C. Certificados de calibración de la balanza analítica y el material volumétrico.

CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN

Certificado No: CAB-01-179-19

Certificate Number:

Razón Social del Solicitante: **QUALITY FARMA ANALISIS S.A.S.**
Dirección: **Cra. 31 No. 25A - 61**
Ciudad (Departamento) - País: **Bogotá D.C. (Cundinamarca) - Colombia**

DATOS DEL INSTRUMENTO SOMETIDO A CALIBRACIÓN:

Descripción:	Instrumento de pesaje de funcionamiento no automático	Modelo:	PIONEER PA224
Fabricante:	OHAUS	Capacidad Máxima:	220 g
Serie:	B444208349	División de Escala:	0,0001 g
Código Interno:	E17		

Fecha de Calibración: **2019-06-01**

Lugar de Calibración: **Área de Pesaje**

Estado de recepción del instrumento: **Se encontró en buenas condiciones de emplazamiento y uso para realizar calibración.**

Extractos o enmiendas de los certificados y reproducciones parciales o totales requieren autorización del laboratorio de Calibración de Masa y Balanzas de WR S.A.S.

Los certificados de calibración sin firmar no tienen validez.

La frecuencia de calibración del instrumento es responsabilidad del solicitante.

Laboratorios WR S.A.S no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado de los instrumentos calibrados.

Este certificado expresa fielmente el resultado de las mediciones realizadas las cuales se refieren al momento y condiciones en que se realizaron las mediciones. Los resultados del certificado no son validos si el instrumento se cambia del sitio y ubicación donde fue calibrado.

FIRMA AUTORIZADA:

Autorizado por:

ADRIANA QUEMBA MARTÍNEZ
Jefe Laboratorio de Calibración

ADRIANA QUEMBA MARTÍNEZ
Firmado digitalmente por
ADRIANA QUEMBA MARTÍNEZ
Fecha: 2019.06.27
09:35:50 -05'00'



ISO/IEC 17025:2005
18-LAC-007



LABORATORIO DE CALIBRACIÓN WR S.A.S

Área: Masas y Balanzas

Calle 23 No. 116 - 31 Bodega 22

Parque Industrial Puerto Central

Teléfono: 4222300 Ext. 2200 - 1620

Bogotá D.C. - Colombia

www.labwr.com

Numero de Hojas del certificado:

4 HOJAS

Fecha de elaboración:

2019-06-27

MÉTODO DE CALIBRACIÓN:

Para la calibración se emplea el método de comparación directa con pesas patrón trazables al sistema internacional de unidades (SI). El laboratorio realiza una serie de pruebas, donde determina la desviación estándar por repetibilidad, errores por el efecto en la indicación de la aplicación excéntrica de una carga y encuentra unos errores de indicación relacionados a diferentes cargas aplicadas; luego establece la incertidumbre con la cual fueron realizadas estas mediciones de acuerdo a Guía SIM MWG7/cg-01/v.00

CONDICIONES AMBIENTALES:

	MINIMA	MAXIMA
TEMPERATURA	20,1 °C	20,1 °C
HUMEDAD RELATIVA	79,9 % HR	83,5 % HR
PRESIÓN ATMOSFÉRICA	753,0 hPa	753,1 hPa

Las condiciones ambientales registradas corresponden a las presentadas durante la calibración.

PRUEBA DE REPETIBILIDAD:

La prueba se realiza con tres cargas de prueba; colocando cada carga 10 veces en el receptor de carga verificando en cada medición el cero. Se realiza la prueba conforme al numeral 5.1 de la Guía SIM MWG7/cg-01/v.00. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

	CARGA 1	CARGA 2	CARGA 3
	10 g	100 g	200 g
No. Medición	Indicaciones (g)		
1	10,0000	100,0001	200,0003
2	10,0000	100,0001	200,0002
3	10,0000	100,0001	200,0002
4	10,0000	100,0001	200,0002
5	10,0000	100,0001	200,0001
6	10,0000	100,0001	200,0001
7	10,0000	100,0001	200,0001
8	10,0000	100,0001	200,0001
9	9,9999	100,0001	200,0001
10	9,9999	100,0001	200,0001
Desviación Est.	4,22E-05	0,00E+00	7,07E-05

g

PRUEBA DE EXCENTRICIDAD:

La prueba se realiza colocando una carga de prueba en distintas posiciones del receptor de carga verificando en cada medición el cero. Se realiza la prueba conforme al numeral 5.3 de la Guía SIM MWG7/cg-01/v.00. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:



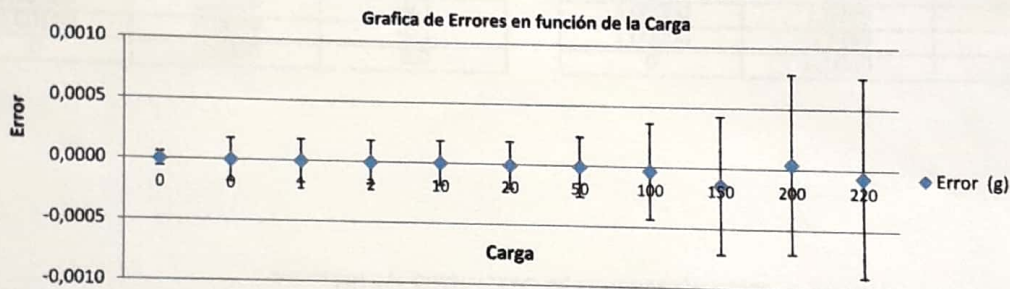
	CARGA	100 g
No. Posición	Indicación (g)	Error Exc. (g)
1	100,0000	0,0000
2	100,0005	0,0005
3	99,9995	-0,0005
4	99,9994	-0,0006
5	100,0006	0,0006
1	100,0000	0,0000

Max Error Exc. (g)	0,0006
--------------------	--------

PRUEBA DE ERRORES EN LA INDICACIÓN:

La prueba se realiza colocando 11 cargas de prueba de manera ascendente. Se realiza la prueba conforme al numeral 5.2 de la Guía SIM MWG7/cg-01/v.00. Los resultados se muestran en la siguiente tabla y grafico:

Carga (g)	Indicación (g)	Error (g)	Factor de cobertura k
0,00000	0,0000	0,0000	2,0
0,01000	0,0100	0,0000	2,2
0,50000	0,5000	0,0000	2,2
2,00000	2,0000	0,0000	2,2
10,00000	10,0000	0,0000	2,2
20,00001	20,0000	0,0000	2,1
50,00001	50,0000	0,0000	2,0
100,00004	100,0000	0,0000	2,0
150,00004	149,9999	-0,0001	2,0
200,00006	200,0001	0,0000	2,0
220,00007	220,0000	-0,0001	2,0



$A_0:$ 1,49E-04	$A_1:$ 2,09E-06	$A_2:$ 4,43E-09	$U = A_0 + A_1 X + A_2 X^2$
-----------------	-----------------	-----------------	-----------------------------

X: representa la carga en la cual se desea encontrar la incertidumbre requerida, sus unidades están definidas por el instrumento.

INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN:

La incertidumbre expandida (U) reportada para cada carga evaluada, fue calculada teniendo un factor de cobertura de $k = 2$ equivalente a un nivel de confianza del 95,45 % aproximadamente para una distribución normal.

TRAZABILIDAD DE LAS MEDICIÓN:

Los patrones utilizados son trazables al Sistema Internacional de Unidades, mediante su calibración contra patrones nacionales e Internacionales. Laboratorios WR S.A.S asegura el mantenimiento de la trazabilidad mediante el cumplimiento de un Plan Interno de Calibración y Verificación con intervalos apropiados.

INSTRUMENTO	RANGO	CLASE	No. CERTIFICADO	CALIBRADO POR
Juego de Pesas	1 mg a 1 kg	E2	CAP-002-18	LAB WR
TERMOHIGRÓMETRO	-20 °C a 50 °C / 0 %HR a 100 % HR	0,1 °C / 0,1 % HR	T-2721 / H-1580	Unión Metrológica
BARÓMETRO	700 hPa a 1100 hPa	0,1 hPa	CERT-18-EMP-067-3095	CDT de GAS

OBSERVACIONES:

1. La conformidad del instrumento de pesaje es responsabilidad del cliente según las tolerancias establecidas en su proceso
2. La estampilla va adherida al instrumento de pesaje.
3. La prueba de errores en la indicación fue evaluada de manera ascendente retirando la carga en cada medición.

Calibrado por: GERMAN REYES Cargo: Metrólogo

PRUEBA DE TARA SUSTRACTIVA:

TARA			50 g
Carga (g)	Indicación (g)	Error (mg)	
0	0,0000	0,0	
0,00100	0,0010	0,0	
0,00300	0,0029	-0,1	
0,00800	0,0080	0,0	
0,01801	0,0180	0,0	
0,00800	0,0079	-0,1	
0,00300	0,0029	-0,1	
0,00100	0,0009	-0,1	
0	0,0000	0,0	

TARA			100 g
Carga (g)	Indicación (g)	Error (mg)	
0	0,0000	0,0	
1,00000	1,0000	0,0	
3,00000	2,9999	-0,1	
8,00001	7,9999	-0,1	
18,00001	18,0000	0,0	
8,00001	7,9999	-0,1	
3,00000	2,9999	-0,1	
1,00000	0,9999	-0,1	
0	0,0000	0,0	

***** FIN DEL CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN *****



ISO/IEC 17025:2005
11-LAC-023

CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN No.
Certificate of Calibration Number

SM.LVGV.0718.2018

FECHA DE RECEPCIÓN 2018-11-08

FECHA DE CALIBRACIÓN 2018-11-13

FECHA DE EMISIÓN 2018-11-13

1. INFORMACIÓN DEL CLIENTE

SOLICITANTE QUALITY FARMA ANALISIS
DIRECCIÓN CARRERA 31 N° 25A - 61
TELÉFONO 2895130
CIUDAD BOGOTÁ

2. CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS O DE FABRICACIÓN DEL INSTRUMENTO

INSTRUMENTO PROBETA
NÚMERO DE SERIE 01.09
FABRICANTE LMS
MODELO NO APLICA
CAPACIDAD NÓMINAL 1000 mL
DIVISIÓN ESCALA 10 mL
IDENTIFICACIÓN PT-1000-01
CLASE EXACTITUD B
MATERIAL VIDRIO BOROSILICATO

NÚMERO DE PÁGINAS DEL CERTIFICADO INCLUYENDO ANEXOS: (2)

FIRMA AUTORIZADA

Miller A. Florez J.

ING. MILLER ALEXANDER FLOREZ
Jefe De Laboratorio

3. DECLARACIÓN

Servimeters S.A.S. con acreditación ONAC vigente a la fecha, con código de acreditación 11-LAC-023, bajo la norma ISO/IEC 17025:2005 genera este certificado el cual no podrá ser reproducido parcialmente, excepto con autorización por escrito del laboratorio que lo emite. Los resultados contenidos en el presente certificado se refieren al instrumento relacionado y expresa fielmente el momento y las condiciones en que se realizaron las mediciones. Servimeters S.A.S. no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado de los instrumentos calibrados. El usuario es responsable de la calibración de sus instrumentos a intervalos apropiados.

4. MÉTODO DE CALIBRACIÓN

El método empleado en la calibración del instrumento bajo prueba fue el Gravimétrico, este método de referencia se emplea para la determinación de cualquier dispositivo volumétrico, el cual consiste en determinar la masa del líquido y dividirla sobre su densidad, en este caso en conformidad con la guía técnica sobre trazabilidad metrológica e incertidumbre de medida en los servicios de calibración de recipientes volumétricos por método gravimétrico del CENAM - 2016. el líquido que se utiliza como material de referencia es agua destilada Grado 3.

5. SITIO DE MEDICIÓN

Laboratorio de Pequeños Volúmenes, Servimeters S.A.S.

6. CONDICIONES AMBIENTALES

Las condiciones ambientales en el momento de la calibración fueron las siguientes :

Temperatura Ambiente:	20,3	±	0,1	°C
Humedad Relativa:	60,0	±	0,6	%HR
Presión Atmosférica:	747,9	±	0,1	hPa

PÁGINA 1 DE 2

VIGENCIA: 2018-05-28

VERSIÓN 04

CÓDIGO : GCA-RG-59

www.servimeters.com

Carrera 20C No 74A - 10 Barrio San Felipe, Tels.: (571) 210 0833 - 742 0887, Bogotá D.C. - Colombia



CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN No.
Certificate of Calibration Number

SM.LVGV.0718.2018

* Todos los resultados consignados en la siguiente tabla se encuentran expresados en mL

7.1 RESULTADOS DE CALIBRACIÓN

Volumen Indicado (V _{ind})	Volumen Patrón (V _p)	Error Sistemático	Error Máximo Permitido	Incertidumbre Expandida	Factor De Cobertura
100	97,40	-2,60	10,00	0,14	2
500	497,14	-2,86		0,23	
1000	997,38	-2,62		0,25	

Nota :

El Error Máximo Permitido reportado es el especificado por el fabricante e impreso en el instrumento calibrado.

La incertidumbre (U) reportada es la estándar compuesta multiplicada por el factor de cubrimiento k=2, con el cual se logra un nivel de confianza del 95,45% aproximadamente para una distribución normal.

8. TRAZABILIDAD

Servimeters S.A.S. a través de los certificados enunciados a continuación asegura el mantenimiento de la trazabilidad metrológica de los patrones utilizados en la calibración del instrumento al Sistema Internacional de unidades (SI).

Patrón	Número de Identificación	No. Certificado de Calibración	Fecha de Calibración	Fuente de Trazabilidad	Acreditación ONAC
BALANZA	LV-PT-02	1411	2018-07-06	INM	INM
TERMÓMETRO DE PUNZON	LV-PT-24	CLT 8018	2018-01-10	CONAMET	09-LAC-008
Termómetro Ambiente	LV-EA-07	CLT 265817	2017-06-28	CONAMET	09-LAC-008
Higrómetro	LV-EA-07	CLH 67417	2017-06-27	CONAMET	09-LAC-008
Barómetro	LV-EA-06	CERT-18-EMP-113-3099	2018-02-01	CDT DE GAS	10-LAC-013

9. OBSERVACIONES

- 9.1 SE ADJUNTA LA ESTAMPILLA N° LVGV.0718.18
- 9.2 SEGÚN EL VOCABULARIO INTERNACIONAL DE METROLOGIA (VIM), EL ERROR SISTEMÁTICO ES CALCULADO DE ACUERDO A LA SIGUIENTE ECUACIÓN
- $$E = V_p - V_{ind}$$
- 9.3 ANTES DEL PROCEDIMIENTO DE CALIBRACIÓN SE REALIZA UNA VERIFICACIÓN AL EQUIPO DE PESAJE PARA GARANTIZAR SU CORRECTO FUNCIONAMIENTO.

FIN DEL CERTIFICADO

PÁGINA 2 DE 2

CÓDIGO : GCA-RG-59

VIGENCIA: 2018-05-28

VERSIÓN 04

www.servimeters.com

Carrera 20C No 74A - 10 Barrio San Felipe, Tels.: (571) 210 0833 - 742 0887, Bogotá D.C. - Colombia

SM SERVIMETERS

A LA MEDIDA DE COLOMBIA



ISO/IEC 17025:2005
11-LAC-023

CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN No.
Certificate of Calibration Number

SM.LVGV.0644.18

FECHA DE RECEPCIÓN 2018-10-25

FECHA DE CALIBRACIÓN 2018-10-31

FECHA DE EMISIÓN 2018-10-31

1. INFORMACIÓN DEL CLIENTE

SOLICITANTE: QUALITY FARMA ANALISIS
DIRECCIÓN: CARRERA 31 N° 25A -61
TELÉFONO: 2895130
CIUDAD: BOGOTÁ

2. CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS O DE FABRICACIÓN DEL INSTRUMENTO

INSTRUMENTO: BALÓN VOLUMÉTRICO
NÚMERO DE SERIE: SIN ESPECIFICAR
FABRICANTE: SCHOTT DURAN
MODELO: NO APLICA
CAPACIDAD NÓMINAL: 50 mL
IDENTIFICACIÓN: BA-50-01
CLASE EXACTITUD: A
MATERIAL: VIDRIO BOROSILICATO

NÚMERO DE PÁGINAS DEL CERTIFICADO INCLUYENDO ANEXOS: (2)

FIRMA AUTORIZADA

Miller A. Florez S.
ING. MILLER ALEXANDER FLOREZ
Jefe De Laboratorio

3. DECLARACIÓN

Servimeters S.A.S. con acreditación ONAC vigente a la fecha, con código de acreditación 11-LAC-023, bajo la norma ISO/IEC 17025:2005 genera este certificado el cual no podrá ser reproducido parcialmente, excepto con autorización por escrito del laboratorio que lo emite. Los resultados contenidos en el presente certificado se refieren al instrumento relacionado y expresa fielmente el momento y las condiciones en que se realizaron las mediciones. Servimeters S.A.S. no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado de los instrumentos calibrados. El usuario es responsable de la calibración de sus instrumentos a intervalos apropiados.

4. MÉTODO DE CALIBRACIÓN

El método empleado en la calibración del instrumento bajo prueba fue el Gravimétrico, este método de referencia se emplea para la determinación de cualquier dispositivo volumétrico, el cual consiste en determinar la masa del líquido y dividirla sobre su densidad, en este caso en conformidad con la guía técnica sobre trazabilidad metrológica e incertidumbre de medida en los servicios de calibración de recipientes volumétricos por método gravimétrico del CENAM - 2016. el líquido que se utiliza como material de referencia es agua destilada Grado 3.

5. SITIO DE MEDICIÓN

Laboratorio de Pequeños Volúmenes, Servimeters S.A.S.

6. CONDICIONES AMBIENTALES

Las condiciones ambientales en el momento de la calibración fueron las siguientes :

Temperatura Ambiente:	20,2	±	0,2	°C
Humedad Relativa:	55,7	±	0,8	%
Presión Atmosférica:	750,1	±	0,1	hPa

PÁGINA 1 DE 2

CÓDIGO : GCA-RG-58

VIGENCIA: 2018-05-28

VERSIÓN 04

www.servimeters.com

Carrera 20C No 74A - 10 Barrio San Felipe, Tels.: (571) 210 0833 - 742 0887, Bogotá D.C. - Colombia



CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN No.
Certificate of Calibration Number

SM.LVGV.0644.18

* Todos los resultados consignados en la siguiente tabla se encuentran expresados en mL

7.1 RESULTADOS DE CALIBRACIÓN

Volumen Indicado (V_{ind})	Volumen Patrón (V_p)	Error Sistemático	Error Máximo Permitido	Incertidumbre Expandida	Factor De Cobertura
50	50,09954	0,09954	0,06	0,00064	2

Nota :

El Error Máximo Permitido reportado es el especificado por el fabricante e impreso en el instrumento calibrado.

La incertidumbre (U) reportada es la estándar compuesta multiplicada por el factor de cubrimiento $k=2$, con el cual se logra un nivel de confianza del 95,45% aproximadamente para una distribución normal.

8. TRAZABILIDAD

Servimeters S.A.S. a través de los certificados enunciados a continuación asegura el mantenimiento de la trazabilidad metrológica de los patrones utilizados en la calibración del instrumento al Sistema Internacional de unidades (SI).

Patrón	Número de Identificación	No. Certificado de Calibración	Fecha de Calibración	Fuente de Trazabilidad	Acreditación ONAC
BALANZA	LV-PT-01	1413	2018-07-18	INM	INM
TERMÓMETRO DE PUNZON	LV-PT-24	CLT 8018	2018-01-10	CONAMET	09-LAC-008
TERMÓMETRO AMBIENTAL	LV-EA-07	CLT 265817	2017-06-28	CONAMET	09-LAC-008
HIGRÓMETRO	LV-EA-07	CLH 67417	2017-06-27	CONAMET	09-LAC-008
BARÓMETRO	LV-EA-06	CERT-18-EMP-113-3099	2018-02-01	CDT DE GAS	10-LAC-013

9. OBSERVACIONES

- 9.1 SE ADJUNTA LA ESTAMPILLA N° LVGV.0644.18
- 9.2 SEGÚN EL VOCABULARIO INTERNACIONAL DE METROLOGÍA (VIM), EL ERROR SISTEMÁTICO ES CÁLCULADO DE ACUERDO A LA SIGUIENTE ECUACIÓN
- $$E = V_p - V_{ind}$$
- 9.3 ANTES DEL PROCEDIMIENTO DE CALIBRACIÓN SE REALIZA UNA VERIFICACIÓN AL EQUIPO DE PESAJE PARA GARANTIZAR SU CORRECTO FUNCIONAMIENTO.

FIN DEL CERTIFICADO

PÁGINA 2 DE 2

VIGENCIA: 2018-05-28

VERSIÓN 04

CÓDIGO : GCA-RG-58

www.servimeters.com

Carrera 20C No 74A - 10 Barrio San Felipe, Tels.: (571) 210 0833 - 742 0887, Bogotá D.C. - Colombia



CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN No.
Certificate of Calibration Number

SM.LVGV.0648.18

FECHA DE RECEPCIÓN 2018-10-25

FECHA DE CALIBRACIÓN 2018-11-01

FECHA DE EMISIÓN 2018-11-01

1. INFORMACIÓN DEL CLIENTE

SOLICITANTE
DIRECCIÓN
TELÉFONO
CIUDAD

QUALITY FARMA ANALISIS
CARRERA 31 N° 25A -61
2895130
BOGOTÁ

2. CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS O DE FABRICACIÓN DEL INSTRUMENTO

INSTRUMENTO
NÚMERO DE SERIE
FABRICANTE
MODELO
CAPACIDAD NÓMINAL
IDENTIFICACIÓN
CLASE EXACTITUD
MATERIAL

BALÓN VOLUMÉTRICO
01.13
MARIENFELD
SUPERIOR
10 mL
BA-10-01
A
VIDRIO BOROSILICATO

NÚMERO DE PÁGINAS DEL CERTIFICADO INCLUYENDO ANEXOS: (2)

FIRMA AUTORIZADA

Miller A. Florez J.
ING. MILLER ALEXANDER FLOREZ
Jefe De Laboratorio

3. DECLARACIÓN

Servimeters S.A.S. con acreditación ONAC vigente a la fecha, con código de acreditación 11-LAC-023, bajo la norma ISO/IEC 17025:2005 genera este certificado el cual no podrá ser reproducido parcialmente, excepto con autorización por escrito del laboratorio que lo emite. Los resultados contenidos en el presente certificado se refieren al instrumento relacionado y expresa fielmente el momento y las condiciones en que se realizaron las mediciones. Servimeters S.A.S. no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado de los instrumentos calibrados. El usuario es responsable de la calibración de sus instrumentos a intervalos apropiados.

4. MÉTODO DE CALIBRACIÓN

El método empleado en la calibración del instrumento bajo prueba fue el Gravimétrico, este método de referencia se emplea para la determinación de cualquier dispositivo volumétrico, el cual consiste en determinar la masa del líquido y dividirla sobre su densidad, en este caso en conformidad con la guía técnica sobre trazabilidad metrológica e incertidumbre de medida en los servicios de calibración de recipientes volumétricos por método gravimétrico del CENAM - 2016. el líquido que se utiliza como material de referencia es agua destilada Grado 3.

5. SITIO DE MEDICIÓN

Laboratorio de Pequeños Volúmenes, Servimeters S.A.S.

6. CONDICIONES AMBIENTALES

Las condiciones ambientales en el momento de la calibración fueron las siguientes :

Temperatura Ambiente:	19,5	±	0,0	°C
Humedad Relativa:	53,2	±	2,3	%
Presión Atmosférica:	748,0	±	0,1	hPa

PÁGINA 1 DE 2

CÓDIGO : GCA-RG-58

VIGENCIA: 2018-05-28

VERSIÓN 04

www.servimeters.com

Carrera 20C No 74A - 10 Barrio San Felipe, Tels.: (571) 210 0833 - 742 0887, Bogotá D.C. - Colombia



CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN No.
Certificate of Calibration Number

SM.LVGV.0648.18

* Todos los resultados consignados en la siguiente tabla se encuentran expresados en mL

7.1 RESULTADOS DE CALIBRACIÓN

Volumen Indicado (V_{ind})	Volumen Patrón (V_p)	Error Sistemático	Error Máximo Permitido	Incertidumbre Expandida	Factor De Cobertura
10	9,99890	-0,00110	0,025	0,00047	2

Nota :

El Error Máximo Permitido reportado es el especificado por el fabricante e impreso en el instrumento calibrado.

La incertidumbre (U) reportada es la estándar compuesta multiplicada por el factor de cubrimiento $k=2$, con el cual se logra un nivel de confianza del 95,45% aproximadamente para una distribución normal.

8. TRAZABILIDAD

Servimeters S.A.S. a través de los certificados enunciados a continuación asegura el mantenimiento de la trazabilidad metrológica de los patrones utilizados en la calibración del instrumento al Sistema Internacional de unidades (SI).

Patrón	Número de Identificación	No. Certificado de Calibración	Fecha de Calibración	Fuente de Trazabilidad	Acreditación ONAC
BALANZA	LV-PT-01	1413	2018-07-18	INM	INM
TERMÓMETRO DE PUNZON	LV-PT-24	CLT 8018	2018-01-10	CONAMET	09-LAC-008
TERMÓMETRO AMBIENTAL	LV-EA-07	CLT 265817	2017-06-28	CONAMET	09-LAC-008
HIGRÓMETRO	LV-EA-07	CLH 67417	2017-06-27	CONAMET	09-LAC-008
BARÓMETRO	LV-EA-06	CERT-18-EMP-113-3099	2018-02-01	CDT DE GAS	10-LAC-013

9. OBSERVACIONES

- 9.1 SE ADJUNTA LA ESTAMPILLA N° LVGV.0648.18
- 9.2 SEGÚN EL VOCABULARIO INTERNACIONAL DE METROLOGÍA (VIM), EL ERROR SISTEMÁTICO ES CÁLCULADO DE ACUERDO A LA SIGUIENTE ECUACIÓN
- $$E = V_p - V_{ind}$$
- 9.3 ANTES DEL PROCEDIMIENTO DE CALIBRACIÓN SE REALIZA UNA VERIFICACIÓN AL EQUIPO DE PESAJE PARA GARANTIZAR SU CORRECTO FUNCIONAMIENTO.

FIN DEL CERTIFICADO

PÁGINA 2 DE 2

CÓDIGO : GCA-RG-58

VIGENCIA: 2018-05-28

VERSIÓN 04

www.servimeters.com

Carrera 20C No 74A - 10 Barrio San Felipe, Tels.: (571) 210 0833 - 742 0887, Bogotá D.C. - Colombia



CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN No.
Certificate of Calibration Number

SM.LVGV.0655.18

FECHA DE RECEPCIÓN 2018-10-25

FECHA DE CALIBRACIÓN 2018-11-02

FECHA DE EMISIÓN 2018-11-02

1. INFORMACIÓN DEL CLIENTE

SOLICITANTE QUALITY FARMA ANALISIS
DIRECCIÓN CARRERA 31 N° 25A -61
TELÉFONO 2895130
CIUDAD BOGOTÁ

2. CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS O DE FABRICACIÓN DEL INSTRUMENTO

INSTRUMENTO PIPETA AFORADA
NÚMERO DE SERIE 06.15
FABRICANTE LMS
MODELO NO APLICA
CAPACIDAD NÓMINAL 1 mL
IDENTIFICACIÓN PA-1-01
CLASE EXACTITUD AS
MATERIAL VIDRIO BOROSILICATO

NÚMERO DE PÁGINAS DEL CERTIFICADO INCLUYENDO ANEXOS: (2)

FIRMA AUTORIZADA

Miller A. Florez J.
ING. MILLER ALEXANDER FLOREZ
Jefe De Laboratorio

3. DECLARACIÓN

Servimeters S.A.S. con acreditación ONAC vigente a la fecha, con código de acreditación 11-LAC-023, bajo la norma ISO/IEC 17025:2005 genera este certificado el cual no podrá ser reproducido parcialmente, excepto con autorización por escrito del laboratorio que lo emite. Los resultados contenidos en el presente certificado se refieren al instrumento relacionado y expresa fielmente el momento y las condiciones en que se realizaron las mediciones. Servimeters S.A.S. no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado de los instrumentos calibrados. El usuario es responsable de la calibración de sus instrumentos a intervalos apropiados.

4. MÉTODO DE CALIBRACIÓN

El método empleado en la calibración del instrumento bajo prueba fue el Gravimétrico, este método de referencia se emplea para la determinación de cualquier dispositivo volumétrico, el cual consiste en determinar la masa del líquido y dividirla sobre su densidad, en este caso en conformidad con la guía técnica sobre trazabilidad metrológica e incertidumbre de medida en los servicios de calibración de recipientes volumétricos por método gravimétrico del CENAM - 2016. el líquido que se utiliza como material de referencia es agua destilada Grado 3.

5. SITIO DE MEDICIÓN

Laboratorio de Pequeños Volúmenes, Servimeters S.A.S.

6. CONDICIONES AMBIENTALES

Las condiciones ambientales en el momento de la calibración fueron las siguientes :

Temperatura Ambiente:	19,8	±	0,1	°C
Humedad Relativa:	54,4	±	1,5	%
Presión Atmosférica:	748,7	±	0,1	hPa

PÁGINA 1 DE 2

CÓDIGO : GCA-RG-58

VIGENCIA: 2018-05-28

VERSIÓN 04

www.servimeters.com

Carrera 20C No 74A - 10 Barrio San Felipe, Tels.: (571) 210 0833 - 742 0887, Bogotá D.C. - Colombia



CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN No.
Certificate of Calibration Number

SM.LGV.0655.18

* Todos los resultados consignados en la siguiente tabla se encuentran expresados en mL

7.1 RESULTADOS DE CALIBRACIÓN

Volumen Indicado (V_{ind})	Volumen Patrón (V_p)	Error Sistemático	Error Máximo Permitido	Incertidumbre Expandida	Factor De Cobertura
1	1,00564	0,00564	0,008	0,00047	2

Nota :

El Error Máximo Permitido reportado es el especificado por el fabricante e impreso en el instrumento calibrado.

La incertidumbre (U) reportada es la estándar compuesta multiplicada por el factor de cubrimiento $k=2$, con el cual se logra un nivel de confianza del 95,45% aproximadamente para una distribución normal.

8. TRAZABILIDAD

Servimeters S.A.S. a través de los certificados enunciados a continuación asegura el mantenimiento de la trazabilidad metrológica de los patrones utilizados en la calibración del instrumento al Sistema Internacional de unidades (SI).

Patrón	Número de Identificación	No. Certificado de Calibración	Fecha de Calibración	Fuente de Trazabilidad	Acreditación ONAC
BALANZA	LV-PT-01	1413	2018-07-18	INM	INM
TERMÓMETRO DE PUNZON	LV-PT-24	CLT 8018	2018-01-10	CONAMET	09-LAC-008
TERMÓMETRO AMBIENTAL	LV-EA-07	CLT 265817	2017-06-28	CONAMET	09-LAC-008
HIGRÓMETRO	LV-EA-07	CLH 67417	2017-06-27	CONAMET	09-LAC-008
BARÓMETRO	LV-EA-06	CERT-18-EMP-113-3099	2018-02-01	CDT DE GAS	10-LAC-013

9. OBSERVACIONES

- 9.1 SE ADJUNTA LA ESTAMPILLA N° LVGV.0655.18
- 9.2 SEGÚN EL VOCABULARIO INTERNACIONAL DE METROLOGÍA (VIM), EL ERROR SISTEMÁTICO ES CÁLCULADO DE ACUERDO A LA SIGUIENTE ECUACIÓN
- $$E = V_p - V_{ind}$$
- 9.3 ANTES DEL PROCEDIMIENTO DE CALIBRACIÓN SE REALIZA UNA VERIFICACIÓN AL EQUIPO DE PESAJE PARA GARANTIZAR SU CORRECTO FUNCIONAMIENTO.

FIN DEL CERTIFICADO

PÁGINA 2 DE 2

CÓDIGO : GCA-RG-58

VIGENCIA: 2018-05-28

VERSIÓN 04

www.servimeters.com

Carrera 20C No 74A - 10 Barrio San Felipe, Tels.: (571) 210 0833 - 742 0887, Bogotá D.C. - Colombia