BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

LICENCIATURA EN QUIMICOFARMACOBIÓLOGO

TITULO DE TESIS**: *"VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN Y ENSAYO DE UN ANTIOXIDANTE EN CREMA DE APLICACIÓN TÓPICA"***

FECHA DE LA TESIS**: DICIEMBRE 2018**

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIÓLOGO

PRESENTA:

p.Q.F.B. ELESBAN LIMA SANTAMARÍA

DIRECTOR DE TESIS:

Q.F.B. XÓCHITL GALICIA OLMOS

ASESOR DE TESIS:

M. en C. LIDIA AGUILAR CRUZ

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE FARMACIA

"VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALITICO PARA LA IDENTIFICACIÓN Y ENSAYO DE UN ANTIOXIDANTE EN CREMA DE APLICACIÓN TÓPICA"

REPORTE TÉCNICO PRESENTADO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLÓGO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
B.U.A.P
ÁREA DE FARMACIA

Guadalupe Muñoz
Departamento de
Farmacia
16-11-18

PRESENTA:

p.Q.F.B. ELESBAN LIMA SANTAMARÍA

DIRECTOR DE REPORTE TÉCNICO:

M. en C. LIDIA AGUILAR CRUZ

PUEBLA DE ZARAGOZA, NOVIEMBRE 2018

BUAP

DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
P R E S E N T E

Los que suscriben, integrantes de la Comisión Revisora de la Tesis del alumno de la carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO
LIMA SANTAMARÍA ELESBAN

realizada en el area de Farmacia, comunican a Ud. la aprobación de la misma con la siguiente redacción:

"VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALITICO PARA LA IDENTIFICACIÓN Y ENSAYO DE UN ANTIOXIDANTE EN CREMA DE APLICACIÓN TÓPICA"

Se extiende la presente, para los usos que al interesado convengan, a los 3 dias del mes de Diciembre de 2018

A t e n t a m e n t e

"Pensar bien para vivir mejor"

QFB. MARÍA REINA JURADO ANDRADE

QFB. HECTOR CESAR TECOZAUTLA VARELA

MC. HUGO LOPEZ AVILA

C.c.p. Archivo

Vo. Bo.

Facultad de Ciencias Químicas
San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390 y 01 (222) 244 31 06

ASUNTO: NOMBRAMIENTO
DE COMISION REVISORA

Al Dr. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
BUAP
PRESENTE

Reciba un cordial saludo y al mismo tiempo, me permito informar que la Comisión Revisora de la Tesina, que presenta la pasante de la Licenciatura en **QUÍMICO FARMACOBIÓLOGO**, **ELESBAN LIMA SANTAMARÍA,** para obtener el Título **de Licenciado en QUÍMICO FARMACOBIÓLOGO en la modalidad de reporte técnico** con la dirección de la **M.C. Lidia Aguilar Cruz.**

Estará integrada por:

Comisión Revisora:

QFB María Reina Jurado Andrade
QFB Hector César Tecozautla Varela
M.C. Hugo López Ávila

Sin más por el momento quedo de Usted

H. Puebla de Z., a 16 de noviembre de 2018

D.C. María de Guadalupe Muñoz Arenas
Coordinadora del Departamento de Farmacia
FCQ-BUAP

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
B.U.A.P
ÁREA DE FARMACIA

Puebla, Pue. a 20 de Noviembre de 2018

C. LIMA SANTAMARÍA ELESBAN
P R E S E N T E

Toda vez que se cuenta con la aprobación del Coordinador del Area de Farmacia,

MC. LIDIA AGUILAR CRUZ, Director de Tesis,

se le comunica la autorización de su anteproyecto de tesis denominado:

"VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALITICO PARA LA IDENTIFICACIÓN Y ENSAYO DE UN ANTIOXIDANTE EN CREMA DE APLICACIÓN TÓPICA"

Y con esta fecha se registra en los archivos de la Dirección de esta Facultad, para los fines legales a los que haya lugar

A t e n t a m e n t e

"Pensar bien para vivir mejor"

DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ
D I R E C T O R

Facultad de Ciencias Químicas
San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390 y 01 (222) 244 31 06

BUAP

Puebla, Pue. a 26 de Noviembre de 2018

QFB. MARÍA REINA JURADO ANDRADE
QFB. HECTOR CESAR TECOZAUTLA VARELA
MC. HUGO LOPEZ AVILA

Con toda atencion comunico a Uds. que se les propone como integrantes de la Comisión Revisora de Tesis que presenta el (la) Pasante de la Carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO

LIMA SANTAMARÍA ELESBAN

cuyo título es :

"VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALITICO PARA LA IDENTIFICACIÓN Y ENSAYO DE UN ANTIOXIDANTE EN CREMA DE APLICACIÓN TÓPICA"

Realizada en el Area de Farmacia;

asimismo, les ruego que a la brevedad posible emitan el dictamen correspondiente.

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ

DIRECTOR

C.c.p. Archivo

Facultad de Ciencias Químicas
San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390 y 01 (222) 244 31 06

MTRA. MARIA ELENA RUIZ VELASCO
DIRECCION DE ADMINISTRACION ESCOLAR
P R E S E N T E

En relacion al oficio de fecha 5 de Diciembre de 2018, signado por el Coordinador del Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias Quimicas, me permito comunicar a Ud. el nombre de los Catedráticos que integran el Jurado de Examen Profesional de la Carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO que sustentará:

LIMA SANTAMARÍA ELESBAN

J U R A D O

QFB. MARÍA REINA JURADO ANDRADE
QFB. HECTOR CESAR TECOZAUTLA VARELA
MC. HUGO LOPEZ AVILA

Examen que se realizará el dia 8 de Enero de 2019, a las 12:00 horas en el SALON DE USOS MULTIPLES.

Esperando una respuesta favorable al presente, le reitero mi atenta y distinguida consideracion

A t e n t a m e n t e

"Pensar bien para vivir mejor"

H. Puebla de Z. a 5 de Diciembre de dos mil dieciocho

DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ
D I R E C T O R

C.c.p. Archivo

Facultad de Ciencias Químicas
San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390 y 01 (222) 244 31 06

DEDICATORIA

Quiero dedicar este logro importante para mi vida profesional a todas esas personas que han estado desde el inicio en mi etapa de estudiante, así como a las personas que estuvieron en mi etapa culminante para lograr este título.

Gracias mamá Mayela Santamaría Rugerio, por siempre confiar en mí, hacer que nunca me rindiera y por hacerme creer que siempre lograría lo que tenía en mente.

A mis hermanas Mayte y Samantha, que con sus burlas y excelente sentido del humor me hicieron verle el lado divertido a mis pesares y angustias.

A mí abuelita Teresa Rugerio Xicoténcatl, por siempre apoyarme cuando sentí que ya no había salida a mis problemas, por sus palabras de aliento en todo momento.

Pero sobre todo, este trabajo y logro es gracias al apoyo incondicional de ti, mi amor Fiordalizzo Nani Rodríguez, gracias por todos esos concejos, aportes tan correctos y profesionales, por siempre querer que este trabajo quedara cada vez mejor, por nunca dejarme solo y darme ánimos a continuar, por apoyarme en todo este pesar de trámites, eres el amor de mi vida; y por supuesto a mis suegros y cuñado, que siempre me brindaron la confianza de pasar días completos en su hogar para lograr este objetivo y ayudar a que todo saliera en “automático”.

No cabe duda que la unión, hace la fuerza.

Gracias.

AGRADECIMIENTOS

A la PDMS Leader Q.F.B. Xóchitl Galicia Olmos por brindarme la confianza, permitirme y facilitarme la información necesaria para realizar esta tesis a su cargo, por todos los concejos durante mi ejecución de este trabajo, y de igual forma a todos mis compañeros de trabajo por crear un excelente ambiente de trabajo y hacer más amena mi estadía en ese lugar.

A la M. en C. Lidia Aguilar Cruz, por confiar en mí y mi trabajo, aceptando ser mí asesora, apoyándome con su experiencia profesional en el área farmacéutica.

Gracias.

INDICE

Contenido

FIGURAS iv

TABLAS vi

ABREVIATURAS viiix

1.0 INTRODUCCIÓN 1

1.1 TIPOS DE VALIDACIÓN 3

1.1.1 Existen cuatro tipos de validación: *3*

1.2 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN 4

2.0 MARCO DE REFERENCIA 6

2.1 ANTECEDENTES HPLC 6

3.0 JUSTIFICACIÓN 9

4.0 OBJETIVOS 10

5.0 METODOLOGÍA 11

5.1 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN 12

5.2 PARÁMETROS DE ANÁLISIS 12

5.3 ESPECIFICIDAD E IDENTIFICACIÓN 13

5.3.1 Secuencia de inyección *14*

5.4 EXACTITUD 14

5.4.1 Secuencia de inyección *15*

5.5 PRECISIÓN 15

5.5.1 Repetibilidad del sistema *16*

5.5.2 Repetibilidad del análisis *17*

5.5.3 Precisión intermedia *17*

5.6 LÍMITE DE DETECCIÓN 18

5.7 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN 18

5.8 REPORTING THRESHOLD (RT) 18

5.9 LINEALIDAD 18

5.9.1 Secuencia de inyección *19*

5.10 INTERVALO 19

5.11 ROBUSTEZ 20

5.11.1 Secuencia de inyección *21*

5.11.2 Robustez en condiciones cromatográficas *21*

5.11.3 Composición de la fase móvil *22*

5.12 ESTABILIDAD DE LA SOLUCIÓN 22

5.12.1 Secuencia de inyección *23*

5.12.2 Secuencia de inyección *23*

5.12.3 Fase móvil *24*

5.13 ESTUDIO DE FILTRACIÓN 24

5.13.1 Secuencia de inyección *25*

5.14 FACTOR DE RESPUESTA RELATIVO 25

5.15 PRUEBA DE ADECUABILIDAD DEL SISTEMA 26

5.15.1 Información de prueba de Adecuabilidad del sistema *26*
6.0 RESULTADOS 27
6.1 RESULTADOS PARA ESPECIFICIDAD 27
6.1.1 Resultados para identificación basados en tiempo de retención *31*
6.1.2 Resultados para Identificación basada con LC-PDA *31*
6.2 RESULTADOS DE EXACTITUD 34
6.3 RESULTADOS DE PRECISIÓN 34
6.3.1 Resultados para repetibilidad del Sistema *34*
6.3.2 Resultados para repetibilidad del análisis *35*
6.3.3 Resultados de precisión intermedia *35*
6.4 RESULTADOS DE LINEALIDAD 36
6.5 RESULTADOS DE INTERVALO 37
6.6 RESULTADOS DE ROBUSTEZ 38
6.6.1 Resultados de Robustez en preparación de muestra *38*
6.6.2 Resultados Robustez en condiciones cromatográficas *39*
6.7 RESULTADOS DE ESTABILIDAD DE SOLUCIONES 40
6.8 RESULTADOS DE ESTUDIO DE FILTRACIÓN 42
7.0 DISCUSIÓN DE RESULTADOS 46
8.0 CONCLUSIÓN 47
9.0 BIBLIOGRAFÍA 48

PÁGINA

FIGURAS

1. Diagrama de trabajo……..…11
2. Cromatograma típico de las condiciones de análisis empleadas……..…27
3. Acercamiento en la región de interés……..…27
4. Cromatograma del parámetro de Especificidad de placebo muestra 1……..…30
5. Cromatograma del parámetro de Especificidad de placebo muestra 2……..…30
6. Cromatograma del parámetro de Especificidad de muestra de crema……..…31
7. Espectro de estándar de antioxidante y placebo muestra 1……..32
8. Espectro de estándar de antioxidante y placebo muestra 1 adicionado con antioxidante.....32
9. Espectro de pico de antioxidante en solución muestra de crema y solución estándar de trabajo de antioxidante……..33
10. Curva de datos experimentales del parámetro de linealidad del antioxidante……..37

TABLAS **PÁGINA**

1. Parámetros de Validación……12
2. Parámetros de Análisis ponerlo en tabla……12
3. Tabla de compuestos……13
4. Metodología y criterios de aceptación de los parámetros de especificidad e identificación……13
5. Secuencia de inyección de los parámetros de especificidad e identificación ……14
6. Metodología y criterios de aceptación del parámetro de exactitud……14
7. Secuencia de inyección de parámetro de exactitud……15
8. Metodología y criterios de aceptación del parámetro de precisión……15
9. Secuencia de inyección de la repetibilidad del sistema del parámetro de precisión……16
10. Secuencia de inyección de la repetibilidad del análisis del parámetro de precisión……17
11. Secuencia de inyección de la precisión intermedia del parámetro de precisión……17
12. Información de la prueba de precisión intermedia……17
13. Metodología y criterios de aceptación del parámetro de linealidad……18
14. Secuencia de inyección del parámetro de linealidad……19
15. Metodología de la medición del intervalo……19
16. Metodología y criterios de aceptación del parámetro de Robustez……20
17. Secuencia de inyección del parámetro de robustez……21
18. Robustez en condiciones cromatográficas……21
19. Composición de la fase móvil cromatográfica……22
20. Metodología y criterios de aceptación del parámetro de estabilidad de la solución……22
21. Condiciones de almacenamiento de muestras y estándares para la medición del parámetro de estabilidad de la solución……23

22. Secuencia de inyección del parámetro de estabilidad de la solución del tiempo cero……23

23. Secuencia de inyección para la medición del periodo de estabilidad……24

24. Secuencia de inyección para la medición de la fase móvil……24

25. Metodología y criterios de aceptación del parámetro de Estudio de Filtración……24

26. Secuencia de inyección para la medición del estudio de filtración……25

27. 43 Filtros de jeringa utilizados en el estudio de filtración……25

28. Metodología de adecuabilidad del sistema……26

29. Tiempos de retención de los componentes de muestra de crema……28

30. Tabla de respuestas en base al área y tiempo de retención de cada solución analizada……28

31. dentificación de antioxidante con LC-PDA……33

32. Tabla de resultados del parámetro de exactitud del antioxidante……34

33. Resultados de precisión del sistema de antioxidante en la solución estándar de referencia……35

34. Resultados de la prueba de repetibilidad del análisis en crema tópica……35

35. Resultados de la prueba de precisión intermedia del análisis en crema tópica……36

36. Resultados del parámetro de linealidad del antioxidante……36

37. Información de intervalo……37

38. Robustez en preparación de la muestra con variación en tiempo de agitación en vortex……38

39. Robustez en preparación de la muestra con variación en temperatura utilizando baño de ultrasonido……38

40. Robustez en preparación de la muestra con variación en tiempo de sonicación……39

41. Robustez analizada en condiciones cromatográficas en solución estándar de referencia……39

42. Robustez analizada en condiciones cromatográficas en solución muestra de crema tópica……40

43. Estabilidad de soluciones almacenadas a temperatura ambiente durante 192 h (8 días) ……41

44. Estabilidad de soluciones almacenadas en refrigeración (5°C +/- 2°C) durante 192 h (8 días) ……41

45. Estabilidad de fase móvil almacenada a temperatura ambiente durante 19 días……42

46. Resultados de muestras filtradas a través de filtro para jeringa 6872-2504 GD/X TM25 0.45 µm membrana de PVDF……42

47. Resultados de muestras filtradas a través de filtro para jeringa SLHV033NK Millex R HV con membrana Durapore……42

48. Resultados de muestras filtradas a través de filtro para jeringa SLHVM25 PVDF con prefiltro de fibra de vidrio 25 mm……42

49. Resultados de la prueba de adecuabilidad del sistema……43

50. Resultados de la prueba de adecuabilidad del sistema (continuación)……44

51. Resultados de la prueba de adecuabilidad del sistema (continuación) ……45

ABREVIATURAS

- HPLC: Cromatografía líquida de alta afinidad
- SSA: Secretaria de Salud
- FDA: Food and Drug Administration
- GMP´s: Good Manufacturing Procedures
- GLP´s: Good Laboratory Procedures
- A.O.A.C. The Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL
- PVDF: fluoruro de polivinilideno
- PDA: Parenteral Drug Association
- N/A: no aprobado
- min: minutos
- nm: nanómetros
- °C: grados Celsius
- %w/w: relación de porcentaje de peso
- mg: miligramos
- mL: mililítros
- g: gramos
- %: porcentaje
- h: hora
- ≤: menor o igual a
- t: tiempo
- PA: principio active
- ICH: Conferencia Internacional sobre Armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano
- USFDA: Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos
- EC: Unión Europea

1.0 INTRODUCCIÓN

La salud es una de las principales preocupaciones de la humanidad, y para mantenerla, los medicamentos son una de las herramientas más importantes para hacerlo. Por su efecto en la salud, los productos de la industria farmacéutica, han alcanzado una gran importancia social en comparación con los productos de otras empresas (Salomón, 2006).

La industria farmacéutica es un elemento muy importante de los sistemas de asistencia sanitaria en todo el mundo; está constituida por un gran número de organizaciones públicas y privadas dedicadas al descubrimiento, desarrollo, fabricación y comercialización de medicamentos para la salud humana y animal. El Sector farmacéutico se enfoca a la investigación, desarrollo, producción y comercialización de productos químicos o biofármacos utilizados para la prevención o tratamiento de enfermedades (Tait, 2012).

En los países en vías de desarrollo, el consumo de productos farmacéuticos incrementa cada vez más. Algunos de los factores que contribuyen a este crecimiento son el poder adquisitivo, tener un mayor acceso a los servicios de salud así como el incremento del gasto gubernamental de salud. A nivel internacional las principales compañías que son Pfizer, Astra Zeneca, Bristol Meyer y Sanofi, enfrentan el reto del vencimiento de las patentes de sus principales productos, lo que ha generado que los medicamentos genéricos ocupen un mayor número en el mercado (ProMéxico, 2015).

México se ha convertido en un país atractivo para invertir en la industria farmacéutica debido a la mejora que ha tenido a lo largo de los años en temas importantes como el marco regulatorio y el aumento en las certificaciones de calidad. México es el segundo mercado farmacéutico más importante de America Latina contando con 12 de las 20 empresas más prestigiadas del mundo, siendo un importante productor de medicamentos de alta tecnología (Comercio, 2018).

En México, dentro de las dependencias regulatorias más importantes, se cuenta con la Secretaria de Salud (SSA) y a nivel internacional con la Food and Drug Administration (FDA), las Good Manufacturing Procedures (GMP's) y Good Laboratory Procedures (GLP´s) (Becker, 2009; ProMéxico, 2015).

Las GMP´s garantizan que la calidad esté integrada en la organización y el proceso involucrado en la fabricación de los productos farmacéuticos. Dichas actividades involucradas en la calidad, van más allá que las propias operaciones de fabricación. Por esta razón, deben de haber métodos validados que puedan controlar cada etapa del proceso involucrando los materiales, embalajes, tiempo de fabricación, materia prima, etc. de los productos terminados. Deben de existir instrucciones y procedimientos por escrito que cubran el procesamiento de las pruebas, el manejo, el almacenamiento, la recepción y el envío. Se deben especificar y poner a disposición instalaciones adecuadas, equipos y personal capacitado (Patel, 2008).

El alto nivel de rigor científico, junto con procesos detallados de GLP´s, proporciona a las dependencias regulatorias una mayor confianza tanto en la relevancia como en la calidad de los estudios científicos de las GLP´s por cuestiones de seguridad, por tal razón es sumamente importante para la toma de decisiones regulatorias para proporcionar estudios de gran peso y confianza (Becker, 2009).

La calidad de datos analíticos es asegurada gracias a la combinación de un número crítico de componentes presentes en el triángulo de calidad. La base de este triángulo es:

*La calificación analítica del instrumento: evidencia que un instrumento es adecuado para el análisis y que esta propiamente calibrado.

*Idoneidad del sistema y los controles de calidad: que son empleados para demostrar que la combinación del sistema y métodos presentados proporcionan un análisis esperado en tiempo y forma (Mcpolin, 2009).

Una de las herramientas con las que se cuenta para asegurar la calidad de los productos y procedimientos, es la validación de los mismos, por lo cual, la adopción de un nuevo método analítico debe estar soportado por suficientes datos de laboratorio y una validación documentada, que cumpla con los requisitos establecidos en México por la Secretaria de Salud y las instituciones internacionales como FDA y GMP´s (Becker, 2009; Patel, 2008).

En el año de 1992, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una guía bajo el título de “Validación de procedimientos analíticos usados en la examinación de materiales farmacéuticos” el cual apareció en 32 de los reportes emitidos por esta organización en donde se mencionan las especificaciones para las preparaciones farmacéuticas (Rajput, 2013).

La palabra validación no fue mencionada en las GMP´s del año de 1971, mientras que la precisión y la exactitud fueron declaradas en ese año como controles de laboratorio. No fue sino hasta Marzo del año de 1979 en donde la “validación” se manejaba de manera implícita en las GMP´s (Rajput, 2013).

La Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH), ha sido encargada del desarrollo de las directrices tripartitas armonizadas para su adopción en los Estados Unidos, Japón y la EC (Unión Europea), la cual ha emitido dos guía llamadas: “Texto sobre validación de procedimientos analíticos y “Validación de metodología de procedimientos analíticos (Ermer, 2005; Rajput, 2013).

El procedimiento analítico se refiere a la manera en la cual se lleva a cabo un análisis. La validación permite comprobar que cualquier procedimiento, proceso, equipo, material, actividad o sistema funciona adecuadamente bajo un conjunto de condiciones específicas, proporcionando así, precisión, sensibilidad, robustez y otros parámetros requeridos para un análisis (Rajput, 2013).

La validación de métodos analíticos es requerida para obtener datos de alta calidad y pueden ser considerados como un complejo de varios pasos que van desde el muestreo hasta la generación de resultados. Internacionalmente la validación es reconocida como métodos para obtener datos de alta calidad (Eserian, 2015).

La validación de un procedimiento analítico pretende establecer las características de rendimiento de las aplicaciones analíticas a través de pruebas experimentales, lo que resulta en un método analítico adecuado para su propósito (Eserian, 2015).

El objetivo principal de una validación es producir resultados confiables, reproducibles, cuantificables, robustos, exactos, precisos y lineales para un análisis de rutina y estabilidad de análisis. El desarrollo de un método analítico es el proceso por el cual un método analítico específico se desarrollará para la elaboración de productos farmacéuticos desde su elaboración hasta el producto terminado (Daksh, 2015; Mcpolin, 2009).

Un método analítico lleva acabo las siguientes etapas para poder hacer un análisis. Este puede incluir: la preparación de las muestras, los reactivos y los estándares, el uso de la fórmula para realizar los cálculos pertinentes, etc.

El uso del método analítico durante el desarrollo y manufactura de un medicamento provee la siguiente información:

- Potencia: lo cual puede relacionarse directamente para el requerimiento de la dosis conocida.
- Impurezas: que pueden relacionarse con el perfil de seguridad del medicamento.
- Evaluación de las características del medicamento como: la forma cristalina, uniformidad, propiedades que pueden comprometen la biodisponibilidad (Mcpolin, 2009).

Por tal razón, la validación de un método analítico es de suma importancia en la industria farmacéutica ya que permite asegurar que la calidad esté incorporada en los procesos que respaldan el desarrollo y la fabricación de los medicamentos.

1.1 Tipos de validación

1.1.1 Existen cuatro tipos de validación:

1) Validación prospectiva**: G**eneralmente se lleva a cabo antes de la distribución de un producto nuevo o un producto fabricado bajo un proceso de fabricación revisado. Es un enfoque científico pre-planificado e incluye las etapas iniciales del desarrollo de la formulación, el desarrollo del proceso, el establecimiento de planes de muestreo de procesos, el diseño de registros de lotes, la definición de las especificaciones de las

materias primas, la finalización de las pruebas piloto, la transferencia de tecnología de lotes de escalado a lotes de tamaño comercial, se realiza un listado de los principales procesos y controles ambientales.

2) Validación Concurrente: Proceso en el cual los lotes de producción actuales son utilizados para controlar los parámetros de un procesamiento estudiado. Este tipo de validación ofrece un enfoque práctico.
3) Validación Retrospectiva: Conducido por un producto ya marcado, y es basado en datos extenso acumulados de una variedad de lotes y por mucho tiempo. Este tipo de validación puede ser utilizado para productos más antiguos que no fueron validados por el fabricante en el momento en que fueron comercializados y que deben de ser validados.
4) Proceso de re-validación: Se requiere cuando hay un cambio en cualquiera de los parámetros críticos del proceso de formulación primaria asi como de componentes del embalaje, entre otros (Singh, 2016).

1.2 Parámetros de Validación

- Linealidad: debe ser determinada independientemente de todas las etapas de la formulación durante el desarrollo del fármaco.
- Especificidad: el método debe de tener la habilidad para separar cada impureza conocida y producto de degradación a nivel cuantitativo, y si cualquier pico del placebo o blanco es encontrado deberá ser propiamente separado del pico de impureza y del pico de interés.
- Precisión: refleja la proximidad de una serie de mediciones de muestreo múltiple obtenidas de la misma muestra bajo la misma condición al mismo tiempo.
- Repetibilidad: expresa la precisión bajo la misma condición de operación sobre un intervalo corto de tiempo.
- Reproducibilidad: expresa la precisión de un método con variaciones en diferentes días, análisis y equipos dentro de un laboratorio.
- Exactitud: la precisión debe de realizarse en un mínimo de cinco niveles de concentración y la concentración máxima serán seis replicados de preparación y de concentración media deberán de ser tres replicados según el método de prueba especificado.
- Estabilidad de solución: es la estabilidad de un solución estándar y solución de muestra extraída (lista para ser usada) de la muestra o matriz y analizada. Deberá de ser almacenada propiamente a temperatura ambiente y refrigerada en condiciones dependiendo de su estabilidad tanto de la muestra como del estándar.

- Robustez: es la capacidad para permanecer sin ser afectado por pequeños pero deliberadas variaciones en parámetros del método y provee una indicación de su fiabilidad durante su uso normal (Eserian, 2015; Khushboo, 2014; Mcpolin, 2009).

La investigación farmacéutica ha jugado un papel crucial a través de los años en el desarrollo de los productos farmacéuticos, y ha sido guiado por la farmacología y ciencias clínicas, e impulsado por la química, la investigación farmacéutica, microbiología y bioquímica que han permitido el descubrimiento de nuevos medicamentos.

El desarrollo de los medicamentos comienza con la innovación de una molécula que muestra una actividad terapéutica para el control o cura de alguna enfermedad. La síntesis y caracterización de cada una de las moléculas empleadas en una formulación farmacéutica, son llamadas principios activos (PA´s) y su análisis permiten obtener datos preliminares sobre la seguridad y eficacia terapéutica de éstos, pues son requisitos previos para hacer una identificación de ellos y poder llevar a cabo una investigación más detallada sobre sus propiedades(Pública, 2010).

2.0 MARCO DE REFERENCIA

2.1 ANTECEDENTES HPLC

En sus inicios los sistemas cromatográficos de líquidos resultaron ineficaces debido a que la velocidad de flujo de los disolventes dependía de la gravedad, llegando a tardar hasta días para lograr la separación. La cromatografía de gases (GC) en ese momento era más efectiva que la cromatografía de líquidos (LC), pero no fue efectiva para algunos químicos orgánicos debido a la inestabilidad térmica de los solutos, teniendo como consecuencia la formulación de hipótesis sobre técnicas alternativas que permitieron el avance de la HPLC (Thammana, 2016).

De acuerdo al trabajo de Martin y Synge en 1941 en la década de los 60 Josef Huber y otros se logró trabajar con cromatografía de líquidos en el modo de alto rendimiento disminuyendo la medición de la molécula de presión debajo de los 150 µm y la utilización de presión para ampliar la velocidad de la etapa versátil. La innovación de Zipax, una molécula externamente permeable, fue prometedora para la tecnología HPLC. En la década de 1970 se lograron avances en equipamiento e instrumentación comenzando a utilizar bombas e inyectores para realizar una configuración simple de un sistema de HPLC (Thammana, 2016).

En 1980 los métodos de HPLC aparecieron por primera vez para ensayos de materiales de drogas a granel convirtiéndose en el principal método en la USP XXVII y de menor grado, pero uno de los más extensos métodos utilizados también en Ph. Eur (Siddiqui, 2017; Thammana, 2016).

La cromatografía es una técnica usada para la separación de componentes en mezclas de compuestos distribuidos continuamente entre dos fases: fase móvil y fase estacionaria de manera continua (Sabir, 2013).

La Cromatografía de acuerdo a la USP se puede definir como: Proceso por el cual un soluto es separado por un proceso diferencial de migración en un sistema que consiste en dos o más fases la cual una de ellas se mueve continuamente en una dirección dada (Sabir, 2013).

La cromatografía líquida de alto rendimiento es una técnica especifica usada para la separación, identificación y cuantificación de cada componente de una mezcla de complejos encontrados en sistemas químicos o biológicos siendo una técnica avanzada de cromatografía liquida en columna donde generalmente el solvente fluye a través de la columna forzado por altas presiones para que la muestra se pueda separar (Malviya, 2010; Siddiqui, 2017; Thammana, 2016).

Hay distintos tipos de cromatografía liquida de alto rendimiento las cuales dependen del sistema de fase utilizado en el proceso:

Cromatografía de fase normal: En el modo de fase normal la separación se basa en la polaridad la fase estacionaria es polar se utiliza principalmente sílice y la fase móvil es no polar se

utiliza hexano, cloroformo y éter dietílico. En esta técnica los componentes no polares viajan rápido y son eluidos primero: Esto es debido a la menor afinidad entre los componentes no polares y la fase estacionaria. Los componentes polares son retenidos por mayor tiempo por su mayor afinidad con la fase estacionaria, estos componentes por lo tanto toman más tiempo en eluir, las muestras polares se conservan en la columna (Malviya, 2010; Sabir, 2013; Thammana, 2016).

Cromatografía de fase invertida: En este modo la fase estacionaria es no polar empaquetada con grupos funcionales octyl u octa decyl depositado en el gel de sílica y la fase móvil que es un solvente polar. Los componentes polares eluyen primero y los componentes no polares son retenidos mayor tiempo, Funciona según el principio de las interacciones hidrófobas, que resultan de las fuerzas repulsivas entre un eluyente polar, el analito relativamente no polar y la fase estacionaria no polar, La unión del analito a la fase estacionaria es proporcional al área de superficie de contacto alrededor del segmento no polar de la molécula de analito en asociación con el ligando en el eluyente acuoso, en fase acuosa permite utilizar un soluto secundario químicamente en equilibrio para controlar la retención y la selectividad (Malviya, 2010; Sabir, 2013; Thammana, 2016).

Cromatografía de exclusión de tamaño: También llamada cromatografía de filtración en gel, separa principalmente las partículas en función a su peso molecular, moléculas grandes eluyen primero y las moléculas pequeñas al último. La columna se incorporará con moléculas de sustrato controladas con precisión. Este método se utiliza cuando la mezcla contiene componentes con una diferencia de masa molecular de al menos 10%. Útil para determinar la estructura terciaria y la estructura cuaternaria de proteínas y aminoácidos. Esta técnica es ampliamente utilizada para la determinación del peso molecular de los polisacáridos (Malviya, 2010; Sabir, 2013; Thammana, 2016).

Cromatografía de intercambio iónico: en la cromatografía de intercambio, la retención se basa en la atracción entre los iones de soluto y los sitios cargados unidos a la fase estacionaria. La fase estacionaria tiene una superficie cargada iónicamente opuesta a la carga de la muestra conteniendo grupos iónicos como: NR_3^+ SO_3^- los cuales interactúan con el grupo iónico de las moléculas de la muestra. Se excluyen los iones de la misma carga. La fase móvil utilizada es un tampón acuoso que controlará el pH y la fuerza iónica. Esta forma de cromatografía se usa ampliamente en purificación de agua, cromatografía de intercambio iónico de proteínas, Esta técnica es adecuada para la separación de solo moléculas cargadas. Cambiando el pH y la concentración de la sal puede modular la retención (Malviya, 2010; Sabir, 2013; Thammana, 2016).

Cromatografía de bioafinidad: separación basada en la interacción reversible específica de proteínas con ligandos. Los ligandos se unen covalentemente al soporte sólido en una matriz de bioafinidad, retiene proteínas con interacción con los ligandos unidos a la columna, eluyendo de dos maneras:

• Elución bioespecífica: inclusión del ligando libre en el buffer de elución que compite con el ligando unido a la columna.

- Elución específica: cambio en el pH, sal, etc. que debilita la interacción de la proteína con el sustrato unido a la columna.

Debido a la especificidad de la interacción, la cromatografía de bioafinidad puede resultar en una purificación muy alta en un solo paso (Malviya, 2010).

Cromatografía por afinidad: Esta técnica utiliza interacciones bioquímicas altamente específicas para la separación. La fase estacionaria contiene grupos específicos de moléculas que pueden absorber la muestra si se satisfacen ciertas condiciones relacionadas con la carga y cierto estérico. Esta técnica se puede utilizar para aislar proteínas, enzimas y anticuerpos de mezclas complejas (Sabir, 2013).

3.0 JUSTIFICACIÓN

En México, como en todo el mundo, la industria farmacéutica ha logrado ser un pilar importante para el desarrollo y estabilidad social. Mantener la salud es y ha sido fundamental por toda persona, y para lograrlo, es necesario el consumo de medicamentos sin importar el poder adquisitivo del consumidor; sin embargo, la principal característica que se busca en ellos es la calidad del producto, y para lograr dicha calidad, se somete al medicamento por diversas pruebas y análisis desde su fabricación hasta el tiempo de vida útil que pueda tener, se cuentan con numerosas dependencias regulatorias en el mundo para evaluar y dar veracidad a la calidad de los medicamentos y brindar confianza a la hora de consumirlos.

La forma en que un medicamento puede demostrar su calidad a estas dependencias es mediante las validaciones de procedimientos analíticos en cada etapa de su elaboración, dichas validaciones son requeridas para obtener datos confiables de alta calidad, reproducibles, cuantificables, robustos, exactos y lineales mediante pruebas experimentales en el laboratorio. Existen numerosas técnicas para validar el método analítico de un medicamento, pero sin duda, la más común por su eficacia de separación, identificación y cuantificaciones es la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Por tal razón, este trabajo se basa en la validación de un método analítico para una crema de aplicación tópica, asegurando la identificación y ensayo del antioxidante presente en ella mediante la técnica de cromatografía liquida de alto rendimiento (HPLC), con la finalidad de demostrar que se trata de un producto estable, confiable y seguro, brindado así, un producto de calidad al consumidor que al mismo tiempo genera a la empresa productora prestigio, seguridad, preferencia del público por el consumo de sus productos y por ende ganancias, satisfacción por el hecho de ser reconocido por sus calidad de productos.

4.0 OBJETIVOS

Objetivo general:

Validar el método analítico que permita garantizar la identificación y ensayo de un antioxidante presente en una crema de aplicación tópica

Objetivos específicos:

- Demostrar la estabilidad del antioxidante bajo condiciones a temperatura ambiente y en refrigeración.
- Demostrar que el antioxidante puede ser detectable y cuantificable a diferentes concentraciones.
- Demostrar que el método analítico es específico para el antioxidante.
- Verificar que el método analítico es reproducible.

5.0 METODOLOGÍA

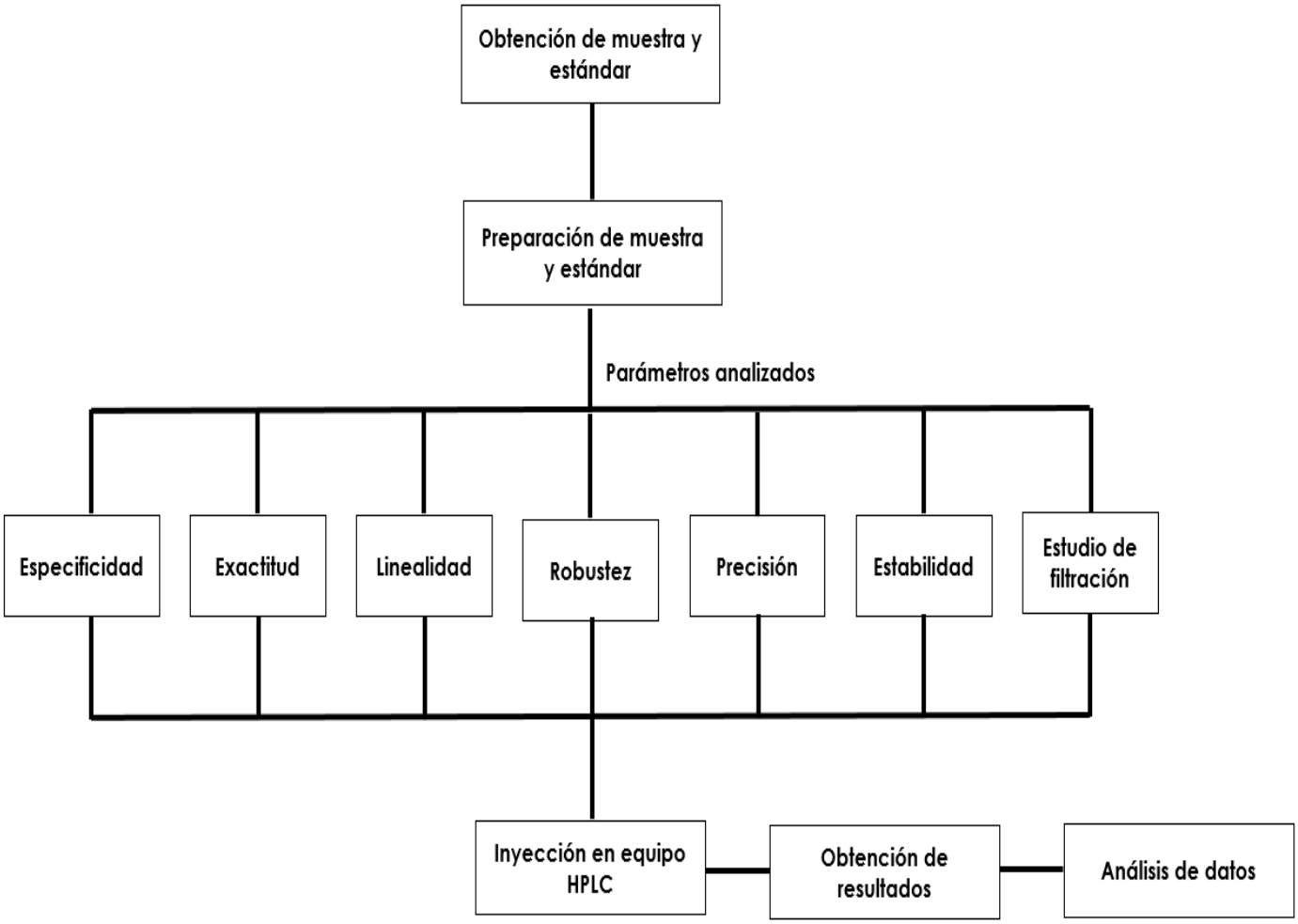

Figura 1. Diagrama de trabajo.

5.1 Parámetros de validación

Los parámetros de validación examinados durante la validación acorde a <1225> de USP 32 y el pág <450> de FEUM 11ª son enlistados en la tabla 1:

Tabla 1: Parámetros de Validación.

Parámetros de Validación	Examinado
Especificidad e Identificación	Si
Exactitud	Si
Precisión:	
Repetibilidad del Sistema (Precisión del Sistema)	Si
Repetibilidad del Análisis (Precisión del Análisis)	Si
Precisión Intermedia/Reproducibilidad	Si
Límite de Detección	No
Límite de Cuantificación/Reporting Threshold	No
Linealidad	Si
Intervalo	Si
Robustez	Si
Estabilidad de Soluciones	Si
Estudio de Filtración	Si
Factor de Respuesta Relativo	No
Adecuabilidad del sistema	Si

5.2 Parámetros de análisis

El método de análisis consta de una extracción de la muestra con solvente orgánico, analizado por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución y realizando una cuantificación con respecto a un estándar de concentración conocida.

Tabla 2. Parámetros de Análisis.

Condiciones HPLC	
✓ Columna:	YMC ODS-A, 120Å, TP 3 µm, Dimensiones: 15 cm x 4.6mm Número de parte: AA12S03-1546WT
✓ Velocidad de flujo:	1.0 mL/min
✓ Longitud de onda	220 nm PDA 200 – 400 nm
✓ Temperatura de análisis:	Temperatura ambiente

✓ Tiempo de corrida:	40 min

Los compuestos que serán evaluados durante esta validación están enlistados en la **tabla 2**:

Tabla 3: Tabla de compuestos.

Compuesto	**Descripción**
Antioxidante	N/A
Muestra crema	Muestra 3
Placebo – 1	Muestra 1
Placebo – 2	Muestra 2

5.3 Especificidad e Identificación

Tabla 4. Metodología y criterios de aceptación de los parámetros de especificidad e identificación.

METODOLOGÍA
La especificidad del método para la identificación y Ensayo serán demostrados analizando las siguientes soluciones: • Solución Blanco • Muestra 1 • Muestra 2 • Placebo estresado térmicamente: muestra 1 • Placebo estresado térmicamente: muestra 2 • Placebo estresado con luz: muestra 1 • Placebo estresado con luz: muestra 2 • Solución estándar de trabajo de antioxidante. • Solución de Ingrediente Farmacéutico Activo • Solución de Conservador • Solución muestra para identificación y ensayo de antioxidante. • Solución muestra estresada térmicamente para identificación y ensayo de antioxidante. Almacenada 10 días a 50 °C. • Solución muestra estresada con luz para identificación y ensayo de antioxidante. Expuestas a 1.2 millones Lux h condiciones de luz ICH. La identificación del antioxidante basada en tiempo de retención será evaluada durante la validación del método.
CRITERIO DE ACEPTACIÓN

ESPECIFICIDAD	
PARÁMETRO	**CRITERIO**
Picos de Blanco	Preferiblemente ausentes, si se observa interferencia con otros picos de interés, corrección por blanco es excepcionalmente permitida si los criterios de aceptación de todas las pruebas cromatográficas de la validación del método se cumplen.
Picos de Placebo	Deberían estar separados del antioxidante
Cualquier otro pico	Deberían estar separados del antioxidante
IDENTIFICACION	
Identificación del Antioxidante basada en el tiempo de retención	El intervalo de tiempo de retención del antioxidante en la solución muestra es ± 5% con respecto al tiempo de retención del antioxidante en la primera inyección de la solución de referencia réplica 1 de 5.

5.3.1 Secuencia de inyección

Tabla 5. Secuencia de inyección de los parámetros de especificidad e identificación.

Degradación	Secuencia	Numero de inyecciones
N\A	Solución blanco	2
	Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	5
	Segunda Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	2
	Solución placebo muestra 1	1
	Solución placebo muestra 2	1
	Muestra Crema	1
	Solución de Ingrediente Farmacéutico Activo	1
	Solución de Conservador	1
DEGRADACION TERMICA	Solución placebo muestra 1	1
	Solución placebo muestra 2	1
	Muestra Crema	1
N\A	Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	2
FOTODEGRADACION	Solución placebo muestra 1	1
	Solución placebo muestra 2	1
	Muestra Crema	1
N\A	Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	2

5.4 Exactitud

Tabla 6. Metodología y criterios de aceptación del parámetro de exactitud.

METODOLOGÍA
La exactitud será evaluada usando un mínimo de 9 determinaciones independientes sobre un mínimo de 3 concentraciones (n = 3 en cada nivel) abarcando el intervalo especificado (60.0, 100.0 y 140.0%) de la concentración nominal para conservadores.

Cada concentración será preparada 3 veces de 3 soluciones stock preparadas y que contienen placebo (sin antioxidante) al 100% w/w.

La exactitud se calculará como % de recobro y el recobro promedio deberá ser calculado a cada nivel de concentración.

Nivel de Concentración	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	
	Recobro individual %	Recobro promedio %
60.0%	95.0 ≤ % Recobro ≤ 105.0	97.0 ≤ % Recobro ≤ 103.0
100.0%	95.0 ≤ % Recobro ≤ 105.0	97.0 ≤ % Recobro ≤ 103.0
140.0%	95.0 ≤ % Recobro ≤ 105.0	97.0 ≤ % Recobro ≤ 103.0

5.4.1 Secuencia de inyección

Tabla 7. Secuencia de inyección de parámetro de exactitud.

Secuencia	Numero de inyecciones
Solución blanco	2
Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	5
Segunda Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	2
Exactitud de antioxidante al 60%-M1	1
Exactitud de antioxidante al 60%-M2	1
Exactitud de antioxidante al 60%-M3	1
Exactitud de antioxidante al 100%-M1	1
Exactitud de antioxidante al 100%-M2	1
Exactitud de antioxidante al 100%-M3	1
Exactitud de antioxidante al 140%-M1	1
Exactitud de antioxidante al 140%-M2	1
Exactitud de antioxidante al 140%-M3	1
Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	2

5.5 Precisión

Tabla 8. Metodología y criterios de aceptación del parámetro de precisión.

5.5.1 REPETIBILIDAD DEL SISTEMA	PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
La repetibilidad del Sistema es determinada de 5 réplicas de inyecciones de la misma solución de referencia.	%RSD	≤ 1.5

5.5.2 REPETIBILIDAD DEL ANÁLISIS	PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
La repetibilidad del Análisis será evaluada usando 6 preparaciones individuales de muestra al 100% de la concentración nominal, por un analista en un instrumento en una secuencia de análisis. **Reportar:** Pesos, respuestas, resultados de ensayo, % RSD y criterio de aceptación.	% RSD	≤ 3.0

5.5.3 PRECISIÓN INTERMEDIA / REPRODUCIBILIDAD
Dos analistas prepararán cada uno el mismo lote 6 veces y analizarán sus soluciones muestra y referencia preparadas individualmente en días diferentes de acuerdo a la descripción del método analítico. Preferiblemente son usados diferentes instrumentos, de diferentes marcas y diferentes lotes de material de empaque de la columna. **Reportar:** Pesos, respuestas, resultados de ensayo, % RSD, criterios de aceptación

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN			
Intervalo de Concentración	**% Diferencia Absoluta**	**% RSD para cada analista**	**% RSD combinado**
100 %, w/w of nominal concentration	≤ 5.0	≤ 3.0	≤ 3.0

5.5.1 Repetibilidad del sistema

5.5.1.1 Secuencia de inyección

Tabla 9. Secuencia de inyección de la repetibilidad del sistema del parámetro de precisión.

Secuencia	Numero de inyecciones
Solución blanco	2
Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	5

5.5.2 Repetibilidad del análisis

5.5.2.1 Secuencia de inyección

Tabla 10. Secuencia de inyección de la repetibilidad del análisis del parámetro de precisión.

Secuencia	Número de inyecciones
Solución blanco	2
Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	5
Segunda Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	2
Crema-M1	1
Crema-M2	1
Crema-M3	1
Crema-M4	1
Crema-M5	1
Crema-M6	1
Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	2

5.5.3 Precisión intermedia

5.5.3.1 Secuencia de inyección

Tabla 11. Secuencia de inyección de la precisión intermedia del parámetro de precisión.

Secuencia	Número de inyecciones
Solución blanco	2
Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	5
Segunda Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	2
Crema-M1	1
Crema-M2	1
Crema-M3	1
Crema-M4	1
Crema-M5	1
Crema-M6	1
Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	2

En esta sección se reporta la información y los resultados obtenidos en las pruebas de precisión.

Tabla 12. Información de la prueba de precisión intermedia.

	Analista 1	**Analista 2**
Fecha de Análisis:	23NOV17	08DIC17

Identificación de HPLC		MX_LC_TS_045 Alliance Blue (HPLC)	MX_LC_TS_035 Acquity Clase H (UPLC)
Columna	**Número de Parte:**	0415224510	0415242432
	Número de Lote:	11857	13077
Metanol usado	**Marca:**	BDH	BDH
	Número de Lote:	17060464	16I194013
Acetonitrilo usado	**Marca:**	BDH	BDH
	Número de Lote:	17010110	17010110
Ácido o-fosfórico usado	**Marca:**	Merck	Merck
	Número de Lote:	K44883873 342	K45738473 427
Filtro de jeringa	**Número de Parte:**	SLHVM25NK PVDF	SLHVM25NK
	Tipo de Membrana:	PVDF	PVDF
	Tamaño de Poro:	0.45µm	0.45µm
	Número de Lote:	R7AAG0800	R7AAG0800

5.6 Límite de detección

El límite de detección no es aplicable para la identificación y el ensayo de Antioxidantes, por lo tanto, no se generan resultados analíticos.

5.7 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación no es aplicable para la identificación y el ensayo de Antioxidantes, por lo tanto, no se generan resultados analíticos.

5.8 Reporting threshold (RT)

Reporting Threshold no es aplicable para la identificación y el ensayo de Antioxidantes, por lo tanto, no se generan resultados analíticos.

5.9 Linealidad

Tabla 13. Metodología y criterios de aceptación del parámetro de Linealidad.

METODOLOGÍA
Por la Linealidad del Antioxidante será demostrada con las siguientes concentraciones: 60.0 – 80.0 – 100.0 – 120.0 – 140.0 %w/w. Cada solución contiene activo y placebo al 100.0%

La linealidad pude ser inferida de los resultados de exactitud, sección 6.1, respectivamente de las primeras preparaciones de cada nivel de concentración y no de los valores promedio, con adición de 2 niveles de concentración intermedios.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN			
Concentración (%, w/w)	**r**	**% RSD de los Factores de Respuesta**	**Visual**
Conservador **60.0% - 140.0%**	**≥ 0.995**	**≤ 4.0**	**Lineal**
Reportar:	Concentraciones, respuestas, coeficiente de correlación r, pendiente, intercepto, % RSD de factores de respuesta, gráfico de linealidad y criterio de aceptación		

5.9.1 Secuencia de inyección

Tabla 14. Secuencia de inyección del parámetro de linealidad.

Secuencia	Numero de inyecciones
Solución blanco	2
Solución Estándar de Trabajo de antioxidante	5
Segunda Solución Estándar de Trabajo de antioxidante	2
Linealidad de antioxidante al 60%	1
Linealidad de antioxidante al 80%	1
Linealidad de antioxidante al 100%	1
Linealidad de antioxidante al 120%	1
Linealidad de antioxidante al 140%	1
Solución Estándar de Trabajo de antioxidante	2

5.10 INTERVALO

Tabla 15. Metodología de la medición del Intervalo.

METODOLOGÍA	REPORTAR
El intervalo es derivado de los resultados de Linealidad, Precisión y Exactitud.	Las concentraciones más alta y más baja para las cuales Exactitud, Precisión y Linealidad son demostradas y deben ser reportadas

Se establece confirmando que el método de ensayo cromatográfico proporciona un grado aceptable de Linealidad, Exactitud y Precisión.	

5.11 ROBUSTEZ

Tabla 16. Metodología y criterios de aceptación del parámetro de Robustez.

<table>
<tr><th colspan="3">METODOLOGÍA</th></tr>
<tr><td colspan="3">Las variables experimentales que puede influenciar en el desempeño del método cromatográfico serán variadas sistemáticamente para asegurar que el método cromatográfico funciona como se pretende durante el uso normal.

Esas variaciones pueden dividirse en dos:
-Cambios en condiciones cromatográficas.
-Cambios en preparación de la muestra.</td></tr>
<tr><th colspan="2">CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS</th><th>PREPARACIÓN DE MUESTRA</th></tr>
<tr><td colspan="2">La robustez de las condiciones cromatográficas será evaluada sobre soluciones que contienen:

1) Activo + placebo + conservadores
2) Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante
Variando los siguientes parámetros:
✓ Velocidad de Flujo
✓ Composición de fase móvil</td><td>La robustez de la preparación de muestra para ensayo puede ser evaluada variando los siguientes parámetros:

✓ Parámetros de agitación
• Tiempo
✓ Parámetros de sonicación
• Temperatura programada del baño de ultrasonido.
• Tiempo</td></tr>
<tr><th>PARÁMETRO</th><th>EVALUAR</th><th>CRITERIO</th></tr>
<tr><td rowspan="3">CROMATOGRAFICO</td><td>Factor de simetría en la primera inyección del Estándar de Trabajo de Antioxidante</td><td>0.8 ≤ Factor Simetría ≤ 1.5</td></tr>
<tr><td>Desviación Estándar Relativa (% RSD) de áreas de Antioxidante de las 5 inyecciones sucesivas de Estándar de Trabajo de Antioxidante.</td><td>% RSD ≤ 2.0</td></tr>
<tr><td>% Recobro de Antioxidante en la segunda Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante</td><td>98.0% ≤ Recobro ≤ 102.0%</td></tr>
<tr><td>PREPARACIÓN DE MUESTRA</td><td>% Diferencia absoluta</td><td>≤ 3.0 %</td></tr>
<tr><td colspan="3">Reportar: Los parámetros e intervalos evaluados, resolución y factor de simetría, pesos de muestra, respuestas, resultados, % de diferencia absoluta, criterios de aceptación.</td></tr>
</table>

NOTA: En casos donde un efecto es observado, se presentarán los resultados del instrumento representativo

NOTA: Los parámetros a evaluar se seleccionan debido a la mayor probabilidad de que se modifiquen durante la ejecución del análisis de rutina y porque tienen un efecto en el desempeño del método analítico.

5.11.1 Secuencia de inyección

Tabla 17. Secuencia de inyección del parámetro de robustez.

Parámetro	Secuencia	Numero de inyecciones
N\A	Solución blanco	2
	Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	5
	Segunda Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	2
Tiempo de Agitación: 1 min	Muestra Crema	1
Tiempo de Agitación: 3 min	Muestra Crema	1
Temperatura Sonicador: 30°C	Muestra Crema	1
Temperatura Sonicador: Temperatura Ambiente	Muestra Crema	1
Tiempo de sonicado: 10 min	Muestras Crema	1
Tiempo de Sonicado: 20 min	Muestras Crema	1
N\A	Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	2

5.11.2 Robustez en condiciones cromatográficas

Tabla 18. Robustez en condiciones cromatográficas.

Analizar la siguiente secuencia de inyección para cada velocidad de flujo programada:

Secuencia	Numero de inyecciones
Solución blanco	2
Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	5
Segunda Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	2
Muestra Crema	1
Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	2

5.11.3 Composición de la fase móvil

Tabla 19. Composición de la fase móvil cromatográfica.

Analizar la siguiente secuencia para cada fase móvil preparada:

Secuencia	Numero de inyecciones
Solución blanco	2
Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	5
Segunda Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	2
Muestra Crema	1
Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	2

5.12 Estabilidad de la solución

Tabla 20. Metodología y criterios de aceptación del parámetro de estabilidad de la solución.

<table>
<tr><th>METODOLOGÍA</th><th colspan="2">CRITERIO DE ACEPTACIÓN</th></tr>
<tr><td rowspan="2">La estabilidad será evaluada en las siguientes soluciones:
✓ Solución Estándar stock de Antioxidante
✓ Solución Estándar de trabajo de Antioxidante
✓ Segunda Solución de trabajo de Antioxidante
✓ Solución Muestra
✓ Fase Móvil
El periodo de Estabilidad será determinado durante un mínimo de 7 días</td><td>Concentración del Conservador (% w/w)</td><td>Diferencia Absoluta entre el valor inicial y valor al tiempo t</td></tr>
<tr><td>70.0 ≤ y ≤ 130.0</td><td>≤ 3.0</td></tr>
<tr><td>El estudio será realizado usando matraces volumétricos de vidrio transparente. El tiempo inicial para iniciar el estudio de estabilidad es el momento en el cual el solvente de dilución es adicionado. En la solución de referencia solo el activo y conservadores debe ser evaluado.

Las condiciones de almacenamiento son a temperatura ambiente y refrigeración.</td><td>Fase Móvil</td><td>Debe cumplir criterios de Adecuabilidad del Sistema mencionados en la sección 4.0 inciso d.</td></tr>
</table>

La fase móvil será almacenada en condiciones de temperatura ambiente del laboratorio.		
Reportar: Valores iniciales, valores en cada tiempo t, % de diferencia absoluta del conservador entre el tiempo inicial y el tiempo t.		

Se colocaron esas soluciones bajo las siguientes condiciones de almacenamiento en sus respectivos matraces volumétricos:

Tabla 21. Condiciones de almacenamiento de muestras y estándares para la medición del parámetro de estabilidad de la solución.

Tiempo (horas)	Tempertaura ambiente (25 ± 3 °C)			Refrigeración (5 ± 2°C)		
192	Stock Ref	Trabajo Ref	Crema M1	Stock Ref	Trabajo Ref	Crema M2

5.12.1 Secuencia de inyección

Analizar la siguiente secuencia de inyección para el tiempo cero:

Tabla 22. Secuencia de inyección del parámetro de estabilidad de la solución del tiempo cero.

Secuencia	Numero de inyecciones
Solución blanco	2
Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	5
Segunda Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	2
Muestra Crema	1
Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	2

5.12.2 Secuencia de inyección

Analizar la siguiente secuencia de inyección para el periodo de estabilidad:

Tabla 23. Secuencia de inyección para la medición del periodo de estabilidad.

	Secuencia	Numero de inyecciones
Soluciones recién preparadas	Solución blanco	2
	Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	5
	Segunda Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	2
Almacenada 192 horas a temperatura ambiente	Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	1
	Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante (preparada de la solución estándar stock almacenada)	1
	Muestra Crema- M1	1
Almacenada 192 horas en refrigeración	Segunda Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	1
	Segunda Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante (Check preparado de la solución estándar stock almacenada)	1
	Muestra Crema- M2	1
Solución recién preparada	Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	2

5.12.3 Fase móvil

Almacenar la fase móvil a temperatura ambiente y usarla después de 19 días.

5.12.3.1 Secuencia de inyección

Analizar la siguiente secuencia de inyección para el periodo de estabilidad evaluados:

Tabla 24. Secuencia de inyección para la medición de la fase móvil.

Secuencia	Numero de inyecciones
Solución blanco	2
Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	5
Segunda Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	2

5.13 Estudio de Filtración

Tabla 25. Metodología y criterios de aceptación del parámetro de Estudio de Filtración.

METODOLOGÍA	**CRITERIO DE ACEPTACIÓN**	
El filtro usado es específicamente caracterizado en el método cromatográfico.	**Concentración** **% w/w**	**Diferencia Absoluta entre soluciones**

El filtrado colectado de la solución muestra y blanco para determinación de ensayo serán analizados y comparados con las mismas muestras centrifugadas (no filtradas).		**filtradas y centrifugadas**
	70.0 ≤ y ≤ 130.0	**≤ 3.0**
Reportar: Los resultados de las muestras filtradas y las muestras centrifugadas, % de diferencia relativa y evaluación de contaminantes.		

5.13.1 Secuencia de inyección

Tabla 26. Secuencia de inyección para la medición del estudio de filtración.

Secuencia	Numero de inyecciones
Solución blanco	2
Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	5
Segunda Solución Estándar de Trabajo de Antioxidante	2
Solución Blanco	1
Blanco Filtro A	1
Blanco Filtro B	1
Blanco Filtro C	1
Muestra Centrifugada	1
Muestra Filtro A	1
Muestra Filtro B	1
Muestra Filtro C	1
Solución Estándar de Trabajo de antioxidante	2

Tabla 27. Filtros de jeringa usados en estudio de filtración.

Tipo de filtro	Diámetro de filtro	Tamaño de poro µm	Marca
6872-2504 GD/X™25 Syringe Filter with 0.45µm PVDF Membrane	25	0.45	Whatman
SLHV033NK Millex® HV Syringe Filter with Durapore® PVDF	33	0.45	Millipore-Sigma
SLHVM25NK PVDF with graduated glass fiber prefilter, 25 mm	25	0.45	Merck Millipore

5.14 Factor de respuesta relativo

El factor de respuesta relativo no es aplicable para Identificación y Ensayo de antioxidante, por lo tanto, no se generaron resultados analíticos.

5.15 Prueba de Adecuabilidad del sistema

Tabla 28. Metodología de Adecuabilidad del sistema.

METODOLOGÍA	REPORTAR
Los resultados de la Adecuabilidad del Sistema generados durante la validación analítica del método son reportados en el Reporte de Validación del Método Cromatográfico. El Factor de simetría debe ser reportado. No hay un criterio de aceptación definido para este factor. El factor de simetría es una medida de la simetría del pico de interés.	En la solución estándar de trabajo evaluar: ✓ Resolución (Si aplica) ✓ Factor de Simetría (USP) ✓ Platos Teóricos (USP) ✓ % RSD de áreas del pico de Antioxidante En la segunda solución de estándar de trabajo evaluar: ✓ % Recobro En la solución estándar de trabajo (Bracketing) evaluar: ✓ % RSD de áreas del pico de Antioxidante

5.15.1 Información de prueba de Adecuabilidad del sistema

La información de la Prueba Adecuabilidad del Sistema generada durante la Validación del método es enlistada en las Tablas 48, 49 y 50.

6.0 RESULTADOS

A continuación se muestra un cromatograma típico obtenido en las condiciones de análisis utilizadas.

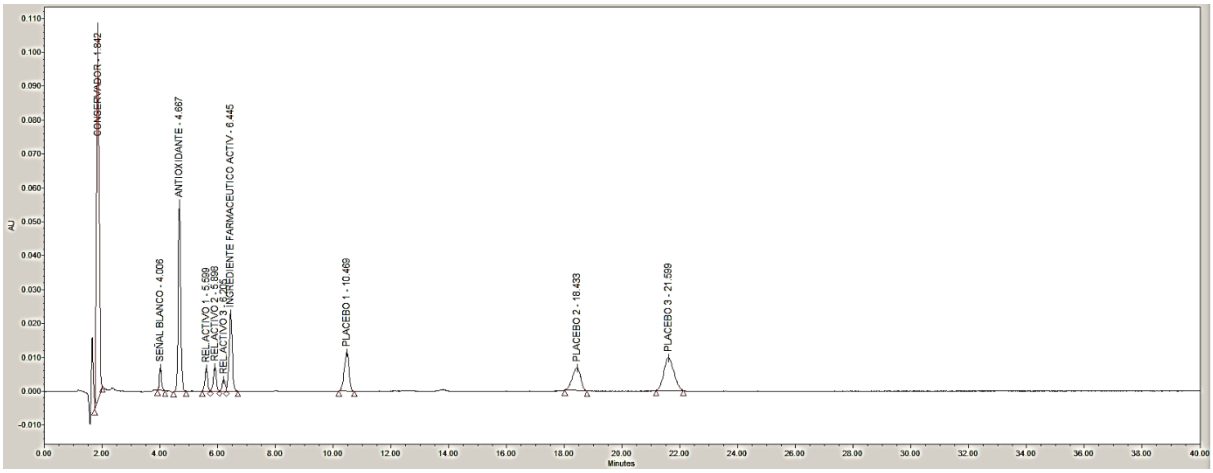

Figura 2. Cromatograma típico de las condiciones de análisis empleadas.

Acercamiento en la región de interés:

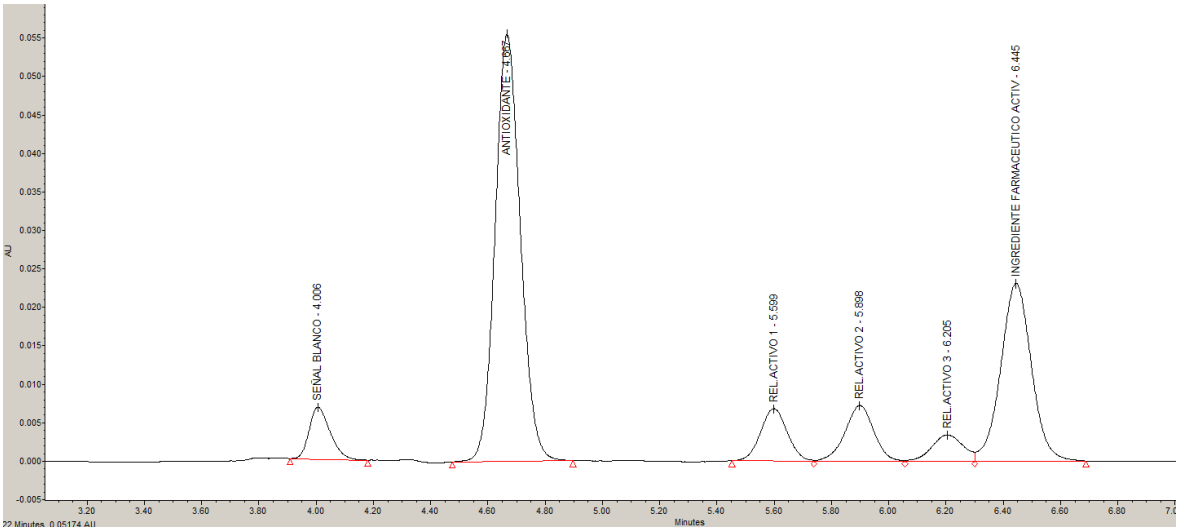

Figura 3. Cromatograma en donde se muestra el acercamiento de la región de interés.

6.1 Resultados para Especificidad

El orden de elución se ha determinado por el Ingrediente Farmacéutico Activo el conservador y antioxidante. Los tiempos de retención se muestran en la Tabla 3.

Tabla 29. Tiempos de retención de los componentes de la muestra de crema tópica.

Componente	Descripción	Tiempo de retención (min)
Conservador	Conservador	1.86
Antioxidante	Conservador	4.67
Ingrediente Farmacéutico Activo	Ingrediente Farmacéutico Activo	6.43
Rel-Placebo-1	Placebo	10.36
Rel-Placebo-2	Placebo	18.17
Rel-Placebo-3	Placebo	21.26

Tabla 30. Tabla de respuestas en base al área y tiempo de retención de cada solución analizada:

NOMBRE DE SOLUCIÓN ANALIZADA	DESCRIPCIÓN	NOMBRE DEL COMPONENTE	ÁREA (µVsec)	TR (min)
BLANCO	NO DEGRADADA	SEÑAL BLANCO	36281.00	4.075
ESTÁNDAR DE TRABAJO DE ANTIOXIDANTE	NO DEGRADADA	SEÑAL BLANCO	37458.15	4.064
		ANTIOXIDANTE	341974.90	4.671
MUESTRA 1	NO DEGRADADA	CONSERVADOR	708548.4	1.841
		SEÑAL BLANCO	36170.99	4.027
		RELATIVO 1	40116.15	5.600
		RELATIVO 2	46551.55	5.899
		RELATIVO 3	23473.56	6.203
		INGREDIENTE FARMACÉUTICO ACTIVO	164001.3	6.445
		PLACEBO 1	145134.26	10.471
		PLACEBO 2	135804.78	18.435
		PLACEBO 3	252218.37	21.588
	TÉRMICAMENTE DEGRADADO	CONSERVADOR	704274.90	1.867
		RELATIVO 1	35697.34	5.538
		RELATIVO 2	39789.84	5.832
		RELATIVO 3	21536.71	6.132
		INGREDIENTE FARMACÉUTICO ACTIVO	162310.90	6.365
		PLACEBO 1	135982.88	10.246
		PLACEBO 2	133647.46	17.923
		PLACEBO 3	248438.68	21.002
	FOTO-DEGRADADO	CONSERVADOR	633983.02	1.884
		RELATIVO 1	55840.63	5.580
		RELATIVO 2	44777.19	5.871
		RELATIVO 3	24930.81	6.179
		INGREDIENTE FARMACÉUTICO ACTIVO	82041.16	6.416
		PLACEBO 1	174616.32	10.343
		PLACEBO 2	173389.24	18.110
		PLACEBO 3	310629.86	21.148
MUESTRA 2	NO DEGRADADA	SEÑAL BLANCO	36405.86	4.02
		PLACEBO 1	178794.46	10.475
		PLACEBO 2	119385.2	18.418
		PLACEBO 3	246040.68	21.582
	TÉRMICAMENTE DEGRADADO	PLACEBO 1	179963.39	10.234
		PLACEBO 2	126937.61	17.868
		PLACEBO 3	259506.93	20.943
	FOTO-DEGRADADO	INGREDIENTE FARMACÉUTICO ACTIVO	20393.43	6.594
		PLACEBO 1	443116.88	10.384
		PLACEBO 2	310827.36	18.174
		PLACEBO 3	617636.71	21.013
MUESTRA 3	NO DEGRADADA	CONSERVADOR	719922.87	1.839
		SEÑAL BLANCO	35638.27	4.014
		ANTIOXIDANTE	362769.89	4.667

NOMBRE DE SOLUCIÓN ANALIZADA	DESCRIPCIÓN	NOMBRE DEL COMPONENTE	ÁREA (µVsec)	TR (min)
		RELATIVO 1	18649.38	5.598
		RELATIVO 2	18870.10	5.899
		RELATIVO 3	14017.17	6.212
		INGREDIENTE FARMACÉUTICO ACTIVO	40096.18	6.445
		PLACEBO 1	140338.37	10.468
		PLACEBO 2	135463.96	18.434
		PLACEBO 3	248063.55	21.577
	TÉRMICAMENTE DEGRADADO	CONSERVADOR	745828.68	1.868
		ANTIOXIDANTE	362319.07	4.649
		RELATIVO 1	20290.94	5.545
		RELATIVO 2	18081.49	5.839
		RELATIVO 3	14831.12	6.152
		INGREDIENTE FARMACÉUTICO ACTIVO	39367.68	6.377
		PLACEBO 1	131186.75	10.269
		PLACEBO 2	136378.25	17.975
		PLACEBO 3	244828.54	21.060
	FOTO-DEGRADADO	CONSERVADOR	743207.26	1.882
		ANTIOXIDANTE	367543.14	4.674
		RELATIVO 1	37586.42	5.573
		RELATIVO 2	23561.99	5.847
		RELATIVO 3	16606.37	6.182
		INGREDIENTE FARMACÉUTICO ACTIVO	16355.32	6.414
		PLACEBO 1	139249.74	10.334
		PLACEBO 2	144622.65	18.094
		PLACEBO 3	255997.79	21.174

- Ningún pico del blanco interfiere con el pico de interés (Antioxidante)
- Ningún pico de placebo interfiere con el pico de interés.
- El conservador y antioxidante están separados entre sí y del IFA.

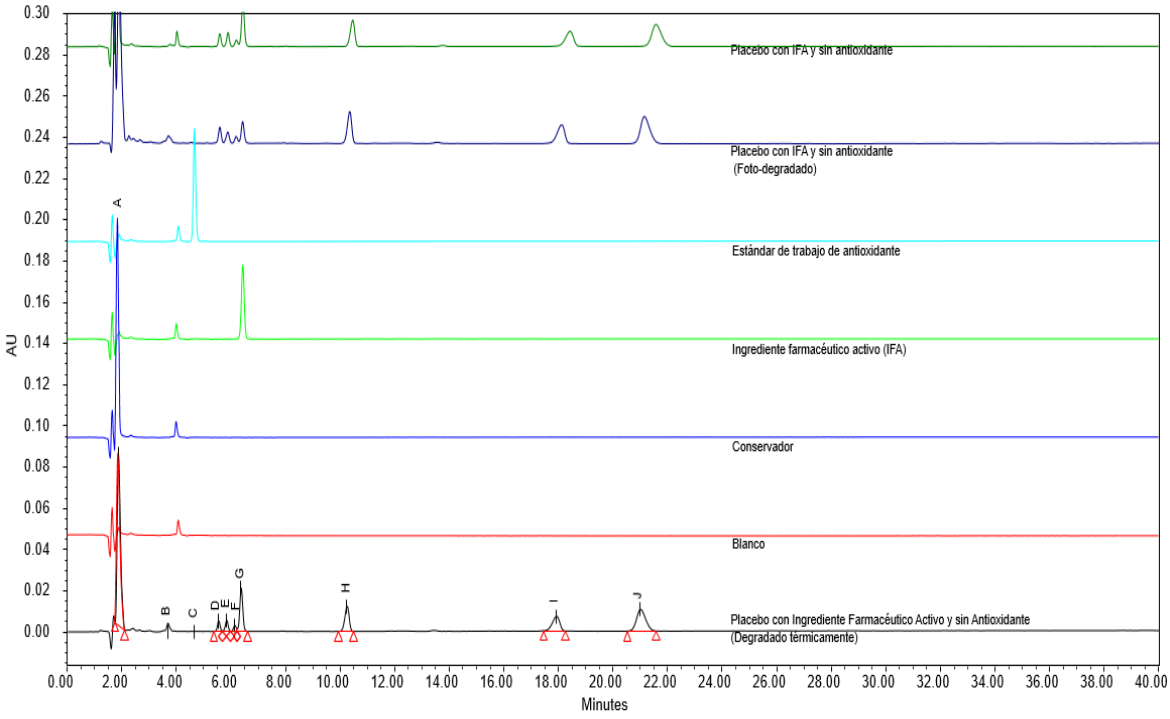

Figura 4. Cromatograma de Especificidad de muestra 1. Especificidad: Superposición de cromatogramas de: muestra 1 (Inicial, Foto y térmicamente degradado), soluciones de blanco, Ingrediente Farmacéutico Activo y Conservador.

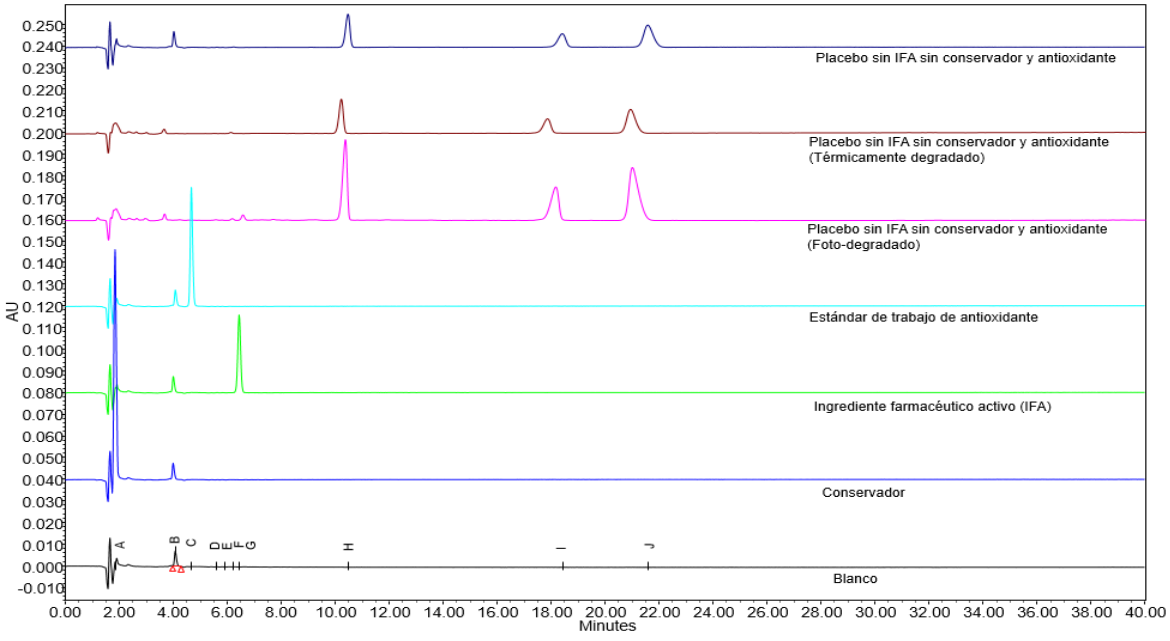

Figura 5. Cromatograma de Especificidad de muestra 2. Especificidad: Superposición de cromatogramas de: muestra 2 (Inicial, Foto y Térmicamente degradado), soluciones de blanco, Ingrediente Farmacéutico Activo y Conservador.

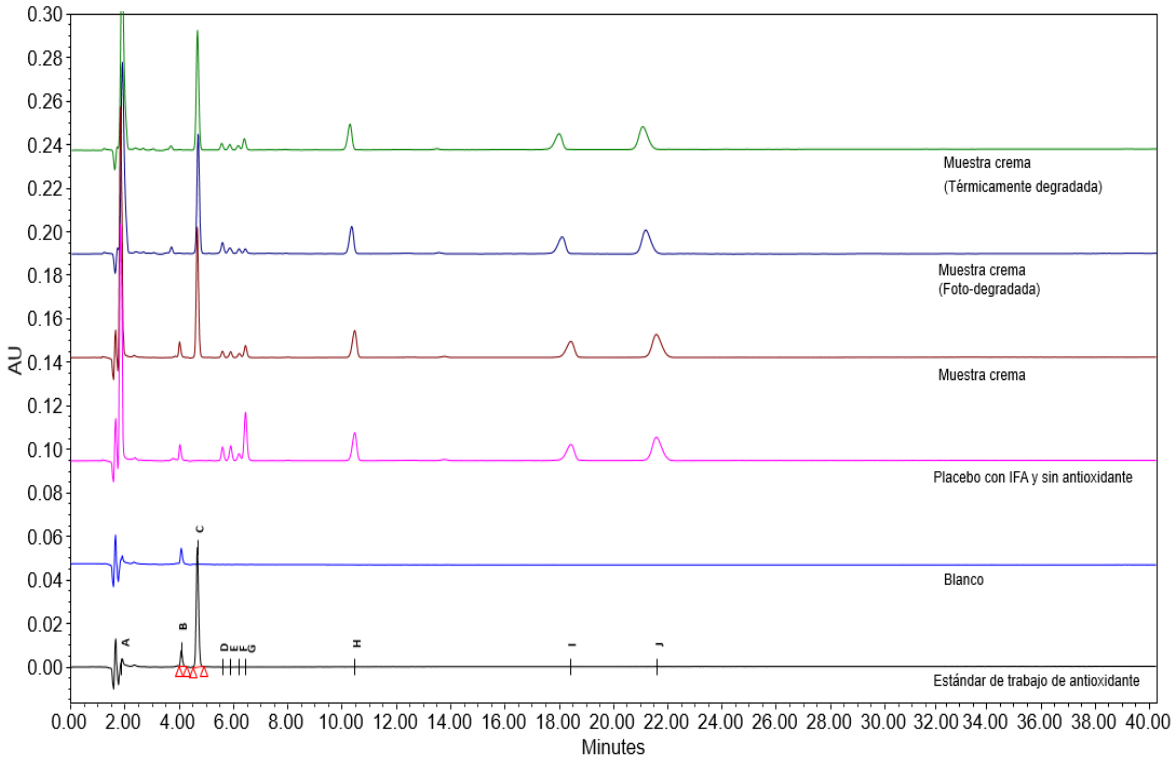

Figura 6. Cromatograma de Especificidad de muestra de crema tópica. Especificidad: Superposición de cromatogramas de: Muestra de Crema (Inicial, Foto y Térmicamente degradada), soluciones de Placebo con Ingrediente Farmacéutico Activo y sin Antioxidante, blanco y Estándar primario de antioxidante.

6.1.1 Resultados para identificación basados en tiempo de retención

La ventana de tiempo de retención fue evaluada durante la validación. El intervalo de tiempo de retención del antioxidante en la solución muestra es ±5% del tiempo de retención del antioxidante en la primera inyección de la solución de referencia de la réplica 1 de 5.

6.1.2 Resultados para Identificación basada con LC-PDA

Ver figuras 7, 8, 9, y tabla 31.

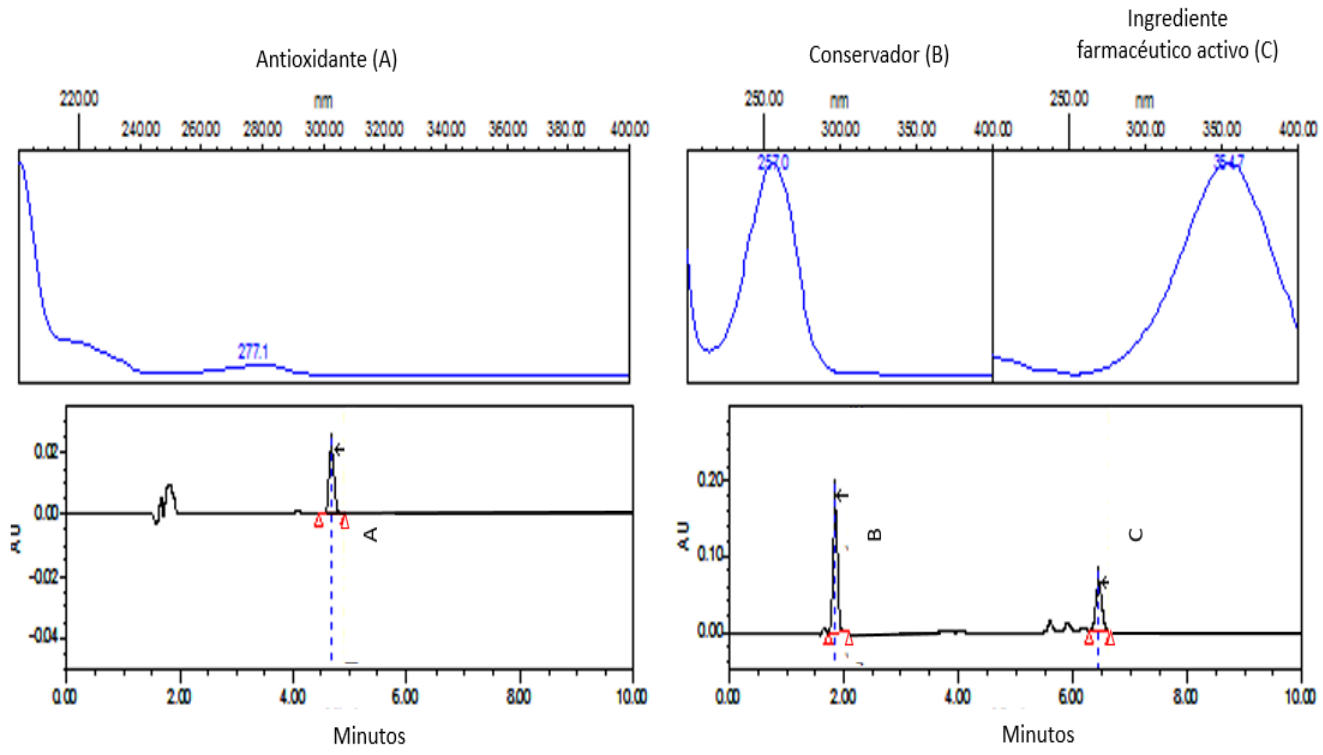

Figura 7. Espectro de estándar de antioxidante y muestra 1.

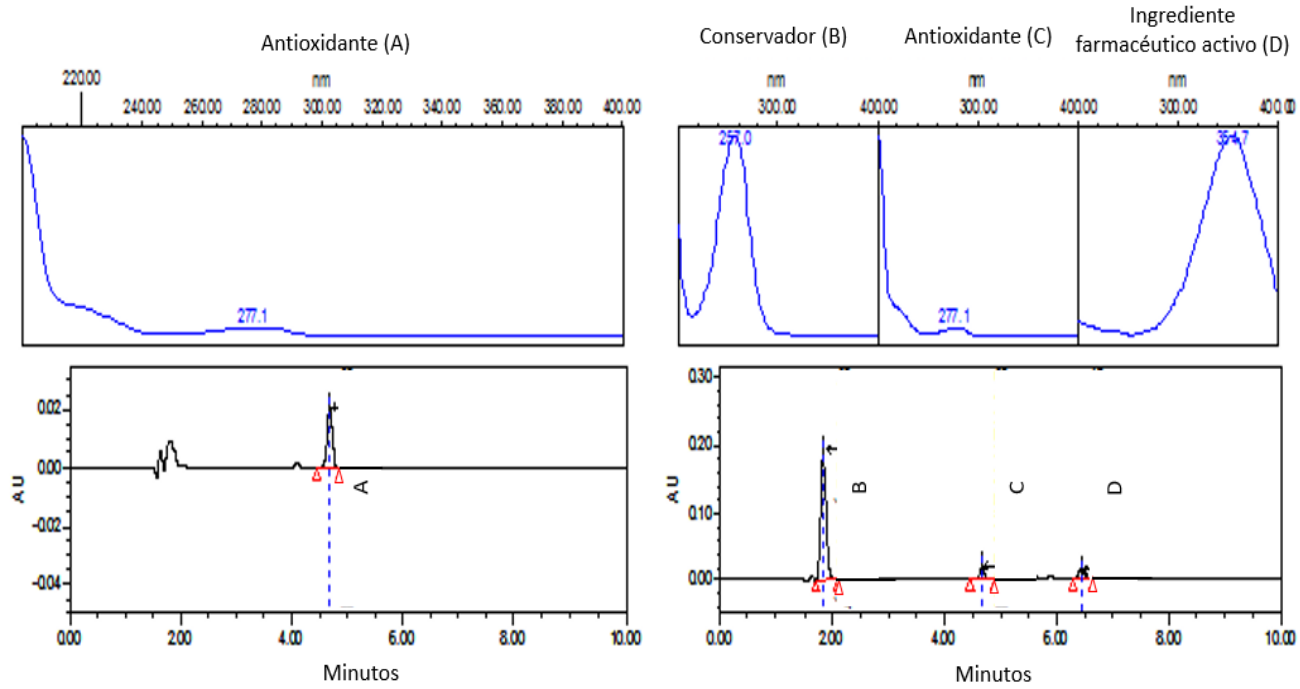

Figura 8. Espectro de estándar de antioxidante y muestra 1 adicionado con antioxidante**.**

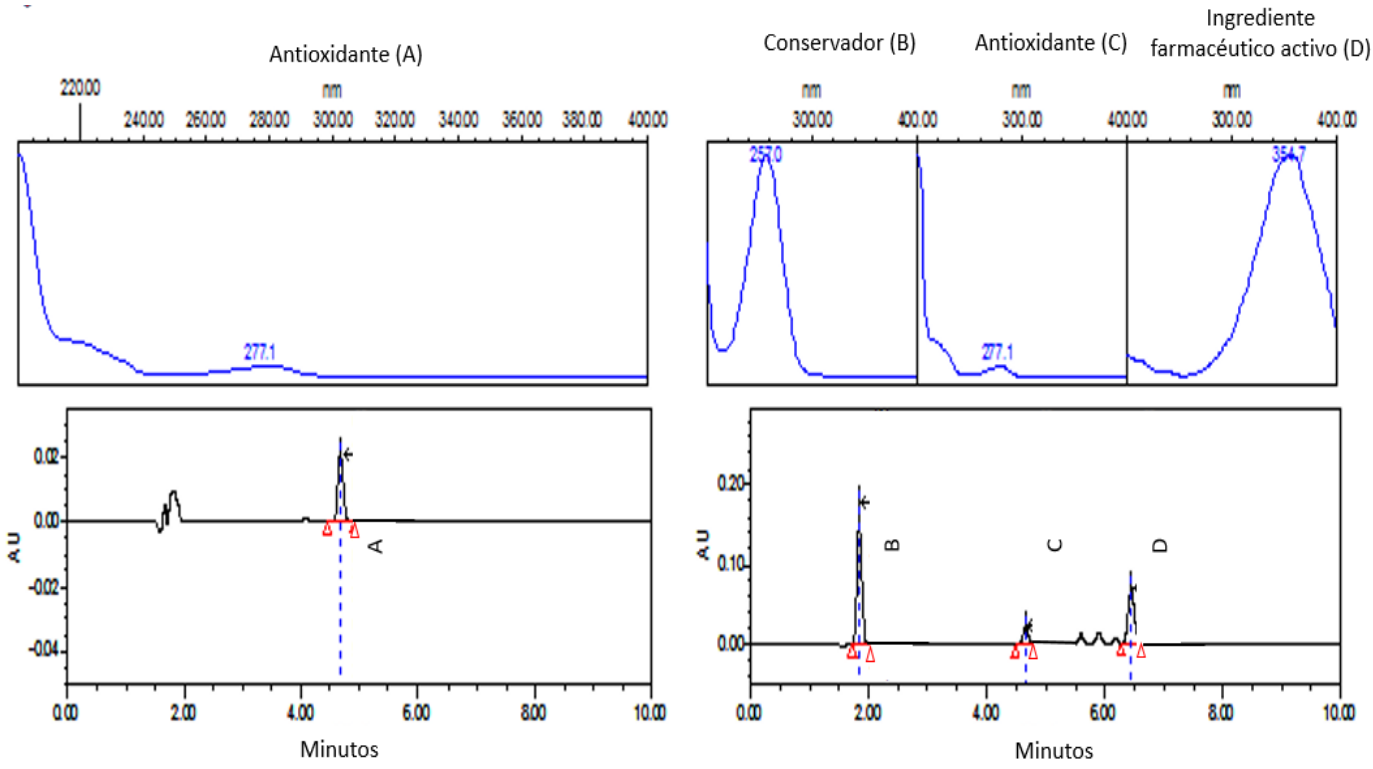

Figura 9. Espectro de pico de antioxidante en solución muestra de crema tópica y solución estándar de trabajo del antioxidante.

Tabla 31. Identificación de antioxidante con LC-PDA

	Placebo	**Placebo Adicionado**	**Crema**	**Estándar de Trabajo de Antioxidante**
Máxima λ (nm)	-	200.4	200.4	**200.4**
Diferencia*	**N.A.**	0	0	0
Criterio	No hay interferencia	≤ 2 nm	≤ 2 nm	≤ 2 nm
Cumple/ cumple	**Cumple**	**Cumple**	**Cumple**	**Cumple**

*Diferencia entre la longitud de onda máxima absorbancia del espectro de Antioxidante en las soluciones de placebo adicionado y muestra y la longitud de onda de máxima absorbancia del espectro de Antioxidante en la solución de referencia.

- Los perfiles del espectro del placebo adicionado (
- Figura), muestras (Figura 9) y solución estándar de trabajo de Antioxidante corresponde.

- No hay interferencia de Placebo (abla 31.

- **Figura**).

6.2 Resultados de Exactitud

En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se reportan los resultados o btenidos en la prueba de exactitud con 3 niveles de concentración como se indica en la tabla.

Tabla 32. Resultados del parámetro de exactitud del antioxidante.

Nivel de Concentración (%)	Recobro (%)	Criterio Recobro (%)	Cumple / No Cumple
60 (1)	**100.39**	95.0 ≤ % Recobro ≤ 105.0	**Cumple**
60 (2)	**100.47**	95.0 ≤ % Recobro ≤ 105.0	**Cumple**
60 (3)	**99.89**	95.0 ≤ % Recobro ≤ 105.0	**Cumple**
Recobro promedio	**100.25**	97.0 ≤ % Recobro ≤ 103.0	**Cumple**
100 (1)	**100.93**	95.0 ≤ % Recobro ≤ 105.0	**Cumple**
100 (2)	**100.69**	95.0 ≤ % Recobro ≤ 105.0	**Cumple**
100 (3)	**99.95**	95.0 ≤ % Recobro ≤ 105.0	**Cumple**
Recobro promedio	**100.52**	97.0 ≤ % Recobro ≤ 103.0	**Cumple**
140 (1)	**101.14**	95.0 ≤ % Recobro ≤ 105.0	**Cumple**
140 (2)	**100.63**	95.0 ≤ % Recobro ≤ 105.0	**Cumple**
140 (3)	**99.85**	95.0 ≤ % Recobro ≤ 105.0	**Cumple**
Recobro promedio	**100.54**	97.0 ≤ % Recobro ≤ 103.0	**Cumple**

6.3 Resultados de precisión

6.3.1 Resultados para repetibilidad del Sistema

Los resultados de la Precisión del Sistema (Repetibilidad) se reporta en la **¡Error! No se e ncuentra el origen de la referencia.**.

En esta tabla se reportan los resultados obtenidos de las siguientes pruebas:

Precisión Intermedia del Analista 1.

Tabla 33. Resultados de precisión del sistema de antioxidante en la solución estándar de referencia.

	Respuesta Area (µVsec)
Número de inyección	**Analista 1**
1	338704.09
2	340003.99
3	340204.16
4	340662.39
5	341536.12
RSD (%)	**0.30**
Criterio de Aceptación (%)	≤ 3.0
Cumple/No cumple	**Cumple**

6.3.2 Resultados para repetibilidad del análisis

Los resultados de Repetibilidad del Análisis se reportan en las Tabla 34.

En estás tablas están reportados los resultados obtenidos de la siguiente prueba:

Precisión Intermedia Analista 1.

Tabla 34. Resultados de la prueba de repetibilidad del análisis en crema tópica.

Determinación	Peso de muestra (g)	Area (µVsec)	Ensayo (%)		
1	1.0254	344961.22	98.86		
2	1.0525	353278.12	98.64		
3	1.0086	339802.05	99.01		
4	1.0426	351278.77	99.01		
5	1.0790	365603.20	99.57	**Criterio de Aceptación RSD (%)**	**Cumple/ No cumple**
6	1.0646	364742.19	99.74		
		Promedio:	99.14		
		RSD (%):	**0.43**	≤ 2.0	**Cumple**

6.3.3 Resultados de precisión intermedia

Los resultados de Precisión Intermedia se reportan en la Tabla 35.

Para esta evaluación, el análisis fue llevado a cabo por dos analistas. La preparación de soluciones, estándares y muestras fue independiente y en diferentes días.

Tabla 35. Resultados de la prueba de precisión intermedia del análisis en crema tópica.

Fecha:	23NOV17			08DIC17		
Equipo HPLC:	MX_LC_TS_045			MX_LC_TS_035		
Lote de Columna:	11857			13077		
Analista:	ELS			MJC		
Número de muestra	**Peso de Muestra (g)**	**Área (µVsec)**	**Ensayo (%)**	**Peso de Muestra (g)**	**Área (µVsec)**	**Ensayo (%)**
1	1.0254	344961.22	98.86	1.0032	355602.76	99.90
2	1.0525	353278.12	98.64	1.0253	364708.64	100.25
3	1.0086	339802.05	99.01	1.0249	360951.09	99.25
4	1.0426	351278.77	99.01	1.0027	351426.63	98.77
5	1.0790	365603.20	99.57	1.0115	356343.65	99.29
6	1.0646	364742.19	99.74	1.0299	360809.98	98.73
	Promedio:		99.14	**Promedio:**		99.37
RSD (%) Por analista	**RSD (%):**		**0.23**	**RSD (%):**		**0.61**
	Criterio (%):		**≤ 3.0**	**Criterio (%):**		**≤ 3.0**
	Cumple/ No Cumple		**Cumple**	**Cumple/ No Cumple**		**Cumple**

Diferencia Absoluta (%)	**Resultado (%)**	**Criterio (%)**	**Cumple/ No Cumple**
	0.23	**≤ 5.0**	**Cumple**

RSD combinada (%)	**Resultado (%)**	**Criterio (%)**	**Cumple/ No Cumple**
	1.04	**≤ 5.0**	**Cumple**

6.4 Resultados de Linealidad

Para el antioxidante, la Linealidad es demostrada con las siguientes concentraciones: 60.0 – 80.0 – 100.0 – 120.0 – 140.0 %, w/w. Ver los resultados del reporte en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**.

Tabla 36. Resultados del parámetro de Linealidad del antioxidante.

Concentración		**Area (µVsec)**	**Factor respuesta** $\frac{\text{Área (µVsec)}}{\text{Concentración (mg/mL)}}$		
Teórica (%)	**Práctica (mg/mL)**				
60.0	0.006003	205999.36	3431612008.08		
80.0	0.008004	274026.42	3423623573.65		
100.0	0.010005	344626.40	3444546893.37		
120.0	0.012006	411713.09	3429232944.04	**Criterio**	

140.0	0.014007	483339.41	3450704181.11		**Cumple/No**
% RSD			**0.33**	≤ 4.0	**Cumple**
r			**1.0000**	≥ 0.995	**Cumple**
Visual			**Linear**	Linear	**Cumple**

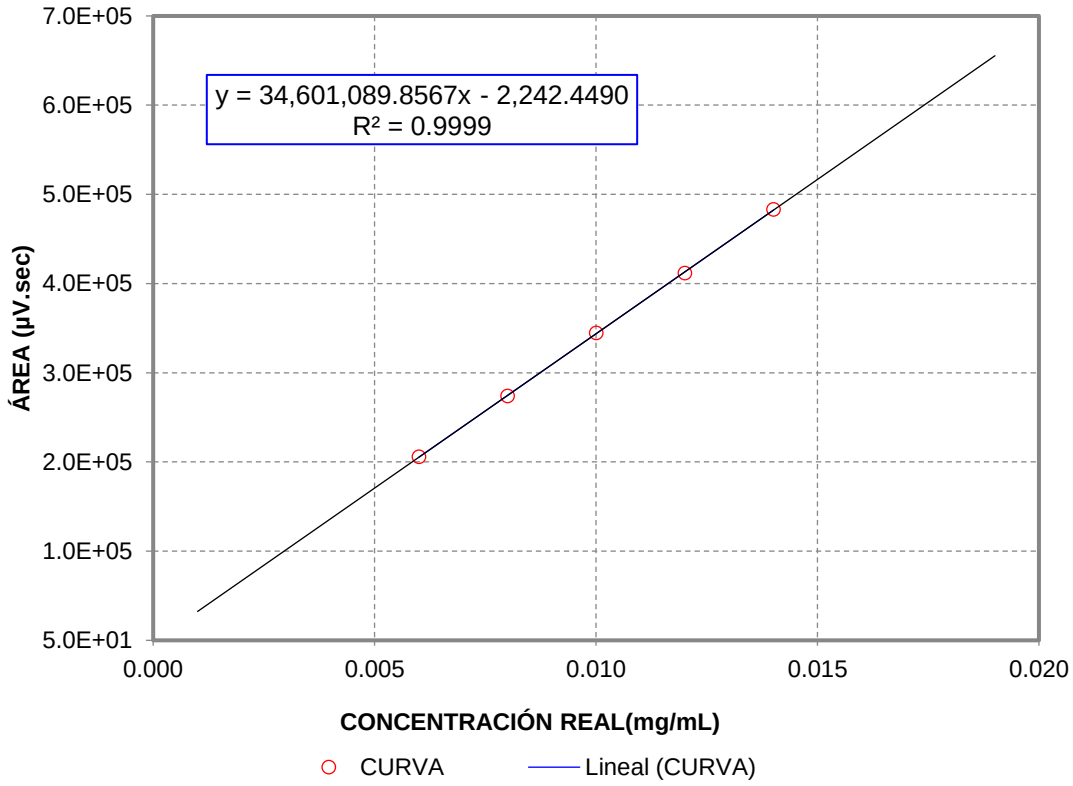

Figura 10. Curva de datos experimentales del parámetro de linealidad del antioxidante.

6.5 Resultados de intervalo

En la siguiente tabla se reporta el Intervalo analizado en las pruebas de Exactitud, Precisión y Linealidad.

Tabla 37. Información de intervalo.

Parámetro	**Concentración Analizada (%)**	**Criterios**	**Cumple /**

				No Cumple
Exactitud	60.0 – 100.0 – 140.0	**Recobro**	95.0 ≤ Individual (%) ≤	**Cumple**
			97.0 ≤ Promedio (%) ≤	
Precisión	100.0	**Repetibilidad del**	RSD (%) ≤ 1.5	**Cumple**
		Repetibilidad del	RSD (%) ≤ 3.0	
		Precisión Intermedia	Diferencia absoluta (%)	
			$RSD_{por\ analista}$(%)	
			$RSD_{combinado}$ (%)	
Linealidad	60.0–80.0–100.0–120.0–140.0	**Coeficiente de**	r ≥ 0.995	**Cumple**
		Factor respuesta	RSD (%) ≤ 4.0	
		Visual	Lineal	

6.6 Resultados de Robustez

6.6.1 Resultados de Robustez en preparación de muestra

Los resultados de Robustez en Preparación de Muestra son reportados en las tablas 38, 39 y 40.

Tabla 38. Robustez en preparación de la muestra con variación en tiempo de agitación en vortex.

Variante analizada: Tiempo de agitación 1 y 3 minutos en vortex.

Parámetro	Muestra	Peso Muestra (g)	Área (µVsec)	Ensayo (%)	Diferencia Absoluta		Cumple/ No cumple
					Resultado (%)	Criterio (%)	
Valor Nominal	Crema	Ensayo promedio de prueba de Precisión Intermedia (analista 1)		99.14	N.A.	≤ 3.0	N.A.
Agitación 1 min		1.0219	342987.84	98.85	**0.01**		**Cumple**
Agitación 3 min		1.0009	336988.90	99.16	**0.27**		**Cumple**

Tabla 39. Robustez en preparación de la muestra con variación en temperatura utilizando baño de ultrasonido.

Variante analizada: Temperatura baño de ultrasonido (Temperatura: 30 °C y temp. ambiente).

Parámetro	Muestra	Peso de Muestra (g)	Área (µVsec)	Ensayo (%)	Diferencia Absoluta		Cumple/ No cumple
					Resultado (%)	Criterio (%)	
Valor nominal	Crema	Ensayo promedio de prueba de Precisión		99.14	N.A.	≤ 3.0	N.A.
Temp. baño: 30°C		1.0389	349750.94	99.15	**0.01**		**Cumple**
Temp. baño: Ambiente		1.0326	346660.53	98.87	**0.27**		**Cumple**

Tabla 40. Robustez en preparación de la muestra con variación en tiempo de sonicación.

Variante analizada: Tiempo de sonicación: 10 min y 20 min.

Parámetro	Muestra	Peso de Muestra (g)	Área (µVsec)	Ensayo (%)	Diferencia Absoluta		Cumple/ No cumple
					Resultado (%)	Criterio (%)	
Valor nominal	Crema	Ensayo promedio de prueba de Precisión		99.14	N.A.	≤ 3.0	N.A.
10 min		1.0501	355481.08	99.70	**0.56**		**Cumple**
20 min		1.0162	344899.71	99.96	**0.82**		**Cumple**

6.6.2 Resultados Robustez en condiciones cromatográficas

Los resultados para Robustez en condiciones cromatográficas son reportados en las tablas 41 y 42.

Tabla 41. Robustez analizada en condiciones cromatográficas en solución estándar de referencia.

Variantes analizadas: Velocidad de flujo (0.8 y 1.2 mL/min).
Composición de fase móvil: Cantidad agregada de Acetonitrilo
Composición de fase móvil: Cantidad agregada de ácido o-Fosfórico.

	Parámetro	RT	Coleo USP	Platos USP	% RSD Estándar Referencia 1	% Recobro Estándar Referencia 2	% RSD Estándar de Referencia 1*
	Valor nominal	4.671	1.11	13156	0.30	99.67	0.30
VEL. FLUJO	**0.8 mL/min**	5.818	1.05	11658	0.18	99.79	0.18
	1.2 mL/min	3.937	1.09	13711	0.10	100.07	0.10
	[950:50:1] V:V:V	3.599	1.07	8531	0.19	98.49	0.19

	Parámetro	RT	Coleo USP	Platos USP	% RSD Estándar Referencia 1	% Recobro Estándar Referencia 2	% RSD Estándar de Referencia 1*
	Valor nominal	4.671	1.11	13156	0.30	99.67	0.30
COMPOSICIÓN DE FASE MÓVIL	**[850:150:1] V:V:V**	6.187	1.02	13175	0.15	98.05	0.15
	[900:100:0.5] V:V:V	4.617	1.05	10830	0.41	99.72	0.41
	[950:50:2] V:V:V	4.662	1.05	10749	0.39	99.49	0.39
	Criterio	N.A.	≤ 1.5	≥ 4000	≤ 2.0%	98.0 – 103.0	≤ 3.0%
	Cumple/No cumple	**N.A.**	**Cumple**	**Cumple**	**Cumple**	**Cumple**	**Cumple**

*Estándares de Referencia y verificadores.

Tabla 42. Robustez analizada en condiciones cromatográficas en solución muestra de crema tópica.

Variantes analizadas: Velocidad de flujo (0.8 y 1.2 mL/min).
Composición de fase móvil: Cantidad agregada de Acetonitrilo
Composición de fase móvil: Cantidad agregada de ácido o-fosfórico

	Parámetro	RT	Coleo USP	Platos USP		Ensayo (%)	Diferencia Absoluta (%)	Criterio (%)	Cumple/ No Cumple
	Nominal value	4.665	1.10	13554		99.14	N.A.	N.A.	N.A.
VEL. FLUJO	**0.8 mL/min**	5.827	1.05	12183		99.84	**0.70**	≤ 3.0	**Cumple**
	1.2 mL/min	3.942	1.09	14172		99.43	**0.29**		**Cumple**
COMPOSICIÓN DE FASE MÓVIL	**[950:50:1] V:V:V**	3.603	1.09	8753		99.55	**0.41**		**Cumple**
	[850:150:1] V:V:V	6.188	1.02	13604		99.70	**0.56**		**Cumple**
	[900:100:0.5] V:V:V	4.622	1.06	10957		99.01	**0.13**		**Cumple**
	[950:50:2] V:V:V	4.654	1.06	10999		98.63	**0.51**		**Cumple**
	Criterio	N.A.	≤ 1.5	≥ 4000					
	Cumple/No cumple		**Cumple**	**Cumple**					

6.7 Resultados de estabilidad de soluciones

Los resultados de Estabilidad de la Solución están reportados en las Tablas 43, 44 y 45.

Tabla 43. Estabilidad de soluciones almacenadas a temperatura ambiente durante 192 h (8 días).

		Tiempo inicial		t = 8 días		Dif. Abs. (%)	Criterio (%)	Cumple/ No cumple
Solución	**Conc. (mg/mL)**	**Area µV.sec**	**Recobro (%)**	**Area µV.sec**	**Recobro (%)**			
Solución referencia	0.010008	339842.97	99.89	339340.85	100.16	**0.27**	≤ 3.0	**Cumple**
Solución referencia preparado de: Solución stock				340274.87	100.44	**0.55**		**Cumple**
		Tiempo inicial		**t = 8 días**				
Solución muestra:	**Peso muestra (g)**	**Area µV.sec**	**Ensayo (%)**	**Area µV.sec**	**Ensayo (%)**	**Dif. Abs. (%)**	**Criterio (%)**	**Cumple/ No cumple**
Crema	1.0254	344961.22	98.86	345986.82	99.57	**0.72**	≤ 3.0	**Cumple**

Tabla 44. Estabilidad de soluciones almacenadas en refrigeración (5°C +/- 2°C) durante 192 h (8 días).

		Tiempo inicial		t = 8 días		Dif. Abs. (%)	Criterio (%)	Cumple/ No cumple
Solución	**Conc. (mg/mL)**	**Area µV.sec**	**Solución**	**Conc. (mg/mL)**	**Area µV.sec**			
Solución Check	0.00999	338815.19	99.67	338575.89	100.01	**0.34**	≤ 3.0	**Cumple**
Solución Check preparade de: Solución stock				343433.91	101.45	**1.79**		**Cumple**
		Tiempo inicial		**t = 8 días**				
Solución muestra:	**Peso muestra (g)**	**Area µV.sec**	**Ensayo (%)**	**Area µV.sec**	**Ensayo (%)**	**Dif. Abs. (%)**	**Criterio (%)**	**Cumple/ No cumple**
Crema	1.0525	353278.12	98.64	353201.52	99.03	**0.40**	≤ 3.0	**Cumple**

Tabla 45. Estabilidad de fase móvil almacenada a temperatura ambiente durante 19 días.

		t = 19 días				
Solución	**Conc. (mg/mL)**	**RT min**	**Area µV.sec**	**Coleo USP**	**Platos USP**	**Recobro (%)**
Referencia	0.010008	4.677	334994.23	1.08	13938	**N.A.**
Check	0.010006	4.669	333374.85	1.08	13949	99.41
Criterio		**N.A.**	**N.A.**	**≤ 1.5**	**≥ 4000**	**98.0-102.0**

*En la solución blanco no es observado picos adicionales relacionados a fase móvil.

6.8 Resultados de estudio de filtración

Los resultados para el estudio de filtración son reportados en las tablas 46, 47 y 48.

Tabla 46. Resultados de muestras filtradas a través de filtro para jeringa 6872-2504 GD/X TM25 0.45 µm membrana de PVDF.

Solución muestra	Peso muestra (g)	Area (µVsec)	Centrifugada Ensayo (%)	Área (µVsec)	Filtrada Ensayo (%)	Dif. Abs. (%)	Criterio	Cumple/ No cumple
Crema	1.0318	339257.06	99.94	337156.30	99.32	**0.62**	≤ 2.0	**Cumple**

Tabla 47. Resultados de muestras filtradas a través de filtro para jeringa SLHV033NK Millex® HV con membrana Durapore.

Solución muestra	Peso muestra (g)	Area (µVsec)	Centrifugada Ensayo (%)	Área (µVsec)	Filtrada Ensayo (%)	Dif. Abs. (%)	Criterio	Cumple/ No cumple
Crema	1.0318	339257.06	99.94	336623.55	99.16	**0.78**	≤ 2.0	**Cumple**

Tabla 48. Resultados de muestras filtradas a través de filtro para jeringa SLHVM25NK PVDF con prefiltro de fibra de vidrio, 25 mm.

Solución muestra	Peso muestra (g)	Area (µVsec)	Centrifugada Ensayo (%)	Area (µVsec)	Filtrada Ensayo (%)	Dif. Abs. (%)	Criterio	Cumple/ No cumple
Crema	1.0318	339257.06	99.94	338118.91	99.60	**0.34**	≤ 2.0	**Cumple**

Tabla 49. Resultados de prueba de Adecuabilidad del sistema.

PRUEBA DE ADECUABILIDAD DEL SISTEMA						
	Especificidad (No degradada)	**Precisión Intermedia A1**	**Exactitud y Linealidad**	**Estabilidad de soluciones Día-8**	**Robustez (Preparación muestra)**	**Precisión Intermedia A2**
Fecha	22NOV17	23NOV17	28NOV17	01DIC17	05DIC17	08DIC17
Result set ID	10161	2662	6284	6101	6401	4577
Concentración de solución de Referencia 1 (mg/mL)	0.009992	0.009998	0.00999	0.009986	0.009994	0.010000
Área promedio de la solución de Referencia 1 µV.seg (n=5)	341974.9	340222.15	338767.83	338391.69	339338.11	354826.85
% RSD de Áreas de solución de Referencia 1 (n=5) ≤ 2.0%	0.17	0.3	0.04	0.15	0.19	0.84
Plaros USP ≥ 4000	13073	13156	13371	13584	13566	16485
Coleo USP ≤ 1.5	1.11	1.11	1.12	1.12	1.12	1.16
Concentración de solución de Referencia 2 (mg/mL)	0.009994	0.00999	0.00999	0.009992	0.00999	0.009992
Área promedio de la solución de Referencia 2 µV.seg (n=2)	339330.01	338815.19	336601.45	337915.06	341204.84	348343.51
Recobro promedio de Solución de Referencia 2	100.1	99.67	99.36	99.8	100.59	98.25
Área promedio de Solución de Referencia 1 (Verificadores) µV.seg (n=2)	344387.01	341408.03	340399.91	341862.61	340486.97	356480.7
% RSD Área de todas las soluciones estándar inyectadas en el sample set	0.33	0.40	0.26	0.51	0.37	0.82

Recobro promedio de Verificadores	100.1	100.35	100.48	101.03	100.34	100.47

Tabla 50. Resultados de prueba de Adecuabilidad del sistema (continuación).

PRUEBA DE ADECUABILIDAD DEL SISTEMA						
	Robustez (Cromatográfica) $ACN:H_2O:H_3PO_4$ (850:150:1)	**Robustez** (Cromatográfica) $ACN:H_2O:H_3PO_4$ (950:50:1)	**Robustez** (Cromatográfica) $ACN:H_2O:H_3PO_4$ (900:100:0.5)	**Robustez** (Cromatográfica) $ACN:H_2O:H_3PO_4$ (900:100:0.5)	**Robustez** (Cromatográfica) Velocidad de flujo: 0.8 mL/min	**Especificidad** (Degradación Térmica y Foto)
Fecha	04ENE18	04ENE18	05ENE18	05EN18	06ENE18	07ENE18
Result set ID	8085	8085	8519	8519	8613	8692
Concentración de solución de Referencia 1	0.009992	0.009992	0.009992	0.009992	0.009992	0.009992
Área promedio de la solución de Referencia 1	345548.9	351772.17	349464.92	351072	434850.81	350951.16
% RSD de Áreas de solución de Referencia 1	0.19	0.15	0.41	0.39	0.18	0.11
Plaros USP ≥ 4000	8531	13175	10830	10749	11658	10554
Coleo USP ≤ 1.5	1.07	1.02	1.05	1.05	1.05	1.05
Concentración de solución de Referencia 2	0.009988	0.009988	0.009988	0.009988	0.009988	0.009988
Área promedio de la solución de Referencia 2	340185.98	344770	348359.85	349142.74	433749.17	349943.75
Recobro promedio de Solución de Referencia 2	98.49	98.05	99.72	99.49	99.79	99.75
Área promedio de Solución de Referencia 1 (Verificadores)	346921.47	351743.54	348642.28	351966.08	433858.27	345504.33

% RSD Área de todas las soluciones estándar	0.25	0.15	0.38	0.34	0.18	0.77
Recobro promedio de Verificadores	100.4	99.99	99.76	100.25	99.77	98.45

Tabla 51. Resultados de prueba de Adecuabilidad del sistema (continuación).

PRUEBA DE ADECUABILIDAD DEL SISTEMA		
	Estudio de filtración	**Robustez (Cromatográfica) Velocidad de flujo: 1.2 mL/min**
Fecha	09ENE18	12ENE18
Result set ID	9796	9429
Concentración de solución de Referencia 1 (mg/mL)	0.009992	0.009998
Área promedio de la solución de Referencia 1 µV.seg (n=5)	328737.94	273259.17
% RSD de Áreas de solución de Referencia 1 (n=5) ≤ 2.0%	0.18	0.1
Plaros USP ≥ 4000	14031	13711
Coleo USP ≤ 1.5	1.08	1.09
Concentración de solución de Referencia 2 (mg/mL)	0.009988	0.009996
Área promedio de la solución de Referencia 2 µV.seg (n=2)	329243.98	273383.08
Recobro promedio de Solución de Referencia 2 98.0 – 102.0%	100.19	100.07
Área promedio de Solución de Referencia 1 (Verificadores) µV.seg (n=2)	332367.39	274074.35
% RSD Área de todas las soluciones estándar inyectadas en el sample set µV.seg (n=5+X inyecciones de Verificadores)	0.56	0.18

Recobro promedio de Verificadores **97.0 – 103.0 %**	101.1	100.3

7.0 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

- El método es específico para el antioxidante porque el espectro y cromatogramas obtenidos en la prueba de especificidad demuestran que no hay picos que coeluyan con el analito de interés a 220 nm en las condiciones cromatográficas establecidas en este reporte. El método es adecuado para la identificación del antioxidante basada en tiempo de retención y una segunda identificación con LC-PDA.
- Los resultados se encuentran dentro de los criterios de aceptación en los 3 niveles de concentración para el antioxidante, en el intervalo de concentración de 0.006 mg/mL (60%, w/w), 0.01 mg/mL (100%, w/w) y 0.014 mg/mL (140%, w/w), por lo tanto, se considera que el método proporciona resultados exactos para la cuantificación del antioxidante bajo las condiciones cromatográficas establecidas en este reporte.
- Los resultados de la prueba de precisión (Repetibilidad del Sistema, Repetibilidad del Análisis y Precisión Intermedia) cumplen los criterios establecidos para el análisis de cuantificación del antioxidante en la crema de uso tópico , siendo precisos y reproducibles los resultados obtenidos entre analistas para el antioxidante, concluyéndose que el método es adecuado para reproducirse en el Laboratorio de Control de Calidad para el análisis de rutina, en las condiciones establecidas en este reporte.
- Se cumplen todos los criterios de aceptación, demostrando la linealidad del método para la cuantificación del antioxidante en la crema de uso tópico bajo las condiciones establecidas en este reporte.
- Los resultados de Exactitud, Precisión y Linealidad demuestran que el método es Exacto, Preciso y Lineal en el Intervalo analizado bajo las condiciones establecidas en este reporte
- Con los resultados reportados en tablas previas de esta sección podemos concluir lo siguiente:

  Un valor máximo de 1.5 es establecido como criterio de aceptación de Adecuabilidad del sistema para factor de simetría en la primera inyección de solución de referencia replica 1 de 5.

  La Desviación Estándar Relativa (%RSD) para áreas del antioxidante es establecido como máximo 2.0 de 5 inyecciones sucesivas de Solución de Referencia 1

El intervalo de mínimo 97.0% y máximo 103.0% es establecido como criterio de aceptación de Adecuabilidad del Sistema para el porcentaje de recobro del antioxidante en la solución de Referencia 2 (Check).

El valor de ensayo para el antioxidante de las diferentes preparaciones de muestra está dentro del 3.0% de diferencia absoluta comparado con el valor nominal.

La robustez del método es demostrada probando la validez del método antes cambios pequeños y deliberados a los parámetros del método.

- La Estabilidad de la Solución es demostrada para la solución de Referencia al 100% y solución muestra durante un periodo de 8 días, almacenado a temperatura ambiente y en refrigeración en matraces volumétricos transparentes.

  La Estabilidad de la Solución es demostrada para la Fase Móvil durante un periodo de 19 días a temperatura ambiente.
- El estudio de filtración demostró ausencia de adsorción significativa del antioxidante al lecho filtrante estudiado.

8.0 CONCLUSIÓN

1. Los resultados muestran que la validación del método analítico para la identificación y ensayo de un antioxidante en crema de aplicación tópica, es un método específico, lineal, exacto, preciso y robusto para la predefinida variable en preparación de la muestra y condiciones cromatográficas establecidas acorde a las especificaciones farmacopeicas.

2. El antioxidante es estable bajo condiciones a temperatura ambiente y bajo condiciones de refrigeración por un periodo de tiempo relativamente prolongado, asegurando la calidad del producto.

3. El antioxidante logró ser detectado con una buena señal de respuesta, desde concentraciones muy pequeñas y muy altas en cuanto a la concentración normal del producto.

4. El antioxidante logró ser cuantificado con unos excelentes recobros del antioxidante, desde concentraciones muy pequeñas y muy altas en cuanto a la concentración normal del producto.

5. El método analítico para la identificación y ensayo del antioxidante en una crema tópica es reproducible teniendo resultados similares entre analistas

6. Este método puede aplicarse para fines de control de calidad y estabilidad, así como para la identificación y el ensayo del antioxidante en la crema de uso tópico.

9.0 BIBLIOGRAFÍA

1. Becker, R. A. (2009). Good Laboratory Practices and Safety Assessments *Environmental Health Perspectives, 117*, A482-A485. doi:10.1289/ehp.0900884
2. Comercio, P. M. I. y. (2018). La industria farmacéutica en México. *Secretaria de Economía*, 15.
3. Daksh, S., et. al. (2015). Validation of analytical methods-strategies and significance. *International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences 4*, 1489-1497.
4. Ermer, J. M., J. H. McB. (2005). Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice. In W. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (Ed.), (pp. 411).
5. Eserian, K. J., et. al. (2015). Method validation in pharmaceutical analysis: from theory to practical optimization. *INNOVATIONS in pharmacy, 6*, 1-3.
6. Khushboo, D. S., et. al. (2014). Overview of validation and basic concepts of process validation. *Scholars Academic Journal of Pharmacy, 3*, 178-190.
7. Malviya, R., et. al. (2010). High performance liquid chromatography: a short review. *Journal of Global Pharma Technology, 2*, 22-26.
8. Mcpolin, O. (2009). *Validation of analytical methods for pharmaceutical analysis* (M. T. Services Ed.).
9. Patel, K. T. C., N. P. (2008). Pharmaceutical GMP: past, present, and future – a review. *Pharmazie, 63*, 251-255.
10. ProMéxico. (2015). *Industria Farmacéutica. Unidad de inteligencia de Negocios*. Retrieved from file:///C:/Users/amor/Desktop/Amor/INTRODUCCIÓN/111115_DS_Farmaceutico.pdf
11. Rajput, D., et. al. (2013). Validation of Analytical Methods for Pharmaceutical Analysis *International Journal of Pharmaceutical Erudition, 3*, 31-40.

12. Sabir, A. M., et. al. (2013). HPLC method development and validation: a review. *International research journal of pharmacy, 4*, 39-46. doi:10.7897/2230-8407.04407
13. Salomón, A. (2006). La industria farmacéutica en México. *Comercio exterior, Horizonte Sectorial, 56*, 13.
14. Siddiqui, M. R., , et. al. (2017). Analytical techniques in pharmaceutical analysis: a review. *Arabian journal of chemistry, 10*, S1409.
15. Singh, S. P. e. a. (2016). A Review on Process Validation. *PharmaTutor, 4*, 1-19.
16. Tait, K. (2012). Industria farmacéutica *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*.
17. Thammana, M. (2016). A review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Journal of pharmaceutical analysis, 5*(2), 22-28.
18. Becker, R. A. (2009). Good Laboratory Practices and Safety Assessments *Environmental Health Perspectives, 117*, A482-A485. doi:10.1289/ehp.0900884
19. Comercio, P. M. I. y. (2018). La industria farmacéutica en México. *Secretaria de Economía*, 15.
20. Daksh, S., et. al. (2015). Validation of analytical methods-strategies and significance. *International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences 4*, 1489-1497.
21. Ermer, J. M., J. H. McB. (2005). Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice. In W. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (Ed.), (pp. 411).
22. Eserian, K. J., et. al. (2015). Method validation in pharmaceutical analysis: from theory to practical optimization. *INNOVATIONS in pharmacy, 6*, 1-3.
23. Khushboo, D. S., et. al. (2014). Overview of validation and basic concepts of process validation. *Scholars Academic Journal of Pharmacy, 3*, 178-190.
24. Malviya, R., et. al. (2010). High performance liquid chromatography: a short review. *Journal of Global Pharma Technology, 2*, 22-26.
25. Mcpolin, O. (2009). *Validation of analytical methods for pharmaceutical analysis* (M. T. Services Ed.).
26. Patel, K. T. C., N. P. (2008). Pharmaceutical GMP: past, present, and future – a review. *Pharmazie, 63*, 251-255.
27. ProMéxico. (2015). *Industria Farmacéutica. Unidad de inteligencia de Negocios*. Retrieved from file:///C:/Users/amor/Desktop/Amor/INTRODUCCIÓN/111115_DS_Farmaceutico.pdf
28. Pública, C. d. C. C. d. E. S. y. d. O. (2010). *Situación del sector farmacéutico en México*. Retrieved from file:///C:/Users/amor/Desktop/Amor/INTRODUCCIÓN/Situacion_del_sector_farmaceutico_en_Mexico%20(1).pdf
29. Rajput, D., et. al. (2013). Validation of Analytical Methods for Pharmaceutical Analysis *International Journal of Pharmaceutical Erudition, 3*, 31-40.
30. Sabir, A. M., et. al. (2013). HPLC method development and validation: a review. *International research journal of pharmacy, 4*, 39-46. doi:10.7897/2230-8407.04407
31. Salomón, A. (2006). La industria farmacéutica en México. *Comercio exterior, Horizonte Sectorial, 56*, 13.
32. Siddiqui, M. R., , et. al. (2017). Analytical techniques in pharmaceutical analysis: a review. *Arabian journal of chemistry, 10*, S1409.
33. Singh, S. P. e. a. (2016). A Review on Process Validation. *PharmaTutor, 4*, 1-19.
34. Tait, K. (2012). Industria farmacéutica *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*.
35. Thammana, M. (2016). A review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Journal of pharmaceutical analysis, 5*(2), 22-28.