

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFIA

“ALBERTO CAZORLA TALLERI”



IMPLEMENTACIÓN DE ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC-FID) Y DESARROLLO DE LA VALIDACIÓN DE TÉCNICA ANALÍTICA PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MENTOL Y SALICILATO DE METILO EN UNGÜENTO.

ALLISON LISETH AYALA QUIROZ

TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

ASESOR:

EDGAR MAXIMO PALOMINO FERNANDEZ

LIMA – PERÚ

2021

RESUMEN

Los productos farmacéuticos contribuyen a la salud de la población si cumplen estándares de calidad y se realicen los análisis necesarios siguiendo la metodología analítica correspondiente. En la Industria farmacéutica, el Área de Control de Calidad realiza los análisis fisicoquímicos y microbiológicos que determinan la aprobación o rechazo de los insumos (principios activos, excipientes) y materiales (envases primarios y secundarios) a utilizar en la fabricación de un producto farmacéutico, éstos deben cumplir con parámetros de proceso y atributos de calidad. Los productos en desarrollo y los que comercializa el presente laboratorio nacional, certificado en Buenas Prácticas de Manufactura, son formas farmacéuticas semisólidas; estas contienen principios activos cuya identificación y cuantificación requiere el desarrollo de técnicas analíticas propias, ya que, las monografías de los productos a desarrollar no se encuentran descritas en farmacopeas internacionales, por tanto, las técnicas analíticas deben ser desarrolladas y validadas científicamente.

Con la adquisición de un Cromatógrafo de gases (GC-FID), el Área de Control de Calidad realiza el desarrollo y validación de la técnica analítica para poder ejecutar los análisis de materias primas, productos en desarrollo, estabilidades y producto terminado. La validación de técnica analítica es un requisito para obtener Registro Sanitario y para el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura, así como para la evaluación de la estabilidad del producto. Por tal motivo, se plantea como parte de la implementación, para justificar la adquisición del GC-FID la evaluación

de eficiencia en costos, la mejora en la respuesta de la velocidad de análisis y el desarrollo de validación de técnica analítica propia para identidad y contenido de los principios activos de uno de los ungüentos que contiene mentol y salicilato de metilo siguiendo la metodología de validación propuesta por la normativa nacional e internacional.

Palabras clave: validación, cromatógrafo de gases, técnica analítica, ungüento.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Antecedentes	5
1.2. Problema	6
1.3. Justificación.....	6
1.4. Competencias profesionales.....	8
1.5. Fundamentos teóricos.....	9
1.6. Objetivos	12
1.1.3. Objetivo General.....	12
1.1.4. Objetivos Específicos	12
2. METODOLOGÍA.....	13
2.1. Instalación del Cromatógrafo de Gases.....	13
2.2. Desarrollo y Validación de técnica analítica.....	13
2.3. Metodología del trabajo	14
2.4. Flujograma del proceso de fabricación	15
3. RESULTADOS	16
3.1. Instalación del Cromatógrafo de gases.	16
3.1.1. Calificación de Diseño	16
3.1.2. Calificación de Instalación.....	17
3.1.3. Calificación de Operación y Desempeño	17
3.2. Técnica analítica.....	18
3.2.1. Fórmula cualicuantitativa.....	18
3.2.2. Condiciones de trabajo	18
3.2.3. Procedimiento analítico.....	19
3.2.4. Condiciones cromatográficas	20
3.3. Validación de técnica analítica propia	21
3.3.1. Protocolo de Validación.....	22
3.3.2. Informe de Validación.....	26
3.4. Parámetros	27
a. Precisión instrumental.....	27
b. Especificidad.....	28
b.1. Determinación de interferencias	28

b.2. Análisis del placebo dosificado y estándar	29
b.3. Determinación de interferencia de productos de degradación.....	32
c. Linealidad.....	35
c.1. Linealidad del sistema.....	35
c.2. Linealidad del método.....	38
d. Exactitud	40
e. Precisión.....	41
e.1. Repetibilidad	41
e.2. Precisión intermedia.....	43
f. Robustez.....	44
3.5.Eficiencia de la adquisición del Cromatógrafo de gases.....	48
4. DISCUSIÓN	50
5. CONCLUSIONES	56
6. RECOMENDACIONES.....	57
7. BIBLIOGRAFÍA	58

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

A inicios del siglo XX, no existían regulaciones para la fabricación y comercialización de productos farmacéuticos, por tanto, existía mayor probabilidad de que sean perjudiciales para la salud de la población, debido a que las condiciones de fabricación no eran las adecuadas [1]. Fueron muchos los incidentes que conllevaron a que organizaciones tales como Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA), Organización Mundial de la Salud (OMS), entre otros, desarrollaran y aplicaran regulaciones. Hoy en día, los productos farmacéuticos deben evaluarse rigurosamente antes de su comercialización.

Las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), son directrices que brindan las pautas e información necesaria que se debe seguir y cumplir para asegurar que los medicamentos cumplan con estándares de calidad [2].

Una manera de asegurar la calidad es realizando estudios de validación, la validación es una prueba documentada que brinda seguridad al proceso conforme a los resultados que se esperan obtener [3]. En la industria farmacéutica, se aplica a la mayoría de procesos para demostrar que el procedimiento ejecutado genera resultados confiables [2].

La Autoridad Nacional de Medicamentos, Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas (DIGEMID) emitió el Reglamento para el Registro, Control y Vigilancia Sanitaria de Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios aprobado con Decreto Supremo 016-2011[4], documento que brinda la reglamentación para asegurar la calidad, seguridad y eficacia de los productos. El Artículo 40 indica los Requisitos para la Inscripción y Reinscripción de Especialidades Farmacéuticas y categoriza a las especialidades farmacéuticas en tres categorías; la categoría 1 involucra especialidades farmacéuticas cuyos ingrediente(s) farmacéutico(s) activo(s) – IFA(S) o asociaciones se encuentran en el Petitorio Nacional Único de Medicamentos Esenciales; la categoría 2, especialidades farmacéuticas cuyos ingrediente(s) farmacéutico(s) activo(s) – IFA(S) o asociaciones no se encuentren en el Petitorio Nacional Único de Medicamentos Esenciales y se encuentran registrados en países de alta vigilancia sanitaria y la categoría 3, especialidades farmacéuticas cuyos ingrediente(s) farmacéutico(s) activo(s) – IFA(S) no se encuentran considerados en las categorías 1 o 2.

Los productos farmacéuticos según su categoría 1, 2 o 3 pueden comercializarse por importación o por el desarrollo del producto en un laboratorio nacional. El proceso de desarrollo de un producto

farmacéutico innovador involucra una serie de estudios, actividades y procesos [5]. Se necesita de la investigación pre-clínica y clínica para obtener una molécula con la actividad biológica requerida, incorporarla en una formulación, realizar las pruebas y estudios necesarios para desarrollar métodos analíticos que determinan con precisión y exactitud el contenido del fármaco, así como una serie de procesos que garantizan que el medicamento cumple con su especificación de calidad [5,6,7]. El proceso de desarrollo de un medicamento genérico permite su elaboración posterior al vencimiento de la patente del medicamento innovador, es comparable al producto farmacéutico innovador o de referencia en forma de dosificación, concentración, vía de administración, calidad y características de rendimiento previsto utilizar [8]. La diferencia entre el medicamento innovador y el medicamento genérico radica en el tiempo e inversión en la investigación y desarrollo, siendo mayor tiempo e inversión para el medicamento innovador.

1.2.Problema

El laboratorio farmacéutico nacional certificado en Buenas Prácticas de Manufactura se dedica a la fabricación y comercialización de productos farmacéuticos semisólidos, de acuerdo a la Autoridad Nacional de Medicamentos (DIGEMID) el laboratorio es titular de registro sanitario de especialidades farmacéuticas categoría 2 y categoría 3. Los requisitos como titulares de registro sanitario involucran Especificaciones Técnicas y Técnicas Analíticas de materias primas, principios activos o ingredientes farmacéuticos activos (IFAS), producto terminado, Estudios de Estabilidad, entre otros que garanticen la calidad de sus productos. El laboratorio realiza la tercerización de sus análisis por un laboratorio externo para garantizar la calidad de sus productos, esto origina que los análisis no sean realizados de manera oportuna y no se puedan cumplir los compromisos de entrega con los clientes, debido a la alta demanda de producto en el mercado y al costo de los análisis, el laboratorio ha evaluado la posibilidad que el Área de Control de Calidad realice los análisis de materias primas, productos terminados y estabildades, con la adquisición de un Cromatógrafo de gases (GC-FID) para incrementar la eficiencia en tiempo y costos, que involucra a su vez el desarrollo y validación de técnica analítica para poder ejecutar los análisis correspondientes.

1.3.Justificación

El laboratorio farmacéutico nacional tiene como objetivo mantener el registro sanitario y la comercialización del registro sanitario del producto farmacéutico DCI-001, para ello se debe cumplir con el Artículo 40 – Requisitos para la inscripción y reinscripción de especialidades farmacéuticas, según el D.S. 016-2011[4]. Para la especificación técnica y técnica analítica del producto terminado, se ha realizado la búsqueda en las farmacopeas de referencia, Farmacopea

de los Estados Unidos de América (USP), Farmacopea europea, Farmacopea Británica, Farmacopea Internacional (OMS) y no se encuentra registrada, por tanto, según lo citado líneas abajo por la normativa peruana, se debe realizar una técnica analítica propia y la validación. Las Buenas Prácticas de Laboratorio indican también que debe existir un procedimiento para la identificación y cuantificación de los principios activos del producto que se va a analizar, en el caso, se desarrolle técnica analítica propia, esta debe estar validada [9].

“Si la técnica analítica del producto terminado difiere o no se encuentra en ninguna de las farmacopeas de referencia, el interesado debe presentar los documentos que acrediten la validación de técnicas analíticas propias emitidos por el fabricante de la forma farmacéutica, laboratorio que encarga la fabricación u otro laboratorio de control de calidad certificado por la Autoridad Nacional de Productos Farmacéuticos, Dispositivos médicos y Productos Sanitarios o por las Autoridades competentes de los países de alta vigilancia sanitaria o de los países con los cuales exista reconocimiento mutuo en Buenas Prácticas de Manufactura o Buenas Prácticas de Laboratorio”

La fórmula cualicuantitativa del producto DCI-001 se acoge a la ficha técnica del producto Cold & Hot Therapy Pain Relief Balm Extra Strength (ver Anexo 1) comercializado en Estados Unidos, un PAVS (País de Alta Vigilancia Sanitaria) correspondiendo a una Categoría 2, tal como lo indica el D.S. 016-2011 en el Artículo 40 inciso B.

En el mundo y en nuestro país, los principios activos en estudio, mentol y salicilato de metilo son componentes que se encuentran en muchos productos farmacéuticos que se comercializan sin receta médica [10] en establecimientos farmacéuticos y en algunas ocasiones en establecimientos comerciales. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, estos productos con este tipo de forma farmacéutica y con estos componentes no tienen registrada una técnica analítica en las farmacopeas de referencia más accesibles y conocidas.

La población utiliza estos productos farmacéuticos con componentes como el mentol y salicilato de metilo para aliviar dolores asociados a artritis, dolores de espalda, distensión muscular entre otras indicaciones terapéuticas (Anexo 1). Por tanto, se ha realizado la implementación de análisis por cromatografía de gases (GC-FID) y el desarrollo de la validación de técnica analítica propia, con el objetivo de brindar un producto de calidad, con componentes identificados y cuantificados, además cumplir la normativa peruana e internacional y principalmente generar valor en la empresa con la eficiencia en costos y en tiempo de análisis para la comercialización del registro sanitario del producto farmacéutico DCI-001.

1.4. Competencias profesionales

La malla curricular de la carrera de Farmacia y Bioquímica en la Facultad de Ciencias y Filosofía Alberto Cazorla Talleri ha contribuido al desarrollo profesional y competencias profesionales. Se mencionan algunos cursos, competencias y objetivos realizados y aplicados en el presente Trabajo de Suficiencia Profesional.

El curso de Biofarmacia y farmacocinética ha brindado los conocimientos necesarios para poder relacionar las propiedades fisicoquímicas de los principios activos, excipientes y formas de dosaje con su comportamiento en el organismo. Tratamiento matemático de datos experimentales, curso obligatorio de la carrera de Farmacia y Bioquímica brinda la capacidad de aplicar métodos estadísticos que permiten trabajar experimentalmente con corrección y rigurosidad científica. Analítica e Instrumentación farmacéutica es el curso que proporciona visión teórica y práctica de los instrumentos, procedimientos, y fundamentos de los métodos de análisis, de liberación y estabilidad de los principios activos, utilizados para la evaluación cualitativa y cuantitativa de materias primas y producto terminado en la industria del medicamento, cosmético, productos veterinarios y otros.

Gestión de la Calidad Farmacéutica Total logra que el alumno conceptualice la gestión de calidad y la aplicación práctica de las herramientas para el aseguramiento de la calidad en las empresas farmacéuticas, bajo una visión moderna de los procesos y el mejoramiento continuo, brindando conocimientos especializados de calificación de instalaciones, equipos, validación de procesos y analiza los beneficios y costos de su aplicación. Industria farmacéutica brinda la capacidad de conocer la formulación, desarrollo y producción de distintas formas farmacéuticas.

El curso de administración y gerencia estratégica farmacéutica proporciona las herramientas para desarrollar un pensamiento estratégico y capacitarse en los componentes de la metodología de la Gerencia Estratégica desarrollando habilidades conceptuales que le permitan buscar nuevas alternativas de cambio, desde una perspectiva globalizada.

Química Analítica Cuantitativa, el alumno sabe la clasificación, alcances y fundamentos teóricos de los métodos de análisis químicos no instrumentales del Análisis Cuantitativo, volumétricos, gravimétricos y gasométricos. Sabe aplicar los métodos de análisis a muestras problema, calcular y expresar los resultados de los análisis, además de tener destrezas manuales en el trabajo de laboratorio.

El rol del Químico Farmacéutico en la implementación de análisis por GC-FID y desarrollo de la validación de técnica analítica es

fundamental, en la industria farmacéutica, según las Buenas Prácticas de Manufactura, el sistema de aseguramiento de la calidad, las áreas de producción y control de calidad deben funcionar bajo la jefatura de un profesional Químico Farmacéutico.

Así mismo, el Químico Farmacéutico es el especialista del medicamento, alimento y tóxico; y los conocimientos y fundamentos científicos adquiridos y estudiados en la carrera de estudios de Farmacia y Bioquímica hacen posible el desarrollo profesional del Químico Farmacéutico en la industria farmacéutica.

Las actividades realizadas para el presente Trabajo de Suficiencia Profesional en el Laboratorio involucran participación en la producción, envasado y acondicionado de productos farmacéuticos semisólidos, conocimiento y práctica en trámites de reinscripción de productos farmacéuticos. Clasificación de reactivos en el Área de Control de Calidad, preparación de reactivos, soluciones y estándares. Muestreo de materia prima. Análisis de materia prima y producto terminado. Manejo del equipo Cromatógrafo de gases. Participación y asistencia en Validación de técnica propia. Conocimiento y práctica de Buenas Prácticas de Laboratorio. Verificación de material de vidrio. Participación y asistencia en la calibración y calificación de equipos.

El presente trabajo realizado demuestra comportamiento, compromiso ético y responsabilidad con el entorno social, gestión de actividades, trabajo en equipo, así también, el aprendizaje en la gestión de procesos de producción y control de calidad de productos farmacéuticos con el objetivo de asegurar la calidad según la normativa legal vigente.

1.5.Fundamentos teóricos

Un método analítico, procedimiento analítico o técnica analítica es la descripción detallada para realizar pruebas o ensayos analíticos que reconocen una característica definida (punto de fusión, rotación óptica, entre otros) de acuerdo al criterio de aceptación o especificación [11,12].

Las técnicas analíticas que deben validarse son aquellas técnicas farmacopeicas que se modifican o técnicas de productos que no se encuentren en ninguna farmacopea de referencia (no farmacopeicas) [13]. La validación de técnicas analíticas no farmacopeicas, permite garantizar la calidad del producto farmacéutico a comercializar, disminuye errores y tiempo durante el análisis y asegura que la metodología analítica se realiza adecuadamente [13,14].

Organismos y agencias reguladoras nacionales e internacionales ofrecen información y guías para realizar la validación de técnicas analíticas. La Conferencia Internacional sobre Armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos de uso humano (ICH) provee

una guía para el método de validación analítica que asocia definiciones y términos entre las autoridades reguladoras de Estados Unidos, Japón y Europa [14]. La Organización Mundial de la Salud (OMS), brinda el informe técnico N° 44 de Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos, donde indica requisitos necesarios para el desarrollo de una validación [15]. En Perú, la Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas (DIGEMID) tiene la Norma Técnica de Salud N°147-MINSA/2019/DIGEMID que indica la información que debe contener el documento de validación [16].

Para realizar una validación de técnica analítica, se elabora el protocolo de validación que es un documento que describe a detalle la validación, como el objetivo, alcance, materiales, métodos, entre otros [11,12]. También se elabora el informe de validación que es un documento que contiene principalmente el desarrollo de parámetros y las conclusiones [16]. Los parámetros son exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y rango [14, 17, 18]. Para su ejecución, se realizan mediciones que presentan incertidumbre que es el rango dentro del cual se situará el valor real con un determinado grado de confianza [19], y se requiere que análisis estadísticos sustenten la veracidad de los resultados obtenidos.

El objetivo y propósito de la técnica analítica va a determinar el desarrollo de la validación. Los organismos y agencias reguladoras, generalmente, tienen cuatro clasificaciones, el primero, test de identificación; el segundo, test cuantitativo para el contenido de impurezas; el tercero, test límite para el control de impurezas y el cuarto, test cuantitativo de la sustancia activa en la muestra de producto farmacéutico [14, 15, 20]. La clasificación y los parámetros de validación evalúan la capacidad de desempeño de la técnica analítica.

Una vez realizada la validación, se mantiene vigente hasta su fecha de expira o vigencia, sin embargo, si ocurren cambios debe realizarse una revalidación. Si los cambios son críticos y afectan directamente en el objetivo de la validación se realiza una revalidación completa, pero si los cambios no afectan directamente aplica una revalidación parcial [17].

Una técnica de análisis usada para la separación de componentes, es la cromatografía. La cromatografía consta de una fase estacionaria y fase móvil, la fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido sobre un sólido o un gel mientras que la fase móvil puede ser gaseosa, líquida o un fluido supercrítico. El principio de separación se determina por el material de las fases y la naturaleza química de la sustancia, adsorción, intercambio iónico, tamaño, masa o volumen [21]. Existen diferentes técnicas cromatográficas, dependiendo del tipo de fase estacionaria y

fase móvil, cromatografía por intercambio iónico, líquida, gaseosa, entre otras [22].

La cromatografía de gases se utiliza para sustancias volátiles, consta de un inyector, un gas de transporte o fase móvil, una columna, un detector y un dispositivo registrador que grafica el cromatograma. El gas de arrastre puede ser helio, nitrógeno o hidrógeno. Puede tener una fase estacionaria líquida que está disponible en columnas rellenas o capilares o fase estacionaria sólida que es característica de las columnas rellenas. La capacidad de elución de los analitos depende de todos los componentes del cromatógrafo, así como de la programación de la temperatura [21,22].

Un cromatógrafo de gases es capaz de separar los analitos y un detector es capaz de emitir una señal proporcional a la cantidad del analito. Un detector que se utiliza junto al cromatógrafo de gases y el más común es el detector de ionización de llama (FID), incinera los compuestos gaseosos provenientes de la columna y cuantifica el número de iones que se forma durante la combustión [21]. La respuesta del detector se representa gráficamente en un cromatograma, que es la concentración de analito en el efluente u otra cantidad usada como una medida de concentración del efluente en función del volumen de efluente o del tiempo [21,23].

Las sustancias o analitos de estudio son dos y presentan diferentes propiedades químicas, físicas y terapéuticas. El mentol es un alcohol obtenido de diversos aceites de menta o preparado por síntesis y químicamente es levógiro o racémico [22], muy soluble en etanol y dietil éter, ligeramente soluble en agua, son cristales incoloros, con olor característico y refrescante con un sabor ardiente y a la vez fresco [23,24]. En bajas concentraciones estimula en forma selectiva las terminaciones sensitivas para el frío y causa una sensación de frescura acompañada de analgesia local [22].

El salicilato de metilo es un líquido incoloro o amarillento, tiene un fuerte olor característico, es miscible en etanol, en dietil éter y ligeramente soluble en agua [22]. Actúa como analgésico, rubefaciente, queratolítico y antiinflamatorio [23].

La técnica analítica del producto que se va a validar posee una forma farmacéutica tipo ungüento, los productos farmacéuticos tipo ungüento pueden estar compuestos por uno o más principios activos, son preparaciones semisólidas que no contienen un alto contenido de agua y pueden tener bases hidrocarbonatadas, bases de absorción, bases lavables con agua y bases hidrosolubles. El ungüento de estudio contiene dos analitos (l-mentol y salicilato de metilo y una base hidrocarbonatada compuesto por vaselina y parafina). Este producto no se encuentra en las farmacopeas de referencia, por lo que es importante

que la técnica analítica del producto sea confiable por medio del desarrollo de la validación.

1.6. Objetivos

1.1.3. Objetivo General

Describir la implementación del Cromatógrafo de gases (GC-FID) y desarrollar la validación de técnica analítica propia para la identificación y cuantificación de mentol y salicilato de metilo en ungüento.

1.1.4. Objetivos Específicos

- a. Describir los requerimientos para la instalación y uso adecuado del cromatógrafo de gases (GC-FID), para cumplir los requerimientos de la normativa peruana.
- b. Describir la elaboración de la Técnica analítica para identificación y cuantificación de salicilato de metilo y mentol en ungüento.
- c. Describir la elaboración del Protocolo e Informe de validación de la técnica analítica para identificación y cuantificación de mentol y salicilato de metilo en ungüento por Cromatógrafo de Gases (GC-FID).
- d. Determinar los parámetros y criterios de aceptación para la validación de la técnica analítica para la identificación y cuantificación de mentol y salicilato de metilo en ungüento por Cromatógrafo de Gases (GC-FID).
- e. Analizar la eficiencia obtenida por la adquisición del Cromatógrafo de Gases (GC-FID).

2. METODOLOGÍA

2.1. Instalación del Cromatógrafo de Gases

Se inicia con el Requerimiento de Usuario (URS) solicitado por el Área de Control de Calidad para aprobación e inicio de la instalación del equipo.

2.2. Desarrollo y Validación de técnica analítica

El desarrollo de técnica analítica se elabora considerando las propiedades físicas y químicas de los tres principios activos y así también a la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) en Especificaciones: Procedimientos testeados y criterios de aceptación para nuevas sustancias y nuevos productos: sustancias químicas (Q6A) [24]

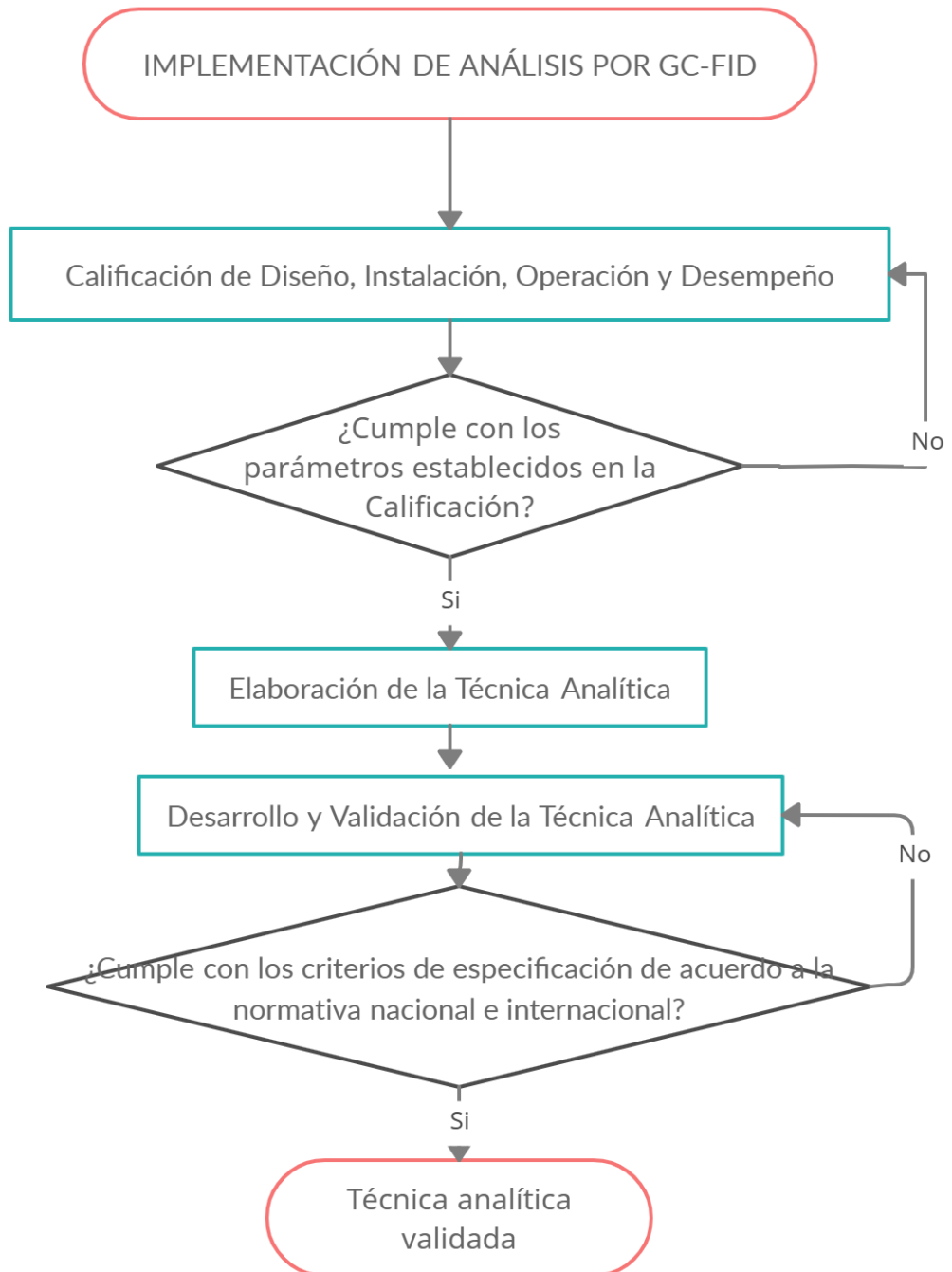
El protocolo de validación se elabora teniendo en cuenta la “Técnica analítica para identidad y contenido de mentol y salicilato de metilo” desarrollado por el laboratorio según Documento Técnico N° 147-MINSA/2019/DIGEMID, Norma Técnica de Salud que regula la información mínima que debe contener el documento de validación de técnicas analíticas propias [14].

La validación corresponde a una técnica analítica de identificación y cuantificación de principios activos de un producto farmacéutico por cromatografía de gases, considerando la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) en Validación de Procedimientos Analíticos Q2 (R1) [14], los parámetros a desarrollar son: especificidad, linealidad, rango, exactitud, precisión (repetibilidad, precisión intermedia).

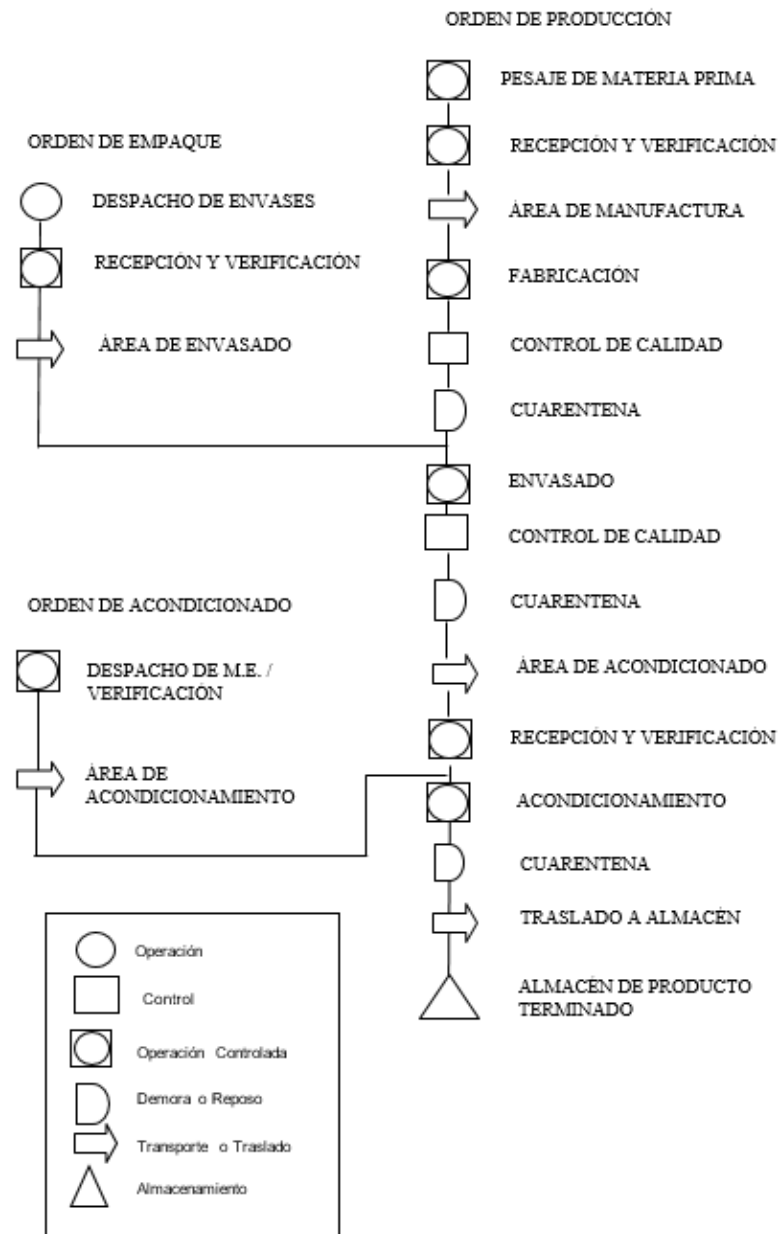
El informe de validación se elabora considerando el Documento Técnico N° 147-MINSA/2019/DIGEMID, Norma Técnica de Salud que regula la información mínima que debe contener el documento de validación de técnicas analíticas propias [16].

Respecto a la Documentación, el Sistema de Gestión de Calidad [25] del laboratorio cuenta con Procedimientos Operativos Estandarizados, Documentos internos, Formatos e Instructivos que determinan los procesos y contribuyen a la trazabilidad de la información de cada una de las áreas del laboratorio. El Plan Maestro de Validaciones contiene las pautas, instrucciones y requisitos sobre sistemas, equipos, métodos, procedimientos, formatos que se deben tener en cuenta previo a la Validación de la Técnica Analítica.

2.3. Metodología del trabajo



2.4. Flujograma del proceso de fabricación



3. RESULTADOS

3.1. Instalación del Cromatógrafo de gases.

3.1.1. Calificación de Diseño

Inicia con el URS (User Requirements Specifications), documento que describe la función principal del equipo a diseñar, la ubicación, objetivos de la instalación del equipo, requerimientos funcionales y requerimientos de calidad para cumplir con las normativas nacionales e internacionales, así también requerimientos de seguridad que garantizan la seguridad del trabajador y del equipo.

Se realiza la comparación de los equipos probables de adquisición por la empresa considerando características del equipo, funcionalidad, mantenimiento del equipo, atención y garantía por parte del proveedor.

EQUIPOS	SCION-436GC[26]	SCION-456GC[26]	DANI Master GC[27]
Fabricante	SCION INSTRUMENTS	SCION INSTRUMENTS	DANI INSTRUMENTS
País	Países Bajos	Países Bajos	Italia
Proveedor	MS Consultoría SAC	MS Consultoría SAC	NEGOCIAR
Garantía	1 año	1 año	1 año
Asesoría y mantenimiento	Constante y permanente	Constante y permanente	1 año
Inyectores y detectores	2 inyectores, 2 detectores	3 inyectores, 4 detectores	3 detectores y 3 inyectores y 2 zonas auxiliares de temperatura.
Horno	Horno con rampeo rápido 170°C/min	Horno con rampeo rápido 150°C/min	Isotérmico con temperatura programada permitiendo operar con 25 rampas a una tasa de calentamiento de hasta 140°C / min.
Dimensiones	57 x 32 x 61 cm (alto x ancho x fondo)	57 x 66 x 56 (alto x ancho x fondo)	570 x 500 x 50 mm (ancho x alto x profundo)
Alimentación	230VAC 50/60Hz 1500 VA	200 – 240 VAC 50/60Hz 2000 VA	220V 50Hz (±10% máx.) 1500 VA
Peso	26.8 kg	43 kg	65kg

Tabla 1. Características de equipos.

El equipo que cumple las características funcionales para la empresa es el SCION-436 GC.

El URS se aprueba y se inician las pruebas FAT (Factory Acceptance Testing) y Pruebas SAT (Site Acceptance Testing).

3.1.2. Calificación de Instalación

Las pruebas de calificación se realizan de acuerdo con las cGMP para la Fabricación, Procesamiento, Embalaje, o Contenido de Fármacos por el 21 CFR Partes 210 y 211 (ver Anexo 2).

Se realizan siete pruebas de calificación:

- Descripción del Sistema
- Check List de Preinstalación en relación al sitio de instalación
- Entrega del equipo describiendo e identificando cada uno de sus componentes (Sistema, accesorios, automuestreador, software, PC)
- Verificación de la documentación del equipo
- Ensamblaje e instalación, de acuerdo a la documentación verificada del equipo, se siguen las instrucciones del Manual de Instalación, Instrucciones eléctricas, Instrucciones mecánicas e instrucciones de zonas presurizadas.
- Instalación del Software
- Verificación de Instalación /Encendido.

Finalmente se registran todas las pruebas y protocolo realizado para la instalación y se concluye que la instalación ha sido exitosa según los 7 parámetros indicados.

3.1.3. Calificación de Operación y Desempeño

Las pruebas a realizar para calificar la operación y desempeño (ver Anexo 3) del equipo GC-FID SCION436, se describen a continuación.

- Verificación y Operatividad del Funcionamiento del Instrumento, incluye la verificación de flujos en el inyector y detector.
Se realiza el Control Electrónico del Flujo, el cual usa mediciones de una prueba fija calibrada realizada en fábrica para determinar la compensación y otros parámetros requeridos para precisar el control del flujo a través del sistema. La verificación de flujos neumáticas manuales para el inyector consiste en registrar el Flujo en la columna (mL/min) a la salida del detector, se registra el Flujo del Venteo del Split (mL/min) y finalmente el Flujo de la Purga de la Septa (mL/min), los valores se encuentran dentro del 10% del punto establecido. La verificación de flujos en neumáticas manuales para el Detector, se registran los flujos en mL/min para los gases Helio, Hidrógeno y Nitrógeno, se abre cada válvula por separado y se mide el flujo a la salida

del detector, los valores se encuentran dentro de un 10% del punto establecido. La puesta en marcha y verificación de Firmware Se confirmó que el programa informático pasa la prueba porque desplegaba el “Status”, se registran las versiones del Hardware, Firmware, Inyector, Detector, Automuestreador.

- Prueba integral y Desempeño del sistema.
Se programa un método para analizar una muestra prueba en una columna de prueba y se registran los datos del método, se realiza el acondicionamiento por una hora. La muestra de prueba es de 30ng/μL C14, C15 y C16, alcanos normales en iso-octano con un volumen de inyección de 1 μL. La muestra de prueba se diluye 1:20 en iso-octano para inyección Splitless, se programan 5 corridas. Se registran las áreas y tiempos de retención de las 5 corridas obteniendo un RSD igual a 0.1034%.
- Demostración al usuario.
Consiste en asegurar que el representante de calificación ha demostrado adecuadamente la configuración, operación y mantenimiento del software, instrumento y su calibración.

3.2. Técnica analítica

El producto farmacéutico a analizar corresponde a una forma farmacéutica tipo unguento, se requiere identificar y cuantificar los principios activos que contiene el producto farmacéutico, la técnica analítica a detalle se puede visualizar en Anexo 4.

3.2.1. Fórmula cualicuantitativa

Cada 100 g contiene:

<i>Salicilato de metilo</i>	29,00 g
<i>l-mentol</i>	7,60 g
<i>Parafina</i>	10,00 g
<i>Vaselina blanca</i>	53,40 g c.s.p

3.2.2. Condiciones de trabajo

Las condiciones de trabajo corresponden al Área Físicoquímica perteneciente al Área de Control de Calidad con una Temperatura igual a $25^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ y Humedad relativa no mayor a 70%.

3.2.3. Procedimiento analítico

Se realiza la identificación y cuantificación **Salicilato de metilo 29,00 g + Mentol 7,60 g**.

3.2.3.1. Identificación

Analizar y comparar los tiempos de retención de los picos de Salicilato de metilo y 1 - mentol de la Muestra con el Estándar de Referencia, según se obtiene en la Cuantificación.

3.2.3.2. Cuantificación

Se prepara la muestra del producto y el Estándar de Referencia y se analiza por Cromatografía de Gases con las condiciones cromatográficas indicadas en la Tabla 1. Se realiza el cálculo para hallar la concentración de Salicilato de metilo y 1 – mentol.

- a. Estándar Interno (ISTD): Pesar 50 mg de 1-decanol en una fiola de 25 mL y enrasar con alcohol etílico grado HPLC.
- b. Estándar de Referencia (STDR): Pesar con exactitud 290 mg de Estándar Secundario de Salicilato de metilo en una fiola de 50 mL diluir y enrasar con alcohol etílico grado HPLC. Pesar 152 mg de Estándar Secundario de mentol en una fiola de 100 mL diluir y enrasar con alcohol etílico grado HPLC. A partir de estas soluciones, transferir 1 mL de la solución de Salicilato de metilo, 1 mL de la solución de mentol a una fiola de 25 mL, de tal modo que sean concentraciones similares a la muestra. Finalmente agregar 0,5 mL de Estándar Interno y enrasar con alcohol etílico grado HPLC. Filtrar a través de un filtro con membrana Fluoruro de Polivinilideno (PVDF) de 0,22 um. Realizar por duplicado.
- c. Muestra (M): Pesar aproximadamente 1 g de muestra del producto en una fiola de 50 mL, adicionar aproximadamente 30 mL de alcohol etílico grado HPLC. Para extraer los componentes de la muestra, se coloca en baño maría a una temperatura constante de 60 °C por 60 segundos, retirar la fiola del baño maría, agitar con vortex por 10 segundos a 3000 rpm, retirar, agitar manual y vigorosamente. El ciclo debe repetirse por dos veces. Una vez completado los ciclos de extracción, llevar la fiola a un baño de agua con hielo durante 5 minutos

aproximadamente, retirar la fiola del baño con hielo y dejar que alcance temperatura ambiente, enrasar con alcohol etílico grado HPLC, asegurarse que la solución se mantenga homogénea durante el enrase con ayuda de agitación manual o con vortex. Dejar sedimentar la masa grasa por un espacio de tiempo aproximado de 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, tomar 1 mL y llevarlo a una fiola de 25 mL, finalmente agregar a la fiola 0.5 mL de solución de Estándar Interno y enrasar con alcohol etílico grado HPLC. Filtrar la solución a través de un filtro con membrana PVDF de 0,22 μ m. Las muestras deben ser preparadas por duplicado.

d. Concentraciones:

Salicilato de metilo: 0,232 mg/mL

Mentol: 0,06 mg/mL

ISTD: 0,04 mg/mL

3.2.4. Condiciones cromatográficas

Las condiciones cromatográficas que se muestran en la Tabla 2, deben ser programadas en el Software del GC-FID, luego crear una secuencia en el programa del Cromatógrafo de Gases. Realizar seis inyecciones de 3 μ L del Estándar de Referencia y realizar dos inyecciones de 3 μ L de la Muestra.

Finalmente, se registran las áreas y se hacen los cálculos respectivos considerados en el inciso 3.2.3. Procedimiento Analítico, así determinar el contenido de Salicilato de metilo y *l*-mentol en 100 g de muestra del producto. Además, dividir el promedio de áreas de Estándar de Referencia entre el promedio de áreas del Estándar Interno y calcular la Desviación Estándar Relativa (RSD), que no debe ser mayor al 2%.

COMPONENTES	PARÁMETROS
EQUIPO:	Cromatógrafo de Gases - SCION 436-GC
MODELO:	436-GC
DETECTOR:	IONIZACION DE LLAMAS (FID)
COLUMNA UTILIZADA:	TRB-5HT (95% dimetil 5% dimetilpolisiloxano)
GAS CARRIER:	HELIO
FLUJO COLUMNA:	1 mL/min
FLUJO HIDROGENO:	8 psi/min
FLUJO AIRE:	6 psi/min
T° INICIAL:	120 °C

RAMPA:	30 °C/min
T° FINAL:	240 °C
T° INYECTOR:	250 °C
T° DETECTOR:	300 °C
VOLUMEN DE INYECCIÓN:	3 µL
DILUYENTE:	ETANOL
TIPO/INYECCIÓN:	AUTOMÁTICO/SPLIT-SPLITLESS
TIEMPO DE CORRIDA:	Aprox. 10 min

Tabla 2. Condiciones cromatográficas

3.3. Validación de técnica analítica propia

El Protocolo e Informe de Validación (Anexos 5 y 6) son elaborados según NTS N° 174-MINSA/2019/DIGEMID, Norma Técnica de Salud que regula la información mínima que debe contener el documento de validación de técnicas analíticas propias. La información mínima que deben contener en común el Protocolo e Informe de Validación se resume en la Tabla 3.

Laboratorio	Nombre	Nombre del laboratorio nacional
	Dirección	Dirección del laboratorio nacional
Producto	Denominación Común internacional	DCI-001
	Ingrediente Farmacéutico Activo	Salicilato de metilo 29% Mentol 7.6%
	Fórmula cualicuantitativa	Salicilato de metilo 29% Mentol 7.6% Parafina 10% Vaselina 53.40 %
	Forma farmacéutica	Ungüento
Técnica analítica	Título	Técnica analítica para la Identificación y cuantificación Salicilato de metilo 29,00g + Mentol 7,60g
	Código	LFP-CC-TEC-PT-DCI-001
	Versión	1

Tabla 3. Información mínima que contiene el Protocolo e Informe de Validación.

3.3.1. Protocolo de Validación

El Protocolo de Validación (Anexo 5) es un documento que da a conocer el proceso y/o actividades a realizar en la validación, así también, verifica la trazabilidad de la documentación, insumos y materiales a utilizar en la validación, en la Tabla 4 se resume la información mínima que contiene el Protocolo de Validación y en el Anexo 5 se encuentra a detalle.

Título del estudio	Protocolo de Validación de la Técnica analítica para la identificación y cuantificación Salicilato de metilo 29,00g + Mentol 7,60 g Ungüento
Código	LFP-AC-VL-PVTA-002
Versión	1
Objetivo	Establecer y demostrar que el método analítico para la identificación y cuantificación de Salicilato de metilo 29,00 g + mentol 7,60 g en unguento por Cromatografía de Gases (GC-FID) cumple con las especificaciones requeridas según los parámetros establecidos en el presente protocolo.
Alcance	Este protocolo es aplicable para la validación de la identificación y cuantificación de Salicilato de metilo 29,00 g + mentol 7,60 g para la técnica analítica.
Materiales	Ver Tabla 5, 6, 7
Reactivos	Ver Tabla 8
Materiales de referencia	Ver Tabla 9
Equipos	Ver Tabla 10
Verificación de materias primas	Ver Tabla 11
Parámetros	Ver Anexo 6.
Criterios de aceptación	Ver Sección 3.3.1.3.
Firmas	Jefe de Control de Calidad: elabora el Protocolo de Validación. Jefe de Producción: revisa el Protocolo de Validación. Jefe de Aseguramiento de la Calidad: revisa y aprueba el Protocolo de Validación. Dirección Técnica: aprueba el Protocolo de Validación.

Tabla 4. Información mínima que contiene el Protocolo de Validación

Fiolas	25 mL	50mL	100mL
Marca	Witeg	Witeg	Witeg
Procedencia	Alemana	Alemana	Alemana
Ajuste	In	Ex	In
Clase	A	A	A
Material	Borosilicato 3.3	Borosilicato 3.3	Borosilicato 3.3

Valor nominal	25 mL	50 mL	100 mL
Volúmen contenido	24,99648 mL	49,99107 mL	9,99905 mL
Fecha Calibración	22/01/2019	22/01/2019	22/01/2019
Certificado Calibración	LVL19-0102	LVL19-0101	LVL19-0117

Tabla 5. Material de vidrio – Fiolas a utilizar en la validación

Pipetas volumétricas	0.5 mL	1 mL	2mL	3mL	4mL	5mL	6mL
Marca	Witeg	Witeg	Witeg	IsoLab	Witeg	Witeg	Witeg
Procedencia	Alemana	Alemana	Alemana	Alemana	Alemana	Alemana	Alemana
Ajuste	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex
Clase	A	A	A	A	A	A	A
Material	Borosilicato 3.3	Borosilicato 3.3	Borosilicato 3.3	Borosilicato 3.3	Borosilicato 3.3	Borosilicato 3.3	Borosilicato 3.3
Valor nominal	0.5mL	1mL	2mL	3mL	4mL	5mL	6mL
Volumen contenido	0,499912 mL	1,00075 mL	2,01 mL	3,01 mL	4,012 mL	5,016 mL	6,017 mL
Fecha Calibración	22/01/2019	22/01/2019	22/01/2019	22/01/2019	22/01/2019	22/01/2019	22/01/2019
Certificado Calibración	LVL19-0109	LVL19-0110	LVL19-0111	LVL19-0112	LVL19-0113	LVL19-0114	LVL19-0115

Tabla 6. Material de vidrio – Pipetas volumétricas a utilizar en la Validación

Material	Presentación	Marca
Jeringas 5cc	Caja x 150 unidades	S/M
Filtro de Jeringa	Nylon 0.22 µm x 0.25mm en Paquete x 100 unidades	STARLAB SCIENTIFIC
Vial 2mL	Ambar (9mm) Paquete x 100 unidades.	STARLAB SCIENTIFIC

Tabla 7. Materiales a utilizar en la Validación

Reactivo	Código	CAS	Presentación	Fabricante
Alcohol etílico grado HPLC	ALC-001	64-17-5	Frasco x 1L	Pan Reac Applichem
1-Decanol	ALC-005	112-30-1	Frasco x 500g	Sigma Aldrich
Ácido clorhídrico	IQF-03	7647-01-0	Frasco x 4L	Fermont
Peróxido de Hidrógeno	RTV-016	7722-84-1	Frasco x 1 L	Merck
Hidróxido de sodio	RTV-011	1310-73-2	Frasco x 500g	CDH

Tabla 8. Lista de Reactivos a utilizar en la Validación

Estándares	Compuesto	Lote	Código	Presentación	Fabricante
Estándar primario	Salicilato de metilo (99.8%)	R035R0	SP-001	Frasco x 2mL	USP
Estándar primario	Mentol (99.5%)	R09450	SP-003	Frasco x 250mg	USP
Estándar secundario	Salicilato de Metilo	E104019S	ES-001	Frasco x 5g	Rosenthal
Estándar secundario	Mentol	E104029S	ES-003	Frasco x 5g	Rosenthal

Tabla 9. Lista de Estándares Primarios y Secundarios

EQUIPO	MARCA	MODELO	CÓDIGO	CERTIFICADO CALIBRACIÓN/ CALIFICACIÓN
Cromatógrafo de gases	SCION	436-GC	EQ/CC-34	CP501413IQ CP501413OQ
Balanza analítica	SARTORIUS	TE214S	EQ/CC-22	CLF16-0015 LM19-163
Agitador magnético	VELP SCIENTIFICA	ARE	EQ/CC-01	LEE19-0042
Vortex	LAB COMPANION	VM-96A	EQ/CC-31	LEE19-0020

Tabla 10. Lista de equipos a utilizar en la Validación

Materia prima	Fabricante	Certificado de Calidad	Farmacopea	Verificación de Técnica Analítica
Salicilato de metilo	Zhenjiang Maoyuan Chemical Co., Ltd /China	Ver Anexo 7	Farmacopea Japonesa	Sí
Mentol	Anhui Tonghui Perfume Co Ltd, China	Ver Anexo 8	Farmacopea Japonesa	Sí
Parafina	Hansen & Rosenthal KG /Alemania	Ver Anexo 9	Farmacopea Japonesa	Sí
Vaselina	Globalwax LLC /New Jersey, Estados Unidos.	Ver Anexo 10	Farmacopea Japonesa	Sí

Tabla 11. Verificación de monografía de materias primas

3.3.1.2. Criterios de aceptación

Los parámetros de la validación deben cumplir con criterios de aceptación o especificaciones para certificar que la identificación y cuantificación de la técnica analítica propuesta tenga un procedimiento adecuado.

PARÁMETROS	ENSAYOS	ESPECIFICACIONES
PRECISIÓN DEL SISTEMA	Desviación Estándar Relativa	$RSD \leq 2\%$
	DETERMINACIÓN DE INTERFERENCIAS	
ESPECIFICIDAD	Diluyente	No presenta señal
	Estándar Interno	Señal $RSD \leq 2\%$
	Placebo	No presenta señal
	ANÁLISIS DEL PLACEBO DOSIFICADO Y ESTÁNDAR	
	Placebo dosificado	$RSD \leq 2\%$
	Estándar	$RSD \leq 2\%$
	DETERMINACIÓN DE INTERFERENCIAS DE PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN	
	FOTÓLISIS	Tiempo de retención $RSD \leq 2\%$
	TERMÓLISIS	Tiempo de retención $RSD \leq 2\%$
	HIDRÓLISIS ÁCIDA	Tiempo de retención $RSD \leq 2\%$
	HIDRÓLISIS BÁSICA	Tiempo de retención $RSD \leq 2\%$
	OXIDACIÓN	Tiempo de retención $RSD \leq 2\%$
LINEALIDAD DEL SISTEMA	Coefficiente de correlación	$r > 0.9950$
	Coefficiente de determinación	$r^2 > 0.9950$
	Homogeneidad de varianzas	$G_{exp} < G_{tablas}$
	ANOVA	$F_{exp} > F_{tab}$
	Coefficiente de variación de los factores de respuesta	$RSD \leq 2\%$
	Significación estadística de la pendiente	$t_{exp} > t_{tab}$
	Test de proporcionalidad	$t_{exp} < t_{tab}$
LINEALIDAD DEL MÉTODO	Coefficiente de correlación	$r > 0.9950$
	Coefficiente de determinación	$r^2 > 0.9950$
	Homogeneidad de varianzas	$G_{exp} < G_{tablas}$
	ANOVA	$F_{exp} > F_{tab}$
	Coefficiente de variación de los factores de respuesta	$RSD \leq 2\%$
	Significación estadística de la pendiente	$t_{exp} > t_{tab}$

	Test de proporcionalidad	$t_{exp} < t_{tab}$
EXACTITUD	Desviación Estándar Relativa	$RSD \leq 2\%$
	Porcentaje de recuperación	$>90\%$
	T – Student	$t_{exp} < t_{tab}$
PRECISIÓN	REPETIBILIDAD	$RSD \leq 2\%$
	PRECISIÓN INTERMEDIA	$RSD \leq 2\%$
ROBUSTEZ	Desviación Estándar Relativa	$RSD \leq 2\%$

Tabla 12. Criterios de aceptación de los parámetros de Validación

3.3.2. Informe de Validación

El Informe de Validación (Ver Anexo 6) es un documento que contiene los resultados de los procesos y/o actividades descritos en el Protocolo de Validación e informa las conclusiones de la Validación.

Título del estudio	Protocolo de validación de la técnica analítica para la identificación y cuantificación Salicilato de metilo 29,00g + Mentol 7,60g Ungüento
Código	LFP-AC-VL-RVTA-002
Versión	1
Resultados	Ver Anexo 6 y Sección 3.4.
Análisis de los resultados	Ver Anexo 6, Sección 3.4 y 4.
Conclusiones	La técnica analítica para la identificación y cuantificación de Salicilato de metilo 29,00 g + mentol 7,60 g cumple con los parámetros de validación desarrollados y establecidos en el Protocolo de Validación (LFP-AC-VL-RVTA-002). Por tanto, la técnica analítica es adecuada para su uso en el análisis del producto, en las siguientes concentraciones: Salicilato de metilo 0,23 mg/mL l-mentol 0,06 mg/mL
Firmas	Jefe de Control de Calidad: elabora el Protocolo de Validación. Jefe de Producción: revisa el Protocolo de Validación. Jefe de Aseguramiento de la Calidad: revisa y aprueba el Protocolo de Validación. Dirección Técnica: aprueba el Protocolo de Validación.
Fechas	La fecha de aprobación y emisión se realiza al culminar y revisar el Informe de Validación por los responsables de cada área que participan, según lo aprobado en el Protocolo de Validación.

Tabla 13. Información mínima que contiene el Informe de Validación

Se ha desarrollado y ejecutado cada parámetro de la validación que se pueden visualizar a detalle en los Anexos 5 y 6, se han obtenido resultados según las especificaciones para cada parámetro y para cada principio activo que contiene el producto

farmacéutico en estudio. Los resultados obtenidos para el principio activo salicilato de metilo y mentol cumplen con los criterios de aceptación de los parámetros de la validación de técnica analítica.

3.4. Parámetros

a. Precisión instrumental

Se prepara una solución que contiene estándar secundario de salicilato de metilo, mentol y estándar interno (1-decanol) a concentraciones teóricas del producto terminado. Se determina la desviación estándar relativa (RSD) y el tiempo de retención, se programa la inyección en el cromatógrafo de gases seis veces consecutivas. El estándar (STD) de Salicilato de metilo tiene un tiempo de retención a los 6,26 minutos en los seis análisis y una desviación estándar menor al 2%. (Ver Imagen 1).

	TIEMPO DE RETENCIÓN	STD	ISTD	STD/ISTD
1	6.26	454.4	133.7	3.39865370
2	6.26	460.3	135.3	3.40206948
3	6.26	458.8	135.8	3.37849779
4	6.26	460.8	135.6	3.39823009
5	6.26	460.6	134.2	3.43219076
6	6.26	458.3	134.7	3.40237565
PROMEDIO				3.40200291
DESVIACIÓN ESTANDAR RELATIVA				0.50732326

Tabla 14. Resultados de Precisión Instrumental para Salicilato de Metilo

El estándar (STD) de Mentol tiene un tiempo de retención a los 6,04 minutos en los seis análisis y una desviación estándar menor al 2%. (Ver Imagen 1).

	TIEMPO DE RETENCIÓN	STD	ISTD	STD/ISTD
1	6.04	189.8	133.7	1.419596111
2	6.04	192.2	135.3	1.420546933
3	6.04	192.1	135.8	1.414580265
4	6.04	192.7	135.6	1.421091445
5	6.04	192.8	134.2	1.436661699
6	6.04	192	134.7	1.425389755
PROMEDIO				1.422977701
DESVIACIÓN ESTANDAR RELATIVA				0.530089555

Tabla 15. Resultados de Precisión Instrumental para Mentol

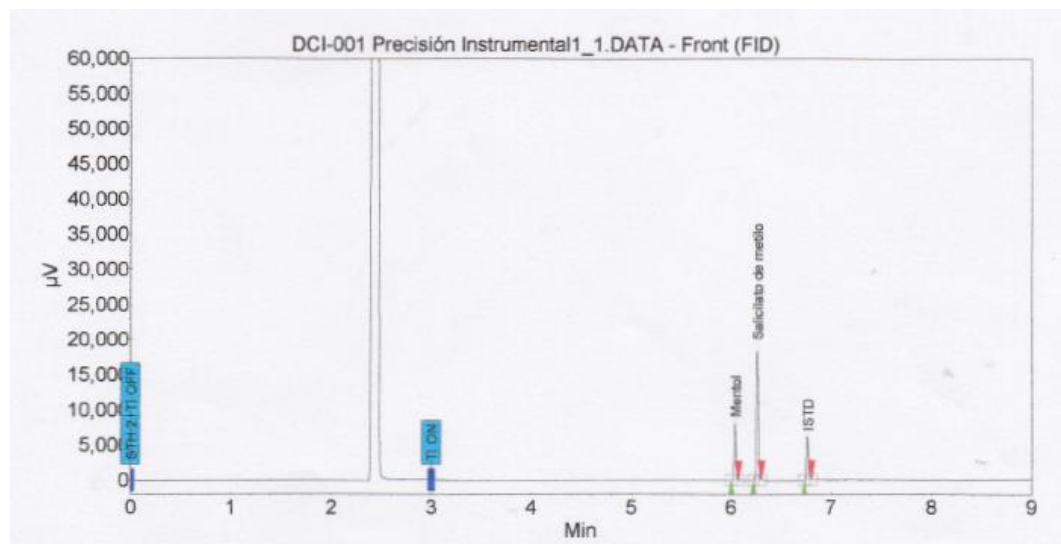


Imagen 1. Cromatograma obtenido para Precisión Instrumental

b. Especificidad

b.1. Determinación de interferencias

Analizar el diluyente (alcohol etílico grado HPLC), estándar interno (ISTD) y placebo (parafina, vaselina) a concentración teórica del producto terminado para determinar tiempos de retención, desviación estándar relativa (RSD) y detección de señal en el cromatograma. Programar 10 inyecciones consecutivas para cada solución en el cromatógrafo de gases.

El diluyente no presenta señal o respuesta significativa en el cromatograma, es decir la respuesta es lineal, tal como se muestra en los cromatogramas adjuntos (ver Imagen 2 y ver Anexo 6).

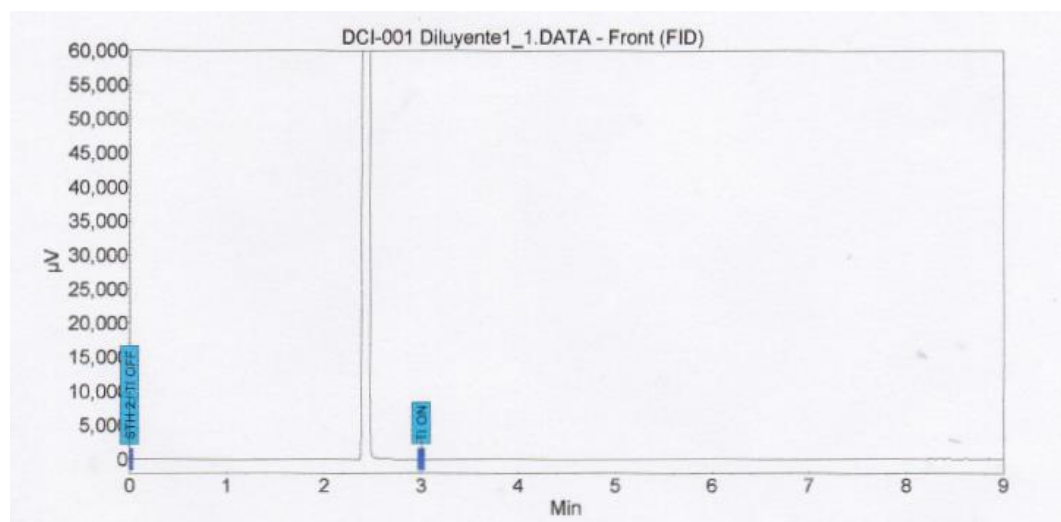


Imagen 2. Cromatograma obtenido para el diluyente.

El placebo no presenta señal o repuesta significativa en los cromatogramas obtenidos, es decir la respuesta es lineal, tal como se muestra en los cromatogramas adjuntos.

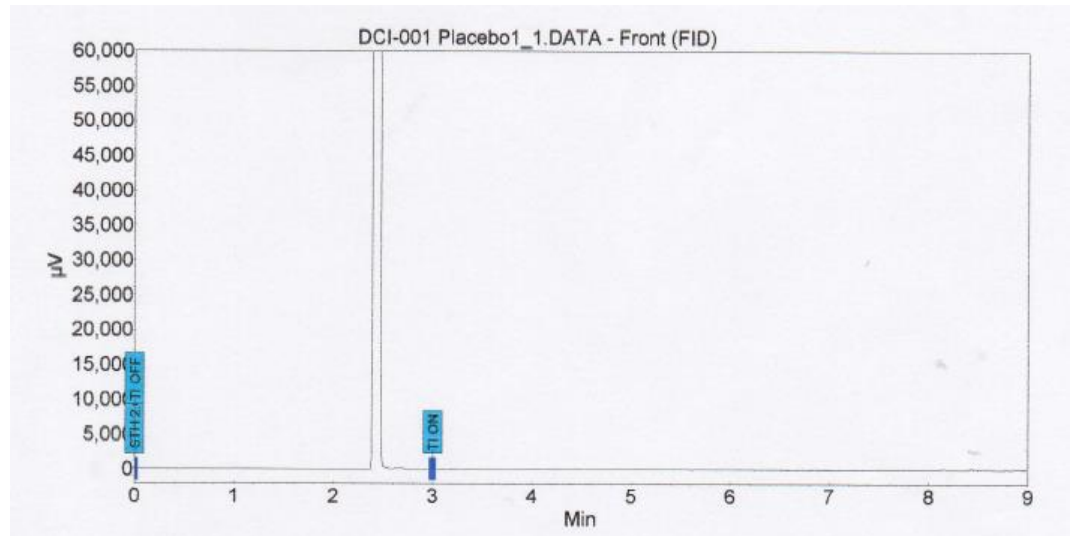


Imagen 3. Cromatograma obtenido para el placebo.

El estándar interno (ISTD) presenta señal a los $6,75 \pm 0.05$ minutos sin ninguna interferencia, tal como se observan en los cromatogramas adjuntos (ver Anexo 6).

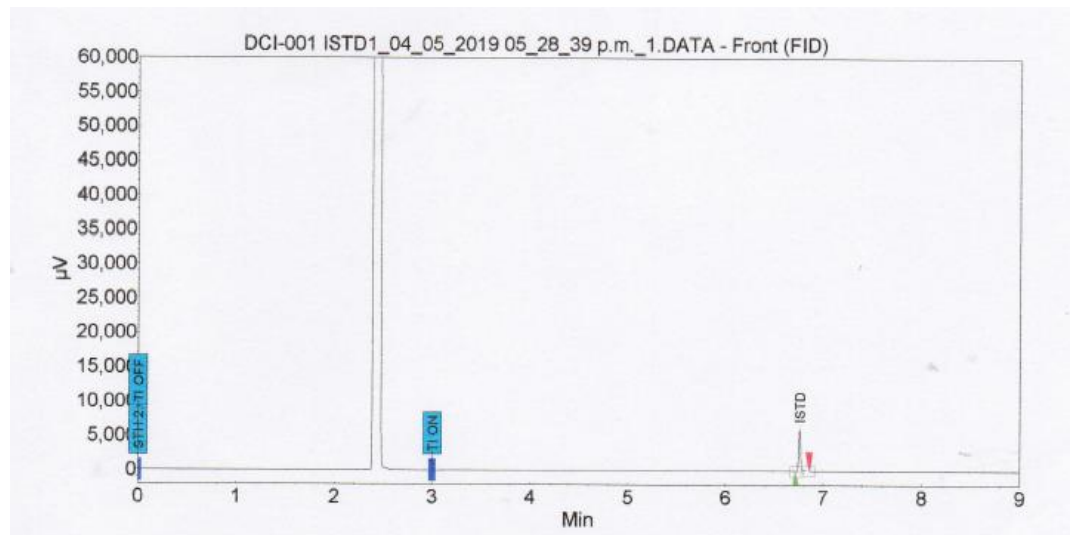


Imagen 4. Cromatograma obtenido para el estándar interno.

b.2. Análisis del placebo dosificado y estándar

Se prepara la solución del placebo dosificado (parafina, vaselina, salicilato de metilo, mentol) a concentraciones teóricas del producto terminado. Se prepara la solución de

estándar secundario de salicilato de metilo y 1-decanol y finalmente otra solución de estándar secundario de mentol y 1-decanol. Programar 10 inyecciones consecutivas de placebo dosificado y estándar en el cromatógrafo de gases, luego se determina la desviación estándar relativa (RSD) de las áreas y se compara los tiempos de retención obtenidos.

El estándar interno (ISTD) presenta señal a los $6,75 \pm 0.05$ minutos y ninguna señal significativa en los tiempos de retención de los estándares (STD) y el placebo dosificado (P). Por lo tanto no presenta interferencia alguna, ver Imagen 5.

El estándar por cada principio activo coincide con los tiempos de retención de los principios activos del placebo dosificado (P), así mismo la desviación estándar relativa es menor al 2%.

Salicilato de Metilo estándar, presenta respuesta o señal a los $6,26 \pm 0.05$ minutos y se observa una señal limpia en el cromatograma, visualizar Imágenes 5,6 y Tabla 16.

Mentol estándar, presenta respuesta a los $6,03 \pm 0.05$ minutos y se observa una señal limpia en el cromatograma, visualizar Imágenes 5, 7 y Tabla 17.

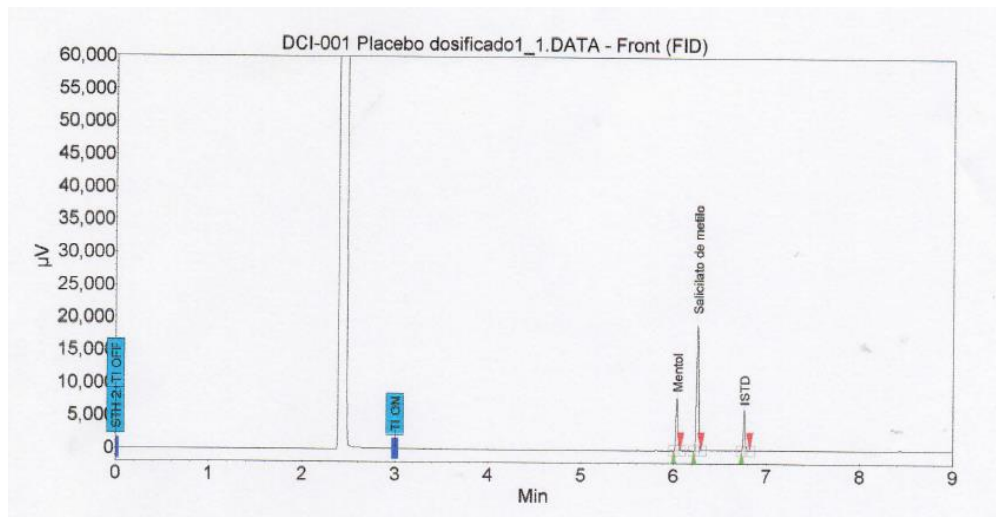


Imagen 5. Cromatograma obtenido para el Placebo dosificado.

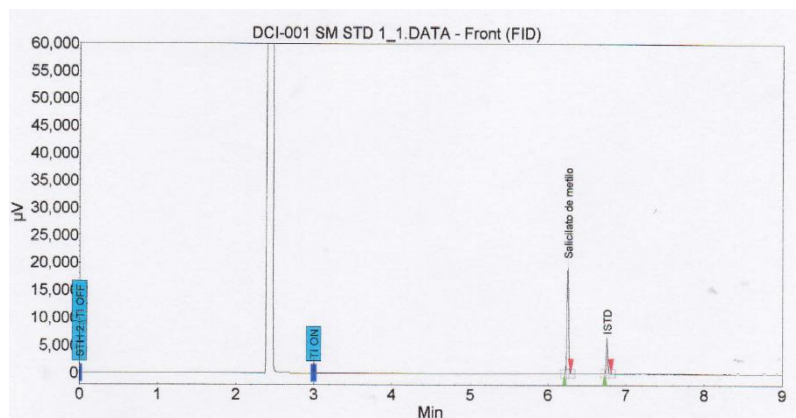


Imagen 6. Cromatograma obtenido para el estándar de Salicilato de metilo.

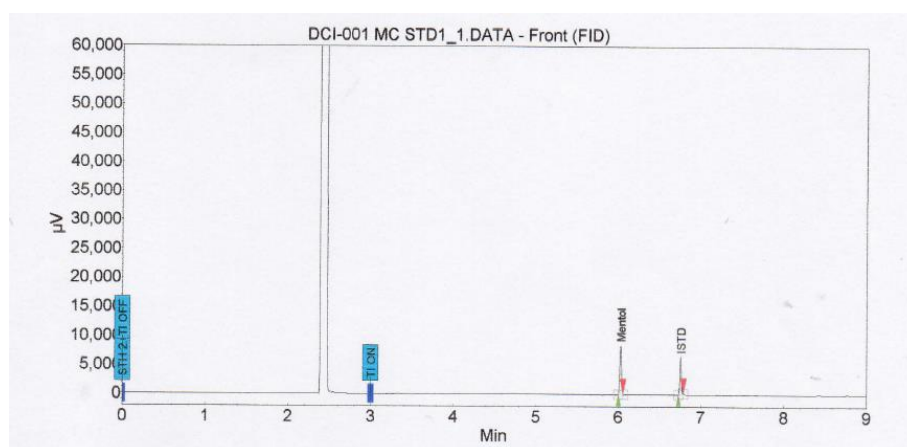


Imagen 7. Cromatograma obtenido para el estándar de Mentol.

PLACEBO DOSIFICADO					ESTÁNDAR			
	TIEMPO DE RETENCIÓN	P	ISTD	P/ISTD	TIEMPO DE RETENCIÓN	STD	ISTD	STD/ISTD
1	6.26	472	135.5	3.483394834	6.25	471.8	140.8	3.350852273
2	6.26	472.8	140.9	3.355571327	6.25	473.8	141.6	3.346045198
3	6.26	472.2	140.7	3.356076759	6.25	471.5	140.5	3.355871886
4	6.26	472	140.3	3.364219530	6.25	473.6	140.6	3.368421053
5	6.26	466.6	140.8	3.313920455	6.26	473.1	140.7	3.362473348
6	6.26	465.5	140.9	3.303761533	6.26	473.6	140.8	3.363636364
7	6.26	470.3	141.6	3.321327684	6.26	473.6	140.5	3.370818505
8	6.26	468.6	140	3.347142857	6.26	472.2	140.7	3.356076759
9	6.26	467.4	140.3	3.331432644	6.26	473.1	140.3	3.372059872
10	6.26	468.6	140.5	3.335231317	6.26	472.5	140.5	3.362989324
		PROMEDIO		3.351207894		PROMEDIO		3.360924458
	(RSD) DESVIACIÓN ESTANDAR RELATIVA			1.504631466		DESVIACIÓN ESTANDAR RELATIVA		0.255561882

Tabla 16. Áreas y ratio para Análisis de placebo dosificado y estándar salicilato de metilo.

PLACEBO DOSIFICADO					ESTÁNDAR			
TIEMPO DE RETENCIÓN	P	ISTD	P/ISTD	TIEMPO DE RETENCIÓN	STD	ISTD	STD/ISTD	
1	6.04	192.5	135.5	1.420664207	6.03	197.5	136.7	1.444769568
2	6.03	196.2	140.9	1.392476934	6.03	197.5	135.8	1.454344624
3	6.04	192.5	140.7	1.368159204	6.03	197.9	136	1.455147059
4	6.03	196.9	140.3	1.403421240	6.03	197.6	136.4	1.448680352
5	6.03	195.4	140.8	1.387784091	6.03	196.4	136.4	1.439882698
6	6.03	192.3	140.9	1.364797729	6.03	197.9	136.6	1.448755490
7	6.03	196.7	141.6	1.389124294	6.03	196.8	136.5	1.441758242
8	6.03	192.9	140	1.377857143	6.03	197.4	136.6	1.445095168
9	6.03	195.2	140.3	1.391304348	6.03	196.4	136.6	1.437774524
10	6.03	192.8	140.5	1.372241993	6.03	196	136.3	1.438004402
PROMEDIO			1.386783118	PROMEDIO			1.445421213	
(RSD) DESVIACIÓN ESTANDAR RELATIVA			1.226900729	DESVIACIÓN ESTANDAR RELATIVA			0.433934993	

Tabla 17. Áreas y ratio para Análisis de placebo dosificado y estándar mentol.

b.3. Determinación de interferencia de productos de degradación

Se realizan cinco ensayos para someter el placebo dosificado a condiciones de degradación, ensayo de fotólisis con luz ultravioleta a temperatura ambiente por 7 días, ensayo de termólisis a 80°C por 7 horas, Hidrólisis ácida con ácido clorhídrico a 80°C por 1 hora, hidrólisis básica con hidróxido de sodio a 80°C por 1 hora y ensayo de oxidación con peróxido de hidrógeno a 80°C por 1 hora. Considerar que para los ensayos de hidrólisis se realiza una neutralización. El placebo dosificado va a contener el placebo, estándar interno (ISTD) y los tres estándares secundarios (STD) a las concentraciones que teóricas. Programar 6 inyecciones consecutivas por cada ensayo, se determina la desviación estándar relativa (RSD) y se compara los tiempos de retención.

b.3.1. Fotólisis

Exposición a la luz UV durante un periodo de 7 días. Los tiempos de retención del placebo dosificado por cada principio activo corresponden al especificado y la desviación estándar relativa es menor al 2%, por lo tanto una exposición a luz UV no presenta interferencia alguna. (Ver Imagen 9).

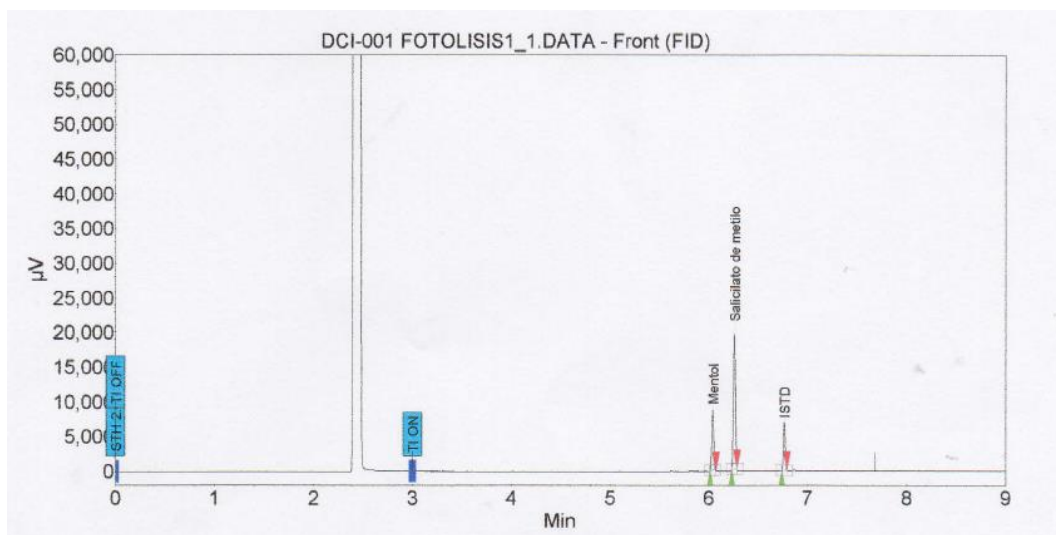


Imagen 9. Cromatograma obtenido para Fotólisis.

b.3.2. Termólisis

Exposición al calor, estufa 80°C por 7 horas. Los tiempos de retención del placebo dosificado por cada principio activo corresponden al especificado y la desviación estándar relativa es menor al 2%, por lo tanto una exposición al calor no presenta interferencia alguna.

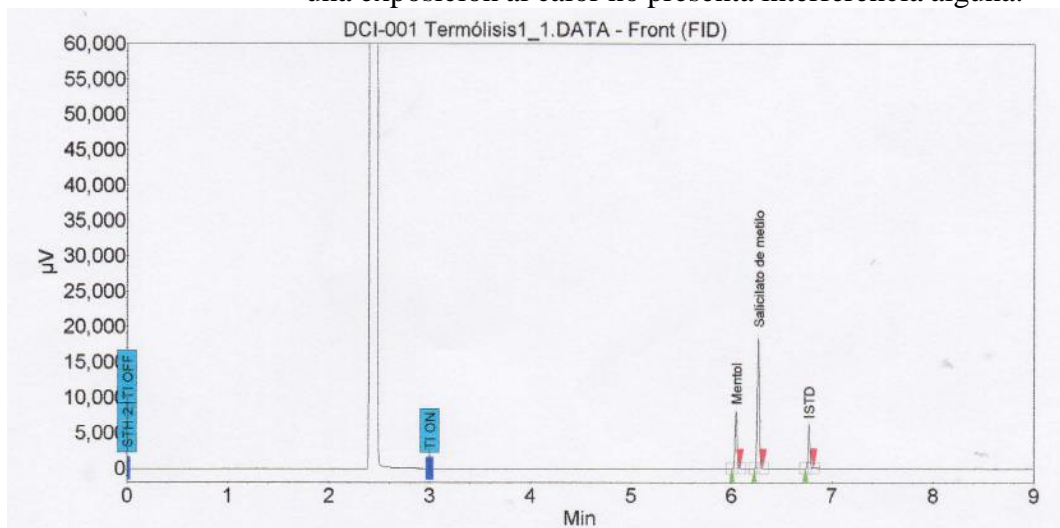


Imagen 10. Cromatograma obtenido para Termólisis.

b.3.3. Hidrólisis ácida

Se adicionaron 5mL HCl 10N. Los tiempos de retención del placebo dosificado por cada principio activo corresponden al especificado y la desviación estándar relativa es menor al 2%, por lo tanto una hidrólisis ácida no presenta interferencia alguna.

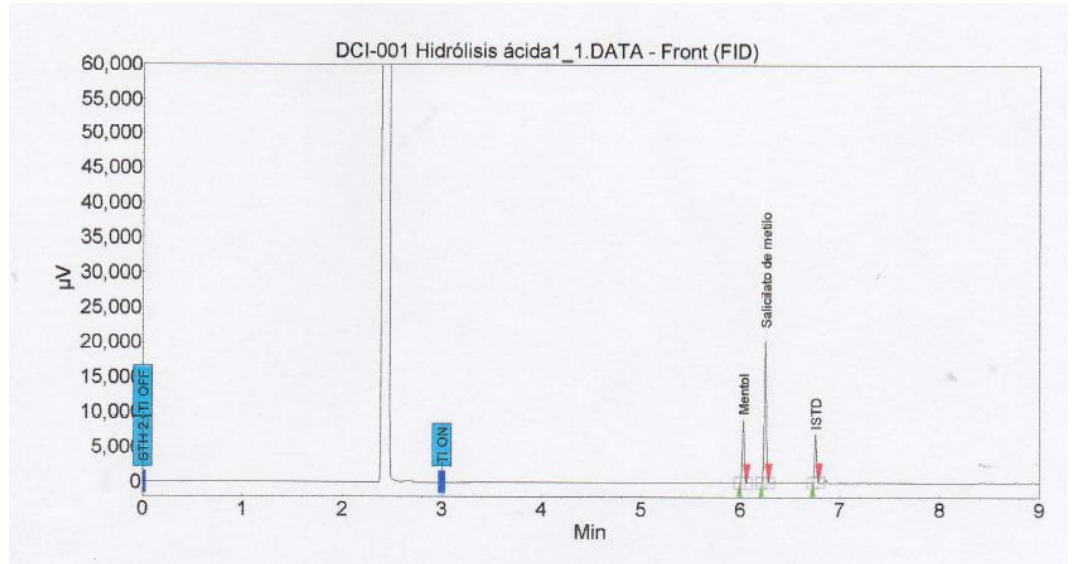


Imagen 11. Cromatograma obtenido para Hidrólisis Ácida.

b.3.4. Hidrólisis básica

Se adicionaron 5mL NaOH 10N. Los tiempos de retención del placebo dosificado por cada principio activo corresponden al especificado y la desviación estándar relativa es menor al 2%, por lo tanto una hidrólisis básica no presenta interferencia alguna.

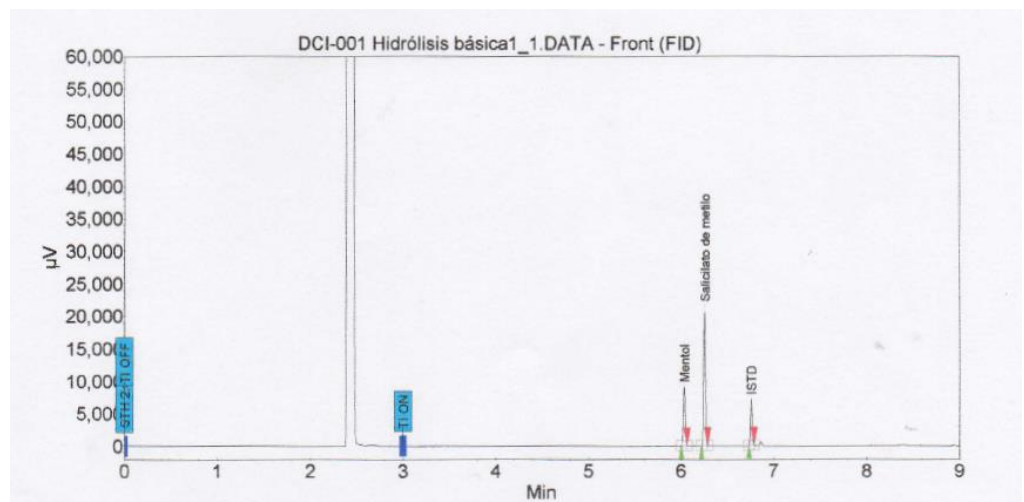


Imagen 12. Cromatograma obtenido para Hidrólisis básica.

b.3.5. Oxidación

Adicionar 5mL de peróxido de hidrogeno 30%. Los tiempos de retención del placebo dosificado por cada principio activo corresponden al especificado y la desviación estándar relativa es menor al 2%, por lo tanto una oxidación con peróxido de hidrógeno 30% no presenta interferencia alguna.

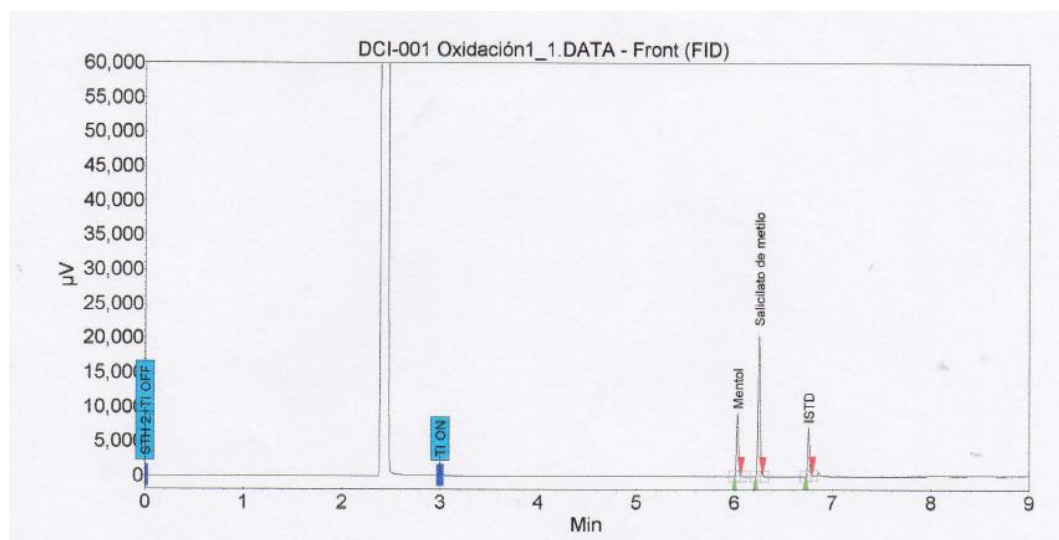


Imagen 13. Cromatograma obtenido para Oxidación.

c. Linealidad

c.1. Linealidad del sistema

Se prepara tres curvas de calibración para cada principio activo, utilizando estándares secundarios que corresponden a las concentraciones teóricas a cinco porcentajes, 50% (0.116 mg/mL y 0.0304 mg/mL para salicilato de metilo y mentol respectivamente), 75% (0.174 mg/mL y 0.0456 mg/mL para salicilato de metilo y mentol respectivamente), 100% (0.232 mg/mL y 0.0608 mg/mL para salicilato de metilo y mentol respectivamente), 125% (0.290 mg/mL y 0.0760 mg/mL para salicilato de metilo y mentol respectivamente), y 150% (0.348 mg/mL y 0.0912 mg/mL para salicilato de metilo y mentol respectivamente). Así mismo preparar el estándar interno al 100%. La preparación es por triplicado por cada porcentaje y se programa la inyección por duplicado en el cromatógrafo de gases.

Porcentaje	Dato	x (mg/mL)	y (ratio áreas)	f (y/x)	Varianza (s ²)
50%	1	0.1182	1.70628	14.440416	0.0037
	2	0.1180	1.70090	14.409540	
	3	0.1182	1.69356	14.323110	
75%	1	0.1772	2.16217	12.199124	1.4096
	2	0.1771	2.53643	14.325256	
	3	0.1774	2.51458	14.177818	
100%	1	0.2363	3.38336	14.316846	0.0007
	2	0.2361	3.39148	14.365808	
	3	0.2365	3.39573	14.359480	
125%	1	0.2954	4.24692	14.376834	0.0035
	2	0.2951	4.24532	14.386049	
	3	0.2956	4.28143	14.483864	
150%	1	0.3545	5.16366	14.566864	0.0061
	2	0.3541	5.16643	14.589478	
	3	0.3547	5.12383	14.444726	
SUMA	15				1.4236

Tabla 18. Datos para cálculo de ecuación de la recta – Salicilato de metilo

Ecuación de la recta:

Pendiente $b = 14.82$

Intercepto $a = -0.121$

Ecuación $y = 14.82x - 0.121$

Coefficiente de correlación = 0.9970

Coefficiente de determinación = 0.9940

Error típico = 0.10293

Observaciones = 15

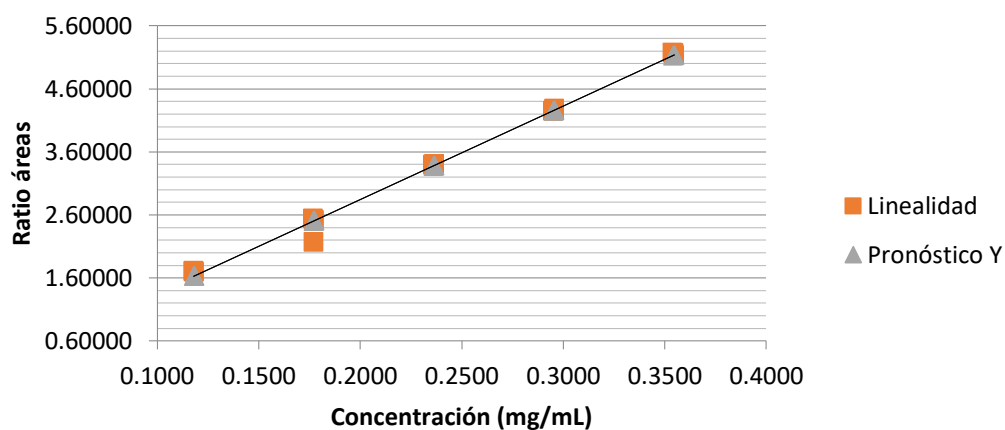


Gráfico 1. Curva de regresión ajustada – Salicilato de metilo

Porcentaje	Dato	x	y	f (y/x)	Varianza
		(mg/mL)	(ratio áreas)		(s ²)
50%	1	0.0323	0.71651	22.209128	0.0081
	2	0.0321	0.71425	22.270058	
	3	0.0321	0.70997	22.093173	
75%	1	0.0484	1.07438	22.201131	0.0461
	2	0.0481	1.08637	22.581939	
	3	0.0482	1.07107	22.220077	
100%	1	0.0645	1.41607	21.946537	0.0170
	2	0.0641	1.42056	22.146492	
	3	0.0643	1.42628	22.191830	
125%	1	0.0807	1.79711	22.281527	0.0244
	2	0.0802	1.80716	22.538840	
	3	0.0803	1.81272	22.563538	
150%	1	0.0968	2.18179	22.542523	0.0059
	2	0.0962	2.17431	22.598175	
	3	0.0964	2.16398	22.446533	
SUMA	15				0.1014

Tabla 19. Datos para cálculo de ecuación de la recta – Mentol

Ecuación de la recta:

Pendiente $b = 22.69$

Intercepto $a = -0.021$

Ecuación $y = 22.69x - 0.021$

Coefficiente de correlación = 0.99976

Coefficiente de determinación = 0.99952

Error típico = 0.01218

Observaciones = 15

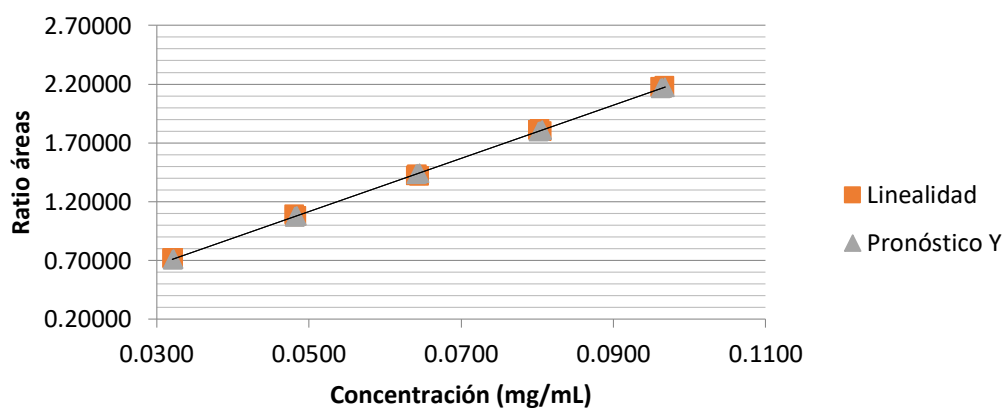


Gráfico 2. Curva de regresión ajustada – Mentol

c.2. Linealidad del método

Preparar tres curvas de calibración para cada principio activo a tres concentraciones, 50% (0.116mg/mL y 0.0304mg/mL para salicilato de metilo y mentol respectivamente), 100% (0.232mg/mL y 0.0608mg/mL para salicilato de metilo y mentol respectivamente), y 150% (0.348mg/mL y 0.0912 mg/mL para salicilato de metilo y mentol respectivamente), como se visualiza en el Anexo 6. Utilizar el placebo dosificado que contiene el principio activo, estándar secundario y estándar interno, preparar por triplicado para cada principio activo y programar la inyección por duplicado en el cromatógrafo de gases.

Porcentaje	Dato	x (mg/mL)	y	f (y/x)	Varianza (s ²)
50%	1	0.1163	1.69194	14.545581	3.2729
	2	0.1166	1.69803	14.567861	
	3	0.1162	2.05630	17.690128	
100%	1	0.2357	3.38953	14.381920	0.0048
	2	0.2354	3.41507	14.505044	
	3	0.2354	3.41348	14.498312	
150%	1	0.3482	5.19415	14.918861	0.0154
	2	0.3485	5.26571	15.110495	
	3	0.3479	5.17622	14.877608	
SUMA	9				3.2931

Tabla 20. Datos para cálculo de ecuación de la recta – Salicilato de metilo

Ecuación de la recta:

Pendiente b = 14.64

Intercepto a = 0.062

Ecuación $y = 14.64x + 0.062$

Coefficiente de correlación = 0.995948

Coefficiente de determinación = 0.991912

Error típico = 0.141871

Observaciones = 9

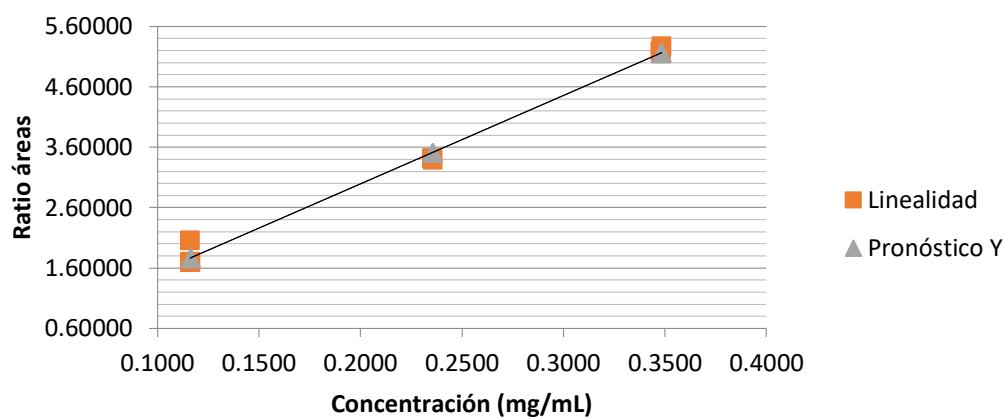


Gráfico 3. Curva de regresión ajustada – Salicilato de metilo

Porcentaje	Dato	x (mg/mL)	y (ratio áreas)	f (y/x)	Varianza (s ²)
50%	1	0.0325	0.70808	21.819505	8.6032
	2	0.0323	0.70976	21.985667	
	3	0.0320	0.86305	26.980855	
100%	1	0.0651	1.42102	21.837491	0.0161
	2	0.0649	1.43248	22.085253	
	3	0.0652	1.42873	21.913340	
150%	1	0.0966	2.20014	22.776776	0.0528
	2	0.0966	2.22741	23.048957	
	3	0.0965	2.18038	22.591961	
SUMA	9				8.6721

Tabla 21. Datos para cálculo de ecuación de la recta – Salicilato de metilo

Ecuación de la recta:

Pendiente $b = 22.40$

Intercepto $a = 0.016$

Ecuación $y = 22.40x + 0.016$

Coefficiente de correlación = 0.995522

Coefficiente de determinación = 0.991064

Error típico = 0.063348

Observaciones = 9

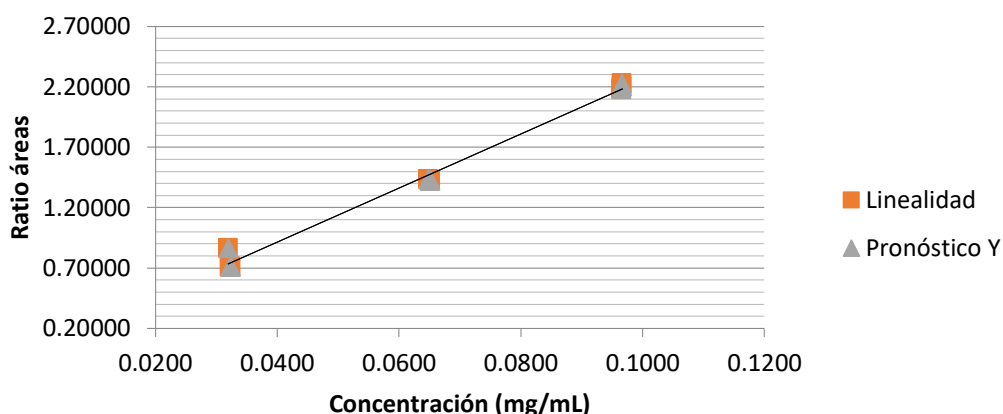


Gráfico 4. Curva de regresión ajustada – Salicilato de metilo

Se realizan las pruebas estadísticas para Linealidad del método y Linealidad del sistema, Varianza Residual constante donde se determina que la distribución de los puntos en la representación de los residuales es aleatoria y no refleja ninguna tendencia., Homogeneidad de varianzas demuestra que las varianzas son homogéneas y por lo tanto el factor concentración no tiene influencia en la variabilidad de los resultados., Análisis de Variancia que concluye que el modelo lineal si proporciona un buen ajuste a los datos. El Test de Linealidad demuestra que la pendiente es significativamente distinta de cero, mientras que el Test de Proporcionalidad demuestra que el intercepto es estadísticamente igual a cero (Ver Anexo 6).

d. Exactitud

Se utilizan las mismas muestras utilizadas en el parámetro de Linealidad del método. Se calcula el porcentaje de recuperación, la desviación estándar relativa (RSD) y prueba t – student.

	PESO (mg)	PORCENTAJE RECUPERADO	PORCENTAJE PROMEDIO
50%	145.4	99.59	99.87
	145.7	99.72	
	145.3	100.30	
100%	294.6	99.45	99.11
	294.3	98.80	
	294.3	99.10	
150%	435.2	99.67	100.00
	435.6	100.94	

434.9	99.39
RECUPERACIÓN PROMEDIO	99.66
DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA (RSD)	0.63863

Tabla 22. Cálculo para el porcentaje de recuperación – Salicilato de metilo

	PESO (mg)	PORCENTAJE RECUPERADO	PORCENTAJE PROMEDIO
50%	76.9	99.13	99.18
	76.5	99.87	
	75.8	98.54	
100%	154.2	99.44	99.25
	153.7	99.88	
	154.5	98.42	
150%	228.9	99.90	100.75
	229	97.83	
	228.7	104.51	
RECUPERACIÓN PROMEDIO			99.73
DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA (RSD)			1.94509

Tabla 23. Cálculo para el porcentaje de recuperación – Mentol

Se realiza la Prueba t-student para y con un 95% de confianza se acepta la Hipótesis nula, por tanto no existe diferencia entre las muestras con respecto al porcentaje obtenido.

e. Precisión

e.1. Repetibilidad

Se realiza la preparación de la muestra a partir del placebo dosificado a tres concentraciones (50%, 100% y 150%) y se programa una doble inyección en el cromatógrafo por cada concentración. Para ello se han considerado los cromatogramas obtenidos en linealidad del método.

Porcentaje	Dato	Áreas Salicilato de Metilo	Áreas 1 - Decanol	Ratio	Promedio	Desviación estándar relativa 1	Desviación estándar relativa 2
50%	1	238.80000	140.80000	1.6960	1.6919	0.34	0.86
		233.60000	138.40000	1.6879			
	2	241.80000	140.40000	1.7222	1.6980	2.01	
		241.20000	144.10000	1.6738			

	3	242.20000	140.20000	1.7275	1.7199	0.63	
		242.80000	141.80000	1.7123			
100%	1	479.80000	141.70000	3.3860	3.3895	0.15	
		477.40000	140.70000	3.3930			
	2	478.20000	140.70000	3.3987	3.4151	0.68	0.42
		482.80000	140.70000	3.4314			
	3	482.30000	141.40000	3.4109	3.4135	0.11	
		480.30000	140.60000	3.4161			
150%	1	738.10000	141.90000	5.2016	5.1942	0.20	
		736.00000	141.90000	5.1868			
	2	747.60000	140.80000	5.3097	5.2657	1.18	0.91
		739.40000	141.60000	5.2218			
	3	731.10000	141.80000	5.1559	5.1762	0.56	
		729.60000	140.40000	5.1966			

Tabla 24. Cálculo de la Desviación estándar entre muestras y concentraciones para Salicilato de metilo

Porcentaje	Dato	Áreas Mentol	Áreas 1 - Decanol	Ratio	Promedio	Desviación estándar relativa 1	Desviación estándar relativa 2
50%	1	99.90000	140.80000	0.7095	0.7081	0.29	
		97.80000	138.40000	0.7066			
	2	100.70000	140.40000	0.7172	0.7098	1.49	1.07
		101.20000	144.10000	0.7023			
	3	101.80000	140.20000	0.7261	0.7220	0.80	
		101.80000	141.80000	0.7179			
100%	1	202.00000	141.70000	1.4255	1.4210	0.45	
		199.30000	140.70000	1.4165			
	2	200.90000	140.70000	1.4279	1.4325	0.46	0.41
		202.20000	140.70000	1.4371			
	3	201.80000	141.40000	1.4272	1.4287	0.16	
		201.10000	140.60000	1.4303			
150%	1	312.10000	141.90000	2.1994	2.2001	0.05	
		312.30000	141.90000	2.2008			
	2	317.00000	140.80000	2.2514	2.2274	1.52	1.07
		312.00000	141.60000	2.2034			
	3	308.80000	141.80000	2.1777	2.1804	0.17	
		306.50000	140.40000	2.1830			

Tabla 25. Cálculo de la Desviación estándar entre muestras y concentraciones para Mentol.

Además se realiza la preparación de la muestra al 100% a partir del placebo dosificado y se programan seis inyecciones en el cromatógrafo. Se obtiene una desviación estándar

menor al 2% por cada principio activo del placebo dosificado (P), preparado bajo condiciones operativas iguales (Analista 1 - Día 1), ver resultados en Tablas 26 y 27.

	TIEMPO DE RETENCIÓN	Área Salicilato de metilo en Placebo dosificado (P)	Área del Estándar Interno (ISTD)	P/ISTD
1	6.25	485.6	141.8	3.4245
2	6.25	487.3	143.8	3.3887
3	6.25	481.9	143.9	3.3489
4	6.26	485.1	142.4	3.4066
5	6.25	480.1	142	3.3810
6	6.25	476.5	141.3	3.3723
PROMEDIO				3.3870
DESVIACIÓN ESTANDAR RELATIVA				0.7817

Tabla 26. Repetibilidad –Salicilato de metilo

	TIEMPO DE RETENCIÓN	Área de Mentol en Placebo dosificado (P)	Área del Estándar Interno (ISTD)	P/ISTD
1	6.03	206.1	141.8	1.4535
2	6.03	205.2	143.8	1.4270
3	6.03	203.1	143.9	1.4114
4	6.03	204.3	142.4	1.4347
5	6.03	201.5	142	1.4190
6	6.03	200.2	141.3	1.4168
PROMEDIO				1.4271
DESVIACIÓN ESTANDAR RELATIVA				1.0717

Tabla 27. Repetibilidad –Mentol

e.2. Precisión intermedia

La preparación de la muestra a concentraciones teóricas del producto es realizada en condiciones operativas diferentes, por un segundo analista y otro día utilizando el mismo método analítico. Se obtiene una desviación estándar menor al 2% por cada principio activo del placebo dosificado (P) preparado bajo condiciones operativas diferentes (Analista 2 - Día 2), ver Tablas 28 y 29.

	TIEMPO DE RETENCIÓN	Área Salicilato de metilo en Placebo dosificado (P)	Área de Estándar Interno (ISTD)	P/ISTD
1	6.27	473	137.4	3.4425
2	6.27	450.3	130.4	3.4532
3	6.27	455.7	130.2	3.5000
4	6.27	452.3	129.7	3.4873
5	6.27	458.6	131	3.5008
6	6.27	453.8	133.3	3.4044
PROMEDIO				3.4647
DESVIACIÓN ESTANDAR RELATIVA				1.1046

Tabla 28. Precisión intermedia para Salicilato de metilo

	TIEMPO DE RETENCIÓN	Área Mentol en Placebo dosificado (P)	Área de Estándar Interno (ISTD)	P/ISTD
1	6.05	193.9	137.4	1.411208151
2	6.05	184	130.4	1.411042945
3	6.05	188.7	130.2	1.449308756
4	6.05	184.2	129.7	1.420200463
5	6.05	188.6	131	1.439694656
6	6.05	188.5	133.3	1.414103526
PROMEDIO				1.424259749
DESVIACIÓN ESTANDAR RELATIVA				1.145269665

Tabla 29. Precisión intermedia para Mentol

f. Robustez

Se va a determinar la susceptibilidad de variaciones en el método analítico. Se compara un análisis inicial a las cero horas con un análisis final a las 96 horas, se calcula la desviación estándar relativa (RSD). En el análisis inicial utilizar las tres primeras muestras de Repetibilidad. Para el análisis final exponer las muestras de Precisión intermedia a temperatura ambiente por 96 horas. Programar en el cromatógrafo de gases 3 inyecciones para el inicio y final.

TIEMPO DE RETENCIÓN		PT	ISTD	PT/ISTD	TIEMPO DE RETENCIÓN		PT	ISTD	PT/ISTD
INICIO					INICIO				
1	6.25	485.6	141.8	3.424541608	1	6.03	206.1	141.8	1.45345557
2	6.25	487.3	143.8	3.388734353	2	6.03	205.2	143.8	1.42698192
3	6.25	481.9	143.9	3.34885337	3	6.03	203.1	143.9	1.4113968
FINAL					FINAL				
1	6.27	470.3	138.9	3.38588913	1	6.04	199.9	138.9	1.43916487
2	6.27	461	138.9	3.318934485	2	6.04	197.3	138.9	1.42044636
3	6.27	458.3	138.9	3.29949604	3	6.05	195.6	138.9	1.40820734
PROMEDIO					PROMEDIO				
3.36107483					1.42660881				
DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA					DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA				
1.40347726					1.20864286				

Tabla 30. Cálculo de la variación de exposición de la muestra a temperatura ambiente por 96 horas.

PARÁMETROS	ENSAYOS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
PRECISIÓN DEL SISTEMA	Desviación Estándar Relativa	RSD \leq 2%	0.5073 %
ESPECIFICIDAD	DETERMINACIÓN DE INTERFERENCIAS		
	Diluyente	No presenta señal	Lineal
	Estándar Interno	Señal	No lineal
		RSD \leq 2%	0.4462 %
	Placebo	No presenta señal	Lineal
	ANÁLISIS DEL PLACEBO DOSIFICADO Y ESTÁNDAR		
	Placebo dosificado	RSD \leq 2%	1.5046 %
	Estándar	RSD \leq 2%	0.2556 %
	DETERMINACIÓN DE INTERFERENCIAS DE PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN		
	FOTÓLISIS	TR = 6.26 \pm 0.05	6.26
		RSD \leq 2%	0.2534 %
	TERMÓLISIS	TR = 6.26 \pm 0.05	6.27
		RSD \leq 2%	0.9477 %
	HIDRÓLISIS ÁCIDA	TR = 6.26 \pm 0.05	6.25
		RSD \leq 2%	0.6031 %
	HIDRÓLISIS BÁSICA	TR = 6.26 \pm 0.05	6.25
		RSD \leq 2%	0.3754 %
	OXIDACIÓN	TR = 6.26 \pm 0.05	6.25
		RSD \leq 2%	0.2843 %
LINEALIDAD DEL SISTEMA	Coefficiente de correlación	r > 0.9950	0.9970
	Coefficiente de determinación	r ² > 0.9900	0.9940
	Homogeneidad de varianzas ANOVA	G exp < G tablas F exp > F tab	0.59 < 0.68 2170.503 > 4.6672

	Coefficiente de variación de los factores de respuesta	RSD \leq 2%	1.10%
	Significación estadística de la pendiente	t exp > t tab	46.58866 > 2.160
	Test de proporcionalidad	t exp < t tab	1.522491 < 2.160
LINEALIDAD DEL MÉTODO	Coefficiente de correlación	r > 0.9950	0.9959
	Coefficiente de determinación	r ² > 0.9900	0.9919
	Homogeneidad de varianzas ANOVA	G exp < G tablas F exp > F tab	0.65 < 0.68 858.51 > 4.6672
	Coefficiente de variación de los factores de respuesta	RSD \leq 2%	1.70%
	Significación estadística de la pendiente	t exp > t tab	29.30042 > 2.160369
	Test de proporcionalidad	t exp < t tab	0.489253 < 2.160369
EXACTITUD	Desviación Estándar Relativa	RSD \leq 2%	0.63862645 %
	Porcentaje de recuperación	> 90%	99.66%
	T - Student	t exp < t tab	1.590123 < 2.306004
PRECISIÓN	REPETIBILIDAD	RSD \leq 2%	0.7817 %
		PRECISIÓN INTERMEDIA	RSD \leq 2%
ROBUSTEZ	Desviación Estándar Relativa	RSD \leq 2%	1.40347726 %

Tabla 31. Resumen resultados para salicilato de metilo.

PARÁMETROS	ENSAYOS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
PRECISIÓN DEL SISTEMA	Desviación Estándar Relativa	RSD \leq 2%	0.5301 %
ESPECIFICIDAD	DETERMINACIÓN DE INTERFERENCIAS		
	Diluyente	No presenta señal	Lineal
	Estándar Interno	Señal	No lineal
		RSD \leq 2%	0.4462 %
	Placebo	No presenta señal	Lineal
	ANÁLISIS DEL PLACEBO DOSIFICADO Y ESTÁNDAR		
	Placebo dosificado	RSD \leq 2%	1.2269 %
	Estándar	RSD \leq 2%	0.4339 %
	DETERMINACIÓN DE INTERFERENCIAS DE PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN		
	FOTÓLISIS	TR = 6.03 \pm 0.05	6.04
RSD \leq 2%		0.6123 %	
TERMÓLISIS	TR = 6.03 \pm 0.05	6.05	
	RSD \leq 2%	1.0023 %	
HIDRÓLISIS ÁCIDA	TR = 6.03 \pm 0.05	6.03	
	RSD \leq 2%	0.6053 %	
HIDRÓLISIS BÁSICA	TR = 6.03 \pm 0.05	6.03	

		RSD \leq 2%	0.4163 %
	OXIDACIÓN	TR = 6.03 \pm 0.05	6.03
		RSD \leq 2%	0.2492 %
LINEALIDAD DEL SISTEMA	Coeficiente de correlación	r > 0.9950	0.9998
	Coeficiente de determinación	r ² > 0.9900	0.9995
	Homogeneidad de varianzas	G exp < G tablas	0.45 < 0.68
	ANOVA	F exp > F tab	26905.05 > 4.6672
	Coeficiente de variación de los factores de respuesta	RSD \leq 2%	0.92%
	Significación estadística de la pendiente	t exp > t tab	164.0276 > 2.160
	Test de proporcionalidad	t exp < t tab	1.21697 < 2.160
LINEALIDAD DEL MÉTODO	Coeficiente de correlación	r > 0.9950	0.9955
	Coeficiente de determinación	r ² > 0.9900	0.9910
	Homogeneidad de varianzas	G exp < G tablas	0.55 < 0.68
	ANOVA	F exp > F tab	776.32 > 4.6672
	Coeficiente de variación de los factores de respuesta	RSD \leq 2%	1.01%
	Significación estadística de la pendiente	t exp > t tab	27.86244 > 2.160369
	Test de proporcionalidad	t exp < t tab	0.287611 < 2.160369
EXACTITUD	Desviación Estándar Relativa	RSD \leq 2%	1.94509142 %
	Porcentaje de recuperación	> 90%	99.73%
	T - Student	t exp < t tab	0.422084 < 2.306004
PRECISIÓN	REPETIBILIDAD	RSD \leq 2%	1.0716559 %
	PRECISIÓN INTERMEDIA	RSD \leq 2%	1.14526966 %
	ROBUSTEZ	Desviación Estándar Relativa	RSD \leq 2%

Tabla 32. Resumen resultados para mentol.

	Tiempo (min)	Área (%)	Asimetría	Platos teóricos	Resolución	RF	Selectividad	Ancho (min)
Mentol	6.04	24.456	0.99	405937.64	0	0.718	0	0.04
Salicilato de metilo	6.26	58.387	1.01	400447.57	5.72	0.307	1.1	0.04
ISTD	6.76	17.157	1.08	628986.28	13.67	1	1.2	0.03

Tabla 33. Parámetros cromatográficos.

3.5.Eficiencia de la adquisición del Cromatógrafo de gases

La adquisición del cromatógrafo de gases (GC-FID) se realizó para el análisis de identificación y cuantificación de principios activos en ungüentos elaborados por el laboratorio nacional certificado en Buenas Prácticas de Manufactura. El uso del GC-FID en el análisis de identificación y cuantificación de salicilato de metilo y mentol en ungüento se realiza según LFP-CC-TEC-001 (Anexo) y se realiza el análisis de la eficiencia considerando el número de lotes fabricados mensualmente del producto, es así, que se realizan 8 fabricaciones mensuales de las 2 presentaciones que comercializan en el mercado.

3.5.1. Eficiencia en costos

Los costos que implican los análisis de identificación y cuantificación de salicilato de metilo y mentol involucran costos rutinarios y mensuales, se ha considerado los costos rutinarios. En la Tabla 34 se resume el costo por lote y costo total para el análisis de identificación y cuantificación de salicilato de metilo y mentol según la técnica analítica validada para 8 fabricaciones mensuales realizadas por el laboratorio propio.

Presentación	Tamaño de lote	Cantidad a muestrear	Lotes fabricados mensual	Costo por lote (\$)	Costo total (\$)
100g	1800	20	4	21.55	86.208
60g	2400	20	4	21.55	86.208

Tabla 34. Costos para análisis de producto terminado.

En el Anexo 13 se describe a detalle los costos rutinarios de los insumos y materiales utilizados siendo el costo total por lote de 21.55 dólares mientras que en el Anexo 14 se puede visualizar que el costo por el laboratorio tercero equivale a 600 dólares por lote.

3.5.2. Eficiencia en tiempo

En el Anexo 15 se puede observar a detalle las actividades para la identificación y cuantificación de salicilato de metilo y mentol en ungüento, los tiempos empleados por actividad y las repeticiones por actividad. Es así, que se obtiene que el análisis de para la identificación y cuantificación de salicilato de metilo y mentol en ungüento por lote fabricado se realiza en 1 día laboral realizando los análisis con la implementación del GC-FID.

Presentación	Tamaño de lote	Cantidad a muestrear	Lotes fabricados mensual	Tiempo de análisis (min)	Tiempo de análisis (días)
100g	1800	20	4	1888	4 días (8 horas laborales)
60g	2400	20	4	1888	4 días (8 horas laborales)

Tabla 35. Tiempo de análisis para producto terminado.

Según el Anexo 14, se observa que el laboratorio tercerizado realiza los análisis en 7 días hábiles.

4. DISCUSIÓN

El cromatógrafo de gases previo a su adquisición debe cumplir con criterios y especificaciones de calidad requeridos para el uso previsto y debe ser sustentable funcionalmente. En la Tabla 1 se describen las características de los posibles equipos que el laboratorio puede adquirir, los equipos SCION-436 GC, SCION-456GC y DANI MASTER GC cumplen con lo solicitado en el URS, sin embargo, de acuerdo a la capacidad de fabricación de productos que elabora y desea desarrollar el laboratorio se seleccionó el equipo SCION-436GC, se adquirió con un inyector automático y un detector de ionización de llama, sin embargo cuenta con capacidad de añadir un inyector y un detector más.

Una vez aprobada la compra para la adquisición del cromatógrafo de gases, este equipo debe ser calificado considerando las cuatro calificaciones [3]. La calificación del equipo fue desarrollado por el proveedor del equipo y verificado por el laboratorio, la calificación de instalación del proveedor fueron realizadas con siete pruebas y/o parámetros que aseguran que el hardware, software se instale de manera segura, las conexiones, suministro de energía, fugas deben verificarse [28].

La calificación de operación y desempeño verificaron que el desempeño del cromatógrafo de gases sea el previsto dentro de su intervalo de operación esperado [28,29], para ello el proveedor cuenta con un procedimiento estandarizado para realizar las pruebas que certifiquen que la calificación del equipo ha sido óptima.

El área de trabajo para el desarrollo del presente trabajo es el Área de Fisicoquímica, la cual debe cumplir ciertas condiciones para que los análisis se realicen en un ambiente óptimo de trabajo. Las condiciones ambientales, incluyendo iluminación, fuentes de energía, temperatura, humedad y presión de aire, tienen que ser apropiadas para las funciones y operaciones que se efectúen. El laboratorio debe asegurar que las condiciones ambientales sean revisadas, controladas y documentadas y que no invaliden los resultados o afecten en forma adversa la calidad de las mediciones [30]. La temperatura del área de trabajo es de $25^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa no mayor a 70% certificada por un mapeo térmico realizados en dos estaciones en el año, invierno y verano.

Para la cuantificación de los principios activos, existen diferentes metodologías, en el presente estudio se está realizando la cuantificación por estándar interno, un método que se utiliza para determinar la concentración del componente de interés [31]. En la Farmacopea de los Estados Unidos, la monografía del producto que contiene Tetracaína y Mentol, ungüento, se realiza la cuantificación de mentol por cromatografía de gases con detector de ionización de llama y se utiliza como estándar interno decanol en n-hexano [32]. En un estudio

realizado por S.G.E. Stevens para la determinación de salicilato de metilo en preparaciones farmacéuticas, utiliza como estándar interno al compuesto difenil por el tiempo de retención y resolución del componente frente a los otros componentes en análisis. Joseph P. describe un método rápido, exacto y preciso para la determinación de salicilato de metilo y mentol en formulaciones tópicas analgésicas y se utiliza como estándar interno a n-nonadecano [33]. En el presente trabajo, el estándar interno que se utiliza es 1-decanol porque cumple con los requisitos como sustancia utilizada como estándar interno [34]. Tiene una resolución de 13.67 respecto a salicilato de metilo, no está presente en la muestra de producto terminado ni reacciona químicamente con los componentes de la muestra, tiene una concentración de 0.04 mg/mL y posee características muy similares a los componentes del unguento.

El salicilato de metilo es un éster derivado del ácido salicílico con un punto de ebullición entre 219 y 224°C, es un líquido incoloro miscible en etanol de 95°, en dietil éter y ligeramente soluble en agua [35,36]. Mentol tiene forma de cristales incoloros con olor característico soluble en etanol de 95°, dietil éter y ligeramente soluble en agua. Ambos principios activos se caracterizan por ser solubles en etanol de 95° [36, 38, 39]. La vaselina es una masa untuosa homogénea de color blanco a amarillo, prácticamente insoluble en agua, etanol de 95° y se disuelve en éter dietílico formando un líquido claro [36]. La parafina es una cera incolora o blanco inodora e insípida, escasamente soluble en dietil éter y prácticamente insoluble en agua, etanol de 95° y en etanol de 99,5° [36]. Los excipientes, a comparación de los principios activos, son insolubles en etanol de 95°. Debido a ello, se considera al etanol el solvente adecuado para realizar la extracción y separación de principios activos de excipientes.

Salicilato de metilo tiene un peso molecular de 152.15 y mentol tiene 156.27, las estructuras químicas se pueden visualizar en las Imágenes 38 y 39. El mentol por su actividad óptica puede ser dextrógiro o levógiro; para la fórmula cualicuantitativa del producto, se utiliza el mentol levógiro cuya estructura química se visualiza en la Imagen 15.

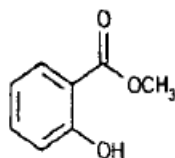


Imagen 14. Estructura química de Salicilato de metilo.

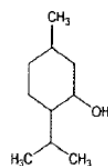


Imagen 15. Estructura química de l - Mentol.

Una de las características de la cromatografía de gases es que se utiliza para hidrocarburos saturados y también compuestos con pesos moleculares bajos, con una volatilidad alta para poder ser transportados por el gas de arrastre, por ese motivo, salicilato de metilo y mentol son analizados por cromatografía gaseosa.

El motivo por el que se realiza la validación de la técnica analítica de salicilato de metilo 29,00g + mentol 7,60g es porque se busca obtener resultados confiables, seguros y verdaderos al realizar el análisis de producto terminado, además se minimizan errores.

En la Tabla 33 se visualizan las condiciones cromatográficas trabajadas para la separación de salicilato de metilo, mentol y 1-decanol. La selectividad (α) entre salicilato de metilo y mentol es igual 1.04 mientras que entre ISTD y salicilato de metilo es igual 1.08, es el factor de separación y se refiere al esparcimiento relativo de los picos. La resolución se refiere a la medida de separación entre los picos de interés respecto a la línea base, la resolución entre salicilato de metilo y mentol es igual a 5.72 y la resolución para salicilato de metilo y estándar interno es 13.67. Los platos teóricos es una función de la eficiencia de la columna y es específicamente para asegurar que los compuestos que eluyan estén resueltos uno del otro, para establecer el poder separativo del sistema, siendo mayor de 20000. Se entiende por eficiencia de una columna cuando más interactúan los componentes de una muestra en análisis con la fase estacionaria lográndose una mayor retención y resolución de los analitos.

La selectividad es el parámetro que permite medir e identificar los principios activos en presencia de otros componentes como impurezas u otros componentes [17]. Para poder determinarlo, se realizan los cromatogramas DCI001 Diluyente 1_1 al 1_10 con el diluyente etanol 95°. Los cromatogramas muestran entre el minuto 2 y 3 la elución del analito, en el minuto 3 se considera el tiempo cero y del minuto 3 al minuto 9 no se observa la identificación de ningún otro componente. Para el estándar interno se corren los cromatogramas DCI001 ISTD1_1 AL DCI001 ISTD1_10, se observa la elución del etanol 95° del minuto 2 al minuto 3, del minuto 3 al minuto 9 no se observa el pico de ninguna otra sustancia, solo en el minuto 6.75 se observa la elución del estándar interno 1-decanol, se obtiene una desviación estándar de 0.45% que es menor al 2%. Según la Tabla 11 se prepara el placebo y se obtienen los cromatogramas DCI001 Placebo 1_1 al 1_10, en el cual se observa que

del minuto 3 al minuto 8 no presenta presencia de ninguna sustancia, a partir del minuto 8 al minuto 9 se observa que la línea base presenta ruido pero no emite una señal significativa para ser medible o cuantificable.

El análisis del placebo dosificado y estándar también se determina para la selectividad, la preparación del estándar de referencia (STD) que son 2 soluciones, una contiene el estándar interno y salicilato de metilo mientras que otra solución contiene mentol y estándar interno, se realizan 10 corridas para poder comparar y relacionar con las 10 corridas del placebo dosificado que contiene parafina, vaselina, mentol, salicilato de metilo y el estándar interno. Para el analito salicilato de metilo, se determina la desviación estándar relativa del placebo dosificado obteniendo una RSD menor al 2% (1.505) mientras que para el estándar de referencia se obtiene una RSD igual a 0.256. Para el analito mentol, la RSD para el placebo dosificado es de 1.227% mientras que para el estándar es de 0.434%. Estos resultados, tanto para el salicilato de metilo como para el mentol indican que los excipientes generan variabilidad en los resultados con respecto a la media, sin embargo cumple con las especificaciones.

La determinación de interferencias de productos de degradación consiste en exponer las soluciones preparadas según lo indicado en el Protocolo de Validación en diferentes situaciones y evaluar si en las condiciones expuestas según la Tabla se generan nuevas sustancias o impurezas que puedan interferir en la identificación y cuantificación de salicilato de metilo y mentol. La muestra se somete a estudios de fotólisis, termólisis, hidrólisis ácida e hidrólisis básica, en los cromatogramas obtenidos se puede observar que no se crea una señal cuantificable o que interfiera con la identificación y cuantificación de los principios activos, así mismo, la desviación estándar relativa para todas las condiciones estudiadas es menor al 2%. La termólisis par ambos principios activos genera una variabilidad más alta con respecto a las otras condiciones, en el caso de salicilato de metilo se obtiene un RSD igual 0.9477% mientras que para mentol es 1.0023%, esta variabilidad frente a una exposición de calor se genera porque los componentes son volátiles y tienen un peso molecular bajo.

La linealidad es la capacidad de obtener resultados proporcionales a la concentración de la sustancia de interés [12, 23], en los Gráficos 1, 2, 3 y 4 se observa la curva de regresión del ratio de áreas (área obtenida para el salicilato de metilo / mentol entre el área obtenida para el estándar interno) y la concentración de salicilato de metilo /mentol. A partir de la curva de regresión, la Farmacopea de los Estados Unidos [17] recomienda calcular estimaciones matemáticas del grado de linealidad como el coeficiente de correlación, pendiente de la curva de calibración que se observan en los resultados obtenidos. Para determinar la linealidad, se recomienda un mínimo de cinco

concentraciones, la linealidad del sistema se ha trabajado con 5 concentraciones, 50%, 75%, 100%, 125% y 150%, dependiendo del tipo de análisis que se realice es que varían el rango de concentraciones a trabajar. En la linealidad del sistema se requieren de la preparación de estándar por triplicado y corrida en el cromatógrafo por duplicado obteniendo seis determinaciones por concentración (50%, 75%, 100%, 125% y 150%), mientras que la linealidad el método requiere la preparación de la muestra a partir del placebo dosificado. El placebo dosificado contiene los principios activos y excipientes del producto, por tanto, se realiza el análisis por triplicado y corrida en el cromatógrafo por duplicado obteniendo 6 determinaciones para las 3 concentraciones (50%, 100% y 150%).

El parámetro de la exactitud determina la veracidad o insesgadez de la técnica analítica, existen diferentes métodos para poder determinar la proximidad entre el valor que es aceptado como verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado [14, 17, 18]. Para determinar la exactitud se realizó un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración, cubriendo el intervalo especificado (es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración). Se utilizaron los resultados obtenidos del parámetro de Linealidad del método, ya que el placebo tiene añadido cantidades conocidas de los principios activos, por tanto, se puede determinar el porcentaje de recuperación obtenido y calcular así la exactitud del método analítico.

El grado de dispersión de los resultados obtenidos de una misma muestra homogénea se calcula con la desviación estándar relativa o coeficiente de variación, el cual se determina por el parámetro de precisión [18]. La precisión puede medirse por el grado de reproducibilidad de la técnica analítica de un laboratorio respecto a otro, el grado de reproducibilidad no se ha realizado en el presente trabajo porque no aplica la metodología analítica en 2 laboratorios distintos [17]. Se ha realizado la precisión intermedia y la repetibilidad con variabilidad en los analistas y días diferentes con el mismo equipo. Se recomienda realizar la repetibilidad utilizando un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado para el procedimiento (es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración) o usando un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración de prueba, se ha determinado tres concentraciones, 50%, 100% y 150% a partir del cual se ha calculado la variabilidad de los datos obtenidos cumpliendo con un RSD menor al 2% para los resultados de salicilato de metilo y mentol.

Para la robustez se consideró realizar los análisis luego de haber expuesto la muestra a 96 horas a temperatura ambiente, para determinar

si el método analítico tiene la capacidad de ser robusto frente a variaciones pequeñas.

La adquisición del cromatógrafo de gases (GC-FID) para el análisis de identificación y cuantificación del producto fabricado por el laboratorio nacional ha sido eficiente en tiempos y costos rutinarios, la liberación de producto terminado es menor al que se generaba con la tercerización de los análisis. Los costos de inversión han sido bastante altos, sin embargo, los costos rutinarios para el análisis del producto han sido bastante eficientes, incluso los costos disminuyen si se aumentan la cantidad de análisis y productos a analizar.

5. CONCLUSIONES

- El Área Fisicoquímica del laboratorio cumple con los requisitos previos a la instalación y el equipo GC-FID SCION 436 – GC se encuentra calificado para su uso.
- La técnica analítica para identificación y cuantificación de salicilato de metilo y mentol en ungüento es una metodología adecuada para su uso.
- El protocolo e informe de validación cumplen con el Documento Técnico N° 147-MINSA/2019/DIGEMID, Norma Técnica de Salud que regula la información mínima que debe contener el documento de validación de técnicas analíticas propias.
- La validación de la técnica analítica para identificación y cuantificación de salicilato de metilo y mentol en ungüento es preciso (RSD = 0.9431% y RSD = 1.1084% para Salicilato de metilo y Mentol respectivamente), exacto (%R= 99.66% y %R= 99.73% para Salicilato de metilo y Mentol respectivamente), con un sistema lineal ($r^2 = 0.9940$ y $r^2 = 0.9995$ para Salicilato de metilo y Mentol respectivamente) y un método lineal ($r^2 = 0.9919$ y $r^2 = 0.9910$ para Salicilato de metilo y Mentol respectivamente).
- El tiempo de análisis para un lote de fabricación realizado por el laboratorio es de 8 horas laborales mientras que el tiempo de análisis de un lote de fabricación realizado por el laboratorio tercerizado es de 7 días hábiles.
- El costo de insumos rutinarios para el análisis de un lote de fabricación realizado por el laboratorio es de 25 dólares mientras que el costo de análisis por el laboratorio tercerizado es de 600 dólares.
- El costo de los análisis realizados por el laboratorio tercerizado es superior al costo de los análisis realizados por el laboratorio propio.

6. RECOMENDACIONES

- Se sugiere que el laboratorio farmacéutico nacional realice el desarrollo de productos farmacéuticos cuyas metodologías analíticas incluyan el análisis por cromatografía de gases (GC-FID).
- El laboratorio farmacéutico nacional debería implementar en sus proyectos la certificación en Buenas Prácticas de laboratorio e ISO 17025 para optimizar el uso de equipos como el GC-FID y brindar el servicio de análisis a terceros.
- Se recomienda realizar un estudio comparativo utilizando 3 diferentes estándares internos para determinar y comparar los parámetros cromatográficos y la potencia de los analitos.
- El curso de Tratamiento de matemático de Datos Experimentales debería incluir en sus contenidos la aplicación estadística en validación de metodologías analíticas (materias primas, especialidades farmacéuticas, microbiológicas, bionálisis), así mismo, incluir en su Bibliografía el libro “Validación de métodos analíticos” – AEFI 2001.
- Se recomienda que el parámetro de Robustez considere variaciones pequeñas como el análisis con otra columna de la misma longitud y diferente longitud, y así determinar la robustez de la técnica.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. J Michelle Meadows. Promoting Safe and Effective Drugs for 100 Years. :8. FDA Consumer magazine [Internet]. Disponible en: <https://www.fda.gov/downloads/AboutFDA/History/ProductRegulation/UCM593520.pdf>
2. World Helath Organization. Quality Assurance of Pharmaceuticals: A compendium of guidelines and related materials. Volumen 2. Segunda Edición. 2007. P.7-170. <https://books.google.com.pe/books?id=59s4hlhFKowC&pg=PA396&lpg=PA396&dq=world+health+organization+glp+and+gmp&source=bl&ots=RXY7tDB7QP&sig=ACfU3U3x0ahxnoLL60Bkdv5M7eyWoS8gdw&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwiqq6K9ud3iAhWNpFkKHaZJArMQ6AEwDXoECAgQAQ#v=onepage&q=world%20health%20organization%20glp%20and%20gmp&f=false>
3. Chaloner-Larsson G, Anderson R, Egan A. Guía de la OMS sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación (PAF) - Segunda parte: Validación. Ginebra 1998. p.158. Disponible: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/64975/WHO_VS_Q_97.02_spa.pdf?sequence=2
4. Reglamento para el registro, control y vigilancia sanitaria de productos farmacéuticos, dispositivos médicos y productos sanitarios. DS016-2011-MINSA. Disponible en: <http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/DS016-2011-MINSA.pdf>
5. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use - ich harmonised tripartite guideline. Development and manufacture

- of drug substances (chemical entities and biotechnological/biological entities). Mayo 2012. Disponible en: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q11/Q11_Step_4.pdf
6. Kannissery Pramod, M. Abu Tahir, Naseem A. Charoo, Shahid H. Ansari, and Javed Ali. Pharmaceutical product development: A quality by design approach. Int J Pharm Investig [Internet]. Volumen 3. 2016. p.129–138. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4991121/>
 7. David E. Nadig. Preparation of Drug Samples for Analysis. En: Lena Ohannesian, Antony J. Streeter. Handbook of Pharmaceutical Analysis. Marcel Dekker, Inc. New York, 2002.p.
 8. Medicamentos Genéricos: Preguntas y Respuestas. U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION. Disponible en: <https://www.fda.gov/media/112590/download>
 9. Decreto Supremo N° 017-2018-SA. Manual de Buenas Prácticas de Laboratorio para el control de calidad de productos farmacéuticos. Ministerio de Salud. Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas. 2018.
 10. Martin D, Valdez J, Boren J, Mayersohn M. Dermal Absorption of Camphor, Menthol, and Methyl Salicylate in Humans. The Journal of Clinical Pharmacology. 2004;44(10):1151-7.
 11. Food and Drug Administration. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry. July 2015.

12. Eurachem. MÉTODOS ANALÍTICOS ADECUADOS A SU PROPÓSITO Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados. Segunda Edición. Los Cués, Qro., México. Noviembre, 2005.
13. Serie Red Panamericana de Armonización de la Reglamentación Farmacéutica – Documento técnico N° 10. Requisitos para el registro de medicamentos en las Américas. Washington, D.C., 2013. Disponible en: <https://apps.who.int/medicinedocs/documents/s20205es/s20205es.pdf>
14. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use ich harmonised tripartite guideline validation of analytical procedures: text and methodology. Noviembre 2005. Disponible en: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf
15. Red Panamericana de Armonización de la Reglamentación farmacéutica. Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos Guía de autoevaluación de BPL. Documento Técnico N°6. Julio 2010. Disponible en: <http://www.paho.org/hq/dmdocuments/2011/Espanol-control-calidad-laboratorios-farmaceuticos.pdf>
16. Documento Técnico NTS N° 147-MINSA/2019/DIGEMID, Norma Técnica de Salud que regula la información mínima que debe contener el documento de validación de técnicas analíticas propias. Perú, 2019. Disponible en:

<https://busquedas.elperuano.pe/normaslegales/norma-tecnica-de-salud-que-regula-la-informacion-minima-que-anexo-rm-no-234-2019minsa-1753107-1/>

17. Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos de América. Preparados por el Consejo de Expertos y sus Comites de Expertos. <1225> Validación de Procedimientos Farmacopeicos. USP 42 – NF 37. Farmacopea de los Estados Unidos. Trigésima Séptima Edición.
18. Asociación española de Farmacéuticos de la industria (AEFI). Validación de métodos analíticos. Barcelona 1997.
19. Guideline for the evaluation of uncertainty of measurement in calibration and testing laboratories. Versión 1. INACAL. 2018.
Disponible en:
[https://www.inacal.gob.pe/repositorioaps/data/1/1/4/jer/documentospecificos/files/DA-acr-09D%20Ver%2001%20Directriz%20de%20Incertidumbre%20de%20la%20Medici%C3%B3n%20\(Revisi%C3%B3n%20Final\).pdf](https://www.inacal.gob.pe/repositorioaps/data/1/1/4/jer/documentospecificos/files/DA-acr-09D%20Ver%2001%20Directriz%20de%20Incertidumbre%20de%20la%20Medici%C3%B3n%20(Revisi%C3%B3n%20Final).pdf)
20. Documento Técnico, Buenas Prácticas de Laboratorio para el control de calidad de productos farmacéuticos. Ministerio de Salud. Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas. 2013.
21. Separation types and used in the core analytical techniques. En: Elsevier Inc. Short overviews of the main analytical techniques containing a separation step. Capítulo 3. 2017. P.55 – 85. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128036846000032>

22. Ozlem Coskum. Separation techniques: Chromatography. Istanbul Northern Anatolian Association of Public Hospitals, 2016. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5206469/pdf/NCI-3-156.pdf>
23. Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos de América. Preparados por el Consejo de Expertos y sus Comites de Expertos. <621> Cromatografía. USP 42 – NF 37. Farmacopea de los Estados Unidos. Trigésima Séptima Edición. Volumen 1.
24. ICH Harmonised Tripartite Guideline. “Specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: Chemical substances. Disponible en: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q6A%20Guideline.pdf>
25. DS-021-2018.pdf. Reglamento para el Registro, Control y Vigilancia Sanitaria de Productos Farmacéuticos, Dispositivos médicos y Productos Sanitarios y aprueba el Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Farmacéuticos. El Peruano, 22 de Agosto del 2018. Disponible en: <http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Normatividad/2018/DS-021-2018.pdf>
26. SCION GC | SCION Instruments | Gas Chromatography Solutions [Internet]. SCION Instruments. [citado 21 de diciembre de 2020]. Disponible en: <https://scioninstruments.com/es/soluciones/scion-436-456-gc/>

27. Master GC [Internet]. Dani Analítica. 2016 [citado 23 de diciembre de 2020]. Disponible en: <https://dani-analitica.com/products/master-line/master-gc/>
28. Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos de América. Preparados por el Consejo de Expertos y sus Comites de Expertos. <415> Valoración de gases medicinales. USP 42 – NF 37. Farmacopea de los Estados Unidos. Trigésima Séptima Edición. Volumen 4.
29. Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos de América. Preparados por el Consejo de Expertos y sus Comites de Expertos. <1058> Calificación de instrumentos analíticos. USP 42 – NF 37. Farmacopea de los Estados Unidos. Trigésima Séptima Edición. Volumen 4.
30. Organización Mundial de la Salud. GLP-Spanish-Informe-44-Anexo-I.pdf. Buenas Prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos. Disponible en: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2013/GLP-Spanish-Informe-44-Anexo-I.pdf>
31. f59_guia_de_validaciones_de_metodos_analiticos_08.02.18.pdf [Internet]. [citado 3 de enero de 2021]. Disponible en: http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/f59_guia_de_validaciones_de_metodos_analiticos_08.02.18.pdf
32. S. G. E. Stevens and B. Warren. J. Pharm. Pharmacol., 1964, 16, Suppl., 32t-34t. Determination of methyl salicylate in pharmaceutical preparations. Marzo 4, 1964

33. Joseph P., Krish Sethachutkul, Joseph E. Simultaneous GLC determination of methyl salicylate and menthol in a topical analgesic formulation. USV Pharmaceutical Corporation, Tuckahoe, NY 10707. Octubre 5,1978.
34. Willis DE. Internal standard method calculations. *Chromatographia*. 1 de enero de 1972;5(1):42-3.
35. Monografías Oficiales. Salicilato de metilo. En USP 38 – NF – 33. Farmacopea de los Estados Unidos. Mayo 2015. Trigésima novena edición. Volumen 4. P. 7293.
36. The Ministry of health, labour, and welfare. The Japanese Pharmacopoeia. Edición 17. Abril 1, 2016.
37. Monografías Oficiales. Mentol. En USP 38 – NF – 33. Farmacopea de los Estados Unidos. Mayo 2015. Trigésima novena edición. Volumen 3. P. 4650.
38. Menthol. Rymond C. Rowe, Paul J. Sheskey, Marian E. Quinn. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Six Edition. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association 2009. P.433.