

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS  
AMÉRICAS**

**CARRERA DE LICENCIATURA EN FARMACIA**

**DETERMINACIÓN DEL PERÍODO DE VIGENCIA DE  
SOLUCIONES DE REFERENCIA PARA SUSTANCIAS  
RELACIONADAS PREPARADAS EN EL LABORATORIO DE  
CONTROL DE CALIDAD DE CALOX, COSTA RICA  
DURANTE EL III CUATRIMESTRE DEL 2016**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE LICENCIATURA EN FARMACIA**

**Autor:**

**ADRIANA CASTRO VALENCIANO**

**Tutora:**

**IRELIS ÁLVAREZ DÍAZ**

**SEDE CENTRAL, ARANJUEZ,**

**ABRIL, 2017**

## CONTENIDO

RESUMEN EJECUTIVO .....	8
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	9
Planteamiento del problema.....	9
Objetivos.....	10
Objetivo General .....	10
Objetivos Específicos .....	10
Justificación .....	10
Antecedentes .....	12
Historia .....	12
Antecedentes Internacionales .....	13
Antecedentes Nacionales .....	15
Proyecciones .....	17
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO .....	18
Control de Calidad .....	18
Sistema de Calidad .....	18
Buenas Prácticas de Manufactura .....	19
Buenas Prácticas de Laboratorio.....	20
Estabilidad .....	21
Estudios de estabilidad.....	21
Tipos de estudios de estabilidad .....	23
Protocolo de los estudios estabilidad.....	25
Frecuencia de análisis para los estudios estabilidad.....	26
Condiciones de almacenamiento para los estudios de estabilidad.....	26
Factores que influyen en la estabilidad.....	28
Fecha de expira .....	29
Estándares de referencia.....	29
Sustancias Relacionadas.....	31
Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) .....	33
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO .....	41
Enfoque .....	41

Diseño de la investigación .....	41
Muestra de la investigación .....	43
VARIABLES.....	44
Instrumentos.....	45
Proceso para la recolección de datos .....	46
Método de análisis.....	47
CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	48
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	84
Conclusiones .....	84
Recomendaciones.....	86
BIBLIOGRAFÍA.....	88
APÉNDICES .....	91
Apéndice A. Procedimiento Estándar Operativo: Análisis de riesgo cuantitativo, cualitativo y matriz de selección.....	91
Apéndice B. Protocolo de Verificación del Período de Vigencia de una Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas.....	92
Apéndice C. Protocolo de Preparación de Soluciones de Referencia de Sustancias Relacionadas del producto A-3 para la Verificación del Período de Vigencia.....	97
Apéndice D. Protocolo de Preparación de Soluciones de Referencia de Sustancias Relacionadas del producto L-1 para la Verificación del Período de Vigencia.....	100
Apéndice E. Protocolo de Preparación de Soluciones de Referencia de Sustancias Relacionadas del producto E-3 para la Verificación del Período de Vigencia.....	103
Apéndice F. Protocolo de Preparación de Soluciones de Referencia de Sustancias Relacionadas del producto I-3 para la Verificación del Período de Vigencia .....	106
Apéndice G. Protocolo de Preparación de Soluciones de Referencia de Sustancias Relacionadas del producto L-7 para la Verificación del Período de Vigencia.....	109
Apéndice H. Protocolo de Preparación de Soluciones de Referencia de Sustancias Relacionadas del producto G-2 para la Verificación del Período de Vigencia.....	113
Apéndice I. Fecha de Verificación del Cromatográfico Líquido Shimadzu LC-2030 3D.....	116
Apéndice J. Reporte de Verificación de la Columna C8 Symmetry 4,6mmx250mm, 5µm. ....	116
Apéndice K. Reporte de Verificación de la Columna C18 Symmetry 4,6mm x 250mm, 5µm.....	117
Apéndice L. Reporte de Verificación de la Columna C18 XBridge 4,6mm x 150mm, 3,5µm. ....	118
Apéndice M. Reporte de Verificación de la Columna C18 Zorbax 4,6mm x 250mm, 3,5µm. ....	119
Apéndice N. Cromatogramas Iniciales y Finales obtenidos en la Aplicación del Protocolo de Verificación del Período de Vigencia en las Soluciones de Referencia para Sustancias Relacionadas. ....	120

## CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1. Zonas Climáticas.....	22
Tabla 2. Condiciones de Almacenamiento para los Estudios de Estabilidad.....	27
Tabla 3. Parámetros del Sistema Cromatográfico que Permiten Variaciones y Detalles del Cambio Permitido.....	40
Tabla 4. Operacionalización de Variables.....	44
Tabla 5. Criterios de la Matriz de Selección.....	48
Tabla 6. Matriz de Selección.....	49
Tabla 7. Razones entre las Concentraciones de los Componentes de la Solución de Referencia de A-3 y las Áreas obtenidas en Análisis Inicial y a los Días de Almacenamiento.....	54
Tabla 8. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto A-3 que fueron Evaluados a los 7 Días de Almacenamiento.....	56
Tabla 9. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto A-3 que fueron Evaluados a los 14 Días de Almacenamiento.....	57
Tabla 10. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto A-3 que fueron Evaluados a los 35 Días de Almacenamiento.....	58
Tabla 11. Razones entre las Concentraciones de los Componentes de la Solución de Referencia de E-3 y las Áreas obtenidas en Análisis Inicial y a los Días de Almacenamiento.....	59
Tabla 12. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto E-3 que fueron Evaluados durante los 7 Días de Almacenamiento.....	60
Tabla 13. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto E-3 que fueron Evaluados durante los 14 Días de Almacenamiento.....	61
Tabla 14. Razones entre las Concentraciones de los Componentes de la Solución de Referencia de L-1 y las Áreas obtenidas en Análisis Inicial y a los Días de Almacenamiento.....	62
Tabla 15. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto L-1 que fueron Evaluados durante los 14 Días de Almacenamiento.....	65
Tabla 16. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto L-1 que fueron Evaluados durante los 28 Días de Almacenamiento.....	66

Tabla 17. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto L-1 que fueron Evaluados durante los 56 Días de Almacenamiento.....	67
Tabla 18. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto L-1 que fueron Evaluados durante los 70 Días de Almacenamiento.....	68
Tabla 19. Razón entre la Concentración de la Impureza de I-3 en la Solución de Referencia y las Áreas obtenidas en Análisis Inicial y a los 7 Días de Almacenamiento.....	69
Tabla 20. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto I-3 que fueron Evaluados durante los 7 Días de Almacenamiento.....	69
Tabla 21. Razones entre las Concentraciones de los Componentes de la Solución de Referencia de L-7 y las Áreas obtenidas en Análisis Inicial y a los Días de Almacenamiento.....	71
Tabla 22. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto L-7 que fueron Evaluados a los 7 Días de Almacenamiento.....	74
Tabla 23. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto L-7 que fueron Evaluados a los 14 Días de Almacenamiento.....	75
Tabla 24. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto L-7 que fueron Evaluados a los 28 Días de Almacenamiento.....	76
Tabla 25. Razón entre la Concentración del Compuesto Relacionado F en la Solución de Referencia de G-2 y las Áreas obtenidas en Análisis Inicial y a los Días de Almacenamiento.....	77
Tabla 26. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto G-2 que fueron Evaluados a los 7 días de Almacenamiento.....	78
Tabla 27. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto G-2 que fueron Evaluados a los 14 Días de Almacenamiento.....	79
Tabla 28. Período de Vigencia y Condiciones de Almacenamiento establecidas para las Soluciones de Referencia para Sustancias Relacionadas.....	80

## CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1. Asa de Muestreo para HPLC de Inyección Manual.....	35
Figura 2. Celda de flujo para un Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia.....	35
Figura 3. Configuración de un Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia.....	36
Figura 4. Cromatograma obtenido mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.....	36
Figura 5. Curva de Pureza.....	39
Figura 6. Gráfico de Pureza.....	39
Figura 7. Hoja de Excel utilizada en el Procesamiento de Datos.....	47
Figura 8. Diagrama de Pareto con los Elementos de Estudio.....	50
Figura 9. Tendencia de la Temperatura del Congelador durante el Período de Almacenamiento de las Soluciones de Referencia.....	51
Figura 10. Tendencia de la Temperatura del Refrigerador durante el Período de Almacenamiento de las Soluciones de Referencia.....	52
Figura 11. Tendencia de la Temperatura Ambiente durante el Período de Almacenamiento de las Soluciones de Referencia.....	53
Figura 12. Razones entre la Concentración de A-3 en la Solución de Referencia y las Áreas obtenidas en Análisis Inicial y a los Días de Almacenamiento.....	54
Figura 13. Razones entre la Concentración de Compuesto Relacionado A de A-3 en la Solución de Referencia y las Áreas obtenidas en Análisis Inicial y a los Días de Almacenamiento.....	55
Figura 14. Razones entre la Concentración de L-1 en la Solución de Referencia y las Áreas obtenidas en Análisis Inicial y a los Días de Almacenamiento.....	63
Figura 15. Razones entre la Concentración de Compuesto Relacionado A de L-1 en la Solución de Referencia y las Áreas obtenidas en Análisis Inicial y a los Días de Almacenamiento.....	64
Figura 16. Razones entre la Concentración de L-7 (a) en la Solución de Referencia y las Áreas obtenidas en Análisis Inicial y a los Días de Almacenamiento.....	71
Figura 17. Razones entre la Concentración de L-7 (b) en la Solución de Referencia y las Áreas obtenidas en Análisis Inicial y a los Días de Almacenamiento.....	72

Figura 18. Razones entre la Concentración de Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina en la Solución de Referencia y las Áreas obtenidas en Análisis Inicial y a los Días de Almacenamiento.....	73
Figura 19. Razón entre la Concentración del Compuesto Relacionado F en la Solución de Referencia de G-2 y las Áreas obtenidas en Análisis Inicial y a los Días de Almacenamiento.....	77

### **Lista de Abreviaturas y Siglas empleadas**

BPL: Buenas Prácticas de Laboratorio

BPM: Buenas Prácticas de Manufactura

CR: Compuesto Relacionado

FDA: Food and Drug Administration

FN: Formulario Nacional

HR: Humedad Relativa

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia

ICH: Internacional Conference of Harmonization (Conferencia Internacional de Armonización)

LCS: Límite de Control Superior

LCI: Límite de Control Inferior

OMS: Organización Mundial de la Salud

Pond.: Ponderado

Ptos: Puntos

RTCA: Reglamento Técnico Centroamericano

USP: United States Pharmacopeia (Farmacopea de Estados Unidos)

## RESUMEN EJECUTIVO

La presente investigación tiene como título “Determinación del Período de Vigencia de Soluciones de Referencia para Sustancias Relacionadas preparadas en el Laboratorio de Control de Calidad de Calox, Costa Rica durante el III cuatrimestre del 2016”.

Para el registro de los medicamentos ante autoridades sanitarias se le solicita al laboratorio fabricante, entre otras pruebas analíticas, la identificación y cuantificación de las sustancias relacionadas en el medicamento. Esta prueba se realiza empleando soluciones de referencia preparados con estándares oficializados por una farmacopea farmacéutica, estos tienen un alto costo económico y una cantidad mínima que usualmente permite una única preparación.

Para reducir los costos, facilitar el trabajo del analista y acortar las brechas de tiempo de aprobación del producto terminado y su liberación al mercado, el Laboratorio de Control de Calidad de Calox, Costa Rica opta por almacenar las soluciones que se preparan con dichos estándares; sin embargo, por Buenas Prácticas de Laboratorio y Buenas Prácticas de Manufactura se debe demostrar que tras el tiempo de almacenamiento aún son aptas para su uso.

Por lo anterior, para la presente investigación se planteó como objetivo general: Determinar del período de vigencia de las soluciones de referencia para sustancias relacionadas preparadas en el laboratorio de Control de Calidad de Calox, Costa Rica, de acuerdo a la selección realizada.

La investigación tiene un enfoque cuantitativo de tipo cuasiexperimental, cuyo principal instrumento es el Protocolo de Verificación del Período de Vigencia de una Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas. Este se ejecutó en seis productos farmacéuticos por un plazo establecido por su propia estabilidad química.

Obteniéndose como conclusiones que la solución L-1 es la que tiene mayor período de vigencia con 56 días si se almacena a una temperatura inferior a 25°C o a una temperatura de -10 a -20°C y la solución G-2 es la que tiene el menor período de vigencia con 7 días si se almacena entre 2 y 8 °C. Las soluciones A-3 y L-7 pueden ser almacenadas por 14 días, a una temperatura inferior a 25°C para A-3 y a una temperatura de 2 a 8 °C para L-7, mientras que las soluciones I-3 y E-3 no son estables y no pueden ser almacenadas.

Debido a que la prueba de sustancias relacionadas es crítica para asegurar la calidad del medicamento, se recomienda que se implemente el estudio con los otros productos que no resultaron seleccionados.

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

### Planteamiento del problema

La identificación y/o cuantificación de las sustancias relacionadas de un medicamento es obligatoria para conseguir su registro sanitario ante el Ministerio de Salud, el principal propósito de la prueba es el control de las impurezas de degradación que surgen durante la síntesis del ingrediente farmacéutico activo o durante el proceso de fabricación de la forma farmacéutica, las cuales tienen límites admitidos bajos y están usualmente vinculados con toxicidad del tratamiento, razón por la cual su análisis cobra importancia. (World Health Organization (WHO), 2007)

El alto costo económico y la frecuente demanda de uso de las sustancias de referencia utilizadas en pruebas como la cuantificación de sustancias relacionadas del fármaco, ha llevado a que el Laboratorio de Control de Calidad de Calox, C.R. opte por almacenar las soluciones que se preparan con dichas sustancias, se tiene como objeto el reducir los costos y facilitar el trabajo del analista, acortando las brechas de tiempo de aprobación del producto terminado y su liberación al mercado.

A pesar de que constituye una práctica usual entre los laboratorios de Control de Calidad de empresas farmacéuticas del país, no existe información alguna para establecer una fecha de vigencia a la solución preparada con un estándar de referencia, así como sus condiciones óptimas de almacenamiento, para garantizar que durante el tiempo en que se almacenó la solución de referencia preparada, ésta todavía conserva sus características físicas y químicas iniciales y es por tanto, apta para el uso como patrón de referencia en la prueba de sustancias relacionadas.

Debido a que la prueba de identificación y/o cuantificación de sustancias relacionadas es una prueba crítica en el Control de Calidad es importante para el laboratorio farmacéutico garantizar que la estabilidad del patrón no sea una variable que afecte el resultado final, llevando a un falso positivo y permite la liberación al mercado de un medicamento que pueda atentar contra la salud del paciente, o al contrario, se obtenga un falso negativo provocando pérdidas para la empresa al rechazar un producto que en realidad se encuentra conforme.

Ante la problemática mencionada se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es el período de vigencia para una solución de referencia de sustancias relacionadas que permite su uso en el Control de Calidad del medicamento tras el tiempo de almacenamiento?

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

Determinar del período de vigencia de las soluciones de referencia para sustancias relacionadas preparadas en el laboratorio de Control de Calidad de Calox, Costa Rica, de acuerdo con la selección realizada.

### **Objetivos Específicos**

1. Diseñar una matriz de selección para la escogencia de la muestra de estudio.
2. Elaborar el protocolo de verificación del período de vigencia de soluciones de referencia para sustancias relacionadas preparadas en el laboratorio de Control de Calidad de Calox, Costa Rica.
3. Ejecutar el protocolo de verificación del período de vigencia de la muestra seleccionada, durante un período de seis meses.
4. Proponer un plan de contingencia y la documentación necesaria para asegurar la calidad de las soluciones de estándares preparadas.

## **Justificación**

El Control de Calidad es una actividad esencial dentro de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) de un laboratorio farmacéutico, ya que permite respaldar a través de información obtenida por diferentes pruebas fisicoquímicas y microbiológicas que los productos tienen los atributos y propiedades idóneos para el propósito al cual está destinado: prevenir, curar o mitigar una determinada patología; es responsabilidad del laboratorio garantizar que los resultados sean íntegros, confiables, reproducibles y de calidad mediante el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).

La Farmacopea de Los Estados Unidos y la Farmacopea Británica son las principales referencias utilizadas por los laboratorios de Control de Calidad de los medicamentos, estas farmacopeas establecen en sus monografías las pruebas, procedimientos y criterios de aceptación para un principio activo y sus formas farmacéuticas, y constituyen libros oficiales

reconocidos por el Ministerio de Salud para el registro sanitario de medicamentos en el país, a través de la Ley General de Salud y según lo decretado en el Reglamento Técnico Centroamericano 11.03.59:11: Productos Farmacéuticos. Medicamentos de Uso Humano. Requisitos De Registro Sanitario.

En la ejecución de las pruebas se solicita que se utilice un estándar de referencia de una fuente oficial reconocida, estos estándares corresponden a sustancias certificadas por la Food and Drug Administration (FDA) o por la Comunidad Económica Europea, envasadas en pequeñas cantidades y con un alto costo económico, es indispensable para ensayos fisicoquímicos que involucren identificación y/o cuantificación del fármaco o de otros compuestos relacionados a él.

Debido a la necesidad de reducir el presupuesto destinado a la compra de las sustancias de referencia, el Laboratorio de Control de Calidad de Calox, Costa Rica requiere de un protocolo para evaluar los tiempos de estabilidad de las soluciones preparadas con dichas sustancias. El protocolo que se desarrollará con la investigación servirá para establecer una fecha de vigencia y sus condiciones de almacenamiento, de manera que su uso garantice el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Laboratorio y de Manufactura.

La investigación contribuirá con un protocolo para la evaluación de los tiempos de estabilidad de las soluciones de referencia preparadas para la identificación y/o cuantificación de sustancias relacionadas, siendo aplicable a cualquier otra sustancia de referencia y consistente con las BPL según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la ISO 17025, las BPM de industrias farmacéuticas, así como la normativa C(2002) 3044 Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados.

Este proyecto se considera conveniente ya que, al implementarlo en los laboratorios, se podrían almacenar las soluciones de referencia durante un plazo determinado, reduce la necesidad de comprar frecuentemente las sustancias de referencia, optimizándose el tiempo de análisis del medicamento y su consecuente aprobación, al ahorrarse el tiempo de la preparación de las soluciones, y minimizándose a la vez los desechos químicos generados por el laboratorio.

Además, con la investigación se beneficiarían no solo los laboratorios farmacéuticos del país, sino también los laboratorios de diferentes áreas industriales que utilicen sustancias de referencia en su Control de Calidad. También podría implementarse en las Universidades

Públicas y Privadas del país, en los laboratorios académicos o de investigación donde se utilicen soluciones de referencia. Debido a los beneficios que se obtendrían y a la disposición los recursos y tiempo necesarios para llevar a cabo la investigación, ésta se considera viable.

## **Antecedentes**

### **Historia**

La calidad de los medicamentos adquirió una dimensión mundial después del establecimiento de la OMS en 1948 y especialmente en 1951 cuando el Consejo Ejecutivo de la OMS adoptó la resolución EB7.R79 en la cual se solicitó examinar las ventajas que presentaría para la salud y para el comercio internacional la aplicación en los distintos países de métodos de inspección más uniformes en los procesos de fabricación y control de calidad de los medicamentos (Organización Mundial de la Salud (OMS), 1999, párr. 2).

La estabilidad de un medicamento es una característica intrínseca a su calidad y empieza a ser de interés para el farmacéutico cuando pasan de las preparaciones magistrales, las cuales se conservaban por lapsos cortos (días), a preparados farmacéuticos estandarizados que se almacenaban por mayor tiempo (años) antes de ser adquirido por el paciente. Para demostrar su estabilidad se empezó a recurrir a estudios cinéticos, ya que se demostró que la inestabilidad es un proceso dinámico y se puede describir en términos de la velocidad de cambio del medicamento con el paso del tiempo. (Fonseca y Berrocal, 1956, p.49.)

En 1994 se publica una de las primeras guías para realizar estudios de estabilidad a los medicamentos, creada por International Conference of Harmonization (ICH) y que se denominó en inglés como "ICH Topic Q1A. Stability Testing Guidelines: Stability testing of New Drug Substances and Products", en la que se estableció que la estabilidad del medicamento debía ser demostrada ante diferentes condiciones ambientales de temperatura, humedad y luz, y reevaluada en varios periodos para establecer su fecha de expira.

Esta guía aplicaba únicamente en Estados Unidos, Japón y Europa como un requisito para conseguir el registro del producto; sin embargo, fue la base para que se crearan otras normativas que vinculaban a más regiones, uniformando los criterios y requisitos de un estudio de estabilidad, lo que se fue acatando en Costa Rica tras la participación del Ministerio de Salud en la creación del Reglamento Técnico Centroamericano sobre estudios de estabilidad de medicamentos de uso humano en el año 2009 en su primera actualización.

## **Antecedentes Internacionales**

Como parte del Control de Calidad de los medicamentos está su estudio de estabilidad, las primeras pautas para realizar un estudio se definieron en 1994 en la guía Q1A por el Consejo Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH: International Conference of Harmonization), que para el año 2003 publicó la guía Q1A(R2): "Stability Testing of New Drug Substances and Products", en la cual recomienda las condiciones de almacenamiento intermedias para las zonas I y II y las condiciones de largo plazo para las zonas III y IV.

Hasta el año 2002 se emitió por parte de la OMS en la serie de informes Técnicos. No.902 un informe donde se incluía el Anexo 3 denominado Buenas prácticas para Laboratorios Nacionales de Control Farmacéutico, con el objetivo de proporcionar una guía detallada para los laboratorios que realizan control de calidad de medicamentos, basados en requisitos de las Guías de la OMS para las Buenas Prácticas de Fabricación y en requisitos de la norma internacional ISO/IEC 17025: Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.

Un elemento fundamental en las Buenas Prácticas de Laboratorio es la confiabilidad de los resultados analíticos que se reportan, razón por la cual la Comisión Europea publicó en el diario Oficial N° L 221 del año 2002 su decisión en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados, proporcionando criterios que se basan en la norma internacional ISO/IEC 17025 y que constituyen una guía para realizar las pruebas analíticas del control de calidad de los medicamentos.

Las Buenas Prácticas de Laboratorio son parte esencial de las BPM para la Industria Farmacéutica, las cuales establecen las directrices que regulan las actividades involucradas con la producción de los medicamentos, con la finalidad de asegurar su calidad, seguridad y eficacia, reglamento que se aprobó por el Consejo de Ministros de Integración Económica en el año 2007 bajo el nombre de Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 11.03.42:07: Productos Farmacéuticos. Medicamentos de uso humano. Buenas Prácticas de Manufactura para la Industria Farmacéutica.

En este mismo año, se publicó el RTCA 11.03.47:07: Productos Farmacéuticos. Medicamentos para uso humano. Verificación de la calidad, el cual especifica las pruebas analíticas que debe realizar el laboratorio fabricante a los medicamentos para demostrar que

son de calidad. Estas pruebas analíticas se realizan de acuerdo a las especificaciones individuales de cada producto indicadas por las farmacopeas oficiales y tienen carácter obligatorio para obtener el registro sanitario del medicamento ante el Ministerio de Salud.

Toda industria farmacéutica, como parte de las BPM, debe realizar estudios de estabilidad a los medicamentos en su sistema de envase-cierre seleccionado y bajo condiciones de almacenamiento controladas, durante el período en que espera que el producto permanezca dentro de las especificaciones aprobadas. En Costa Rica, la estabilidad de los medicamentos se evalúa a través de un estudio fisicoquímico y microbiológico en condiciones aceleradas y naturales de almacenamiento según el reglamento técnico centroamericano pertinente.

Las pautas de un estudio de estabilidad se definieron desde el año 2010 por el Consejo de Ministros de Integración Económica en la resolución N° 256- 2010 (COMIECO-LIX) del RTCA 11.01.04:10 Productos Farmacéuticos. Estudios de estabilidad de medicamentos para uso humano; este reglamento que establece las condiciones necesarias para llevar a cabo los estudios de estabilidad de medicamentos, determinar su período de validez y sus condiciones de almacenamiento.

En dicho reglamento los requisitos que se establecen para los estudios de estabilidad están dirigidos hacia los medicamentos de uso humano que se fabriquen o importen en el país, no es aplicable a los suplementos dietéticos o nutricionales, preparaciones magistrales, productos homeopáticos, radiofármacos y naturales medicinales (Consejo de Ministros de Integración Económica, 2010, p.3). En cuanto a los estándares de referencia no se establece el requisito de evaluarle su estabilidad, ya que no tienen fecha de caducidad mientras el lote se encuentre vigente ante la farmacopea de referencia. (USP, 2016)

Generalmente se establece como fecha de caducidad un año después de que se encuentre un nuevo lote vigente, una vez que un estándar de referencia se abre y queda un remanente para un subsecuente uso, la Farmacopea de los Estados Unidos (o USP por su nombre en inglés) establece que debe almacenarse con los cuidados que se definan en procedimientos del laboratorio, pero debido a que hay variables que exceden el control de la USP, no se garantiza la aptitud permanente de los Estándares de Referencia abiertos previamente y su uso queda a responsabilidad del usuario. (USP, 2016)

En lo respectivo a las soluciones que se preparen con estándares de referencia no se solicita estudio de estabilidad debido a que se consideran preparaciones de un único uso,

además dependiendo de la cantidad necesitada para una prueba de Control de Calidad que requiera de un determinado estándar de referencia, este puede ser utilizado para más de una preparación, por lo que no existen indicaciones sobre el almacenamiento de estas soluciones para su posterior uso. (USP, 2016)

### **Antecedentes Nacionales**

Los estudios de estabilidad se aplican en medicamentos fabricados en el país o importados, siendo un requisito de cumplimiento obligatorio para conseguir su registro sanitario y posterior comercialización. La estabilidad puede demostrarse en diferentes sustancias, que no necesariamente tienen una acción terapéutica, como son las soluciones de sustancias de referencia mediante un protocolo de evaluación similar al que se sigue con los medicamentos.

Durante los últimos cinco años las investigaciones realizadas en universidades públicas y privadas que imparten la carrera de Farmacia en Costa Rica, como la Universidad de Costa Rica, la Universidad Latina, la Universidad Internacional de las Américas, la Universidad Iberoamericana y la Universidad de Ciencias Médicas relacionadas con el tema de investigación han sido pocas. A continuación, se describen las investigaciones que se encuentran asociadas al tema de acuerdo a la universidad de procedencia y organizados en forma cronológica.

En el año 2011, Corea investigó en su proyecto de graduación en la Universidad de Costa Rica sobre la estabilidad de preparaciones magistrales de espironolactona, furosemida e hidralazina clorhidrato preparadas en el Hospital México, realizando el análisis organoléptico, de potencia y microbiológico a estas preparaciones a los 1, 7, 15, y 21 días, llegando a la conclusión que tienen una fecha límite de uso de 21 días mientras se mantengan en refrigeración y con protección de la luz.

Para el 2012, Alfaro desarrolló una tesis en la Universidad Internacional de las Américas (UIA) acerca de la validación prospectiva de un cubículo de estabilidad en condiciones naturales, temperatura y humedad constante, en el Laboratorio de Tecnologías Biotecnológicas S.A llegando a la conclusión principal que el cubículo no cumple con los niveles de desempeño para realizar estudios naturales ya que no mantiene uniforme la temperatura y la humedad en las diferentes posiciones del cubículo.

Gamboa realizó en el año 2012 su proyecto de graduación para obtener el título de Farmacia en la UIA acerca de la Validación de un Protocolo de Estabilidad Acelerada en el Laboratorio de Tecnologías Biointegrales concluyendo que los resultados obtenidos con el protocolo con los productos Promemora, Equilibra y Artifin son confiables para la obtención de períodos de validez de dos años y, ningún dato es erróneo y desviado ya que se mantuvieron por debajo del 5%.

En el 2013, Bogantes, D estudiante de farmacia en la UIA, realizó una investigación cuasi-experimental acerca de la estabilidad de la suspensión reconstituida de Claritromicina 250mg/5mL en el Laboratorio farmacéutico Calox durante el período de validez etiquetado, demostrando que el producto conserva su estabilidad durante el período de conservación recomendado y durante el tiempo de validez etiquetado.

En este mismo año, 2013 Mora y Morice, estudiantes de farmacia de la Universidad Iberoamericana, realizaron su tesis sobre un estudio de estabilidad del Diclofenaco Resinato en condiciones aceleradas de almacenamiento, demostrando que los preparados con este principio activo requieren ser conservados en refrigeración para evitar su descomposición y deberían conjugarse con aminos secundarios para perder su capacidad de ciclación que provocaba pérdida de la actividad farmacológica.

Bogantes, M. (2013) realizó su proyecto de graduación de Farmacia en la Universidad de Ciencias Médicas acerca de la creación de un sistema digital para el manejo de estabilidad a largo plazo de productos farmacéuticos sólidos, líquidos y semisólidos se utiliza el programa Excel por ser sencillo para el usuario, ya que facilita cumplir con los requisitos necesarios para el registro del medicamento, ahorra tiempo y aumenta la eficiencia en la documentación del estudio.

En el año 2015, Murillo en su proyecto de graduación de la carrera de Farmacia en la UIA, reformuló el medicamento inyectable Dexadrol 2% p/v de uso veterinario del Laboratorio Faryvet, S.A y adicionalmente le realizó su estudio de estabilidad natural y acelerado, llegando a la conclusión de que los estudios de estabilidad son indispensables para predecir si un medicamento se mantiene estable al pasar del tiempo tras un cambio significativo en la formulación inicial.

También se revisó las tesis en la base de datos de la Universidad Latina sin encontrar en los últimos 5 años alguna tesis relacionada con el tema de investigación; apreciándose que no

es un tema muy frecuentemente estudiado por los estudiantes de la carrera de Farmacia y que la evaluación de la estabilidad se ha limitado a los medicamentos, donde es la primera aplicación del estudio de estabilidad a soluciones de referencia.

### **Proyecciones**

Con la investigación se pretende que el Laboratorio de Control de Calidad de Calox, Costa Rica cuente con un protocolo para la determinación del período de vigencia de soluciones de referencia para sustancias relacionadas que se preparan durante las pruebas de control de calidad de los medicamentos, permitiendo establecer una fecha de expira y condiciones de almacenamiento a las soluciones de referencia seleccionadas en el muestreo tras su evaluación fisicoquímica durante el plazo de seis meses.

La finalidad del protocolo será implementarlo al resto de soluciones de referencia que se preparan en el laboratorio de Control de Calidad, como por ejemplo las que se emplean en las pruebas de límite de impurezas o compuestos relacionados de los medicamentos no seleccionados en el estudio, en la identificación de materias primas y de valoración, disolución y uniformidad de contenido de los productos terminados, así las soluciones de aptitud del sistema utilizadas en Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia y pruebas de verificación de desempeño, de manera que su uso a través del tiempo de almacenamiento garantice el cumplimiento de las BPL y BPM para la Industria Farmacéutica.

## CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

### Control de Calidad

El control por una parte se define como el conjunto de actividades que se realizan sobre una etapa del proceso, con la finalidad de verificar que se encuentra dentro de los límites establecidos por un patrón previamente seleccionado y en caso de no cumplir, ejercer las acciones correctivas y preventivas para alinearlo a lo esperado. El control permite asegurar que la calidad del producto a un tiempo determinado sea la esperada, ya que la calidad no es una característica estática y se ve modificada por múltiples factores. (Acuña, 2012, p.25)

Mientras que la calidad se define como "la naturaleza esencial de un producto y la totalidad de sus atributos y propiedades, las cuales determinan su idoneidad para los propósitos a los cuales se destina", las características de calidad que se buscan en los medicamentos pueden variar de una forma farmacéutica a otra; sin embargo, el objetivo final es que sea seguro y efectivo para el paciente. (Consejo de Ministros de Integración Económica, 2007, p.5)

La Organización Mundial de la Salud (2002) define control de calidad en una industria farmacéutica como "todas las medidas tomadas, incluyendo el establecimiento de especificaciones, muestreo, análisis e informe de análisis, para asegurar que las materias primas, productos intermedios, materiales de envase y productos farmacéuticos cumplan con las especificaciones establecidas para identidad, contenido, pureza y otras características". (p.5)

### Sistema de Calidad

El Sistema de Calidad se encargará de planear, ejecutar, coordinar y controlar todas las actividades cuya realización tiene como objetivo entregar al cliente un producto con la calidad requerida. (Acuña, 2012, p.29.) En las industrias farmacéuticas la gerencia del laboratorio es la que establece, implementa y mantiene el sistema de calidad apropiado al alcance del laboratorio, incluyendo el tipo, rango y volumen de los ensayos, actividades de validación y de verificación. (Organización Mundial de la Salud, 2002, p.2.)

El Sistema de Calidad debe ser revisado sistemática y periódicamente mediante auditorías internas y externas para asegurar la mejora continua del laboratorio y aplicar cualquier medida correctiva necesaria para lograrlo. Los elementos de este sistema deben estar documentados en un manual de calidad disponible al personal del laboratorio para que se

aplique continuamente de manera que se pueda asegurar la calidad de los resultados generados por el laboratorio. (Organización Mundial de la Salud, 2002, p.3.)

Todo elemento del sistema debe estar documentado en procedimientos, instructivos, especificaciones, formularios, registros, entre otros en una extensión que facilite su cumplimiento por parte del personal, de manera que no se afecte la calidad de los resultados. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (2002) "la documentación usada en este sistema de calidad debe ser comunicada, estar disponible para y ser entendida e implementada por el personal apropiado " (p.4).

### **Buenas Prácticas de Manufactura**

Las Buenas Prácticas de Manufactura para la industria farmacéutica, según el Consejo de Ministros de Integración Económica (2007) es el "conjunto de procedimientos y normas destinados a garantizar la producción uniforme de los lotes de productos farmacéuticos que cumplan las normas de calidad", el cumplimiento de estas prácticas para el laboratorio fabricante es obligatorio y necesario para obtener el permiso de funcionamiento por la autoridad sanitaria del país, que en el caso de Costa Rica compete al Ministerio de Salud. (p. 5)

Estas prácticas, normadas en el Reglamento Técnico Centroamericano No. 65.03.44:07, abarcan todos los aspectos vinculados a la producción de los medicamentos, lo que incluye la compra de materias primas, el procesamiento, el acondicionamiento, el empaque, el almacenamiento y la distribución. Establece también requisitos acerca del personal, del diseño del edificio, de las instalaciones, del saneamiento, mantenimiento, documentación y control de calidad, ya que se reconoce que directa o indirectamente pueden afectar la calidad final del producto.

El objetivo de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) es obtener un producto con la calidad requerida y que por lo tanto puede ser comercializado, siendo necesario que se fomente en la empresa la autoevaluación del cumplimiento de las buenas prácticas mediante auditorías, comunicando y entrenado a todo el personal sobre las Buenas Prácticas de Manufactura de manera que se convierta en un estilo de vida. En la industria farmacéutica el departamento encargado de velar porque se cumplan las BPM es el denominado Aseguramiento de la Calidad. (Consejo de Ministros de Integración Económica, 2007)

## **Buenas Prácticas de Laboratorio**

De acuerdo con el Consejo de Ministros de Integración Económica (2007) las Buenas Prácticas de Laboratorio son "el conjunto de normas, procedimientos operativos y prácticas, para garantizar que los datos generados por un laboratorio de Control de Calidad sean íntegros, confiables, reproducibles y de calidad". Su aplicación es un compromiso para cualquier laboratorio de ensayo o calibración y, principalmente para aquellos que se dediquen a la fabricación de productos de consumo humano como los laboratorios fabricantes de medicamentos. (p.4).

La OMS creó desde el año 1999 la guía de Buenas Prácticas de la OMS para Laboratorios de Control de Calidad de Productos Farmacéuticos, publicadas en su versión más reciente en el Anexo 1 de la Serie de Informes Técnicos de la OMS, No. 957, 2010. Esta guía se aplica a laboratorios de control de calidad de medicamentos que deseen obtener la precalificación de OMS para ser un laboratorio de referencia a nivel internacional para el análisis de medicamentos; sin embargo, esto no excluye a los laboratorios de Control de Calidad de Industrias Farmacéuticas privadas, de manera que se pueda dar el reconocimiento mutuo y cooperación entre los laboratorios dedicados a tal fin.

Esta guía se divide en cuatro partes:

- 1) Gestión e Infraestructura que incluye consideraciones sobre la organización y gestión, el sistema de gestión de calidad, el control de documentos, los registros, los equipos procesadores de datos, el personal, las instalaciones, los equipos, instrumentos y otros dispositivos y sobre los contratos.
- 2) Materiales, Equipos, Instrumentos y Otros Dispositivos que incluye directrices sobre los reactivos, las sustancias de referencia y materiales de referencia, la calibración, la verificación del desempeño y calificación de equipos, instrumentos y otros dispositivos y la trazabilidad.
- 3) Procedimientos de Trabajo acerca del ingreso de muestras, hoja de trabajo analítico, validación de procedimientos analíticos, ensayos, evaluación de los resultados de los ensayos, certificado de análisis y muestras retenidas.
- 4) Seguridad.

## **Estabilidad**

La estabilidad se define como la "capacidad que tiene un producto, de mantener por determinado tiempo sus propiedades originales, dentro de las especificaciones establecidas" (Consejo de Ministros de Integración Económica, 2007, p.6.), misma definición que se proporciona en el Reglamento de Estudios de Estabilidad de Medicamentos para Uso Humano, bajo la salvedad que establece que es para la zona climática IV, zona en la cual se encuentra Costa Rica por las condiciones de temperatura y humedad que predominan en el país.

Según la Farmacopea de los Estados Unidos USP 39-NF 34 la estabilidad se define como la capacidad de un producto de mantener dentro de los límites especificados y a lo largo del período de almacenamiento y uso, las propiedades y características que poseía en el momento de su fabricación. (p.1702) La estabilidad puede verse como la aptitud del producto para mantener sus propiedades originales dentro de especificaciones, generalmente evaluada en función de su identidad, concentración, calidad, pureza y apariencia física.

"La inestabilidad del analito o de los constituyentes de la matriz en la muestra durante el almacenamiento o el análisis puede dar origen a desviaciones significativas del resultado del análisis" (Comisión de las Comunidades Europeas, 2002, p18.), razón por la cual la estabilidad de cualquier producto bajo ciertas condiciones de almacenamiento debe ser caracterizada mediante un estudio de estabilidad, de manera que se obtenga información que respalde el tiempo y las condiciones de almacenamiento específicas para el producto; y por lo tanto, se asegure que la estabilidad no afecta los resultados del análisis y la confiabilidad del laboratorio que lo ejecuta.

## **Estudios de estabilidad**

Los estudios de estabilidad corresponden a pruebas que se efectúan para obtener información sobre las condiciones en las que se deben procesar y almacenar un determinado producto, además de determinar su periodo de validez en el envase primario original y en condiciones de almacenamiento específicas. (Consejo de Ministros de Integración Económica, 2010, p.3.) Se define el período de validez como el intervalo de tiempo en que se espera que un medicamento, después de su producción, permanezca dentro de las especificaciones aprobadas. (Consejo de Ministros de Integración Económica, 2010, p.5)

Estos estudios deben incluir ensayos de los atributos de la sustancia farmacológica que son susceptibles a cambiar durante el almacenamiento y que pueden influir en la calidad, la seguridad y/o eficacia. Los estudios de estabilidad deben cubrir las características físicas, químicas, biológicas y microbiológicas a través de procedimientos analíticos validados (International Conference on Harmonisation, 2003, p.2), siguiendo un plan detallado conocido como protocolo de estudio de estabilidad, en el cual se describe como se recolectan y analizan los datos generados durante el período de evaluación.

En la industria farmacéutica se habla de estudios de estabilidad en ingredientes farmacéuticos activos y en productos farmacéuticos terminados, la finalidad principal de los estudios es "establecer el periodo de reanálisis de una materia prima, la vida útil de un producto terminado y las condiciones de almacenamiento recomendadas según la zona de comercialización del medicamento, tal y como se establece dentro de las Buenas Prácticas de Manufactura".(Ministerio de la Protección Social, 2011, p.10)

Debido a que la estabilidad de un producto puede verse afectada por las condiciones climatológicas del lugar donde se comercializa, la International Conference on Harmonisation dividió al mundo en cuatro zonas climáticas para realizar los estudios de estabilidad según las condiciones de temperatura y humedad predominantes, clasificando a los diferentes países entre las cuatro zonas climáticas definidas. A continuación, se proporciona en la tabla 1, las zonas climáticas.

**Tabla 1. Zonas Climáticas.**

Zona climática	Tipo de clima	Temperatura	Humedad Relativa
I	Templado	21 °C ± 2 °C	45% HR ± 5% HR
II	Subtropical/Mediterráneo	25 °C ± 2 °C	60% HR ± 5% HR
III	Cálida seca	30 °C ± 2 °C	35% HR ± 5% HR
IV a	Cálida húmeda/Tropical	30 °C ± 2 °C	65% HR ± 5% HR
IV b	Cálida húmeda	30 °C ± 2 °C	75% HR ± 5% HR

**Fuente: Choudhary (2008) Climatic Zones for Stability Studies.**

Si se tiene a Costa Rica como el lugar de comercialización, el Reglamento de Estabilidad vigente establece que las condiciones a evaluar serán las establecidas en la zona climática IV a, condiciones que corresponderán a un estudio de estabilidad a largo plazo, el cual será efectuado en tres lotes piloto o tres lotes de producción o su combinación, por un período mínimo e igual al período de caducidad tentativo propuesto con un estudio de estabilidad acelerado. (Consejo de Ministros de Integración Económica, 2010, p.7)

### **Tipos de estudios de estabilidad**

Existen dos tipos principales de estudios de estabilidad, los estudios acelerados y los estudios a largo plazo o tiempo real. El Consejo de Ministros de Integración Económica (2010) establece en el RTCA 11.01.04:10 Productos Farmacéuticos. Estudios de Estabilidad de Medicamentos para Uso Humano los siguientes criterios para cada uno:

Los estudios acelerados de estabilidad son estudios diseñados con el fin de aumentar la tasa de degradación química o física de un medicamento, empleando condiciones extremas de almacenamiento. Estos estudios tienen como objeto determinar los parámetros cinéticos de los procesos de degradación o predecir período de validez del medicamento, en condiciones normales de almacenamiento. El diseño de estos estudios puede incluir temperaturas elevadas, altas humedades y exposición a la luz intensa. Los resultados de los estudios acelerados de estabilidad deben ser complementados por los estudios efectuados en condiciones de almacenamiento normales o en condiciones definidas de almacenamiento.

Los estudios de estabilidad a largo plazo (tiempo real) son aquellos en que se evalúan las características físicas, químicas, biológicas o microbiológicas del medicamento durante el periodo de vencimiento, bajo condiciones controladas de almacenamiento. (p.4)

Actualmente los estudios de estabilidad en las industrias farmacéuticas no solamente se ejecutan por motivos regulatorios del país de comercialización, ahora también se realizan en diferentes etapas de vida del producto ya que constituyen un soporte fundamental para el desarrollo de un producto como para la vigilancia de su calidad en la etapa de postmercado. Desde este punto de vista, los estudios de estabilidad se pueden clasificar como: Estudios de estabilidad de Preformulación y Desarrollo de Producto, Estudios de estabilidad para Registro

Sanitario y autorización de comercialización y Estudios de estabilidad en la etapa de Postmercado. (Ministerio de la Protección Social, 2011)

Los objetivos de los estudios de estabilidad de Preformulación y Desarrollo de Producto son identificar la forma de presentación más adecuada y los auxiliares de formulación más compatibles, así como seleccionar el método de producción y las condiciones bajo las que se mantiene la estabilidad de un(os) principio(s) activo(s). Mientras que los estudios para Registro Sanitario y autorización de la comercialización son los ya mencionados estudios de estabilidad acelerados y de largo plazo (Ministerio de la Protección Social, 2011, p.10)

Por otra parte, los estudios postmercado se efectúan cuando se ha realizado un cambio significativo en la formulación, en el proceso productivo o en el envase primario que pueda tener un impacto sobre la calidad el producto, se respaldan inicialmente con un estudio de estabilidad acelerada y posteriormente se ratifican con estudios de largo plazo. De acuerdo con el Ministerio de la Protección Social (2011) es recomendable realizar estos estudios por las siguientes razones:

1. Modificación cualitativa o cuantitativa de una formulación.
2. Cambio de proveedores de materias primas, fundamentalmente el ingrediente farmacéutico activo.
3. Modificaciones en el proceso de manufactura.
4. Cambios de equipos.
5. Cambio de escala de producción.
6. Cambios o modificaciones en las instalaciones físicas y en los sistemas de apoyo crítico del área de fabricación.
7. Cambios o modificaciones en los procedimientos de mantenimiento y limpieza de equipos y áreas de manufactura comprometidas con el producto.
8. Modificación del envase primario y cierre del producto, incluida la modificación del material y su forma.
9. Cambio de envase.
10. Cambio de proveedor de los materiales de envase primario y cierre.
11. Reprocesamiento de productos.
12. De manera periódica programada, como una política de verificación de que todas las etapas relacionadas con la manufactura de un producto, están bajo

control (“on going stability” o de verificación de BPMv o lo que se denomina Estudios de Aseguramiento de Estabilidad”). (p.11)

### **Protocolo de los estudios estabilidad**

Los estudios de estabilidad se deben efectuar siguiendo un protocolo general, que detalle la información que debe suministrarse, cómo debe ejecutarse y finalmente cómo se recolectan y analizan los datos generados durante el período de evaluación. Un protocolo de estabilidad debe contener al menos la siguiente información: el tipo y tamaño de envase, número de lotes, condiciones de almacenamiento, periodicidad de los análisis, cantidad de muestra, análisis a realizar, método analítico, documentación, presentación de resultados, interpretación, discusión y conclusiones. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2004, p.12)

Esta información es la solicitada para los estudios de estabilidad en medicamentos, donde el envase corresponderá a la presentación que se desea comercializar o en su efecto se realiza un estudio individual para cada envase que se desee probar, el número de lotes depende del tipo de producto a comercializar, si es de nueva comercialización o se le ha efectuado un cambio significativo en la formulación o en el proceso se debe efectuar con mínimo 3 lotes consecutivos, si ya es comercializado se debe incluir un lote cada 50 lotes fabricados del mismo producto o un lote al año y si no se le ha efectuado algún cambio significativo se debe efectuar con 2 lotes consecutivos. (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2004, pp.13-14)

La cantidad de muestra debe ser la necesaria para cumplir los análisis a realizar, éstos últimos dependen de la forma farmacéutica en el caso de los medicamentos, en este aspecto el RTCA 11.01.04:10 Productos Farmacéuticos. Estudios de Estabilidad de Medicamentos para Uso Humano establece cuales pruebas deben realizarse; para el caso del método analítico se recomienda recurrir al que proporcione algunas de las farmacopeas de referencia en su última edición como, por ejemplo, la Farmacopea de los Estados Unidos o la Farmacopea Británica, y debe estar validado antes de usarse. (Consejo de Ministros de Integración Económica, 2010).

Finalmente, para las condiciones de almacenamiento y la periodicidad de los análisis se proporciona la información en dos secciones aparte como se menciona a continuación.

### **Frecuencia de análisis para los estudios estabilidad**

En los estudios a largo plazo la frecuencia de las pruebas debe ser suficiente para establecer el perfil de estabilidad, normalmente se realizan cada 3 meses durante el primer año, cada 6 meses durante el segundo año, y posteriormente cada año hasta cumplir el período de caducidad tentativo propuesto (International Conference on Harmonisation, 2003, p.3). Mientras que en Costa Rica se establece que durante el primer año se debe analizar en tiempo inicial, tiempo intermedio y 12 meses, en el segundo año a los 24 meses y en el tercer año cada 12 meses hasta un máximo de 5 años (Consejo de Ministros de Integración Económica, 2010, p. 7).

En las condiciones de almacenamiento acelerado, se recomienda un mínimo de tres puntos de tiempo, incluye punto inicial, final y un punto intermedio (por ejemplo, 0, 3 y 6 meses). En ocasiones se requiere hacer un cambio significativo en las condiciones de almacenamiento acelerado, cuando esto sucede se habla de un estudio de almacenamiento intermedio que lleva un mínimo de cuatro tiempos, incluyendo los puntos de tiempo inicial y final (por ejemplo, 0, 6, 9, 12 meses) (International Conference on Harmonisation, 2003, p.3).

Estas son las frecuencias establecidas por reglamento para evaluar la estabilidad de medicamentos de uso humano, para otros tipos de sustancias se puede evaluar durante el tiempo de almacenamiento propuesto (días, semanas, meses, años) hasta que se observen los primeros fenómenos de degradación durante la identificación o la cuantificación, la finalidad será registrar el tiempo máximo y las condiciones óptimas de almacenamiento. (Comisión de las Comunidades Europeas, 2002, p. 26.)

### **Condiciones de almacenamiento para los estudios de estabilidad**

Las condiciones de almacenamiento van a variar dependiendo de la naturaleza del estudio; sin embargo, una vez definidas deben controlarse durante todo el período de evaluación con tolerancias aceptables. "Las tolerancias de las condiciones de almacenamiento se definen, como las variaciones aceptables en temperatura y humedad relativa de los sitios de almacenamiento para los estudios de estabilidad" (Ministerio de la Protección Social, 2011, p.15), que para efectos del control deben constantemente monitoreadas y registradas, y los equipos deben ser capaces de mantener dichas condiciones de almacenamiento.

El control de las condiciones de almacenamiento es tan importante en un estudio de estabilidad que solo "se aceptan como inevitables, los cambios ambientales cortos debidos a la apertura de las puertas del sitio de almacenamiento." (Ministerio de la Protección Social, 2011, p.15). Además, cuando un equipo de control falle se debe evaluar su efecto sobre la estabilidad y registrarlo en un reporte. El control de las condiciones se puede realizar a través de instrumentos portátiles para mediciones puntuales, registradores de datos o sistemas computarizados que automáticamente realizan el monitoreo y generan reportes de forma periódica. (Consejo de Ministros de Integración Económica, 2010).

Las condiciones de almacenamiento según el estudio de estabilidad se describen en la tabla 2, las cuales son de acatamiento obligatorio para sustentar las pruebas de estabilidad que se efectúen en Costa Rica en medicamentos de uso humano. Cuando se trabaje con una sustancia fotosensible se debe evaluar su estabilidad con un lote conservado bajo condiciones de luz natural o luz artificial durante 3 meses y con un análisis inicial y uno final, excepto que el fabricante lo envase en un recipiente que lo proteja de la luz y que cuente con información que avale dicha protección. (Consejo de Ministros de Integración Económica, 2010, p.6)

**Tabla 2. Condiciones de Almacenamiento para los Estudios de Estabilidad.**

Tipo de estudio	Condiciones de almacenamiento
<b>Natural (largo plazo)</b>	30°C ± 2°C con 65% ± 5% de humedad relativa para la zona IV a. 3°C ± 2°C para medicamentos que requieren refrigeración. -20°C ± 2°C para medicamentos que requieren congelación.
<b>Intermedio</b>	30°C ± 2°C con 60% ± 5% de humedad relativa
<b>Acelerado</b>	40°C ± 2°C con 75% ± 5% de humedad relativa para formas farmacéuticas sólidas. 40°C ± 2°C para formas farmacéuticas semisólidas y líquidas. 25°C ± 2°C con 60% ± 5% de humedad relativa para medicamentos que requieren refrigeración.

**Fuente: RTCA 11.01.04:10 de Estudios de Estabilidad de Medicamentos para Uso Humano**

La Comisión de las Comunidades Europeas (2002) propone como condiciones de almacenamiento para determinar la estabilidad del analito en una solución, las temperaturas de

-20° C, +4°C y +20°C realizando el ensayo tanto en oscuras como a la luz y durante un tiempo que puede ser días, semanas, o más dependiendo de la degradación que muestre el producto. (p. 26)

### **Factores que influyen en la estabilidad**

Entre los principales factores que influyen sobre la estabilidad de un producto se encuentra la exposición a temperaturas adversas, a la luz, a la humedad, al oxígeno y al dióxido de carbono. El incremento de la temperatura genera un cambio importante en la velocidad de la reacción química, duplicándose la velocidad por cada 10°C de incremento en la temperatura, lo que depende de la energía de activación de cada reacción en particular. Aunque también las temperaturas bajas inadecuadas pueden ser nocivas, pudiendo generar cambios en la viscosidad, sobresaturación, rompimiento de las gotitas de las emulsiones o formación de polimorfos menos solubles. (USP 39-FN 34, 2016, p. 1704)

También existen otros factores asociados a la formulación que influyen en la estabilidad, entre ellos están el tamaño de partícula, el pH, la composición del vehículo, la fuerza iónica de la solución, compatibilidad de aniones y cationes, el envase primario, los aditivos químicos específicos, la unión molecular y la difusión del fármaco y excipientes. Así mismo, pueden verse afectados por varias reacciones que por lo general no generan cambios visuales ni olfativos que permitan evidenciarlos; como la hidrólisis, la polimerización, la descarboxilación, la oxidación y la descomposición fotoquímica. (USP 39-FN 34, 2016, p. 1702)

La oxidación es importante en la evaluación de la estabilidad, ya que en ocasiones los fármacos están formulados en su forma reducida y son susceptibles a procesos de oxidación. La oxidación puede ser catalizada por un valor de pH superior al óptimo, por iones de metales pesados polivalentes, por exposición al oxígeno e iluminación ultravioleta, siendo algunas estructuras moleculares más susceptibles a la oxidación que otras, entre ellas: un grupo hidroxilo unido directamente a un anillo aromático, dienos conjugados, anillos aromáticos heterocíclicos, derivados nitrito y nitroso y los aldehídos. (USP 39-FN 34, 2016, p. 1703)

También la estabilidad puede verse afectada por una descomposición fotoquímica en la que se generan radicales libres que pueden prolongar las reacciones en cadena, o por una reacción de polimerización en el cual dos o más moléculas de fármaco se unen para dar un complejo que en ocasiones es irreversible (Bovil y Calixto, 2015. pp. 17y 18). En cuanto a la

hidrólisis se asocia principalmente a uniones químicas presentes en el analito como los ésteres y  $\beta$ -lactamas, mientras que la descarboxilación se asocia a la presencia de grupos carboxilo; así, por ejemplo, el ácido carboxílico disuelto pierde dióxido de carbono a partir del grupo carboxilo cuando se le calienta. (USP 39-FN 34, 2016, p. 1703)

En los estudios de estabilidad es importante reconocer cuáles factores pueden generar un cambio en el producto, modificando sus propiedades iniciales y no permitiendo aprovecharlo para el propósito al cual estaba originalmente destinado; debido a que en la mayoría de las ocasiones son muchos los factores vinculados a la inestabilidad, se protege al producto de la mayoría de los factores mediante un envase-cierre primario apropiado y estrategias de formulación, y se somete únicamente a una o dos condiciones que permitan medir la variación y establecer una fecha límite de uso, así como condiciones apropiadas de almacenamiento.

### **Fecha de expira**

Una fecha de caducidad o de expira se conoce como la fecha colocada en el contenedor o etiqueta de un producto farmacéutico que designa el tiempo durante el cual se espera que un lote del producto permanezca dentro de sus especificaciones de calidad, siempre que se almacene bajo las condiciones definidas, y después de lo cual no se debe utilizar ya que no tiene la aptitud para el uso. (Bajaj, Singla & Sakhuja, 2012) Para la asignación de la fecha de expira se recurre al período de validez, realizándose la estimación a partir de la información recolectada durante un estudio de estabilidad (Consejo de Ministros de Integración Económica, 2010).

### **Estándares de referencia**

Los estándares o sustancias de referencia son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica ya que constituyen una herramienta confiable para garantizar los resultados analíticos de Laboratorios de Control de Calidad. Se conocen como Sustancias de Referencia Química Internacionales (ICRS) y son establecidas bajo consejo del Comité Experto en Especificaciones para Preparaciones Farmacéuticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS). (QuimiNet, 2006)

Los estándares de referencia de la Farmacopea de los Estados Unidos se calibran con respecto a materiales de referencia internacionales como los provistos por la Organización Mundial de la Salud, cuando se aprueban como aptos para su uso como estándares de

comparación en las pruebas establecidas en las monografías de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) o en el Formulario Nacional (FN) adquieren un estatus oficial (USP 39-NF 34, 2016, p.111)

Se destinan principalmente para los siguientes usos: a) cuantitativos en valoraciones de fármacos y formulaciones, pruebas de límite, o blancos y controles, b) cualitativos en pruebas de identificación, pruebas de aptitud del sistema o marcadores de picos cromatográficos y c) otros usos como estándares de verificación de desempeño, estándares de punto de fusión y para conteo de partículas. En control de calidad de los medicamentos, para la prueba de sustancias relacionadas, se aplican con propósitos cualitativos de identificación o cuantitativos en pruebas de límite. (USP 39-NF 34, 2016, p.112)

Las Sustancias Químicas de Referencia en la Farmacopea Británica se establecen con base en la necesidad científica hallada por el grupo de expertos de la Comisión de la Farmacopea Británica, la cual determina que una sustancia de referencia para una impureza es requerida cuando no es posible o no es deseable el control utilizando una solución diluida de la sustancia que se está examinando, ya sea porque el factor de respuesta o la impureza es diferente del de la sustancia, o cuando es necesario limitar una impureza nombrada (Farmacopea Británica, 2015).

Los estándares aprobados por la Comisión de la Farmacopea Británica son solicitados al Laboratorio que participa en el desarrollo de la monografía, los cuales, tras la confirmación de la idoneidad con el propósito previsto se ponen a disposición. De manera general, los estándares de referencia de la BP se destinan para identificación, pruebas de pureza y ensayos de sustancias de uso farmacéutico y preparaciones farmacéuticas (Farmacopea Británica, 2015, p.758).

Según la Organización Mundial de la Salud (2010) una sustancia o estándar de referencia es un material autenticado y uniforme, con un grado de pureza adecuado para el uso y destinado para el uso en ensayos químicos o físicos especificados, en los que sus propiedades son comparadas con las del producto a analizar. (p.9) Existen diferentes tipos de estándares de referencia, por ejemplo, los Estándares de Referencia de Impurezas, los estándares de este tipo provistos por la USP pueden incluir impurezas orgánicas, impurezas inorgánicas o disolventes residuales.

Los Estándares de Referencia de Impurezas pueden presentarse como materiales purificados de un solo componente o como mezcla de más de una impureza, se utilizan para controlar las impurezas que pueden surgir del proceso de fabricación o durante la vida útil del producto (impurezas orgánicas), o que resultan del proceso de síntesis (impurezas inorgánicas), o para controlar el nivel de disolventes residuales en el producto al ser utilizados durante su fabricación (USP 39-NF 34, 2016, p.111).

Para la Farmacopea Británica (2015) un estándar de referencia correspondiente a una impureza se caracteriza por su identidad y pureza, cuando se usa con propósitos de cuantificación el contenido mínimo solicitado es de 95.0% y cuando no está declarado se considera un valor de 100,0%. Si la impureza no está disponible en una cantidad suficiente, se puede preparar un estándar de referencia que contenga el componente activo y la o las impurezas, o en su efecto preparar un estándar que contenga una mezcla de impurezas específicas (pp.758-759).

Según la USP 39-NF 34 (2016) para la identificación o cuantificación de las impurezas en un determinado medicamento se tienen como opciones: adquirir un estándar del medicamento con un contenido de impurezas declarado, el uso de tiempos de retención y factores de respuesta cromatográfica relativos, o recurrir a valores teóricos de absorptividades UV a longitudes de onda seleccionadas (p.111).

### **Sustancias Relacionadas**

Una sustancia relacionada está vinculada estructuralmente con el fármaco, puede ser 1) una impureza identificada o no que surge del proceso de síntesis de la materia prima, subproducto y no aumenta en el almacenamiento, o 2) un producto de degradación identificado o no que resulta del proceso de manufactura del producto farmacéutico, o que surge durante el almacenamiento del material (Farmacopea de los Estados Unidos 39-Formulario Nacional 34, 2016, p.1276).

Al iniciar con la elaboración de una monografía, el fabricante debe proveer información sobre las impurezas presentes en el producto, debe indicar la naturaleza de las mismas, las cantidades que podrían encontrarse tras su elaboración con BPM, la forma en que pueden variar tras el almacenamiento, junto con una indicación de su toxicidad. Los límites de las impurezas

se fijan por la autoridad de registro antes de otorgar la licencia, después de la evaluación de los estudios de toxicidad y ensayos clínicos realizados (Farmacopea Británica, 2015, p.637).

Se define impureza como “cualquier componente que no es la entidad química definida como el fármaco y, además, para el producto farmacéutico, cualquier componente que no sea un ingrediente de formulación”. Se clasifican como impurezas orgánicas, inorgánicas y disolventes residuales, las impurezas orgánicas pueden surgir durante el proceso de fabricación y/o almacenamiento del fármaco, mientras que las inorgánicas y los disolventes residuales están únicamente asociados a la fabricación (USP 39-NF 34, 2016, p.1274).

Asociado también a la definición de sustancias relacionadas es el concepto de producto de degradación, el cual se define como una “impureza que resulta de un cambio químico en el fármaco ocurrido durante la fabricación y/o almacenamiento del producto farmacéutico por el efecto de, por ejemplo, la luz, temperatura, pH, agua, o por reacción con un excipiente y/o sistema de envase-cierre primario” (USP 39-NF 34, 2016, p.1276).

La prueba de sustancias relacionadas tiene como propósito principal el control de las impurezas de degradación o limitar las impurezas que surgen durante la síntesis del ingrediente farmacéutico activo o durante la formulación y manufactura del medicamento. El poder cumplir con el objetivo de la prueba depende de varios factores que incluyen la naturaleza y disponibilidad de las impurezas, ya sea que se pueda adquirir como un estándar de referencia, como reactivo o que se deba fabricar in situ, también depende del número de ingredientes activos y de la complejidad de la formulación (World Health Organization, 2010, pp.45-46).

Según World Health Organization (2010) debe tomarse en cuenta las siguientes consideraciones para cumplir con la prueba:

1. Si se cuenta con un estándar de referencia de la impureza que se desea evaluar o se consigue una mezcla estandarizada para el caso de que sean varias impurezas y, está establecido su uso en la monografía del principio activo, se adoptará el mismo enfoque que para la monografía de sustancias relacionadas del producto terminado, aunque se debe considerar que los límites pueden necesitar ser diferentes.
2. Si no se puede obtener el estándar de referencia o la mezcla estandarizada, el laboratorio responsable debe examinar si la monografía incluye instrucciones sobre la generación de ciertas impurezas in situ.

3. En caso de que ninguno de estos medios esté disponible para identificar las impurezas se puede realizar una prueba general, con un diseño abierto donde se establecerían los límites nominales para los picos secundarios observados en un análisis cromatográfico utilizando una dilución de la solución de ensayo.
4. En los casos en que la principal impureza no puede ser identificada en el cromatograma por la presencia de picos de excipiente que no pueden ser identificados y excluidos, habrá un límite especificado para las principales impurezas de degradación/ impurezas solamente. Cuando se encuentran dificultades, se debe considerar el uso de la Cromatografía en Capa Fina (TLC) (p.46).

### **Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)**

La Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia o Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) es una técnica de separación de múltiples etapas donde los componentes de la muestra se distribuyen entre la fase estacionaria y la fase móvil, para este tipo de cromatografía la fase estacionaria es sólida y la fase móvil es líquida y, dependiendo de la fase estacionaria empleada, la separación se logra por procesos de partición, absorción o intercambio iónico (USP 39-NF 34, 2016, pp.491 y 495).

En este tipo de cromatografía la fase móvil (FM) es un disolvente o mezcla de disolventes que se desplaza a través de la fase estacionaria (FE) llevando consigo una mezcla en la que se encuentra el analito, este proceso se conoce como elución, si la composición de disolventes se mantiene constante durante toda la corrida se conoce como elución isocrática y si la composición varía entre proporciones diferentes de dos disolventes se denomina elución en gradiente (Skoog, *et al*, 2015, p.915).

Por otra parte, la FE se encuentra fijada en una columna que consta de un tubo angosto empacado con un sólido inerte finamente dividido. Existen muchos tipos de FE empleadas en Cromatografía Líquida, incluyendo entre otras: sílica, alúmina o grafito poroso usada en Cromatografía de Fase Normal, resinas o polímeros con grupos ácidos o básicos empleadas en Cromatografía de Intercambio Iónico, sílica porosa o polímeros usada en Cromatografía por Exclusión de Tamaño, o fases estacionarias especiales de derivados de celulosa, péptidos o ciclodextrinas empleadas en Cromatografía Quiral (Farmacopea Británica, 2015, p.203).

El instrumento que permite la aplicación de este tipo de cromatografía se denomina Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia que consiste en un reservorio conteniendo la fase móvil, una bomba que impulsa a la fase móvil a través del sistema de alta presión, un inyector con el que se introduce la muestra, una columna cromatográfica, un detector y un colector de datos como una computadora (Bogantes, M. 2013, p.21).

La bomba es el dispositivo que permite la introducción de una cantidad medible de fase móvil desde los reservorios con los solventes hasta la columna cromatográfica atravesando con altas presiones una serie de tuberías. (Bogantes, 2013, p.22) En los equipos modernos se incluyen varias bombas, de ahí que se denomine sistema de bombeo, las bombas que se utilizan cumplen con generar presiones de más de 6000 psi, una presión de salida libre de pulsos, velocidades de flujo de 0.1 a 10 mL/min con buena reproducibilidad, además de ser resistentes a la corrosión para una gran cantidad de solventes (Skoog, *et al*, 2015, p.916).

El sistema de bombeo de un cromatógrafo líquido consiste principalmente en varias cámaras cilíndricas que se llenan y se vacían mediante el movimiento hacia atrás y hacia delante de varios pistones. Como parte del sistema de bombeo, los equipos incluyen un dispositivo controlado por computadora que mide la velocidad de flujo mediante la determinación de la caída de presión, así también incluyen una válvula dosificadora que permite mezclar hasta cuatro disolventes de manera programada y continua (Skoog, *et al*, 2015, p.916).

Por otra parte, el sistema de inyección en los cromatógrafos más modernos incorpora un dispositivo denominado asa de muestreo que permite la selección del tamaño de la muestra en microlitros, teniendo un intervalo entre 1 hasta 100  $\mu\text{L}$  o mayor (Skoog, *et al*, 2015, p.917). En la figura 1 se muestra un asa de muestreo para un cromatógrafo líquido de inyección manual; es decir, donde la introducción de la muestra la realiza el operador mediante una jeringa. En la actualidad, la mayoría de los HPLC incluyen un sistema de muestreo automatizado con un inyector automático.

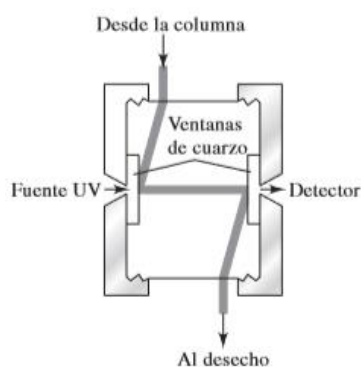
**Figura 1. Asa de Muestreo para HPLC de Inyección Manual.**



**Fuente: Rheodyne Manual Sample Injectors (2004)**

Otro componente del HPLC es el detector, siendo el más utilizado el que se basa en la absorción de radiación ultravioleta-visible, estos detectores se denominan detectores espectrofotométricos UV-Visibles cuando operan en este rango del espectro electromagnético (195 -700nm). El detector consiste en una celda a través de la que pasa la muestra denominada celda de flujo, cuando la luz irradia la celda en presencia de la muestra, ésta absorbe parte de la radiación, al realizar la comparación de esta radiación con la de un rayo que atraviesa la celda sin la presencia de la muestra, se genera una respuesta que se transforma en una señal eléctrica para ser cuantificada (Bogantes, 2013, p.25), en figura 2 se muestra la celda de flujo de un HPLC.

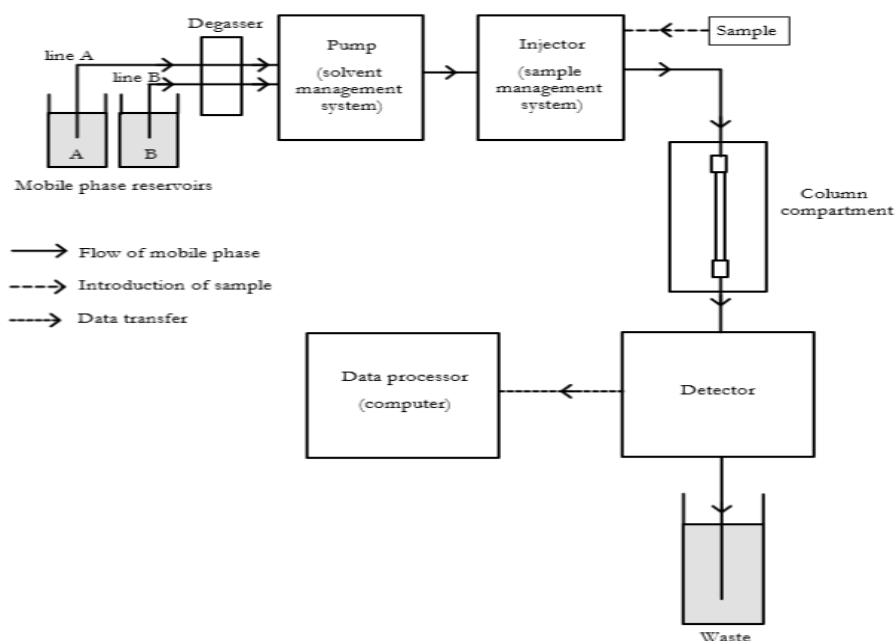
**Figura 2. Celda de flujo para un Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia.**



**Fuente: Skoog, D.; West, D.; Holler, F. y Crouch, S. (2015) Fundamentos de Química Analítica.**

En la figura 3 se muestra la configuración principal de un cromatógrafo líquido de alta eficiencia, señalando como fluye la fase móvil en el sistema a través de sus diferentes componentes para lograr el objetivo de separación, identificación y cuantificación de los analitos presentes en la muestra, información que se recolecta y almacena en la computadora para ser procesada por un software especializado.

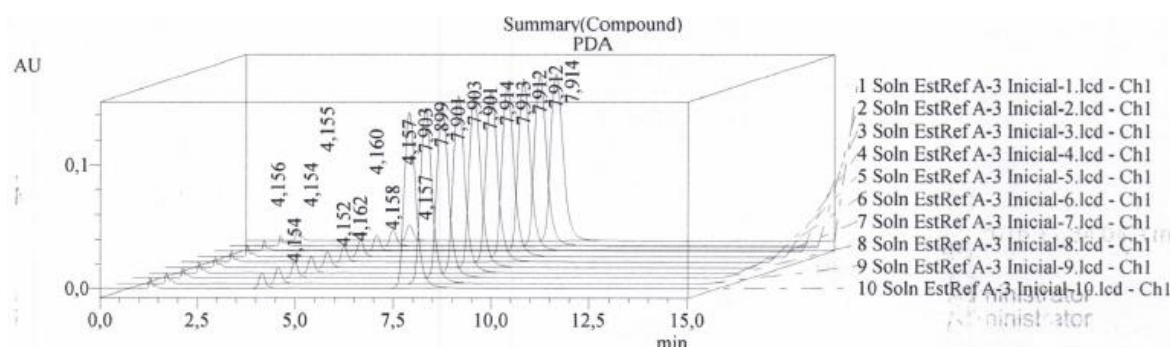
**Figura 3. Configuración de un Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia.**



**Fuente: McPolin, O. (2009) An introduction to HPLC for pharmaceutical analysis.**

Al aplicar esta técnica de separación se genera un cromatograma, denominándose así al registro de la señal o señales de respuesta producidas en el detector ante la presencia del o los analitos de la muestra a la salida de la columna cromatográfica. Se registra esta señal analítica frente al tiempo transcurrido desde el momento en que la mezcla se puso en contacto con la fase móvil y la fase estacionaria (García, Quintana y Da Silva, 2012, p.23), en la figura 4 se muestra un ejemplo de un cromatograma.

**Figura 4. Cromatograma obtenido mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.**



**Fuente: Cromatograma Inicial de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas de A-3.**

**Apéndice N.**

Un elemento importante del cromatograma son los denominados picos, que corresponden a la manera en que se registra la respuesta del detector cuando un componente eluye de la columna; para la identificación del pico de un analito en particular se utiliza el tiempo de retención, que se define como el tiempo transcurrido desde la inyección de la muestra hasta que un determinado soluto alcanza el detector y se genera la señal (García, *et al*, 2012, p.25).

Aunque estos tiempos son característicos del componente, pueden variar de un cromatograma al siguiente, razón por la cual la Farmacopea de los Estados Unidos realiza las comparaciones en términos del tiempo de retención relativo, calculándose como la razón entre el tiempo de retención de la muestra y el tiempo de retención de una sustancia de referencia (USP 39-NF34, 2016, p.498).

Un elemento importante que le da valor a los datos obtenidos es que se obtengan con un equipo calificado y capaz de lograr el desempeño requerido para realizar la prueba o ensayo. La prueba de idoneidad o aptitud del sistema forma parte integrante del método y se utiliza para asegurar un rendimiento adecuado del sistema cromatográfico. (Farmacopea Británica, 2015, p.192) En la monografía se puede solicitar que se demuestren parámetros como: números de platos teóricos (N), resolución (Rs), factor de simetría (también denominado factor de asimetría) (As), relación señal-ruido (S/N), entre otros.

Estos parámetros son definidos por la USP 39-NF 34 (2016) y por la Farmacopea Británica (2015) de la siguiente forma:

- El número de platos teóricos (N) es una medida de la eficiencia de la columna que depende de la sustancia cromatografiada así como de las condiciones operativas, tales como la velocidad de flujo y la temperatura de la fase móvil, la calidad el relleno, el espesor de la película de fase estacionaria, el diámetro interno y la longitud de la columna. Se puede estimar mediante la ecuación 1 si se emplea un integrador electrónico:

$$N = 5.54 \left( \frac{t_R}{W_{h/2}} \right)^2 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde  $t_R$  es el tiempo de retención de la muestra y  $W_{h/2}$  es el ancho del pico a la mitad de la altura.

- La resolución ( $R_s$ ) es la medida de la separación de dos componentes de una mezcla, se estima mediante la ecuación 2 cuando se usa un integrador electrónico:

$$R_s = 1.18 \times (t_{R2} - t_{R1}) / (W_{1, h/2} + W_{2, h/2}) \text{ Ecuación 2}$$

Donde  $t_{R1}$  y  $t_{R2}$  son los tiempos de retención de los dos componentes,  $W_{1, h/2}$  y  $W_{2, h/2}$  son los anchos de los picos a la mitad de la altura.

- El factor de simetría ( $A_s$ ) es una medida del grado de simetría que posee el pico, cuando adquiere un valor de 1 indica que posee simetría perfecta, conforme va incrementando este valor la asimetría se pronuncia, lo que provoca que la integración y la precisión se tornen menos confiables. Se puede calcular mediante la ecuación 3:

$$A_s = W_{0.05} / 2f \text{ Ecuación 3}$$

Donde  $W_{0.05}$  es el ancho del pico al 5% de la altura y  $f$  es la distancia del máximo del pico hasta el borde inicial del pico medida en un punto ubicado al 5% de la altura de la línea base.

- La relación señal-ruido (S/N) se calcula mediante la ecuación 4:

$$S/N = 2H/h \text{ Ecuación 4}$$

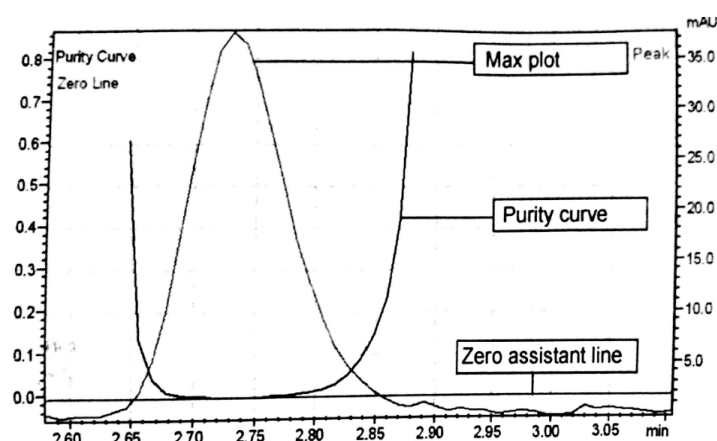
Donde  $H$  es la altura del pico medido a partir del ápice del pico hasta la línea base extrapolada sobre una distancia  $\geq 5$  veces el ancho del pico a su altura media; y  $h$  es la diferencia entre el valor de ruido más grande y más pequeño observados sobre una distancia  $\geq 5$  veces el ancho del pico a su altura media.

Como parte de la aptitud del sistema se debe demostrar si se cumple con el requisito de precisión, el cual puede determinarse mediante la desviación estándar relativa (%RSD) comparando cinco inyecciones repetidas de una preparación estándar cuando el requisito es 2,0% o menos, o en su efecto se utilizan seis inyecciones repetidas si el requisito de RSD% es más de 2,0% (USP 39-NF 34, 2016, pp. 499-500); aunque la monografía de la farmacopea puede especificar un dato de desviación estándar diferente.

Otro parámetro que se puede evaluar es lo que se denomina Pureza de Pico, el cual se refiere al índice que se emplea para indicar si un pico cromatográfico, obtenido por un detector de arreglo de fotodiodos, contiene múltiples componentes. La pureza de pico es evaluada por comparación de la similitud entre el objetivo y el espectro de referencia con el valor umbral calculado a partir de los componentes de ruido (Shimadzu LC2030, 2012).

La presencia de impurezas se puede determinar mediante el índice de pureza siguiendo los siguientes criterios: si el índice es igual o mayor a cero no se detectan impurezas, mientras que si el índice es menor a cero algunas impurezas fueron detectadas (Shimadzu LC2030, 2012). Tras el cálculo, el software genera una curva de pureza como se muestra en la figura 5.

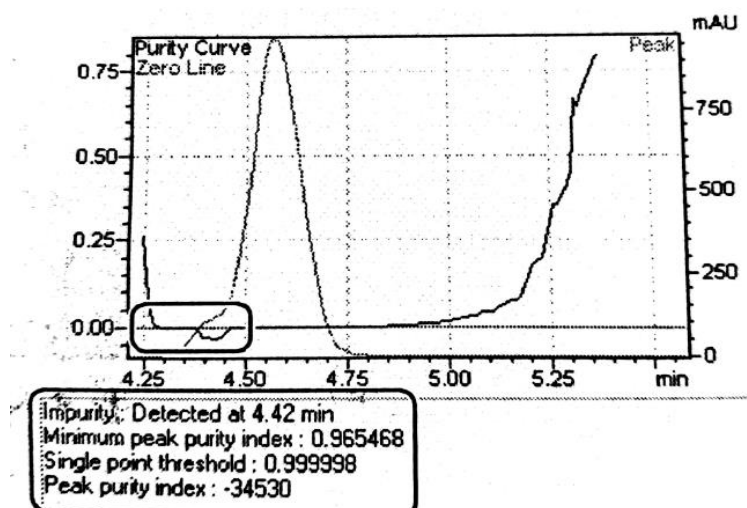
**Figura 5. Curva de Pureza.**



Fuente: Guía teórica de adquisición y procesamiento de datos del HPLC Shimadzu LC2030. (2012)

El software determina el punto del espectro que tiene el índice de pureza mínimo y muestra el índice de similitud, umbral e índice de pureza obtenido en ese punto, también puede indicar que una impureza es detectada cuando la semejanza espectral entre la cima del pico y cualquier punto de muestreo cae bajo el valor umbral (Shimadzu LC2030, 2012). En la figura 6 se muestra un gráfico de pureza, indicando el tiempo al cual se detectó la impureza, el índice de pureza mínimo, el valor umbral para un único punto y el índice de pureza.

**Figura 6. Gráfico de Pureza.**



Fuente: Guía teórica de adquisición y procesamiento de datos del HPLC Shimadzu LC2030. (2012)

Cuando el sistema cromatográfico no cumple con las especificaciones de aptitud del sistema, se permiten realizar algunos ajustes únicamente si se cuenta con los estándares de referencia especificados en la prueba de aptitud y los ajustes realizados generan un cromatograma que cumple con todos los requisitos especificados inicialmente. (USP 39-NF 34,

2016) En la tabla 3 se detallan las variaciones permitidas por la USP 39-NF 34 (2016) y la Farmacopea Británica (2015) para el sistema cromatográfico.

**Tabla 3. Parámetros del Sistema Cromatográfico que Permiten Variaciones y Detalles del Cambio Permitido.**

Parámetro	Variación permitida
<b>pH de la fase móvil</b>	±0.2 unidades del valor o intervalo especificado. Sólo para eluciones isocráticas.
<b>Concentración de sales de la solución amortiguadora</b>	Dentro de ±10%, siempre que se cumpla con la variación de pH permitida. Sólo para eluciones isocráticas.
<b>Relación de los componentes de la fase móvil</b>	En eluciones isocráticas el ajuste se aplica a componentes minoritarios de la fase móvil (50% o menos) en un ±30% relativo. El cambio en cualquier componente no puede exceder de ±10% absoluto. En eluciones en gradiente se permiten variaciones mínimas siempre que se cumplan con los parámetros de idoneidad del sistema, el pico principal eluye con ±15% del tiempo de retención indicado y la composición final no es más débil en poder de elución que la composición inicial.
<b>Tamaño de partícula- Longitud de la columna</b>	Para separaciones isocráticas, se puede modificar el tamaño de partícula (dp) y/o la longitud de columna (L) siempre que la relación entre L y dp permanezca constante o dentro de un intervalo entre -25% y +50% de la relación L/dp prescrita. En el caso de la BP se puede modificar el largo en ±70%.
<b>Diámetro interno de la columna</b>	Se puede ajustar siempre que la velocidad lineal se mantenga constante. (Ver velocidad de flujo) En el caso de la BP se permite un ajuste de ±25%.
<b>Fase estacionaria</b>	Tanto para separaciones isocráticas o en gradiente no se permite cambiar la identidad del sustituyente de la fase estacionaria permitida y en el caso de separaciones isocráticas el tamaño de partícula se puede reducir en un 50%, no se aceptan incrementos.
<b>Velocidad de flujo</b>	Si se modificaron el diámetro de la columna y el tamaño de partícula se debe emplear la ecuación 5. $F_2 = F_1 \times [(d_{c2}^2 \times dp_1) / (d_{c1}^2 \times dp_2)]$ Ecuación 5 Donde $F_1$ y $F_2$ son las velocidades de flujo para las condiciones originales y modificadas, $d_{c1}$ y $d_{c2}$ son los diámetros de columna respectivos y, $dp_1$ y $dp_2$ son los tamaños de partícula. En separación isocrática se puede ajustar en ±50%.
<b>Temperatura de la columna</b>	En eluciones isocráticas se puede ajustar tanto como ±10°C, en eluciones en gradiente ±5°C.
<b>Volumen de inyección</b>	Se puede disminuir siempre que sea congruente con la precisión, la linealidad y los límites de detección aceptados. No se aceptan incrementos.

Fuente: Farmacopea de los Estados Unidos 39-Formulario Nacional 34 (2016).

## CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO

### **Enfoque**

La investigación con enfoque cuantitativo según Hernández (2014) es aquella que "utiliza la recolección de datos para probar hipótesis con base en la medición numérica y el análisis estadístico, con el fin de establecer pautas de comportamiento y probar teorías" (p. 4). Es un tipo de investigación secuencial y de tipo probatorio que parte de un problema de estudio delimitado y que busca después de la recolección y análisis de los datos obtener conclusiones que generen nuevo conocimiento.

Este es el tipo de enfoque que mejor define a la investigación que se efectuó, ya que parte de una serie de objetivos y una pregunta de investigación y, a través de la revisión de literatura se construyó un marco teórico que guió el estudio, del cual se dedujeron variables que se sometieron a prueba mediante el diseño de investigación; a partir de este se definió la muestra y se inició la recolección de los datos, los cuales una vez analizados a través de una herramienta estadística permitieron responder a la pregunta de investigación e interpretarlos con el conocimiento ya existente e inclusive generar nuevo conocimiento.

Como investigación cuantitativa tuvo un alcance de tipo exploratorio, ya que partió de un problema de investigación poco estudiado e inclusive novedoso, como lo evidencia la revisión de literatura realizada en la cual sólo se encuentran ideas vagamente relacionadas con el tema de estudio, la finalidad de la investigación fue familiarizarse con el fenómeno estudiado, obtener información que permitiera llevar a otras investigaciones y sugerir afirmaciones sobre el tema (Hernández, 2014, p.91).

### **Diseño de la investigación**

El diseño de la investigación constituye en un "plan o estrategia concebida para obtener la información que se desea con el fin de responder al planteamiento del problema" (Hernández, 2014, p.128). El diseño que se siguió en la investigación es de tipo experimental, ya que en este tipo el investigador manipula de manera intencional una o más variables independientes para analizar las consecuencias de la manipulación sobre una o más variables dependientes (Hernández, 2014, p.130).

La investigación se considera de tipo experimental ya que de los objetivos específicos propuestos se dedujeron variables independientes que se manipularon para ver la influencia sobre una variable dependiente, de manera que se pudiera concluir al respecto de la pregunta problema. Debido a que las soluciones de referencia para sustancias relacionadas, como grupo de estudio, ya está formado o, es decir, no es aleatorizado, y el tiempo de estudio no es el suficiente para ser indicativo de un experimento puro o completo, se consideró que la subcategoría que mejor representa a esta investigación de tipo experimental es la cuasiexperimental.

La metodología para realizar la investigación tuvo la siguiente secuencia:

1. Se realizó, para fines de este proyecto, una codificación de los materiales en estudio incluidos en la programación de producción de Agosto a Diciembre del año 2016 de Calox de Costa Rica, ya que la información aportada es considerada confidencial y no debe quedar expuesta al dominio público.
2. Se descartaron aquellos productos incluidos en la programación que no requieren el análisis de sustancias relacionadas como parte de su Control de Calidad.
3. Se diseñó y aplicó una matriz de selección en los productos codificados siguiendo el procedimiento estándar operativo "Análisis de riesgo cuantitativo, cualitativo y matriz de selección" de la empresa Calox, Costa Rica.
4. Se confeccionó un Diagrama de Pareto con los resultados obtenidos tras la aplicación de la matriz de selección para escoger la muestra dentro de la regla 80-20.
5. Se elaboró el protocolo de verificación del período de vigencia de soluciones de referencia para sustancias relacionadas y se individualizó por producto seleccionado.
6. Se ejecutó el protocolo durante el plazo de seis meses o por menor tiempo, en función de la estabilidad de la solución, realizando un análisis inicial que fue el control para evaluar los siguientes análisis.
7. Se interpretaron los resultados, estimando la fecha de vigencia de cada solución y estableciendo las condiciones de almacenamiento.
8. Se propuso un plan de contingencia y la documentación necesaria para asegurar la calidad de las soluciones de estándares de referencia para sustancias relacionadas que se preparan y almacenan en el laboratorio.

## **Muestra de la investigación**

La investigación se realizó en la provincia de San José, cantón de Goicochea, distrito Calle Blancos. Cantón que presenta las coordenadas 09°57'31" latitud norte y 83° 59'26" longitud oeste, una anchura máxima es de veinte kilómetros, en dirección noreste a suroeste, desde la naciente del río Durazno hasta el puente sobre el río Torres, carretera Nacional No.5, que va de la ciudad de San José a la de San Juan de Tibás. En esta región se encuentra ubicada el laboratorio farmacéutico Calox, con dirección 100 m sur de La Tostadora El Dorado ubicado en la zona franca del este, lugar específico donde se efectuó el estudio.

El laboratorio Calox es una empresa dedicada a la fabricación y comercialización de medicamentos genéricos y, está comprometida con la salud, calidad de vida y bienestar tanto humano como veterinario. Calox de Costa Rica cuenta con una instalación farmacéutica de aproximadamente 5.300 m<sup>2</sup>, recinto que alberga las oficinas Gerenciales y Administrativas, Producción, Almacenamiento de materias primas, Acopio de productos terminados, Control de Calidad, Comedor y Área de mantenimiento.

Tiene como misión ser una empresa farmacéutica internacional dedicada a la producción y comercialización de medicamentos de calidad, al servicio de la medicina humana y veterinaria. Comprometidos con la plena satisfacción de sus clientes, apoyados en la competencia de sus recursos humanos, innovación, desarrollo de productos, tecnología actualizada, estrictos controles de la calidad y orientados a la preservación del ambiente.

Su visión es ser una empresa reconocida internacionalmente en pro de la salud, logrando la satisfacción de sus clientes en un mercado dinámico y exigente, a través de estrategias claras, desarrollo científico y tecnológico, con una cultura de trabajo en equipo conformado por gente capacitada, identificada y con altos niveles de motivación, en una organización moderna, ágil y proactiva.

La población del estudio estaba constituida por un total de 123 diferentes medicamentos que se fabricaron entre el período de Agosto a Diciembre del 2016, esta muestra incluyó productos sólidos, líquidos y semisólidos, de los cuales sólo una fracción requería el análisis de sustancias relacionadas como parte de su control de calidad. De esta población se seleccionaron aquellos productos que, tras la aplicación de la matriz de selección, quedaron dentro de la regla 80-20 de un diagrama de Pareto, para reducir el tamaño de la muestra a un total de 6 medicamentos sobre los que se aplicó el estudio.

La matriz de selección se escogió como la herramienta para definir la muestra, debido a que permitió seleccionar, entre un grupo de elementos, aquellos que debían incluirse en el estudio. Por sus características, éstos reciben un alto puntaje según criterios de conveniencia definidos por el investigador. Su diseño se basó en el Procedimiento Estándar Operativo de Análisis de Riesgo Cuantitativo del laboratorio farmacéutico Calox de Costa Rica, que se emplea cuando se cuenta con poco tiempo para realizar una actividad y se desea optimizar el uso de los recursos disponibles.

Cabe destacar que el muestreo mediante una matriz de selección se considera como un muestreo de tipo no probabilístico; ya que, la muestra no se define con base en un nivel de confianza estadístico.

### Variables

De los objetivos específicos de investigación se definieron las siguientes variables de estudio, las cuales se operacionalizaron tal y como se muestra en la tabla 4.

**Tabla 4. Operacionalización de Variables**

<b>Objetivo General. Determinar del período de vigencia de las soluciones de referencia para sustancias relacionadas preparadas en el laboratorio de Control de Calidad de Calox, Costa Rica, de acuerdo con la selección realizada.</b>				
<b>Objetivos específicos</b>	<b>Variable</b>	<b>Definición</b>	<b>Instrumento</b>	<b>Operacionalización</b>
Diseñar una matriz de selección para la escogencia de la muestra de estudio.	Matriz de selección	Matriz que combina alternativas de solución a un problema que requieren ser seleccionadas y/o jerarquizados según múltiples criterios previamente definidos.	Procedimiento estándar operativo de Análisis de riesgo cuantitativo, cualitativo y matriz de selección.	Se seleccionan 6 medicamentos incluidos dentro de la regla 80-20 de un Diagrama de Pareto.
Elaborar el protocolo de verificación del período de vigencia de soluciones de referencia para sustancias relacionadas preparadas en el laboratorio de Control de Calidad	Estabilidad de una solución de referencia para sustancias relacionadas	Capacidad que tiene la solución de referencia de mantener por determinado tiempo sus propiedades originales dentro de las especificaciones establecidas.	Protocolo de verificación	El análisis cromatográfico de la solución de referencia cumple con los criterios de aceptación de la prueba para sustancias relacionadas y criterios de desempeño para la verificación de los resultados obtenidos.

de Calox, Costa Rica.				
Ejecutar el protocolo de verificación del período de vigencia de la muestra seleccionada, durante un periodo de seis meses.	Período de vigencia	Intervalo de tiempo en que se espera que las soluciones de referencia preparadas, permanezcan dentro de las especificaciones físico-químicas		Las soluciones de referencia se mantienen estables desde el día 1 hasta el día 180 (6 meses) bajo alguna de las condiciones de almacenamiento seleccionadas.
Proponer un plan de contingencia y la documentación necesaria para asegurar la calidad de las soluciones de estándares preparadas	Este objetivo se cumple a partir de los resultados obtenidos con los objetivos anteriores, con los cuales se elaboran los procedimientos, registros y otros documentos necesarios según lineamientos del sistema documental de Calox de Costa Rica			

Fuente: Elaboración propia, 2016.

## Instrumentos

Para la investigación se contaron con dos instrumentos uno basado en el procedimiento estándar operativo del laboratorio farmacéutico Calox, Costa Rica. denominado "Análisis de riesgo cuantitativo, cualitativo y matriz de selección" a partir del cual se diseñó la matriz de selección y, el segundo que corresponde al protocolo de verificación del período de vigencia, principal instrumento de la investigación y con el cual se obtuvieron los resultados más representativos del objeto de estudio. Para la consulta y revisión de estos instrumentos, remitirse a la sección de apéndices.

Cabe señalar que el segundo instrumento descrito, dirigió el estudio de verificación de la estabilidad de manera general; sin embargo, para su aplicación en cada uno de los productos seleccionados se confeccionó un protocolo específico debido a que el método oficial descrito por la Farmacopea de los Estados Unidos o en su defecto por la Farmacopea Británica para las sustancias relacionadas es diferente, lo que requiere señalar la preparación y el sistema analítico utilizado.

La validación del primer instrumento se realizó por parte de la tutora de la tesis Dra. Irelis Álvarez Díaz y por el Dr. Gabriel Jinesta (farmacéutico de validación), quienes ya tienen experiencia en la confección de este tipo de matrices. Mientras que la validación del segundo instrumento se realizó de dos maneras: una interna a través de parámetros de aptitud que establece la Farmacopea de los Estados Unidos y la Farmacopea Británica para la prueba de

sustancias relacionadas y otra externa que se realizó a través del criterio de experto por parte de la Coordinadora de Control de Calidad en Calox de Costa Rica Dra. Maricela Ledezma y la tutora de tesis.

### **Proceso para la recolección de datos**

Los datos que se obtuvieron durante la investigación surgieron de la aplicación del protocolo de verificación del período de validez para las soluciones de referencia para sustancias relacionadas y durante el plazo previsto, este protocolo fue ejecutado por parte del investigador, quien verificó la estabilidad de la solución a través de la aplicación del protocolo específico de cada producto, este describía el método de preparación y análisis de sustancias relacionadas y su fuente fue la Farmacopea de los Estados Unidos o en su efecto la Farmacopea Británica.

Como técnica de análisis se utilizó la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, en cuyo sistema se registraron y almacenaron los cromatogramas obtenidos con la aplicación de los respectivos protocolos, se guardó el informe por el nombre del medicamento al cual pertenece la sustancia de referencia y por fecha, adicionalmente se guardó en un archivo una impresión de los informes y se registraron los análisis en una bitácora de trabajo que llevó un control fechado, nombre del producto, columna utilizada, método, observaciones y firmas de quien ejecutó la prueba y de quien lo verificó.

También se almacenó una copia de los registros de temperatura y humedad de cada una de las condiciones evaluadas durante el tiempo de verificación de la estabilidad del producto, estos fueron registrados manualmente por los colaboradores del laboratorio para el caso de almacenaje en refrigeración y congelación, y para el almacenaje en ambiente natural por parte del sistema automatizado con que cuenta el laboratorio de Control de Calidad, de manera que se pudiera garantizar que las temperaturas y humedades evaluadas se mantuvieron dentro de tolerancias aceptables durante todo el estudio.

Los resultados obtenidos se fueron evaluando en forma individual tras el término de cada frecuencia de análisis realizada, para asegurarse que cumplieran con los criterios de aceptación de la prueba y que, por lo tanto, pudiera continuarse con el estudio de estabilidad. Al final los datos fueron procesados en conjunto para cada uno de los productos seleccionados

de manera que se reflejara el comportamiento y se pudiera proporcionar un período de validez y condiciones de almacenaje para cada una de las soluciones de referencia.

## Método de análisis

Se introdujeron los datos obtenidos en una Hoja de Excel elaborada por el investigador, permitiendo evaluar el cumplimiento de los parámetros tras cada análisis realizado, en la figura 5 se muestra un fragmento de la hoja de Excel, tomando como ejemplo uno de los productos seleccionados, esta figura muestra qué datos se incluyeron y cómo se evaluaron los resultados por cada frecuencia evaluada.

Figura 7. Hoja de Excel utilizada en el Procesamiento de Datos.

Preparación de solución de referencia			Resultados							
Características	A-3	Compuesto Relacionado A	7 días							
Masa (mg)	137.5	12.6	<25°C (luz)		<25°C (oscuras)		-10 a -20 °C		2 a 8°C	
Potencia (%)	93.5	93	A-3	Compuesto Relacionado A	A-3	Compuesto Relacionado A	A-3	Compuesto Relacionado A	A-3	Compuesto Relacionado A
Humedad (%)	0.16	0	3118800	148893	3032374	146830	3058505	144460	3081613	143497
Factor de dilución (ml)	5000	5000	3059953	142642	3042646	145935	3054310	145680	3104818	144352
Concentración (mg/ml)	0.0273	0.0005	3024305	147184	3020281	144889	3041185	146014	3108608	146457
Lote	36419	HDM312	3059456	148662	3064574	148765	3046824	142131	3197066	145637
Expira	01-ene	Vigente	3112577	149434	3168545	149934	3127613	144047	3100460	145647
Promedio	3075018	147563	3065664	147271	3065683	144466	3118513	145816		
Desviación	39901.4	2345.0	59736.3	2060.2	35259.7	1540.9	45121.4	2372.2		
DSR %	1.3	1.6	1.9	1.4	1.2	1.1	1.4	1.6		

Datos análisis inicial			Cumplimiento de parámetros							
Condición almacenamiento	<25°C (luz)		<25°C (luz)		<25°C (oscuras)		-10 a -20 °C		2 a 8°C	
Frecuencia análisis	Inicial		A-3	Compuesto Relacionado A	A-3	Compuesto Relacionado A	A-3	Compuesto Relacionado A	A-3	Compuesto Relacionado A
Análito	A-3	Compuesto Relacionado A								
Áreas	2987302	143349								
	3037421	143390								
	2982602	146393								
	2985079	146351								
	3010012	145836								
Promedio	3000883	145184								
Desviación estándar	23597.1	1417.3								
DSR %	0.8	1.0								

Parámetros	<25°C (luz)		<25°C (oscuras)		-10 a -20 °C		2 a 8°C	
	A-3	Compuesto Relacionado A	A-3	Compuesto Relacionado A	A-3	Compuesto Relacionado A	A-3	Compuesto Relacionado A
La razón entre las concentraciones iniciales y las respuestas obtenidas en análisis inicial y la frecuencia evaluada debe estar entre 0,95 a 1,05.	1,02	1,02	1,02	1,01	1,02	1,00	1,04	1,01
Cumplimiento	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple
La resolución entre el Compuesto Relacionado A y A-3 no debe ser menor a 8,5	8,6		8,8		8,7		8,6	
Cumplimiento	cumple		cumple		cumple		cumple	
El factor de asimetría no debe ser mayor a 2,0%	1,2	1,1	1,2	1,1	1,3	1,2	1,3	1,2
Cumplimiento	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple
La desviación estándar relativa para cinco inyecciones sucesivas no debe ser mayor a 2%	1,3	1,6	1,9	1,4	1,2	1,1	1,4	1,6
Cumplimiento	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple	cumple

Fuente: Elaboración propia. (2016)

## CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para la selección de la muestra de estudio se partió inicialmente de una población constituida por 123 productos entre presentaciones farmacéuticas sólidas, líquidas y semisólidas. De esta población sólo 48 productos tenían como parte de su Control de Calidad el análisis de sustancias relacionadas (alrededor de un 39%); población que al final se redujo a 21 productos, ya que a pesar que la potencia de un mismo principio activo podía ser diferente, la prueba de sustancias relacionadas era igual para ambas presentaciones farmacéuticas.

Antes de confeccionar y aplicar la matriz de selección, se realizó un filtro adicional a la población mencionada anteriormente, para descartar aquellos productos cuya prueba de sustancias relacionadas era de tipo cualitativo; es decir, cuando se requiere demostrar la ausencia o no de la sustancia en el producto terminado, reduciéndose a un total de 17 productos. Este descarte se realizó para darle prioridad a los productos cuyas sustancias relacionadas pueden verse cuantificadas erróneamente por el uso de una solución de referencia almacenada.

Para la confección de la matriz de selección se estableció inicialmente las características que se evaluarían en los 17 productos terminados cuya prueba de sustancias relacionadas era de tipo cuantitativo, para cada una de estas características se asignó una ponderación en una escala del 1 al 100%, según criterios de relevancia para Calox de Costa Rica. Cada una de las categorías se dividió en subcategorías, repartiendo entre éstas el peso porcentual asignado anteriormente. En la tabla 5 se muestran las categorías y subcategorías que constituyeron los criterios de la matriz de selección.

**Tabla 5. Criterios de la Matriz de Selección.**

Categoría 1		Categoría 2		Categoría 3		Categoría 4	
Disponibilidad de estándar	Ptos.	Lotes a fabricar	Ptos.	Asuntos regulatorios	Ptos.	Columna	Ptos.
Disponible	40	Más de 20	20	Altamente requerido	10	L1 (C-18)	10
No disponible	0	De 10-20	5	Muy requerido	6	L-7 (C-8)	5
-	-	Menos de 10	0	Requerido	4	Otra	0
<b>Pond.</b>	<b>40</b>	<b>Pond.</b>	<b>25</b>	<b>Pond.</b>	<b>20</b>	<b>Pond.</b>	<b>15</b>

Fuente: Elaboración propia (2016).

Los criterios de la tabla 5 se evaluaron en los productos terminados que participaron en el estudio, asignándoles en cada categoría el puntaje que le correspondía. Para la categoría 1 se

recurrió a evaluar con el inventario de estándares primarios, si el estándar de la impureza o la sustancia relacionada se encontraba disponible, ya que el proceso de cotización y comprar por parte del Departamento de Proveduría de Calox de Costa Rica podía demorar el inicio de la investigación por varios meses.

Por otra parte, para la segunda categoría se empleó la programación de producción de Agosto a Diciembre del 2016 para hacer la clasificación según los criterios establecidos, mientras que para la tercera categoría se consultó un listado proporcionado por el Departamento de Asuntos Regulatorios en el cual se especificaba la relevancia para registro de determinados productos. Finalmente, para la cuarta categoría se utilizó la monografía disponible en la USP 39- NF-34 o en su defecto por la BP 2015 para determinar el tipo de columna que requería. Tras asignar el puntaje por categoría, se sumó el puntaje total obteniéndose la tabla 6.

**Tabla 6. Matriz de Selección.**

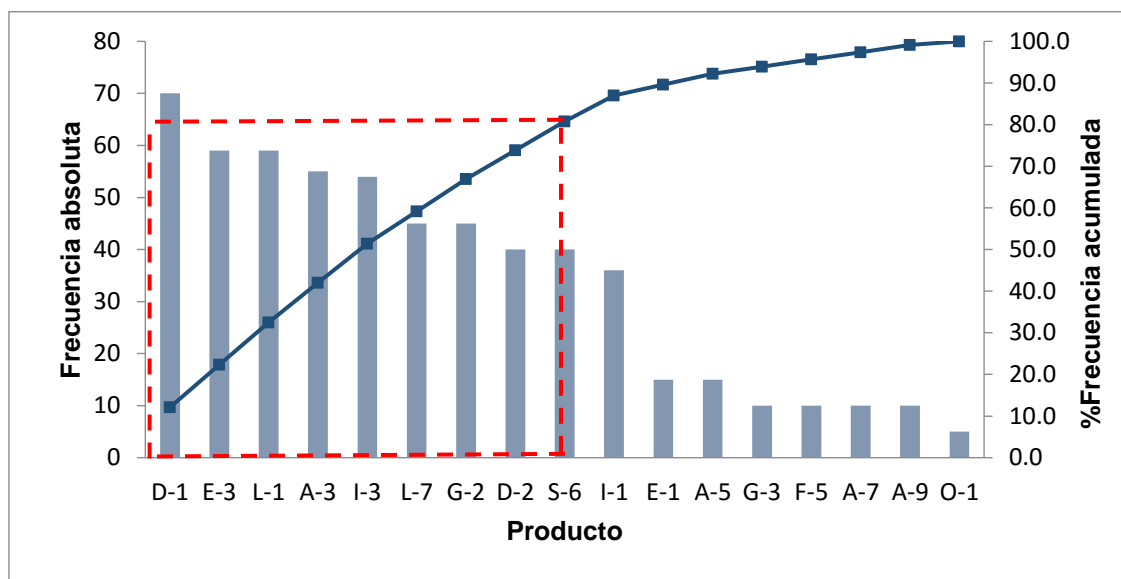
Producto	Clasificación categoría 1	Ptos.	Clasificación categoría 2	Ptos.	Clasificación categoría 3	Ptos.	Clasificación categoría 4	Ptos.	Puntos totales
D-1	Disponible	40	Más de 20	20	No requerido	0	L1	10	70
E-3	Disponible	40	De 10-20	5	Requerido	4	L1	10	59
L-1	Disponible	40	De 10-20	5	Requerido	4	L1	10	59
A-3	Disponible	40	De 10-20	5	No requerido	0	L1	10	55
I-3	Disponible	40	Menos de 10	0	Requerido	4	L1	10	54
L-7	Disponible	40	Menos de 10	0	No requerido	0	L7	5	45
G-2	Disponible	40	Menos de 10	0	No requerido	0	L7	5	45
D-2	Disponible	40	Menos de 10	0	No requerido	0	Otra	0	40
S-6	Disponible	40	Menos de 10	0	No requerido	0	Otra	0	40
I-1	No disponible	0	Más de 20	20	Muy requerido	6	L1	10	36
E-1	No disponible	0	De 10-20	5	No requerido	0	L1	10	15
A-5	No disponible	0	De 10-20	5	No requerido	0	L1	10	15
G-3	No disponible	0	Menos de 10	0	No requerido	0	L1	10	10
F-5	No disponible	0	Menos de 10	0	Altamente requerido	10	Otra	0	10
A-7	No disponible	0	Menos de 10	0	No requerido	0	L1	10	10
A-9	No disponible	0	Menos de 10	0	No requerido	0	L1	10	10
O-1	No disponible	0	Menos de 10	0	No requerido	0	L7	5	5

Fuente: Elaboración propia, (2016).

Con los puntajes obtenidos en la matriz de selección se elaboró un Diagrama de Pareto, con la finalidad de seleccionar la muestra aplicando la regla 80-20, lo que permite identificar el 20% de los productos que representan el 80% de la ponderación, optimizándose el uso de los recursos de la investigación en aquellos productos que tienen mayor valor para la empresa. En

la figura 8 se muestra el Diagrama de Pareto obtenido, a partir de este gráfico se visualiza que los productos D-1, E-3, L-1, A-3, I-3 y L-7 deberían formar parte de la muestra de estudio.

**Figura 8. Diagrama de Pareto con los Elementos de Estudio.**



**Fuente: Elaboración propia, (2016).**

Sin embargo, el producto D-1 no pudo ser seleccionado debido a que no había una columna cromatográfica con características similares a la especificada en la monografía de la USP 39-NF 34, por lo que se seleccionó entre los productos de la regla al G-2 debido a que el estándar estaba disponible y la columna cromatográfica coincidía con el producto L-7, permitiendo montar dos análisis diferentes en el mismo equipo HPLC para un mejor aprovechamiento del tiempo. Por lo tanto, los productos A-3, E-3, L-1, I-3, L-7 y G-2 representaron la muestra de estudio y se fueron evaluando en el orden mencionado.

Los productos seleccionados se evaluaron siguiendo las pautas indicadas en el protocolo general que se describió en Apéndice B. Protocolo de Verificación del Período de Vigencia de una Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, mientras que la preparación de las soluciones empleadas durante la investigación se realizó de acuerdo al Protocolo de Preparación de Soluciones de Referencia de Sustancias Relacionadas, elaborado para cada producto seleccionado y disponible a partir del apéndice C.

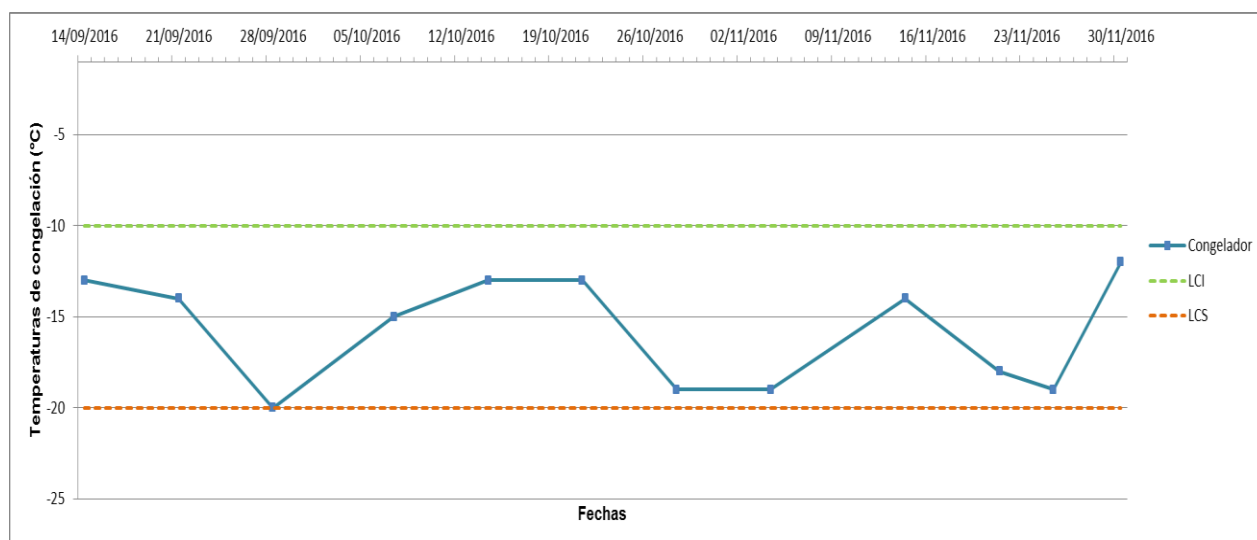
Las preparaciones de las soluciones de referencia descritas en los protocolos se basaron en la prueba de sustancias relacionadas de la monografía del producto terminado correspondiente. Debido a que son monografías aprobadas, ya sea por la Comisión de la

Farmacopea Estadounidense o la Farmacopea Británica, se sabe que han sido verificadas para garantizar que los estándares de referencia oficiales empleados en cada prueba sean solubles y compatibles con los solventes utilizados, de manera que no se afecte el Control de Calidad del producto terminado por degradación o reacción entre los materiales empleados.

Las inyecciones de las muestras para todas las frecuencias y condiciones de almacenamiento establecidas se realizaron en el Cromatógrafo Líquido Shimadzu LC-2030 3D, cuya última verificación se realizó en el mes de agosto del 2016 y que tiene como fecha de próxima verificación el mes de mayo del 2017, tal y como se puede apreciar en el anexo 9. Así mismo, las columnas cromatográficas utilizadas ya habían sido verificadas inicialmente por los analistas del Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica, cuyos certificados se pueden encontrar a partir del Apéndice J.

Como se especificaba en el Protocolo de Verificación del Período de Vigencia de una Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas (apéndice B), cada solución de referencia se almacenó en cuatro condiciones diferentes: una condición de congelación (-10 a -20°C), una condición de refrigeración (2 a 8°C) y una condición a temperatura ambiente (menor a 25°C) que se verificó tanto en condiciones de luz artificial como con protección de la luz. En las figuras 9, 10 y 11 se muestran las tendencias de la temperatura para cada condición de almacenamiento durante el período en que se evaluaron las soluciones.

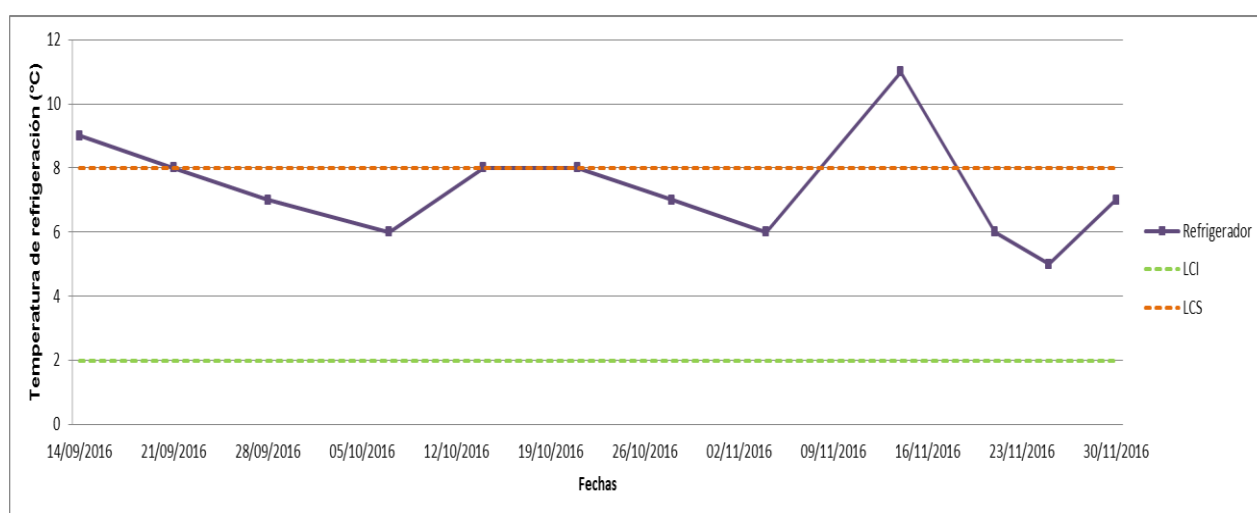
**Figura 9. Tendencia de la Temperatura del Congelador durante el Período de Almacenamiento de las Soluciones de Referencia.**



Fuente: Registro diario de temperatura No. R-VDT-128

Cabe indicar que estos rangos de temperatura están basados en condiciones establecidas por la USP 39-NF 34, las cuales son implementadas por el Laboratorio de Control de Calidad de Calox en las áreas que corresponde. Respecto a la temperatura del Congelador empleado para almacenar las soluciones de referencia para sustancias relacionadas se puede apreciar en la figura 9 que se mantuvo dentro de los límites de control de -10 a -20°C durante todo el período de almacenamiento, que de manera general inició el 18 de setiembre del 2016 y culminó el 29 de diciembre del 2016.

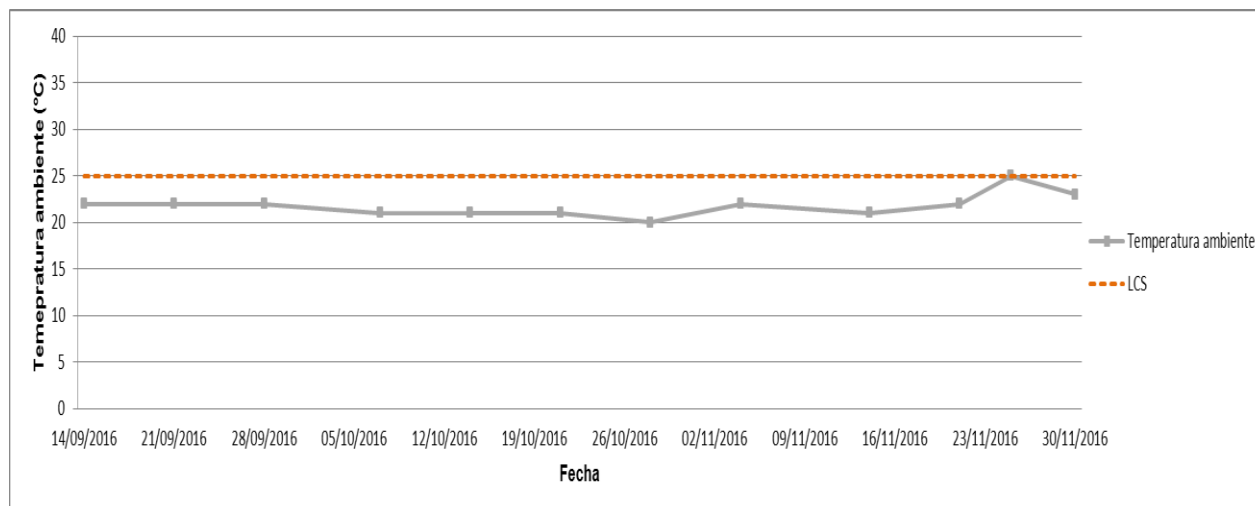
**Figura 10. Tendencia de la Temperatura del Refrigerador durante el Período de Almacenamiento de las Soluciones de Referencia.**



**Fuente: Registro diario de temperatura No. R-VDT-128**

Por otra parte, la temperatura del refrigerador no se mantuvo bajo cumplimiento durante todo el período de almacenamiento de las soluciones de referencia, ya que en una fecha se sobrepasó el límite de control superior (8 °C); sin embargo, en ninguna de las fechas la temperatura disminuyó lo suficiente para aproximarse al límite de control inferior (2 °C) (ver figura 10), considerándose que este incumplimiento solo fue de un día y por tanto su influencia sobre la estabilidad de las soluciones de referencia no fue representativo.

**Figura 11. Tendencia de la Temperatura Ambiente durante el Período de Almacenamiento de las Soluciones de Referencia.**



**Fuente: Registro eléctrico de temperatura y humedad por parte del equipo Rotronic.**

Finalmente, durante el almacenamiento de las soluciones de referencia bajo la temperatura ambiente del área de preparación muestras del Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica, esta se mantuvo durante todo el período de almacenamiento por debajo del límite de control superior de 25°C, como se puede apreciar en la figura 11. Demostrando mediante las figuras 9, 10 y 11 que la estabilidad de las soluciones de referencia para sustancias relacionadas realmente se evaluó bajo las condiciones de almacenamiento establecidas.

Las soluciones de referencia para sustancias relacionadas de los productos que fueron seleccionados corresponden, en la mayoría de los casos, a soluciones empleadas para verificar la aptitud del sistema, así como para la identificación y cuantificación de la impureza o del compuesto relacionado, de ahí que estén constituidas por el estándar de referencia del principio activo y por el estándar de la sustancia relacionada, únicamente para los productos I-3 y G-2 la solución de referencia contenía solamente el estándar de la sustancia relacionada respectiva.

Para cada producto se considera que se obtuvieron dos grupos de resultados diferentes, los relacionados a los parámetros de aptitud del sistema permitiendo asegurar un rendimiento adecuado del sistema cromatográfico en cada etapa, y los directamente relacionados con la estabilidad de la solución de referencia; este último punto se evaluó mediante el cálculo que relaciona la concentración de la solución con las áreas obtenidas (ver anexo 2), este criterio se basa en lineamientos de la FDA para el reporte de resultados analíticos relacionados con un sistema cromatográfico.

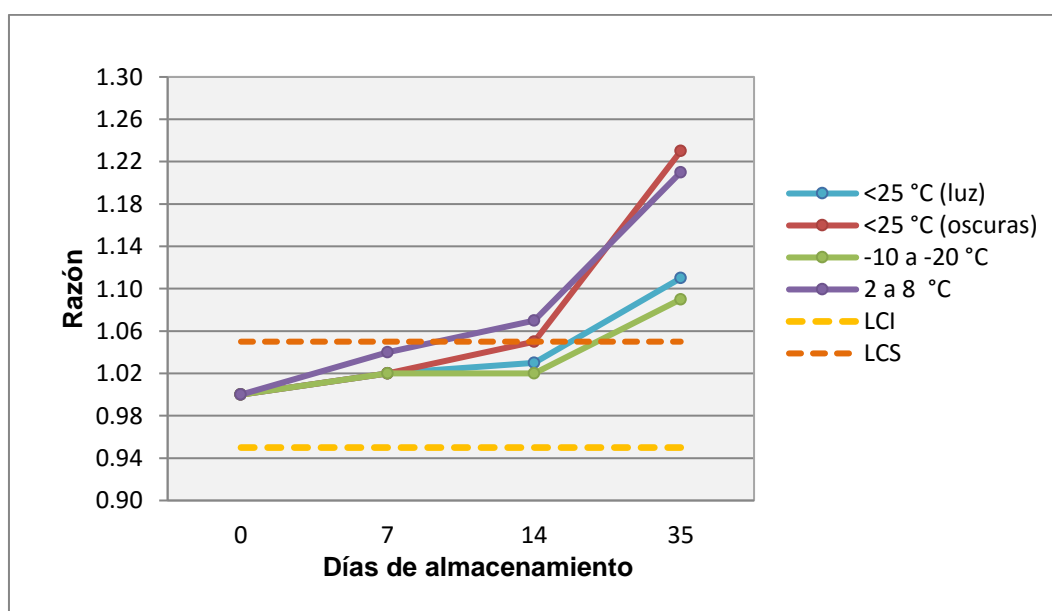
Para el producto codificado como A-3 la solución de referencia para la prueba de sustancias relacionadas estaba compuesta por el estándar de referencia del principio activo de dicho producto (denominado A-3 para efecto del estudio) y por el estándar de referencia del Compuesto Relacionado A, en la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos tras aplicar el cálculo mencionado anteriormente; sin embargo, las figuras 12 y 13 muestran más claramente el comportamiento de los componentes de la solución a lo largo del tiempo de almacenamiento.

**Tabla 7. Razones entre las Concentraciones de los Componentes de la Solución de Referencia de A-3 y las Áreas obtenidas en Análisis Inicial y a los Días de Almacenamiento.**

Condiciones de almacenamiento	E-3			Compuesto Relacionado C		
	Días de almacenamiento			Días de almacenamiento		
	0	7	14	0	7	14
<25 °C (luz)	1,00	0,30	0,31	1,00	0,28	0,28
<25 °C (oscuras)	1,00	0,30	0,34	1,00	0,28	0,29
-10 a -20 °C	1,00	0,30	0,30	1,00	0,28	0,27
2 a 8 °C	1,00	0,30	0,30	1,00	0,28	0,28

Fuente: Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, (2017)

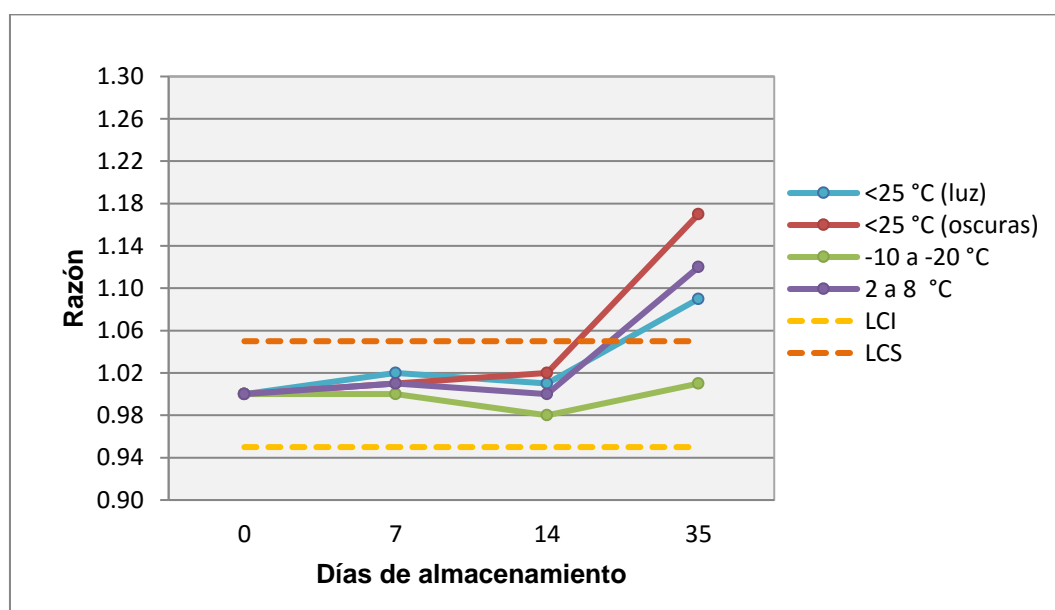
**Figura 12. Razones entre la Concentración de A-3 en la Solución de Referencia y las Áreas obtenidas en Análisis Inicial y a los Días de Almacenamiento.**



Fuente: Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, (2017).

La figura 12 muestra como el componente A-3 en la solución preparada se mantiene entre los límites de control establecidos de 0.95 a 1.05 a los 7 días de almacenamiento para todas las condiciones de almacenamiento evaluadas, mientras que a los 14 días se mantiene dentro del rango las condiciones de <math><25^{\circ}\text{C}</math> (luz y oscuras) y de -10 a -20°C, finalmente a los 35 días en ninguna de las condiciones de almacenamiento se mantuvo dentro de la especificación.

**Figura 13. Razones entre la Concentración de Compuesto Relacionado A de A-3 en la Solución de Referencia y las Áreas obtenidas en Análisis Inicial y a los Días de Almacenamiento.**



**Fuente:** Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, (2017).

La figura 13 revela que el Compuesto Relacionado A de A-3 en la solución de referencia preparada es más estable, ya que tanto a los 7 como a los 14 días de almacenamiento en todas las condiciones evaluadas se mantuvo dentro del rango establecido (0.95-1.05). Sin embargo, a los 35 días de almacenamiento solamente en la condición de -10 a -20°C se mantuvo dentro de la especificación.

En ambas figuras se puede apreciar que la tendencia principal es incrementar el valor a lo largo del tiempo de almacenamiento, si se evalúa los componentes de la ecuación empleada para obtener estos datos, se puede apreciar que se debe al aumento del área del pico en los siguientes análisis con respecto al inicial, este incremento del área puede estar relacionado a un

cambio en la concentración de los componentes en la solución debido a la evaporación de los solventes.

La evaporación de los solventes se considera como una posibilidad ya que un 50% del diluyente empleado en la preparación de la solución estaba compuesto por una mezcla de solventes volátiles como el acetonitrilo y el metanol, además el envase empleado para el almacenamiento correspondía a viales de vidrio con tapa de plástico y septum, considerándose que, a pesar de que tras cada análisis los envases se sellaban con papel parafilm, se presentó una pequeña fuga por las aberturas del septum.

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede estimar como un período válido de almacenamiento de la solución de referencia 14 días después de la fecha de la preparación, pudiendo ser almacenado bajo cualquiera de las siguientes condiciones: <25°C (temperatura ambiente del área de preparación de muestras) ya sea en envase transparente o color ámbar y -10 a -20 °C (rango de temperatura del congelador), condiciones en las que tanto el estándar de A-3 y su Compuesto Relacionado A se mantuvieron dentro de la especificación.

**Tabla 8. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto A-3 que fueron Evaluados a los 7 Días de Almacenamiento.**

Parámetros	<25 °C (luz)		<25 °C (oscuras)		-10 a -20 °C		2 a 8 °C	
	A-3	Compuesto Relacionado A	A-3	Compuesto Relacionado A	A-3	Compuesto Relacionado A	A-3	Compuesto Relacionado A
La resolución entre el Compuesto Relacionado A y A-3 no debe ser menor a 8,5	8,6		8,8		8,7		8,6	
El factor de asimetría no debe ser mayor a 2,0%	1,2	1,1	1,2	1,1	1,3	1,2	1,3	1,2
La desviación estándar relativa para cinco inyecciones sucesivas no debe ser mayor a 2.0%	1,3	1,6	1,9	1,4	1,2	1,1	1,4	1,6
El índice de pureza de pico es mayor o igual a 0,0	0,9	0,2	0,9	0,2	0,9	0,9	0,7	0,6

Fuente: Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, (2017).

Con respecto a la aptitud del sistema cromatográfico empleado para la solución de referencia para sustancias relacionadas del producto A-3 a los 7 días de almacenamiento, se puede apreciar en la tabla 8 que se cumplieron todos los parámetros de aptitud estipulados como la resolución entre los picos, el factor de asimetría, la desviación estándar relativa y el índice de pureza de pico, lo que califica y asegura el buen desempeño del equipo, coincidiendo con los resultados analíticos obtenidos hasta esa fecha.

**Tabla 9. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto A-3 que fueron Evaluados a los 14 Días de Almacenamiento.**

Parámetros	<25 °C (luz)		<25 °C (oscuras)		-10 a -20 °C		2 a 8 °C	
	A-3	Compuesto Relacionado A	A-3	Compuesto Relacionado A	A-3	Compuesto Relacionado A	A-3	Compuesto Relacionado A
La resolución entre el Compuesto Relacionado A y A-3 no debe ser menor a 8,5	8,2		8,1		7,9		7,9	
El factor de asimetría no debe ser mayor a 2,0%	1,3	1,1	1,3	1,2	1,3	1,2	1,3	1,2
La desviación estándar relativa para cinco inyecciones sucesivas no debe ser mayor a 2.0%	0,6	1,6	1,0	0,8	1,4	1,2	1,0	1,5
El índice de pureza de pico es mayor o igual a 0,0	1,0	0,4	1,0	0,4	1,0	0,6	0,9	0,9

Fuente: Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, (2017).

A los 14 días de almacenamiento los parámetros de aptitud del sistema que se cumplen son el factor de asimetría, la desviación estándar relativa y el índice de pureza de pico, solamente la resolución entre los picos no se cumple para ninguna de las condiciones de almacenamiento evaluadas; sin embargo, para la condición de <25°C (luz y oscuras) se obtiene todavía un valor cercano a la especificación (ver tabla 9).

**Tabla 10. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto A-3 que fueron Evaluados a los 35 Días de Almacenamiento.**

Parámetros	<25 °C (luz)		<25 °C (oscuras)		-10 a -20 °C		2 a 8 °C	
	A-3	Compuesto Relacionado A	A-3	Compuesto Relacionado A	A-3	Compuesto Relacionado A	A-3	Compuesto Relacionado A
La resolución entre el Compuesto Relacionado A y A-3 no debe ser menor a 8,5	8,2		8,1		7,9		7,9	
El factor de asimetría no debe ser mayor a 2,0%	1,3	1,1	1,3	1,2	1,3	1,2	1,3	1,2
La desviación estándar relativa para cinco inyecciones sucesivas no debe ser mayor a 2.0%	8,7	11,4	6,7	7,4	6,2	7,2	5,6	5,9
El índice de pureza de pico es mayor o igual a 0,0	0,9	0,1	0,6	0,1	0,9	1	0,8	0,1

Fuente: Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, (2017).

Finalmente, a los 35 días de almacenamiento el sistema cromatográfico incumple un parámetro adicional a la resolución entre picos, donde este es la desviación estándar relativa que incrementa a valores inaceptables (ver tabla 10), razón por la cual el sistema no se considera apto y su comportamiento se relaciona estrechamente con la inestabilidad mostrada por la solución de referencia de A-3 hasta esta fecha.

Para el período de validez propuesto para la solución de referencia (14 días) se considera que el sistema cromatográfico es apto, ya que el único parámetro que no se cumplió fue la resolución entre los picos. Sin embargo, desde el análisis inicial la resolución fue de 8,7 aprobando la especificación por una pequeña diferencia, valor que se mantuvo a los 7 días para después descender a los 14 días de almacenamiento, manteniéndose todavía en un valor aceptable para una columna cromatográfica que tenía previamente varias inyecciones de uso.

Con respecto al producto codificado como E-3 la solución de referencia para la prueba de sustancias relacionadas está compuesta por el estándar de referencia del principio activo de dicho producto y por el estándar de referencia del Compuesto Relacionado C, en la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos durante el período de almacenamiento para ambos elementos que correspondió para este caso a los 14 días.

**Tabla 11. Razones entre las Concentraciones de los Componentes de la Solución de Referencia de E-3 y las Áreas obtenidas en Análisis Inicial y a los Días de Almacenamiento.**

Condiciones de almacenamiento	E-3			Compuesto Relacionado C		
	Días de almacenamiento			Días de almacenamiento		
	0	7	14	0	7	14
<25 °C (luz)	1,00	0,30	0,31	1,00	0,28	0,28
<25 °C (oscuras)	1,00	0,30	0,34	1,00	0,28	0,29
-10 a -20 °C	1,00	0,30	0,30	1,00	0,28	0,27
2 a 8 °C	1,00	0,30	0,30	1,00	0,28	0,28

Fuente: Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, (2017).

En la tabla 11 se puede apreciar que la solución de referencia para sustancias relacionadas del producto E-3 no se mantiene estable bajo ninguna de las condiciones de almacenamiento evaluadas, ya que los resultados obtenidos a los 7 días estuvieron fuera de los límites de control establecidos de 0.95 a 1.05, comportamiento que se repite a los 14 días de almacenamiento. En este caso hubiese sido importante evaluar la estabilidad con una mayor frecuencia durante la primera semana de almacenamiento para determinar qué tan inestable es la solución de referencia.

**Tabla 12. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto E-3 que fueron Evaluados durante los 7 Días de Almacenamiento.**

Parámetros	<25 °C (luz)		<25 °C (oscuras)		-10 a -20 °C		2 a 8 °C	
	E-3	Compuesto Relacionado C	E-3	Compuesto Relacionado C	E-3	Compuesto Relacionado C	E-3	Compuesto Relacionado C
La resolución entre el Compuesto Relacionado C y el E-3 no debe ser menor a 2,0.	4,9		4,6		4,5		4,4	
La desviación estándar relativa para cinco inyecciones sucesivas no debe ser mayor a 2,0%.	0,7	2,8	2,8	2,8	0,7	0,7	0,2	2,2
El índice de pureza de pico es mayor o igual a 0,0.	0,0	0,9	0,6	1,0	0,5	0,9	0,6	0,9

Fuente: Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, (2017).

De la tabla 12 se puede considerar que la aptitud del sistema cromatográfico empleado para la solución de referencia para sustancias relacionadas del producto E-3 fue apta, ya que se cumplieron todos los parámetros estipulados por la monografía oficial de la USP 39-NF 34, que correspondían a la desviación estándar relativa y a la resolución entre picos, razón por la cual el sistema no puede considerarse como un factor determinante de los resultados obtenidos.

Otro factor determinante que se puede descartar es la calidad de la preparación realizada, ya que si desde un inicio la cristalería y los reactivos empleados no hubiesen estado limpios, alguna impureza podría haber intervenido en la concentración inicial, generando valores incorrectos de área; sin embargo, por medio del valor de pureza de pico se puede descartar que los picos obtenidos en la elución de la solución de referencia contuvieran alguna impureza que falseara los resultados, ya que en todos los casos el índice de pureza de pico fue igual o mayor a cero (ver tabla 12).

**Tabla 13. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto E-3 que fueron Evaluados durante los 14 Días de Almacenamiento.**

Parámetros	<25 °C (luz)		<25 °C (oscuras)		-10 a -20 °C		2 a 8 °C	
	E-3	Compuesto Relacionado C	E-3	Compuesto Relacionado C	E-3	Compuesto Relacionado C	E-3	Compuesto Relacionado C
La resolución entre el Compuesto Relacionado C y el E-3 no debe ser menor a 2,0.	4,6		4,6		4,7		4,7	
La desviación estándar relativa para cinco inyecciones sucesivas no debe ser mayor a 2,0%.	1,4	1,8	6,3	12,9	2,6	4,0	0,6	2,6
El índice de pureza de pico es mayor o igual a 0,0.	0,8	0,9	0,9	1,0	0,8	1,0	0,9	0,9

Fuente: Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, (2017).

A los 14 días de almacenamiento, la idoneidad del sistema no fue apta debido a que el criterio de la desviación estándar no se cumple para la mayoría de las condiciones evaluadas, con excepción de la condición <25 °C (luz) en la que sí se cumple, demostrando que la solución se vuelve más inestable conforme pasa el tiempo de almacenamiento. El criterio de pureza se sigue cumpliendo a los 14 días, corroborando que en los resultados obtenidos no se traslapó ninguna impureza.

Por otra parte, el resultado obtenido en la tabla 11 indica que tras 7 días de almacenamiento un 30% del área disminuyó con respecto a su valor inicial, esto estaría directamente vinculado a su valor de concentración, la cual pudo ser modificada por un cambio en la cantidad de estándar o en el volumen, debido a que el diluyente empleado en la preparación era un 60% acuoso no se espera que se haya dado un cambio en el volumen por evaporación y por el contrario, se piensa más en la posibilidad de que se haya presentado una degradación del estándar que modificara su cantidad inicial.

Debido a que la solución de referencia no fue evaluada con mayor frecuencia antes de que cumpliera los 7 días de almacenamiento, no se puede establecer un período de vigencia y se determina que la solución preparada corresponde a una preparación de un solo uso debe descartarse al día siguiente, el principal motivo se debe a que su uso en días posteriores para la

cuantificación del Compuesto Relacionado C en la muestra, podría generar que su valor sea mayor al real, pudiendo ser rechazado el lote por un falso negativo que traería consigo pérdidas económicas importantes para el laboratorio fabricante.

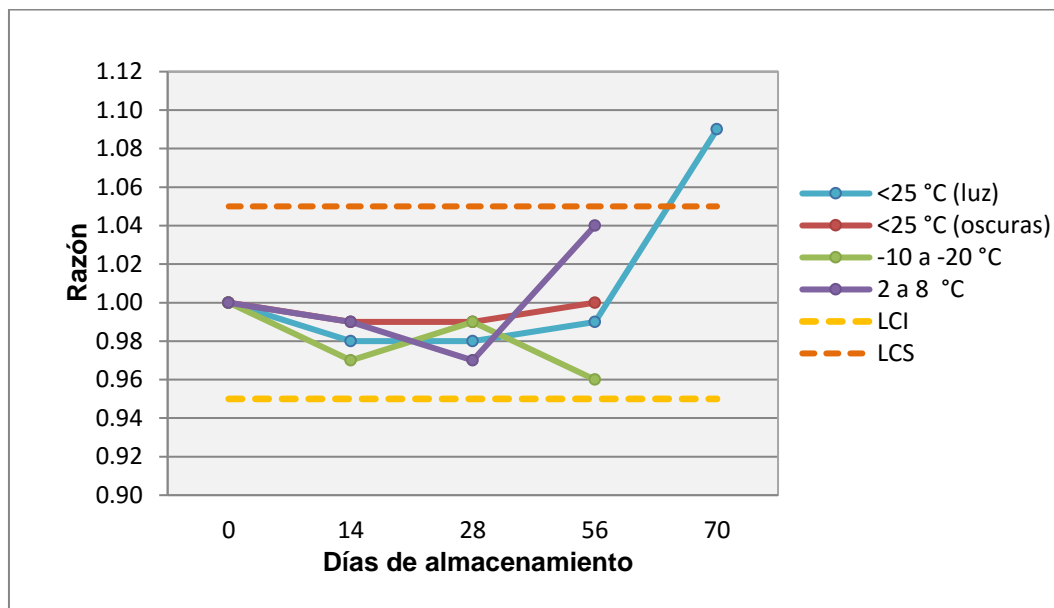
Para el producto codificado como L-1, la solución de referencia para sustancias relacionadas estaba compuesta por dos estándares diferentes, uno que correspondía al principio activo del producto L-1 y otro que correspondía al estándar del Compuesto Relacionado A. En la tabla 14 se muestran los resultados globales obtenidos, en los casos en que se indicó NA se debió a que la solución no se siguió evaluando por más tiempo bajo esas condiciones; para apreciar más claramente el comportamiento de los componentes de la solución a lo largo del tiempo de almacenamiento ver las figuras 14 y 15.

**Tabla 14. Razones entre las Concentraciones de los Componentes de la Solución de Referencia de L-1 y las Áreas obtenidas en Análisis Inicial y a los Días de Almacenamiento.**

Condiciones de almacenamiento	L-1					Compuesto Relacionado A				
	Días de almacenamiento					Días de almacenamiento				
	0	14	28	56	70	0	14	28	56	70
<25 °C (luz)	1,00	0,98	0,98	0,99	1,09	1,00	0,97	1,00	1,01	1,13
<25 °C (oscuras)	1,00	0,99	0,99	1,00	NA	1,00	0,97	0,96	0,96	NA
-10 a -20 °C	1,00	0,97	0,99	0,96	NA	1,00	0,95	0,95	0,91	NA
2 a 8 °C	1,00	0,99	0,97	1,04	NA	1,00	0,97	0,93	0,96	NA

Fuente: Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, (2017).

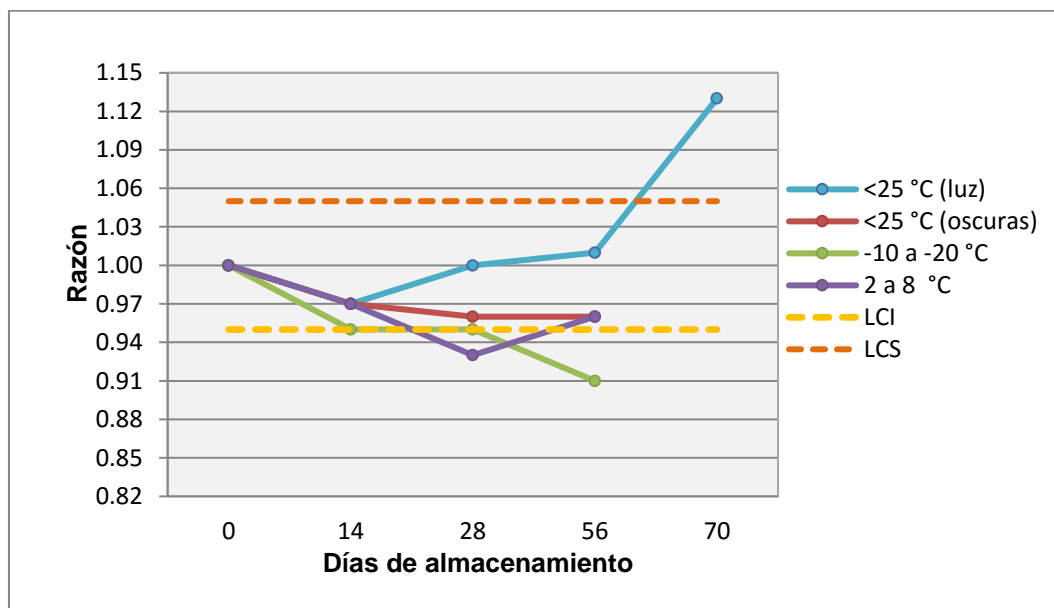
**Figura 14. Razones entre la Concentración de L-1 en la Solución de Referencia y las Áreas obtenidas en Análisis Inicial y a los Días de Almacenamiento.**



**Fuente: Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, (2017).**

La figura 14 muestra como el componente L-1 en la solución preparada se mantiene entre los límites de control establecidos de 0.95 a 1.05 para todas las condiciones evaluadas desde los 14 días hasta los 56 días de almacenamiento. Para los 70 días solo se inyectó la condición de <25°C (luz) debido a que los viales de las otras condiciones se contaminaron, probablemente por la exposición a otras soluciones almacenadas, impidiendo generar un cromatograma que fuera cuantificable. A diferencia de los otros productos, los resultados empiezan a los 14 días, debido a que a los 7 días el sistema cromatográfico falló, realizando una reinyección al día siguiente con resultados no conformes a la prueba inicial.

**Figura 15. Razones entre la Concentración de Compuesto Relacionado A de L-1 en la Solución de Referencia y las Áreas obtenidas en Análisis Inicial y a los Días de Almacenamiento.**



Fuente: Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, (2017).

La figura 15 revela que el Compuesto Relacionado A de L-1 se mantiene dentro de los límites a los 14 días de almacenamiento, mientras que a los 28 días solamente la condición de 2 a 8 °C incumplió la especificación. A los 56 días la condición que incumple es la de -10 a -20 °C y a los 70 días la única condición que se pudo evaluar fue la <25°C (luz), que dio también inconforme. Estos resultados demuestran que L-1 es más estable que el Compuesto Relacionado A, ya que el primero se mantuvo dentro de la especificación hasta los 56 días de almacenamiento, mientras que el segundo elemento desde los 28 días se empezó a mostrar inestable.

Debido a que ambos estándares son importantes para la cuantificación del Compuesto Relacionado A, así como de otras sustancias relacionadas presentes en los productos terminados, el período de vigencia propuesto, así como su condición de almacenamiento en el que ambos estándares se mantuvieron dentro de la especificación, es el de 56 días siendo almacenado en un área de temperatura ambiente que no sobrepase los 25°C, protegiéndolo o no de la luz con un envase de color ámbar.

**Tabla 15. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto L-1 que fueron Evaluados durante los 14 Días de Almacenamiento.**

Parámetros	<25 °C (luz)		<25 °C (oscuras)		-10 a -20 °C		2 a 8 °C	
	L-1	Compuesto Relacionado A	L-1	Compuesto Relacionado A	L-1	Compuesto Relacionado A	L-1	Compuesto Relacionado A
El factor de asimetría no debe ser mayor a 1,5%.	0,8	1,2	0,8	1,2	0,8	1,2	0,8	1,2
La desviación estándar relativa para cinco inyecciones sucesivas no debe ser mayor a 2,0%.	2,0	1,4	0,6	1,2	1,6	1,6	1,1	1,0
El índice de pureza de pico es mayor o igual a 0,0.	1,0	0,4	1,0	0,4	1,0	0,6	0,9	0,9

Fuente: Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, (2017).

Con respecto a la aptitud del sistema cromatográfico empleado para la solución de referencia para sustancias relacionadas del producto L-1 a los 14 días de almacenamiento se puede apreciar en la tabla 15 que se cumplieron todos los parámetros de aptitud estipulados como el factor de asimetría, la desviación estándar relativa y el índice de pureza de pico, calificando al sistema como apto y respaldando los resultados analíticos obtenidos hasta esta fecha, los cuales también resultaron conformes para todos las condiciones de almacenamiento.

**Tabla 16. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto L-1 que fueron Evaluados durante los 28 Días de Almacenamiento.**

Parámetros	<25 °C (luz)		<25 °C (oscuras)		-10 a -20 °C		2 a 8 °C	
	L-1	Compuesto Relacionado A	L-1	Compuesto Relacionado A	L-1	Compuesto Relacionado A	L-1	Compuesto Relacionado A
El factor de asimetría no debe ser mayor a 1,5%.	0,8	1,2	0,8	1,2	0,8	1,2	0,8	1,2
La desviación estándar relativa para cinco inyecciones sucesivas no debe ser mayor a 2,0%.	1,9	1,7	0,7	1,1	1,5	1	4,4	4,7
El índice de pureza de pico es mayor o a igual 0,0.	0,3	0,2	0,3	0,2	0,4	0,3	0,0	0,4

Fuente: Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, (2017).

A los 28 días de almacenamiento los parámetros de aptitud del sistema se cumplieron para la mayoría de las condiciones, solamente la desviación estándar relativa no se cumplió para la condición de almacenamiento de 2 a 8 °C (ver tabla 16), comportamiento que va ligado a los resultados de relación de concentración/área obtenidos hasta esta fecha, condición en la cual se estableció que la solución de referencia para sustancias relacionadas de L-1 no permanece estable.

**Tabla 17. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto L-1 que fueron Evaluados durante los 56 Días de Almacenamiento.**

Parámetros	<25 °C (luz)		<25 °C (oscuras)		-10 a -20 °C		2 a 8 °C	
	L-1	Compuesto Relacionado A	L-1	Compuesto Relacionado A	L-1	Compuesto Relacionado A	L-1	Compuesto Relacionado A
El factor de asimetría no debe ser mayor a 1,5%.	0,8	1,2	0,8	1,2	0,8	1,2	0,8	1,2
La desviación estándar relativa para cinco inyecciones sucesivas no debe ser mayor a 2,0%.	2,0	1,8	1,7	1,6	6,5	6,5	7,1	8,0
El índice de pureza de pico es mayor o igual a 0,0.	0,2	0,3	0,2	0,1	0,3	0,1	0,3	0,3

Fuente: Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, (2017).

A los 56 días una condición de almacenamiento adicional a la de 2 a 8 5°C incumplió también el parámetro de la desviación estándar relativa, la condición de almacenaje de -10 a -20°C (ver tabla 17), comportamiento que se relaciona con los resultados de relación de concentración/área obtenidos hasta esta fecha, en las que tanto el Compuesto Relacionado A como L-1 se mostraron inestables saliéndose o aproximándose a los límites de control (ver figuras 14 y 15).

**Tabla 18. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto L-1 que fueron Evaluados durante los 70 Días de Almacenamiento.**

Parámetros	<25 °C (luz)		<25 °C (oscuras)		-10 a -20 °C		2 a 8 °C	
	L-1	Compuesto Relacionado A	L-1	Compuesto Relacionado A	L-1	Compuesto Relacionado A	L-1	Compuesto Relacionado A
El factor de asimetría no debe ser mayor a 1,5%.	0,7	1,2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
La desviación estándar relativa para cinco inyecciones sucesivas no debe ser mayor a 2,0%.	6,3	11,9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
El índice de pureza de pico es mayor o igual a 0,0.	0,5	0,0	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Fuente: Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, (2017).

Finalmente, a los 70 días de almacenamiento, el sistema cromatográfico de la única condición de almacenamiento evaluada (<25°C, luz) incumplió con la desviación estándar relativa (ver tabla 18), comportamiento que se relaciona estrechamente con la inestabilidad que se mostró por la solución de referencia de L-1 hasta esta fecha, donde los resultados de razón concentración/área se salieron de especificación.

Con el respecto al producto codificado como I-3 la solución de referencia para la prueba de sustancias relacionadas estaba compuesta por un único estándar, denominado para efecto de la investigación como Impureza de I-3, en la tabla 19 se muestra los resultados obtenidos durante el período de almacenamiento de la solución, que correspondió para este caso a los 7 días.

**Tabla 19. Razón entre la Concentración de la Impureza de I-3 en la Solución de Referencia y las Áreas obtenidas en Análisis Inicial y a los 7 Días de Almacenamiento.**

Condiciones de almacenamiento	Impureza de I-3	
	Días de almacenamiento	
	0	7
<25 °C (luz)	1,00	1,65
<25 °C (oscuras)	1,00	1,81
-10 a -20 °C	1,00	1,22
2 a 8 °C	1,00	1,61

Fuente: Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, (2017).

En la tabla 19 se puede apreciar que la solución de referencia para sustancias relacionadas del producto I-3 no se mantuvo estable bajo ninguna de las condiciones de almacenamiento evaluadas, ya que los resultados obtenidos a los 7 días de almacenarla dieron fuera de los límites de control establecidos de 0.95 a 1.05. Para esta solución de referencia, al igual que la solución del producto E-3, hubiese sido importante evaluar la estabilidad con una mayor frecuencia durante la primera semana de almacenamiento.

**Tabla 20. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto I-3 que fueron Evaluados durante los 7 Días de Almacenamiento.**

Parámetros	Condiciones de almacenamiento			
	<25 °C (luz)	<25 °C (oscuras)	-10 a -20 °C	2 a 8 °C
La desviación estándar relativa para cinco inyecciones sucesivas no debe ser mayor a 2,0%.	29,9	46,9	26,8	42,6
El índice de pureza de pico es mayor o igual a 0,0.	-0,8	-0,9	0,9	0,9

Fuente: Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, (2017).

En la tabla 20 se puede observar que la aptitud del sistema cromatográfico empleado a los 7 días para la solución de referencia para sustancias relacionadas del producto I-3 no fue apta, ya que no se cumplió la desviación estándar relativa en ninguna de las condiciones de

almacenamiento evaluadas, por otra parte, el índice de pureza de pico no se cumplió para la condición de temperatura ambiente ( $<25^{\circ}\text{C}$ ), tanto en luz como en oscuridad.

En el caso de la desviación estándar relativa se obtuvieron valores bastante altos (ver tabla 20) ya que a los 7 días de almacenamiento los valores de área aumentaron o descendieron con gran diferencia entre cada inyección y el área promedio (ver apéndice N), de ahí que también los valores de las razones entre concentración/área inicial y a los 7 días de almacenamiento estén muy altos (ver tabla 19), demostrando que la solución de referencia es muy inestable y no puede ser almacenada por mucho tiempo.

Los valores de las razones entre concentración/área se deben al aumento del área promedio del pico en los siguientes análisis con respecto al inicial (ver apéndice N), este incremento del área puede estar relacionado a un cambio en la concentración de los componentes en la solución debido a la evaporación de los solventes, ya que un 80% del diluyente empleado en la preparación de la solución estaba compuesto por una mezcla de solventes volátiles como el acetonitrilo y el metanol, esto aunado a que el envase empleado para el almacenamiento no proveía un adecuado sellado.

Debido a que la solución de referencia no fue evaluada con mayor frecuencia antes de que cumpliera los 7 días de almacenamiento, no se puede establecer un período de vigencia ni condiciones de almacenamiento apropiadas, determinándose que la solución preparada corresponde a una preparación de un solo uso, debiendo descartarse al día siguiente para evitar posibles errores de cuantificación de la impureza.

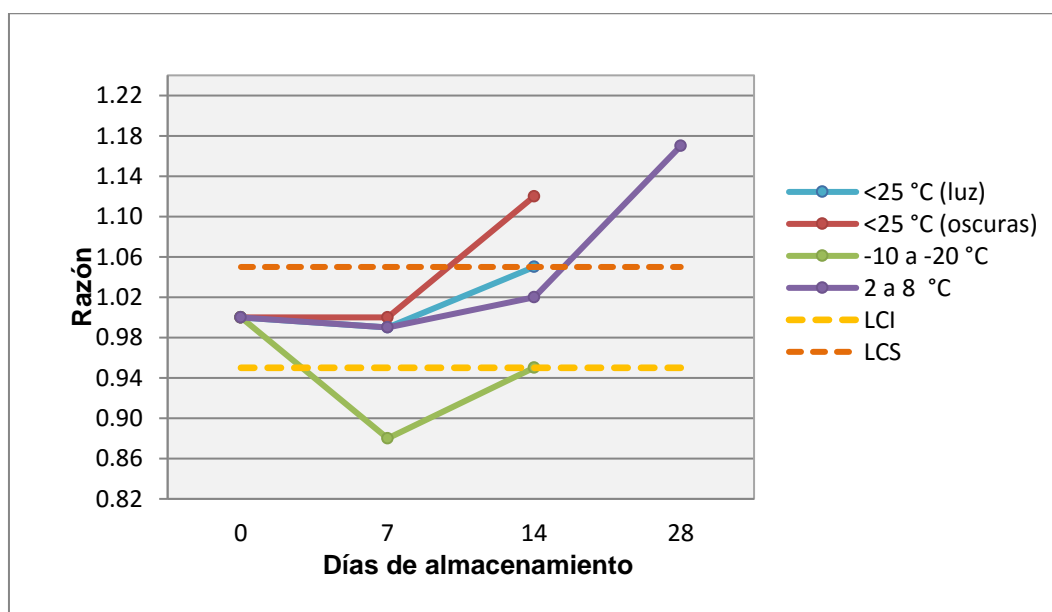
Para el producto codificado como L-7 la solución de referencia para la prueba de sustancias relacionadas que se preparó contenía tres diferentes estándares, dos de ellos correspondían a los principios activos del producto seleccionado y el tercero restante al Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina, para efecto de los resultados los estándares de los principios activos se denominan L-7(a) y L-7(b), presentándose los resultados generales en la tabla 21, en algunos casos no se indicó un dato debido a que el estudio no se continuó más bajo esas condiciones.

**Tabla 21. Razones entre las Concentraciones de los Componentes de la Solución de Referencia de L-7 y las Áreas obtenidas en Análisis Inicial y a los Días de Almacenamiento.**

Condiciones de almacenamiento	L-7(a)				L-7 (b)				Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina			
	Días de almacenamiento				Días de almacenamiento				Días de almacenamiento			
	0	7	14	28	0	7	14	28	0	7	14	28
<25 °C (luz)	1,00	0,99	1,05	NA	1,00	1,04	1,09	NA	1,00	1,04	1,06	NA
<25 °C (oscuras)	1,00	1,00	1,12	NA	1,00	0,94	1,14	NA	1,00	1,04	1,08	NA
-10 a -20 °C	1,00	0,88	0,95	NA	1,00	0,92	0,94	NA	1,00	0,91	0,92	NA
2 a 8 °C	1,00	0,99	1,02	1,17	1,00	1,03	0,97	1,16	1,00	1,03	0,99	1,13

Fuente: Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, (2017).

**Figura 16. Razones entre la Concentración de L-7 (a) en la Solución de Referencia y las Áreas obtenidas en Análisis Inicial y a los Días de Almacenamiento.**



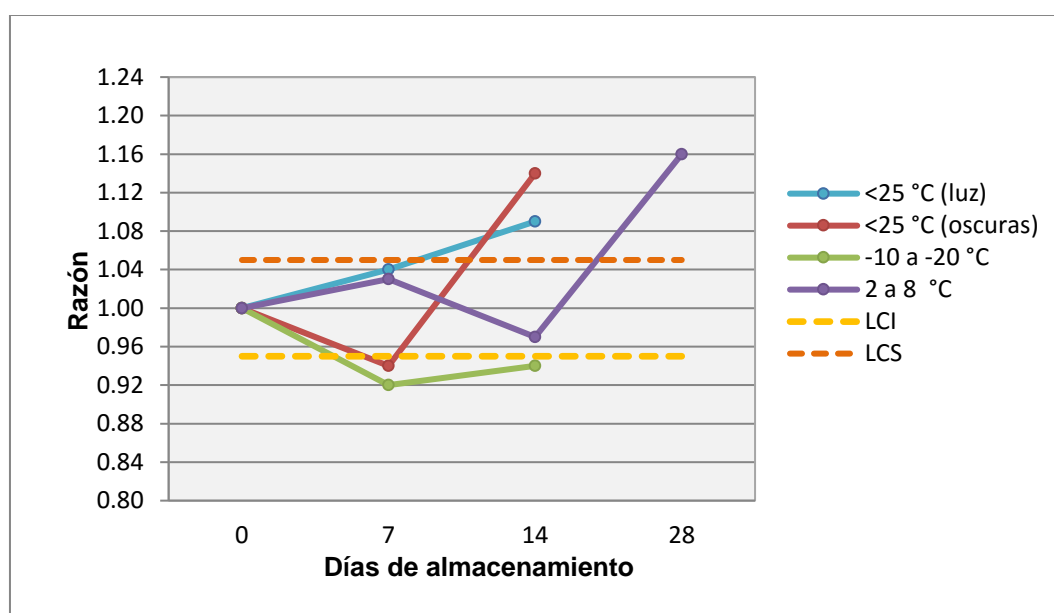
Fuente: Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, (2017).

En la figura 16 se puede apreciar que el comportamiento del estándar de referencia de L-7 (a) a los 7 días de almacenamiento se mantiene dentro de los límites de control de 0.95 a 1.05 para las condiciones de temperatura ambiente, tanto en condiciones de luz artificial y a oscuras, y para la condición de 2 a 8°C de refrigeración, mientras que a los 14 días solamente

las condiciones de <math><25^{\circ}\text{C}</math> (luz) y la de 2 a

Cabe aclarar que a pesar de que a los 14 días la condición de almacenamiento de congelación cumple con la especificación, el resultado no se considera válido ya que a los 7 días de almacenamiento había incumplido el criterio de relación concentración/área. Esta misma condición no se siguió evaluando por más tiempo, así como la condición de <math><25^{\circ}\text{C}</math> (luz), ya que se requiere que ambos componentes de la solución de referencia se mantengan bajo cumplimiento.

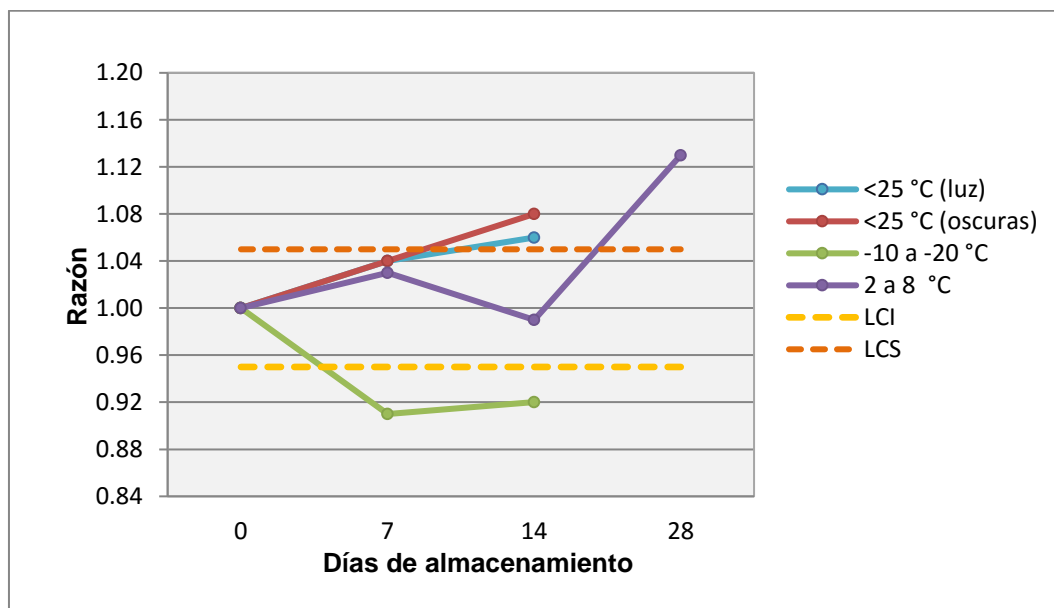
**Figura 17. Razones entre la Concentración de L-7 (b) en la Solución de Referencia y las Áreas obtenidas en Análisis Inicial y a los Días de Almacenamiento.**



**Fuente: Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, (2017).**

La figura 17 muestra el comportamiento del estándar de referencia de L-7 (b) en la solución preparada, revelando que a los 7 días de almacenamiento solamente bajo las condiciones de <math><25^{\circ}\text{C}</math> (luz) y la de 2 a

**Figura 18. Razones entre la Concentración de Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina en la Solución de Referencia y las Áreas obtenidas en Análisis Inicial y a los Días de Almacenamiento.**



Fuente: Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, (2017).

La figura 18 revela que el comportamiento del Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina es muy similar al estándar de referencia L-7 (b), encontrándose que a los 7 días se mantiene dentro del rango de especificación de 0.95-1.05 bajo las condiciones de <math><25^{\circ}\text{C}</math> (luz y oscuras) y 2 a

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede estimar como un período válido de almacenamiento para la solución de referencia 14 días después de la fecha de la preparación, pudiendo ser almacenada únicamente bajo la condición de 2 a

**Tabla 22. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto L-7 que fueron Evaluados a los 7 Días de Almacenamiento.**

Parámetros	<25°C (luz)			<25°C (oscuras)			-10 a -20 °C			2 a 8 °C		
	L-7 (a)	L-7 (b)	C.R. A	L-7 (a)	L-7 (b)	C.R. A	L-7 (a)	L-7 (b)	C.R. A	L-7 (a)	L-7 (b)	C.R. A
La relación señal-ruido debe ser no menor de 10.	13	12	11	13	12	11	13	10	11	13	10	11
La desviación estándar relativa para cinco inyecciones sucesivas no debe ser mayor a 2,0%.	0,8	1,1	1,6	23,3	19,4	1,6	13,8	11,4	11,9	1,5	1,3	1,4
El índice de pureza de pico es mayor o igual a 0,0.	0,7	0,6	0,6	0,9	0,9	0,8	0,9	0,1	0,1	0,9	0,1	0,7

Fuente: Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, (2017).

Con respecto a la aptitud del sistema cromatográfico empleado para la solución de referencia para sustancias relacionadas del producto L-7 se puede apreciar en la tabla 22 que a los 7 días de almacenamiento en todas las condiciones evaluadas se cumplieron los parámetros de relación señal-ruido y el índice de pureza de pico, mientras que la especificación sobre la desviación estándar relativa se cumplió únicamente para las condiciones de <25°C (luz) y 2 a 8 °C, condiciones en las que se obtuvieron resultados de concentración/área más similares entre los elementos de la solución de referencia.

**Tabla 23. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto L-7 que fueron Evaluados a los 14 Días de Almacenamiento.**

Parámetros	<25°C (luz)			<25°C (oscuras)			-10 a -20 °C			2 a 8 °C		
	L-7 (a)	L-7 (b)	C.R. A	L-7 (a)	L-7 (b)	C.R. A	L-7 (a)	L-7 (b)	C.R. A	L-7 (a)	L-7 (b)	C.R. A
La relación señal-ruido debe ser no menor de 10.	12	11	11	12	11	11	12	11	11	12	11	11
La desviación estándar relativa para cinco inyecciones sucesivas no debe ser mayor a 2,0%.	1,6	1,9	1,6	7,5	8,1	8,5	4,3	4,9	3,4	1,2	1	0,6
El índice de pureza de pico es mayor o igual a 0,0.	0,8	0,3	0,9	0,9	0,7	0,1	0,7	0,6	0,1	0,9	0,4	0,6

Fuente: Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, 2017.

Respecto a la aptitud del sistema cromatográfico a los 14 días de almacenamiento se puede apreciar en la tabla 23 que en todas las condiciones evaluadas se cumplieron los parámetros de relación señal-ruido y el índice de pureza de pico, mientras que la especificación sobre la desviación estándar relativa se cumplió únicamente para las condiciones de <25°C (luz) y 2 a 8 °C, manteniendo este comportamiento desde los 7 días de almacenaje.

**Tabla 24. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto L-7 que fueron Evaluados a los 28 Días de Almacenamiento.**

Parámetros	<25°C (luz)			<25°C (oscuras)			-10 a -20 °C			2 a 8 °C		
	L-7 (a)	L-7 (b)	C.R. A	L-7 (a)	L-7 (b)	C.R. A	L-7 (a)	L-7 (b)	C.R. A	L-7 (a)	L-7 (b)	C.R. A
La relación señal-ruido debe ser no menor de 10.	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	12	11	11
La desviación estándar relativa para cinco inyecciones sucesivas no debe ser mayor a 2,0%.	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	6,0	6,0	5,9
El índice de pureza de pico es mayor o igual a 0,0.	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,9	0,0	0,8

Fuente: Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, 2017.

Finalmente, la aptitud del sistema cromatográfico se evaluó a los 28 días de almacenamiento solamente para la condición de 2 a 8°C, debido a que fue la única condición en que todos los estándares de la solución de referencia de L-7 cumplieron la especificación de relación de concentración y áreas (0.95-1.05). En la tabla 24 se pueden observar los resultados obtenidos, en los cuales solamente hay cumplimiento de los parámetros de relación señal-ruido y el índice de pureza de pico, nuevamente la desviación no muestra cumplimiento ya que la solución no permanece estable hasta fecha como se ven en las figuras 16, 17 y 18.

Los resultados obtenidos con respecto a la aptitud del sistema cromatográfico empleado durante el tiempo en que se evaluó la solución de referencia para sustancias relacionadas de L-7, revelan que durante el período de validez propuesto para la solución, así como para la condición de almacenamiento establecida, el sistema cromatográfico se comporta de manera apta para lo que se requiere, ya que cumple con todos los criterios de aceptación establecidos.

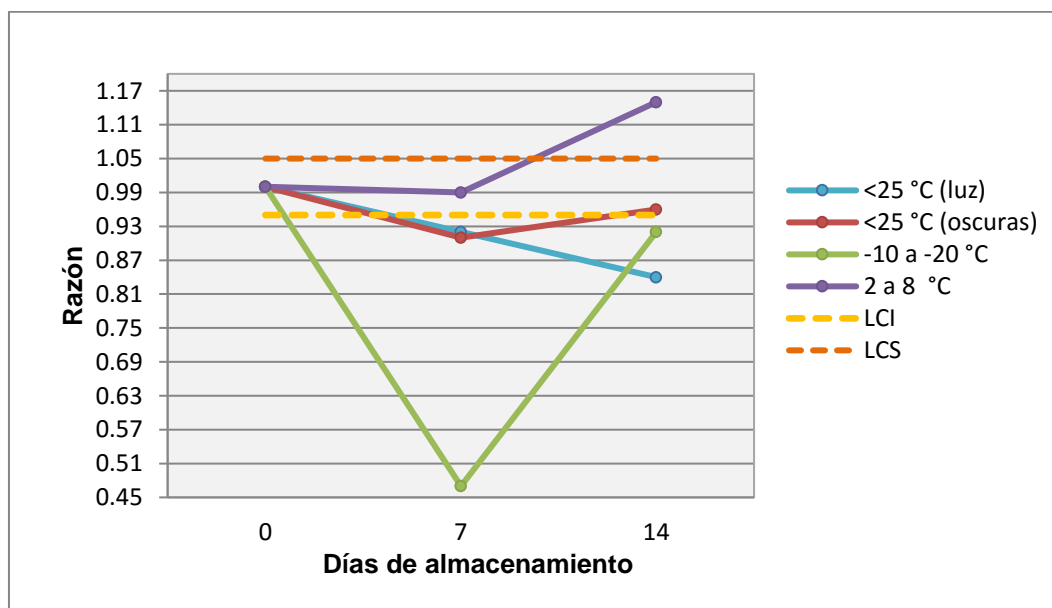
Para el producto codificado como G-2 la solución de referencia para sustancias relacionadas preparada contenía solamente el estándar del Compuesto Relacionado F, en la tabla 25 se muestra los resultados generales obtenidos mientras que en la figura 19 se aprecia más claramente el comportamiento de la solución a lo largo del tiempo de almacenamiento, así como para cada una de las condiciones de almacenamiento evaluadas.

**Tabla 25. Razón entre la Concentración del Compuesto Relacionado F en la Solución de Referencia de G-2 y las Áreas obtenidas en Análisis Inicial y a los Días de Almacenamiento.**

Condición de almacenamiento	Días de almacenamiento		
	0	7	14
<25 °C (luz)	1,00	0,92	0,84
<25 °C (oscuras)	1,00	0,91	0,96
-10 a -20 °C	1,00	0,47	0,92
2 a 8 °C	1,00	0,99	1,15

Fuente: Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, (2017).

**Figura 19. Razón entre la Concentración del Compuesto Relacionado F en la Solución de Referencia de G-2 y las Áreas obtenidas en Análisis Inicial y a los Días de Almacenamiento.**



Fuente: Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, (2017).

La figura 19 muestra como el Compuesto Relacionado F de G-2 en la solución preparada es muy inestable y solamente a los 7 días de almacenamiento para la condición de refrigeración de 2 a 8°C se mantiene entre los límites de control establecidos de 0.95 a 1.05, mientras que a los 14 días la condición que mostró cumplimiento fue la de temperatura ambiente con protección a la luz, resultado que se considera inválido ya que a los 7 días no había mostrado cumplimiento, inclusive bajo la misma temperatura pero sin la protección de la luz.

**Tabla 26. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto G-2 que fueron Evaluados a los 7 días de Almacenamiento.**

Parámetros	Condiciones de almacenamiento			
	<25 °C (luz)	<25 °C (oscuras)	-10 a -20 °C	2 a 8 °C
La resolución entre el Compuesto Relacionado F y G-2 debe ser de al menos 1,8.	1,7	1,7	1,7	1,7
La desviación estándar relativa para cinco inyecciones sucesivas no debe ser mayor a 2,0%.	1,3	1,3	46,7	1,7
El índice de pureza de pico es mayor o igual a 0,0.	0,6	0,7	0,7	0,2

Fuente: Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, 2017.

Para la verificación de la aptitud del sistema cromatográfico se preparó una solución que contenía el estándar de referencia del principio activo y el estándar del Compuesto Relacionado F, a partir de la cual se evaluó que se obtuviera una resolución entre los componentes de 1.8. La tabla 26 muestra que el sistema cromatográfico empleado a los 7 días de almacenamiento en ninguna de las condiciones evaluadas cumplió con el parámetro de resolución entre picos; sin embargo, la diferencia con respecto a la especificación es de 0.1, considerándose todavía aceptable para una columna cromatográfica que tenía previamente varias inyecciones de uso.

Mientras que el parámetro de desviación estándar relativa se evaluó con la solución de referencia del Compuesto Relacionado F, obteniéndose un cumplimiento de la desviación para la mayoría de las condiciones evaluadas, con excepción de la condición de -10 a -20 °C (ver tabla 26), en la cual el promedio de área obtenido difirió considerablemente con su valor inicial, generando un valor de razón concentración/área inaceptable (ver tabla 25). Con esta misma solución se evaluó la pureza de pico con resultados conformes para todos los casos.

**Tabla 27. Parámetros de Aptitud del Sistema Cromatográfico para el Producto G-2 que fueron Evaluados a los 14 Días de Almacenamiento.**

Parámetros	Condiciones de almacenamiento			
	<25 °C (luz)	<25 °C (oscuras)	-10 a -20 °C	2 a 8 °C
La resolución entre el Compuesto Relacionado F y G-2 debe ser de al menos 1,8.	0	0	0	0
La desviación estándar relativa para cinco inyecciones sucesivas no debe ser mayor a 2,0%.	3,6	17,6	26,9	17,7
El índice de pureza de pico es mayor o igual a 0,0.	0,5	0,3	0,1	0,4

Fuente: Informe de Vigencia de la Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas, 2017.

A los 14 días de almacenamiento no se logra obtener resolución alguna entre el Compuesto Relacionado F y G-2 (ver tabla 27) ya que tras su almacenamiento la solución se contaminó con otras impurezas provenientes del ambiente, debido probablemente a una inadecuado sellado del envase con el papel parafilm, generando varios picos secundarios que se interponían con los picos principales dificultando la separación, lo que hizo imposible evaluar este parámetro en la aptitud del sistema empleado para esta fecha.

Por otra parte, la desviación estándar relativa a los 14 días se incumplió para todas las condiciones de almacenamiento evaluadas, obteniéndose valores muy elevados para la mayoría de los casos (ver tabla 28), esto vinculado a los resultados de concentración/áreas obtenidos hasta esta fecha donde se aprecia que el comportamiento fue inestable para todas las condiciones de almacenaje evaluadas (ver figura 19). En el caso de la pureza de pico los resultados fueron conformes para todos los casos.

Debido a la conformidad del sistema cromatográfico a los 7 días de almacenamiento, así como los resultados obtenidos hasta esa fecha, se propone como el período de vigencia para la solución de referencia del Compuesto Relacionado F del producto G-2, 7 días a partir de la fecha de preparación siendo almacenado a una temperatura de 2 a 8 °C, condición que no mantiene la integridad de la solución si se almacena por más tiempo.

En la tabla 28 se muestra un resumen del período de vigencia y condiciones de almacenamiento que se establecieron, según los resultados analíticos, para cada una de las soluciones de referencia para sustancias relacionadas preparadas, estas medidas se espera que sean acatadas por el Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica, de manera que se asegure que la solución de referencia tras el tiempo de almacenamiento bajo las condiciones establecidas, sea todavía apta para su uso en la cuantificación de las sustancias relacionadas.

**Tabla 28. Período de Vigencia y Condiciones de Almacenamiento establecidas para las Soluciones de Referencia para Sustancias Relacionadas.**

Soluciones de Referencia para Sustancias Relacionadas	Período de Vigencia	Condición de almacenamiento
Producto A-3	14 días	Temperatura ambiente inferior a 25 °C, con o sin protección a la luz o temperatura de congelación de -10 a -20°C
Producto E-3	Solución de un sólo uso	No debe ser almacenada
Producto L-1	56 días	Temperatura ambiente inferior a 25 °C, con o sin protección a la luz
Producto I-3	Solución de un sólo uso	No debe ser almacenada
Producto L-7	14 días	2 a 8 °C
Producto G-2	7 días	2 a 8 °C

Fuente. Elaboración propia. (2017)

La validez del uso de las soluciones de referencia para sustancias relacionadas que se preparen y almacenen en el Laboratorio de Control de Calidad se garantiza a través de una serie de medidas que permite mantener las condiciones de almacenamiento establecidas, aun cuando se presenten situaciones externas que dificulten su almacenaje en los sitios seleccionados. Estas medidas se proporcionan en lo que se denominó Plan de Contingencia para el Almacenamiento de las Soluciones de Referencia.

## **Plan de Contingencia para el Almacenamiento de las Soluciones de Referencia.**

### **Soluciones de Referencia almacenadas a una temperatura ambiente menor a 25°C.**

1. Las soluciones de referencia deberán ser almacenadas en un frasco de vidrio de color ámbar con una tapa con cierre hermético, adicionalmente se le debe colocar una tira de papel parafilm alrededor de la tapa.
2. Cada frasco debe llevar pegado una etiqueta con la información necesaria para su identificación, esta etiqueta debe indicar el nombre de la solución, tipo de estándar utilizado (USP o BP), lote, peso, potencia y humedad de dicho estándar, diluyente empleado en la preparación, concentración de la solución, firma del analista que la preparó, fecha de preparación y de expira.
3. Para proteger la información indicada en la etiqueta de posibles derrames de la solución debe cubrirse con una cinta adhesiva transparente.
4. Cuando no haya disponible un recipiente de color ámbar, la solución puede almacenarse en un recipiente de vidrio transparente que debe ser envuelto con papel aluminio para proteger de la radiación.
5. Los frascos con las soluciones se colocarán en una urna en el área de preparación de muestras del laboratorio, o en su efecto en un área donde la temperatura ambiente sea menor de 25°C, aislado de fuentes de calor y con un medidor de temperatura para su verificación diaria.
6. El registro de la temperatura se realizará en forma manual dos veces al día, al inicio y al final de la jornada laboral por parte del personal asignado llenando el registro correspondiente.
7. Cuando el sistema de monitoreo de la temperatura indique valores que incumplen con el límite establecido, debe verificarse el impacto sobre la identidad física y química de la solución, o en su defecto la solución debe descartarse para evitar su uso en pruebas analíticas posteriores.

**Soluciones de Referencia almacenadas a una temperatura de refrigeración de 2 a 8 °C.**

1. Las soluciones de referencia deberán ser almacenadas en un frasco de vidrio con una tapa con cierre hermético, adicionalmente se le debe colocar una tira de papel parafilm alrededor de la tapa.
2. Cada frasco debe llevar pegado una etiqueta con la información necesaria para su identificación, esta etiqueta debe indicar el nombre de la solución, tipo de estándar utilizado (USP o BP), lote, peso, potencia y humedad de dicho estándar, diluyente empleado en la preparación, concentración de la solución, firma del analista que la preparó, fecha de preparación y de expira.
3. Para proteger la información indicada en la etiqueta de la humedad generada por el refrigerador, debe cubrirse con una cinta adhesiva transparente.
4. Cuando se requiera hacer limpieza de la refrigeradora o haya un corte del suministro eléctrico, las soluciones refrigeradas deben trasladarse a una hielera equipada con “ice pack” o acumuladores de frío.
5. Para prevenir que las soluciones se congelen se debe evitar el contacto directo de los frascos con los “ice pack” a través un recipiente de plástico.
6. Cuando el corte del suministro eléctrico se extienda por un tiempo mayor a la capacidad de enfriamiento de los “ice pack” o haya una avería de la refrigeradora, se debe solicitar el traslado de las soluciones hacia una refrigeradora que se encuentre en un área cercana.
7. Durante el almacenamiento de las soluciones de referencia en la hielera se debe monitorear continuamente la temperatura, si esta no se mantiene dentro del rango de 2 a 8 °C, se debe evaluar su impacto sobre la identidad física y química de la solución, o en su defecto la solución debe descartarse para evitar su uso en pruebas analíticas posteriores.
8. El registro de la temperatura del refrigerador se realizará en forma manual dos veces al día, al inicio y al final de la jornada laboral por parte del personal asignado llenando el registro correspondiente.
9. Si la temperatura que se registra del refrigerador incumple con el rango de temperatura permitido, se debe evaluar el impacto sobre la estabilidad de la solución o en su defecto debe descartarse.

**Soluciones de Referencia almacenadas a una temperatura de congelación de -10 a -20 °C.**

1. Las soluciones de referencia deberán ser almacenadas en un frasco de vidrio con una tapa con cierre hermético, adicionalmente se le debe colocar una tira de papel parafilm alrededor de la tapa.
2. Cada frasco debe llevar pegado una etiqueta con la información necesaria para su identificación, esta etiqueta debe indicar el nombre de la solución, tipo de estándar utilizado (USP o BP), lote, peso, potencia y humedad de dicho estándar, diluyente empleado en la preparación, concentración de la solución, firma del analista que la preparó, fecha de preparación y de expira.
3. Para proteger la información indicada en la etiqueta de la humedad generada por el congelador, debe cubrirse con una cinta adhesiva transparente.
4. Cuando se requiera hacer limpieza de la refrigeradora o haya un corte del suministro eléctrico, las soluciones deben trasladarse a una hielera equipada con “ice pack” o acumuladores de frío.
5. Cuando el corte del suministro eléctrico se extienda por un tiempo mayor a la capacidad de enfriamiento de los “ice pack” o haya una avería del congelador, se debe solicitar el traslado de las soluciones hacia una congeladora que se encuentre en un área cercana.
7. Durante el almacenamiento de las soluciones de referencia en la hielera se debe monitorear continuamente la temperatura, si esta no se mantiene dentro del rango de -10 a -20°C, se debe evaluar su impacto sobre la identidad física y química de la solución, o en su defecto la solución debe descartarse para evitar su uso en pruebas analíticas posteriores.
8. El registro de la temperatura del congelador se realizará en forma manual dos veces al día, al inicio y al final de la jornada laboral por parte del personal asignado llenando el registro correspondiente.
9. Si la temperatura que se registra del congelador incumple con el rango de temperatura permitido, se debe evaluar el impacto sobre la estabilidad de la solución o en su defecto debe descartarse.

## CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### Conclusiones

A partir de la investigación realizada se extraen las siguientes conclusiones relacionadas al objetivo general:

**Determinar del período de vigencia de las soluciones de referencia para sustancias relacionadas preparadas en el laboratorio de Control de Calidad de Calox, Costa Rica, de acuerdo con la selección realizada.**

Se determinaron los siguientes períodos de vigencia para las soluciones de referencia para sustancias relacionadas que resultaron seleccionadas:

- A-3 14 días si se almacena a una temperatura ambiente inferior a 25 °C, con o sin protección a la luz, o a una temperatura de congelación de -10 a -20°C.
- L-1 56 días si se almacena a una temperatura ambiente inferior a 25 °C, con o sin protección a la luz.
- L-7 es de 14 días si se almacena a una temperatura de 2 a 8 °C.
- G-2 es de 7 días si se almacena a una temperatura de 2 a 8 °C.

Se establece que las soluciones de referencia para sustancias relacionadas de los productos I-3 y E-3 son preparaciones de un solo uso, debiendo descartarse al día siguiente de la preparación.

A continuación, se muestran las conclusiones obtenidas para cada objetivo específico planteado según el objetivo general de la investigación:

### **Diseñar una matriz de selección para la escogencia de la muestra de estudio.**

La matriz de selección identifica los productos cuya determinación del período de vigencia minimiza los riesgos asociados al uso en la prueba de sustancias relacionadas de una solución almacenada.

Una matriz de selección es una herramienta útil para categorizar y calificar a un conjunto de elementos de acuerdo con las características de relevancia para una empresa, facilitando la selección de una muestra con gran valor para la investigación que se desea iniciar.

La información que proporciona una matriz de selección resulta fácil de graficar a través de herramientas estadísticas como el Diagrama de Pareto lo que facilita su interpretación.

La verificación del período de vigencia debe priorizarse también para las soluciones de referencia para sustancias relacionadas de los productos D-1, D-2 y S-6, de acuerdo a lo hallado con la matriz de selección y la regla 80-20% del Diagrama de Pareto.

**Elaborar el protocolo de verificación del período de vigencia de soluciones de referencia para sustancias relacionadas preparadas en el laboratorio de Control de Calidad de Calox, Costa Rica.**

El Protocolo de Verificación del Período de Vigencia de una Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas establece los principales lineamientos para la ejecución de un estudio de estabilidad en una solución de referencia.

Los protocolos de preparación de las soluciones de referencia que se sometieron a estudio generan soluciones con compatibilidad entre los reactivos, materiales y equipos utilizados, esto por estar basados en las monografías oficiales de farmacopeas de referencia.

El estudio de estabilidad de una solución de referencia se debe realizar en condiciones de almacenamiento farmacopeicas, ya que le da mayor respaldo al estudio si se realiza basado en lineamientos de una farmacopea de referencia.

**Ejecutar el protocolo de verificación del período de vigencia en la muestra seleccionada durante un periodo de seis meses.**

En ninguno de los casos se pudo ejecutar el protocolo de verificación del período de vigencia durante el plazo estipulado de seis meses debido a que las soluciones se mostraron inestables antes del tiempo previsto.

El uso de una solución de referencia para sustancias relacionadas almacenada por un tiempo mayor a su período de validez puede provocar falsos positivos o falsos negativos en la cuantificación de las sustancias.

El cálculo que relaciona la concentración inicial de una solución con sus áreas iniciales y finales permite apreciar el comportamiento de la solución de referencia a lo largo del tiempo de almacenamiento.

La verificación de los parámetros de aptitud del sistema permite garantizar que el equipo está calificado para lograr el desempeño requerido, dándole confiabilidad a los datos obtenidos.

**Proponer un plan de contingencia y la documentación necesaria para asegurar la calidad de las soluciones de estándares preparadas.**

Las medidas descritas en el plan de contingencia buscan asegurar que, ante cualquier incidente ocurrido durante el almacenamiento de las soluciones, éstas conserven sus propiedades y sigan siendo aptas para el uso como patrón de referencia en las pruebas de Control de Calidad de los medicamentos.

El protocolo general de verificación del periodo de vigencia, los protocolos de preparación de las soluciones de referencia y los informes de calidad para el reporte de resultados corresponden parte de la documentación necesaria para asegurar la calidad de las soluciones de estándares preparadas.

**Recomendaciones**

Basándose en los resultados obtenidos y en las conclusiones extraídas de la investigación, pueden derivarse las siguientes recomendaciones:

Implementar el Protocolo de Verificación del Período de Vigencia de una Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas con los productos restantes.

Realizar la determinación del período de vigencia de las Soluciones de Referencia para sustancias Relacionadas por campaña de producción, de manera que se pueda aprovechar el sistema cromatográfico y los recursos.

Coordinar con el Departamento de Producción para que se reorganice la planificación de la producción por campañas más largas de un mismo producto farmacéutico, con la finalidad de darle un máximo aprovechamiento a las soluciones de referencia.

Aprovechar la campaña de producción de I-3 y E-3 para evaluar la estabilidad de las soluciones de referencia con una mayor periodicidad durante los primeros 7 días de almacenamiento.

Evaluar la posibilidad de establecer el período de vigencia de otras soluciones preparadas con estándares de referencia, considerando la cantidad de lotes que se fabrican al año, el consumo anual de estándares, el costo anual de la compra y la factibilidad de realizar los estudios de estabilidad.

Realizar un estudio de factibilidad económica, con el propósito de sustentar alternativas para la ejecución de los protocolos de vigencia ya sea internamente o por contratación, según sea el caso:

- Destinar el uso de un Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución exclusivamente para realizar los estudios de estabilidad de soluciones de referencia, considerando, de ser necesario, la solicitud de una plaza para un analista que se dedique a esta actividad.
- Realizar la contratación de un servicio externo para la verificación del período de vigencia de las soluciones de referencia preparadas, en caso de no poder realizarse en el laboratorio.

Solicitar la compra de una balanza microanalítica con el propósito de que los estándares de referencia rindan para más preparaciones, procurando que haya un área con las condiciones apropiadas para la colocación de dicho instrumento.

Incorporar en el procedimiento de preparación de estándares las medidas establecidas en el plan de contingencia, capacitando al personal para que acate dichas instrucciones.

Llevar el control de la preparación y la expira de las soluciones de referencia mediante una bitácora o registro electrónico.

Agregar a los métodos analíticos de las soluciones de referencia evaluadas una reseña que indique: “La solución preparada según la monografía oficial es estable si se almacena a una temperatura de () °C y durante un tiempo de () días.

En el desarrollo de nuevos métodos analíticos incorporar la fecha de vigencia de las soluciones de referencia, así como las condiciones apropiadas de almacenamiento.

Establecer que el almacenamiento de las soluciones de referencia se realice hasta el período de validez determinado mediante el protocolo respectivo.

## BIBLIOGRAFÍA

Acuña, J. (2012) Control de Calidad. Cuarta edición. Editorial Tecnológica de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. pp. 25 y 29.

Alfaro, S. (2012) Validación prospectiva de un cubículo de estabilidad en condiciones naturales, temperatura y humedad constante, en el Laboratorio de Tecnologías Biotecnológicas S.A., durante los meses de enero a abril de 2012. Tesis para optar por el grado académico de Licenciatura en Farmacia. Universidad Internacional de las Américas.

Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (2004) Desarrollo de un estudio de estabilidad. Editorial MPM, Madrid. pp. 12-14.

Bajaj, S.; Singla, D. & Sakhuja, N. (2012) Stability Testing of Pharmaceutical Products. Journal of Applied Pharmaceutical Science 02 (03): p.136

Bogantes, D. (2013) Estabilidad de la suspensión reconstituida de Claritromicina CALOX 250mg/5mL de acuerdo con el período de validez etiquetado. Tesis para optar por el grado académico de Licenciatura en Farmacia. Universidad Internacional de las Américas.

Bogantes, M. (2013) Creación de un sistema digital para el manejo de estabilidad a largo plazo. Estudio realizado durante el II semestre del 2012. Tesis para optar por el grado académico de Licenciatura en Farmacia. Universidad de Ciencias Médicas. pp.21-25

Bovill, N. y Calixto, J. (2015) Estudios de estabilidad de medicamentos bajo sistemas BPL y GMP. Trabajo fin de grado Ingeniería Química. Universidad del País Vasco. pp. 17-18.

Comisión de las Comunidades Europeas (2002) Decisión de la comisión de 12 de agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. pp. 18-26.

Consejo Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH) (2003) Guidance for Industry Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products. Revisión 2. Estados Unidos.

Consejo de Ministros de Integración Económica (2007) Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 11.03.42:07: Productos Farmacéuticos. Medicamentos de uso humano. Buenas Prácticas de Manufactura para la Industria Farmacéutica. Costa Rica.p.5

Consejo de Ministros de Integración Económica. (2010). Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 11.01.04:10. Productos Farmacéuticos. Estudios de Estabilidad de Medicamentos para uso Humano. Costa Rica.

Corea, J. (2011) Determinación de la estabilidad de las preparaciones magistrales de espironolactona, furosemida e hidralazina clorhidrato preparadas en el Hospital de México. Tesis para optar por el grado académico de Licenciatura en Farmacia. Universidad de Costa Rica.

Farmacopea Británica (2015) Apéndice III Técnicas de Separación Cromatográfica. pp.-188-194. Apéndice III D Cromatografía Líquida. p.203. Capítulo Suplementario IV M. pp. 758-759. Capítulo Suplementario I A. p.637.

Fonseca, L. y Berrocal, L. (1956) Cinética química aplicada a los procesos de descomposición de los fármacos: conceptos básicos de estabilidad de los medicamentos. 1era edición. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, C.R. 49-64pp.

García, M.J; Quintana, M.C y Da Silva, M.P. (2012) Introducción a la Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Editorial Universidad Autónoma de Madrid. pp.23 y 25.

Gamboa, R. (2012) Validación del protocolo de estabilidad acelerada realizado en el Laboratorio de Tecnologías Bio-Integrales S, A. Tesis para optar por el grado académico de Licenciatura en Farmacia. Universidad Internacional de las Américas.

Hernández, R. (2010) Metodología de la Investigación. Quinta Edición. Editorial Mc Graw Hill, México. pp.4,91,128 y 130.

International Conference on Harmonisation (2003) Stability Testing of New Drug Substances and Products. Q1A(R2). p. 3.

Ministerio de la Protección Social (2011) Guía para el desarrollo y presentación de los estudios de estabilidad de medicamentos convencionales. Consultado el 02 de agosto del 2016 en [www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/GUÍA%20PARA%20EL%20DESARROLLO%20Y%20PRESENTACIÓN%20DE%20LOS%20ESTUDIOS%20DE%20ESTABILIDAD%20DE%20MEDICAMENTOS%20CONVENCIONALES.pdf](http://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/GUÍA%20PARA%20EL%20DESARROLLO%20Y%20PRESENTACIÓN%20DE%20LOS%20ESTUDIOS%20DE%20ESTABILIDAD%20DE%20MEDICAMENTOS%20CONVENCIONALES.pdf)

Mora, S. y Morice, M. (2013) Estudio de estabilidad del Diclofenaco resinato. Proyecto de Investigación para optar por el grado de Licenciatura en Farmacia. Universidad de Iberoamérica.

Murillo, J. (2015) Reformulación, estudio de estabilidad natural y acelerada del inyectable Dexadrol 2 % p/v de uso veterinario en la empresa Faryvet S.A. Tesis para optar por el grado académico de Licenciatura en Farmacia. Universidad Internacional de las Américas.

Organización Mundial de la Salud (1999) Medicamentos falsificados - Pautas para la formulación de medidas para combatir los medicamentos falsificados. Consultado el 19 de julio del 2016 en <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2968s/2.1.html>

Organización Mundial de la Salud (2002). Buenas prácticas para Laboratorios Nacionales de Control Farmacéutico. Informe No. 909 Anexo No. 3. pp. 2, 3.

Organización Mundial de la Salud (2010) Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos. Serie de Informes Técnicos de la OMS, No. 957. p.5

QuimiNet. (2006) Las Sustancias de Referencia en la industria farmacéutica. Consultado el 19 de agosto del 2016 en <http://www.quiminet.com/articulos/las-sustancias-de-referencia-en-la-industria-farmaceutica-17185.htm>

Shimadzu LC2030. (2012) Guía teórica de adquisición y procesamiento de datos. Sección 4 Algoritmos Pureza de Pico.

Skoog, D.; West, D.; Holler, F. y Crouch, S. (2015) Fundamentos de Química Analítica. Novena edición. Editorial Cengage Learning. México. pp.915-917.

USP 39-NF 34 (2016) Cromatografía <621>. Impurezas en fármacos y productos farmacéuticos <1086>. Consideraciones sobre estabilidad en la práctica de dispensación <1191>. pp. 491-502, pp. 1274-1276, pp. 1702-1704.

USP (2016) Estándares de Referencia (ER). Recuperado el 27 de julio del 2016 de <http://www.usp.org/es/inicio-de-asistencia-tecnica/estandares-de-referencia>

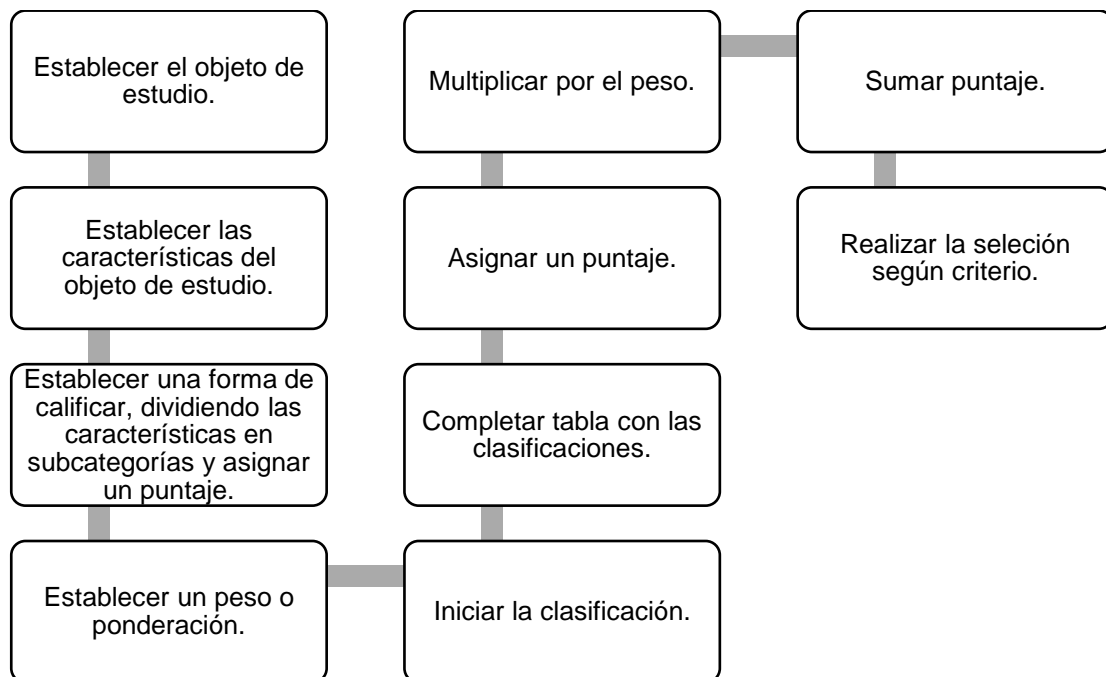
World Health Organization (2010). The International Pharmacopoeia – related substances tests: dosage form monographs guidance notes. Annex 1. pp. 45-46.

## APÉNDICES

### Apéndice A. Procedimiento Estándar Operativo: Análisis de riesgo cuantitativo, cualitativo y matriz de selección

De este procedimiento se tomó únicamente lo relacionado a la elaboración de una matriz de selección. Los pasos que se siguieron para el diseño de la matriz se proporcionan a manera resumida en la figura No.1.

**Figura 1. Procedimiento para la elaboración de una matriz de selección.**



Fuente: Calox, Costa Rica. (2016)

## **Apéndice B. Protocolo de Verificación del Período de Vigencia de una Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas**

### **1. OBJETIVO:**

**1.1** Establecer un procedimiento para realizar el estudio de estabilidad a las soluciones de referencia para sustancias relacionadas que se prepararan en el Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica, con la finalidad de establecer su período de vigencia de acuerdo a las Buenas Prácticas de Manufactura vigentes.

### **2. ALCANCE:**

**2.1** Aplica para todas las soluciones que se preparen con los estándares de referencia empleados en la prueba de sustancias relacionadas, como parte del Control de Calidad de productos terminados de Calox de Costa Rica.

### **3. RESPONSABLES:**

**3.1** De ejecutar la verificación del período de vigencia de las soluciones de referencia para sustancias relacionadas que se preparen en el laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica conforme a lo descrito en este protocolo: Analistas de Control de Calidad.

**3.2** De proporcionar los recursos necesarios y entrenar al personal asignado para ejecutar el estudio de estabilidad; además de velar por el cumplimiento de lo indicado en el protocolo: Coordinador de Control de Calidad.

### **4. FRECUENCIA:**

**4.1** De establecer la fecha de vigencia: Cada vez que se prepare y almacene una nueva solución de referencia para sustancias relacionadas.

**4.2** De actualizar la fecha de vigencia en el archivo de Excel Estatus Vigencia de Soluciones de Referencia: cada vez que se prepare una solución de referencia para sustancias relacionadas.

### **5. EQUIPOS Y MATERIALES:**

**5.1** Estándar de referencia de la sustancia relacionada.

**5.2** Método de análisis del producto terminado al cual corresponde la sustancia relacionada. **5.3** Archivo en Excel de Estatus de Vigencia de Soluciones de Referencia.

## **6. PROCEDIMIENTO:**

**6.1** Condiciones de almacenamiento para realizar el estudio de estabilidad:

**6.1.1** Las soluciones de referencia para sustancias relacionadas que se preparen en el Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica deben ser almacenadas en recipientes de vidrio, debidamente tapadas y rotuladas para todos los casos.

**6.1.2** La cantidad de solución de referencia a preparar debe ser una cantidad suficiente para realizar las pruebas durante las frecuencias previstas y hasta un tiempo de 6 meses.

**6.1.3** Se deberá envasar la cantidad suficiente para almacenar en tres diferentes condiciones:  $-10$  a  $-20^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  (rango de temperatura del congelador),  $+2$  a  $+8^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  (rango de temperatura del refrigerador) y  $< 25^{\circ}\text{C}$  (temperatura ambiente del área de preparación de muestras).

**6.1.4** Para efecto de identificación de las condiciones en las muestras se asignará una letra A para  $< 25^{\circ}\text{C}$  en condiciones de luz, B para  $< 25^{\circ}\text{C}$  en condiciones de oscuridad, C para  $-10$  a  $-20^{\circ}\text{C}$  y D para  $+2$  a  $+8^{\circ}\text{C}$ .

**6.2** Frecuencia de análisis de las soluciones de referencia almacenadas:

**6.2.1** Las soluciones de referencia preparadas y almacenadas se analizarán con las siguientes frecuencias: Inicial (día 0), 7,14, 28,42, 56,70, 84, 98,112, 126, 150,165 y 180 días.

**6.2.2** En caso de no poder ejecutarse alguno de los análisis en la fecha prevista se puede realizar con una diferencia de  $\pm 3$  días, de manera que corresponda a una fecha intermedia con respecto al siguiente análisis.

**6.2.3** Se deberá evaluar la estabilidad de la solución de referencia en tantas frecuencias como sus propiedades fisicoquímicas lo permitan, de acuerdo al grado de cumplimiento de los criterios de aceptación establecidos.

**6.2.4** La fecha de vigencia de las soluciones de referencia se debe incluir en el archivo Estatus de Vigencia de Soluciones de Referencia; el cual se puede ubicar de la siguiente

manera: Mis sitios de red/ Red en Nas/ Carpeta Status/ Estatus de Vigencia de Soluciones de Referencia.

### **6.3 Método de análisis**

**6.3.1** Para la ejecución del estudio se utilizará el método de análisis del producto terminado al cual corresponde la solución de referencia.

**6.3.2** Este método debe incluir paso a paso cómo realizar la prueba de sustancias relacionadas, el cual debe estar conforme al método oficial descrito en alguna de las farmacopeas de referencia.

**6.3.3** Las modificaciones en la composición de la fase móvil o en algunas de las condiciones cromatográficas se debe establecer en el análisis inicial de acuerdo a las necesidades de cumplimiento de la aptitud del sistema, siempre que se cumpla con los requisitos establecidos en el apéndice <621> de Cromatografía de la Farmacopea de los Estados Unidos 39-Formulario Nacional 34. No se permiten modificaciones adicionales en el sistema cromatográfico una vez cumplido el análisis inicial.

**6.3.4** Una vez concluido el análisis se debe generar e imprimir un reporte, por nombre, del producto al cual pertenece la solución de referencia seguido de la frecuencia de análisis.

### **6.4 Preparación de la muestra**

**6.4.1** Se debe preparar una solución madre con el estándar de referencia de la sustancia relacionada según lo descrito en el método de análisis del producto terminado.

**6.4.2** Con esta solución madre se deben preparar 40 alícuotas a la concentración que se requiera para la prueba de sustancias relacionadas.

**6.4.3** Se debe envasar un volumen adecuado en los recipientes apropiados, etiquetarlos y almacenarlos en las condiciones establecidas en este protocolo. Almacenando 10 alícuotas en cada una de las condiciones establecidas en el punto 6.1.3.

### **6.5 Parámetros a evaluar durante el estudio de estabilidad:**

**6.5.1** Durante el estudio se evaluará el grado de concordancia del o los picos de la solución de referencia con el cromatograma obtenido en análisis inicial.

**6.5.2** En todos los casos el cromatograma debe revelar pureza para cada uno de los picos que provengan de algún componente de la solución de referencia, escogiendo la inyección número 6 para efecto de la generación del reporte.

**6.5.3** Para determinar la conformidad de los resultados se debe calcular la relación entre la concentración de partida de la solución de referencia con la respuesta del equipo (área), la cual debe estar entre 0,95 – 1.05 y se calcula con la siguiente fórmula.

$$\frac{\text{concentración inicial}}{\text{promedio área inicial}} / \frac{\text{concentración inicial}}{\text{promedio área obtenida}}$$

**6.5.4** Cuando la solución de referencia no cumpla con las especificaciones establecidas se da por concluido el estudio de estabilidad.

## **6.6** Verificación del análisis:

**6.6.1** Todo análisis debe ser verificado a través del cumplimiento de parámetros de aptitud que se establecen para la prueba de sustancias relacionadas en el método oficial utilizado.

**6.6.2** Como parámetro de aptitud se considera la resolución entre los picos, la desviación estándar para inyecciones replicadas, el factor de asimetría, el límite de cuantificación y/o la relación señal-ruido, los cuales están establecidos en el método oficial de la farmacopea de referencia utilizada.

## **6.7** Resultados y reporte del estudio de estabilidad:

**6.7.1** Los resultados que se generan para cada producto y por frecuencia de análisis debe guardarse en formato digital en la dirección C:/LabSolutions/Data/EstabilidadSR/" Nombre del principio activo con forma farmacéutica" /" Fecha de análisis"

**6.7.2** Una impresión del reporte debe almacenarse en el archivo correspondiente.

**6.7.3** El formato del reporte se establecerá en el análisis inicial y en las siguientes frecuencias de análisis no debe ser modificado. El reporte además de incluir las inyecciones debe llevar los parámetros de aptitud del sistema y la pureza para la inyección número 6, en caso de ser necesario se pueden generar dos reportes.

## **6.8** Registro del Estudio de Estabilidad:

**6.8.1** Cuando se inicie una verificación del período de vigencia para una nueva solución de referencia se debe generar un informe el cual se irá actualizado con la información necesaria hasta culminar el estudio.

**6.8.2** Tras el uso del Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia se debe llenar la bitácora de uso del equipo, así como la hoja de uso de la columna cromatográfica.

**6.8.3** Se debe llevar el control manual o computarizado de las condiciones de almacenamiento establecidas.

## **6.9 Cronograma del estudio de estabilidad**

**6.9.1** Antes de iniciar el estudio de estabilidad de alguna solución de referencia para sustancias relacionadas se debe crear un cronograma según el día que se empezará el estudio y las siguientes fechas de análisis según las frecuencias establecidas en este protocolo.

**6.9.2** Este cronograma debe respetarse en la medida que sea posible, se permite una variación de la frecuencia de análisis de  $\pm 3$  días, de manera que corresponda a una fecha intermedia con respecto al siguiente análisis.

**7. DOCUMENTOS RELACIONADOS: N/A**

**8. ANEXOS: N/A**

## **Apéndice C. Protocolo de Preparación de Soluciones de Referencia de Sustancias Relacionadas del producto A-3 para la Verificación del Período de Vigencia**

### **1. OBJETIVO:**

**1.1** Establecer un procedimiento para la preparación de las soluciones de referencia para sustancias relacionadas de A-3 empleadas en la verificación del período de vigencia, de acuerdo a las Buenas Prácticas de Manufactura vigentes.

### **2. ALCANCE:**

**2.1** Aplica para todas las soluciones que se preparen con los estándares de referencia empleados en la prueba de sustancias relacionadas de A-3, como parte del Control de Calidad de productos terminados de Calox de Costa Rica.

### **3. RESPONSABLES:**

**3.1** De ejecutar la preparación de las soluciones de referencia para sustancias relacionadas de A-3 en el laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica conforme a lo descrito en este protocolo: Analistas de Control de Calidad.

**3.2** De proporcionar los recursos necesarios y entrenar al personal asignado para ejecutar el protocolo; además de velar por el cumplimiento: Coordinador de Control de Calidad.

### **4. FRECUENCIA:**

**4.1** Las soluciones de referencia se deben preparar cada vez que se desee evaluar su período de vigencia ya sea por cambios en las condiciones del protocolo o debido a la integración de nuevas soluciones de referencia.

### **5. EQUIPOS Y MATERIALES:**

**5.1** Estándar(es) de referencia de la(s) sustancia(s) relacionada(s).

**5.2** Balanza analítica.

**5.3** Bomba de vacío.

**5.4** Cristalería: 2 balones aforados de 50 mL, 40 balones de 20 mL.

**5.5** Reactivos: trietilamina, metanol, acetonitrilo y agua purificada.

**5.6** Micropipeta.

**5.7** Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia Shimadzu LC-2030C

**5.8** Columna C18 No. 76 Zorbax Eclipse Plus 4,6 mm x 250 mm, 5,0  $\mu$ m

## 6. PROCEDIMIENTO:

### 6.1 Preparación de solventes:

**6.1.1** Solución amortiguadora: Agregue 7.0 mL de trietilamina a un recipiente que contenga 900 mL de agua purificada. Ajuste la solución con ácido fosfórico a un pH de  $3.0 \pm 0.1$ . Diluya a volumen con agua purificada y mezcle bien.

**6.1.2** Fase móvil: En un recipiente de capacidad adecuada prepare una mezcla de metanol, acetonitrilo y solución amortiguadora (35:15:50). Desgasifique y filtre por filtro de membrana de  $0.45 \mu\text{m}$ . Prepare 1L para la preparación de muestras y un 1 L para la corrida.

### 6.2 Preparación de la solución de referencia:

**6.2.1** Solución madre del estándar de A-3: Pese con exactitud alrededor de 137.5 mg de estándar de referencia A-3 en un balón aforado de 50 mL, agregue 25 ml de fase móvil, someta a ultrasonido durante 10 min, deje enfriar a temperatura ambiente, diluya a volumen con fase móvil y mezcle. (Concentración de 2.75 mg/ml de A-3)

**6.2.2** Solución madre del estándar de compuesto relacionado A de A-3: Pese con exactitud alrededor de 12.5 mg de Compuesto Relacionado A en un balón aforado de 50 mL, agregue 25 ml de fase móvil, someta a ultrasonido durante 10 min, deje enfriar a temperatura ambiente, diluya a volumen con fase móvil y mezcle. (Concentración de 0.25 mg/ml de Compuesto Relacionado A)

**6.2.3** Solución estándar: Transfiera una alícuota de 200  $\mu\text{l}$  de la solución madre del estándar de A-3 y otra de 200  $\mu\text{l}$  de la solución madre del estándar de compuesto relacionado A a un balón aforado de 20 ml, lleve a volumen con fase móvil y mezcle. Repita este paso para un total de 40 alícuotas. Filtre por filtro de membrana de  $0.45 \mu\text{m}$  cada balón a viales (usar viales ámbar para el caso de protección de la luz o envuelva en papel aluminio al almacenar). (Concentración de 0.0275 mg/ml de A-3 y 0.0025 mg/ml de Compuesto Relacionado A)

**6.2.4** Almacene 10 viales bajo las siguientes condiciones:  $-10$  a  $-20^\circ \text{C} \pm 0.5^\circ \text{C}$ ,  $2$  a  $8^\circ \text{C} \pm 0.5^\circ \text{C}$  y  $<25^\circ \text{C} \pm 0.5^\circ \text{C}$  (luz y oscuras). Para efecto de identificación de las condiciones en las muestras se asignará una letra A para  $<25^\circ \text{C}$  en condiciones de luz, B para  $<25^\circ \text{C}$  en oscuridad, C para  $-10$  a  $-20^\circ \text{C}$  y D para  $2$  a  $8^\circ \text{C}$ .

### 6.3 Condiciones del sistema cromatográfico:

**6.3.1** Inyecte 50  $\mu\text{l}$  de cada vial con la solución estándar preparada al sistema cromatográfico operando bajo las siguientes condiciones: columna C18 de 3,9 mm x 150 mm de  $5,0 \mu\text{m}$  (se puede sustituir por la columna C18 de 4,6 mm x 250 mm,  $5,0 \mu\text{m}$  haciendo la modificación correspondiente en el flujo), temperatura de la columna de 35

°C, velocidad de flujo de 1 mL/min (2.3 ml/min al utilizar la columna larga) y a una longitud de onda de 237 nm.

#### 6.4 Aptitud del sistema

**6.4.1** Evalúe si la resolución entre el Compuesto Relacionado A y el A-3 cumple con el siguiente criterio: No menos de 8.5 entre los picos señalados.

**6.4.2** Evalúe si la desviación estándar relativa de cinco inyecciones consecutivas cumple con el criterio: No más de 2.0%.

**6.4.3** Evalúe si el factor de asimetría cumple con el siguiente criterio: No más de 2.0 para ambos picos.

**6.4.4** Evalúe que el índice de pureza de pico sea igual o mayor a 0.

**6.4.5** Se realiza una corrida inicial y durante el estudio se evalúa el grado de concordancia de los picos de la solución de referencia con el cromatograma obtenido en análisis inicial.

**6.4.6** Determine la conformidad de los resultados calculando la relación entre la concentración de partida de la solución de referencia con la respuesta del equipo (área), la cual debe estar entre 0,95 – 1.05 y se calcula con la siguiente fórmula.

$$\frac{\text{concentración inicial}}{\text{promedio área inicial}} / \frac{\text{concentración inicial}}{\text{promedio área obtenida}}$$

**6.4.7** Cuando la solución de referencia no cumpla con las especificaciones establecidas se da por concluido el estudio de estabilidad.

#### 6.5 Resultados y reporte del estudio de estabilidad:

**6.5.1** Los resultados generados se deben guardar en la dirección C: /LabSolutions/Data/EstabilidadSR/A-3 Tabletas/" Fecha de análisis"

**6.5.2** Una impresión del reporte debe almacenarse en el archivo correspondiente.

**6.5.3** Los datos se deben ingresar al Informe de Vigencia de Soluciones de Referencia para Sustancias Relacionadas correspondiente.

### 7. DOCUMENTOS RELACIONADOS:

**7.1** Protocolo de Verificación del Período de Vigencia de una Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas.

**7.2** Informe de Vigencia de Soluciones de Referencia para Sustancias Relacionadas

### 8. ANEXOS: N/A

## **Apéndice D. Protocolo de Preparación de Soluciones de Referencia de Sustancias Relacionadas del producto L-1 para la Verificación del Período de Vigencia**

### **1. OBJETIVO:**

**1.1** Establecer un procedimiento para la preparación de las soluciones de referencia para sustancias relacionadas de L-1 empleadas en la verificación del período de vigencia, de acuerdo a las Buenas Prácticas de Manufactura vigentes.

### **2. ALCANCE:**

**2.1** Aplica para todas las soluciones que se preparen con los estándares de referencia empleados en la prueba de sustancias relacionadas de L-1, como parte del Control de Calidad de productos terminados de Calox de Costa Rica.

### **3. RESPONSABLES:**

**3.1** De ejecutar la preparación de las soluciones de referencia para sustancias relacionadas de L-1 en el laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica conforme a lo descrito en este protocolo: Analistas de Control de Calidad.

**3.2** De proporcionar los recursos necesarios y entrenar al personal asignado para ejecutar el protocolo; además de velar por el cumplimiento: Coordinador de Control de Calidad.

### **4. FRECUENCIA:**

**4.1** Las soluciones de referencia se deben preparar cada vez que se desee evaluar su período de vigencia ya sea por cambios en las condiciones del protocolo o debido a la integración de nuevas soluciones de referencia.

### **5. EQUIPOS Y MATERIALES:**

**5.1** Estándar(es) de referencia de la(s) sustancia(s) relacionada(s).

**5.2** Balanza analítica.

**5.3** Bomba de vacío.

**5.4** Cristalería: balón aforado de 100 mL, balón aforado de 50 mL, 40 balones de 20 mL.

**5.5** Reactivos: sulfato cúprico, L-isoleucina, acetato de amonio, metanol, acetonitrilo y agua purificada.

**5.6** Micropipeta.

**5.7** Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia Shimadzu LC-2030C

**5.8** Columna C18 No. 47 Symmetry 4,6 mm x 250 mm, 5,0  $\mu$ m

## **6. PROCEDIMIENTO:**

### **6.1 Preparación de solventes:**

**6.1.1** Diluyente: En un recipiente con capacidad adecuada prepare una mezcla de acetonitrilo y agua purificada (20:80)

**6.1.2** Fase móvil: En un recipiente de capacidad adecuada pese alrededor de 874 mg de sulfato cúprico, 918 mg de L-iso-leucina y 5.94 g de acetato de amonio. Agregue 700 ml de agua purificada y mezcle hasta disolver. Una vez disuelto agregue 300 ml de metanol y mezcle con ayuda de un agitador magnético. Prepare 1L para la preparación de muestras y un 1 L para la corrida. Desgasifique y filtre por un filtro de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ .

### **6.2 Preparación de la solución de referencia**

**6.2.1** Solución madre del estándar de L-1: Pese con exactitud el equivalente a 250 mg de estándar de referencia de L-1 en un balón aforado de 50 mL, agregue 30 ml de diluyente, someta a ultrasonido durante 15 min, deje enfriar a temperatura ambiente, diluya a volumen con diluyente y mezcle. (Concentración de 5 mg/ml de L-1)

**6.2.2** Solución madre del estándar de compuesto relacionado A: Pese con exactitud alrededor de 10 mg de Compuesto Relacionado A de L-1 estándar de referencia en un balón aforado de 100 mL, agregue 5 ml de fase móvil, someta a ultrasonido durante 5 min, agregue 60 ml de fase móvil, someta a ultrasonido durante 15 min, deje enfriar a temperatura ambiente, diluya a volumen con fase móvil y mezcle. (Concentración de 0.1 mg/ml de Compuesto Relacionado A)

**6.2.3** Solución estándar: Transfiera una alícuota de 800  $\mu\text{l}$  de la solución madre del estándar de L-1 y otra de 200  $\mu\text{l}$  de la solución madre del estándar de compuesto relacionado A a un balón aforado de 20 ml, lleve a volumen con fase móvil y mezcle. Repita este paso para un total de 40 alícuotas. Filtre por filtro de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  cada balón a viales (usar viales ámbar para el caso de protección de la luz o envuelva en papel aluminio al almacenar). (Concentración de 0.2 mg/ml de L-1 y 0.001 mg/ml de Compuesto Relacionado A)

**6.2.4** Almacene 10 viales bajo las siguientes condiciones: -10 a -20° C  $\pm$  0.5 °C, 2 a 8°C  $\pm$  0.5 °C y <25°C  $\pm$  0.5 °C (luz y oscuras). Para efecto de identificación de las condiciones en las muestras se asignará una letra A para <25°C en condiciones de luz, B para <25°C en oscuridad, C para -10 a -20° C y D para 2 a 8°C.

### **6.3 Condiciones del sistema cromatográfico**

**6.3.1** Inyecte 25 µl de cada vial con la solución estándar preparada al sistema cromatográfico operando bajo las siguientes condiciones: columna C18 de 4,6 mm x 250 mm de 5,0 µm, temperatura de la columna de 45 °C, velocidad de flujo de 0.8 mL/min y a una longitud de onda de 360 nm.

#### **6.4. Aptitud del sistema**

**6.4.1** Evalúe si el factor de asimetría cumple con el siguiente criterio: No más de 1.8 para los picos de L-1 y del Compuesto Relacionado A.

**6.4.2** Evalúe si la desviación estándar relativa de cinco inyecciones consecutivas cumple con el criterio: No más de 2.0%.

**6.4.3** Evalúe que el índice de pureza de pico sea igual o mayor a 0.

**6.4.4** Se realiza una corrida inicial y durante el estudio se evalúa el grado de concordancia de los picos de la solución de referencia con el cromatograma obtenido en análisis inicial.

**6.4.5** Determine la conformidad de los resultados calculando la relación entre la concentración de partida de la solución de referencia con la respuesta del equipo (área), la cual debe estar entre 0,95 – 1.05 y se calcula con la siguiente fórmula.

$$\frac{\text{concentración inicial}}{\text{promedio área inicial}} / \frac{\text{concentración inicial}}{\text{promedio área obtenida}}$$

**6.4.6** Cuando la solución de referencia no cumpla con las especificaciones establecidas se da por concluido el estudio de estabilidad.

#### **6.5. Resultados y reporte del estudio de estabilidad:**

**6.5.1** Los resultados generados se deben guardar en la dirección C: /LabSolutions/Data/EstabilidadSR/L-1 Tabletas/" Fecha de análisis"

**6.5.2** Una impresión del reporte debe almacenarse en el archivo correspondiente.

**6.5.3** Los datos se deben ingresar al Informe de Vigencia de Soluciones de Referencia para Sustancias Relacionadas correspondiente.

### **7. DOCUMENTOS RELACIONADOS:**

**7.1** Protocolo de Verificación del Período de Vigencia de una Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas.

**7.2** Informe de Vigencia de Soluciones de Referencia para Sustancias Relacionadas

### **8. ANEXOS: N/A**

## **Apéndice E. Protocolo de Preparación de Soluciones de Referencia de Sustancias Relacionadas del producto E-3 para la Verificación del Período de Vigencia**

### **1. OBJETIVO:**

**1.1** Establecer un procedimiento para la preparación de las soluciones de referencia para sustancias relacionadas de E-3 empleadas en la verificación del período de vigencia, de acuerdo a las Buenas Prácticas de Manufactura vigentes.

### **2. ALCANCE:**

**2.1** Aplica para todas las soluciones que se preparen con los estándares de referencia empleados en la prueba de sustancias relacionadas de E-3, como parte del Control de Calidad de productos terminados de Calox de Costa Rica.

### **3. RESPONSABLES:**

**3.1** De ejecutar la preparación de las soluciones de referencia para sustancias relacionadas de E-3 en el laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica conforme a lo descrito en este protocolo: Analistas de Control de Calidad.

**3.2** De proporcionar los recursos necesarios y entrenar al personal asignado para ejecutar el protocolo; además de velar por el cumplimiento: Coordinador de Control de Calidad.

### **4. FRECUENCIA:**

**4.1** Las soluciones de referencia se deben preparar cada vez que se desee evaluar su período de vigencia ya sea por cambios en las condiciones del protocolo o debido a la integración de nuevas soluciones de referencia.

### **5. EQUIPOS Y MATERIALES:**

**5.1** Estándar(es) de referencia de la(s) sustancia(s) relacionada(s).

**5.2** Balanza analítica.

**5.3** Bomba de vacío.

**5.4** Cristalería: balón aforado de 100 mL, balón aforado de 50 mL, 40 balones de 10 mL.

**5.5** Reactivos: acetato de sodio anhidro, metanol, acetonitrilo y agua purificada.

**5.6** Micropipeta

**5.7** Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia Shimadzu LC-2030C

**5.8** Columna C18 No. 50 XBridge 4,6 mm x 150 mm, 3,5 µm

## **6. PROCEDIMIENTO:**

### **6.1 Preparación de solventes:**

**6.1.1** Hidróxido de sodio 1 M: En un recipiente de capacidad adecuada pese alrededor de 4 g de hidróxido de sodio, agregue agua purificada en una cantidad suficiente para preparar 100 mL y mezcle.

**6.1.2** Solución amortiguadora: En un recipiente de capacidad adecuada pese 1.5 g de acetato de sodio anhidro, adicione 0.4 mL de ácido acético glacial, agregue agua purificada cantidad suficiente para preparar 1000 ml y mezcle. Ajuste con hidróxido de sodio 1M a un pH de 5.20.

**6.1.3** Fase móvil: En un recipiente de capacidad adecuada prepare una mezcla de metanol, acetonitrilo y solución amortiguadora (33:7:60). Desgasifique y filtre por filtro de membrana de 0.45  $\mu$ m. Prepare 1L para la preparación de muestras y un 1 L para la corrida.

### **6.2 Preparación de la solución de referencia**

**6.2.1** Solución madre del estándar de E-3: Pese con exactitud alrededor de 31.9 mg de estándar de referencia en un balón aforado de 50 mL, agregue 25 ml de fase móvil, someta a ultrasonido durante 10 min, deje enfriar a temperatura ambiente, diluya a volumen con fase móvil y mezcle. (Concentración de 0.624 mg/ml E-3)

**6.2.2** Solución madre del estándar de compuesto relacionado C: Pese con exactitud alrededor de 10 mg de Compuesto Relacionado C de E-3 en un balón aforado de 100 mL, agregue 50 ml de fase móvil, someta a ultrasonido durante 15 min, deje enfriar a temperatura ambiente, diluya a volumen con fase móvil y mezcle. (Concentración de 0.1 mg/ml de Compuesto Relacionado C)

**6.2.3** Solución estándar: Transfiera una alícuota de 100  $\mu$ l de la solución madre del estándar de E-3 y otra de 100  $\mu$ l de la solución madre del estándar de compuesto relacionado C a un balón aforado de 10 ml, lleve a volumen con fase móvil y mezcle. Repita este paso para un total de 40 alícuotas. Filtre por filtro de membrana de 0.45  $\mu$ m cada balón a viales (usar viales ámbar para el caso de protección de la luz o envuelva en papel aluminio al almacenar). (Concentración de 6.24  $\mu$ g/ml de E-3 y 1  $\mu$ g/ml de Compuesto Relacionado C)

**6.2.4** Almacene 10 viales bajo las siguientes condiciones: -10 a -20° C  $\pm$  0.5 °C, 2 a 8°C  $\pm$  0.5 °C y <25°C  $\pm$  0.5 °C (luz y oscuras). Para efecto de identificación de las condiciones en las muestras se asignará una letra A para <25°C en condiciones de luz, B para <25°C en oscuridad, C para -10 a -20° C y D para 2 a 8°C.

### **6.3 Condiciones del sistema cromatográfico**

**6.3.1** Inyecte 10  $\mu$ l de cada vial con la solución estándar preparada al sistema cromatográfico operando bajo las siguientes condiciones: columna C18 de 4,6 mm x 100 mm de 3,0  $\mu$ m (se

puede sustituir por la columna C18 de 4.6 mm x 150 mm de 3.5 µm), temperatura de la columna de 45 °C, velocidad de flujo de 1 mL/min y a una longitud de onda de 239 nm.

#### **6.4 Aptitud del sistema**

**6.4.1** Evalúe si la resolución entre el E-3 y el Compuesto Relacionado C cumple con el siguiente criterio: No menos de 3.0 entre los picos señalados.

**6.4.2** Evalúe si la desviación estándar relativa de cinco inyecciones consecutivas cumple con el criterio: No más de 2.0%

**6.4.3** Evalúe que el índice de pureza de pico sea mayor o igual a 0.

**6.4.4** Se realiza una corrida inicial y durante el estudio se evalúa el grado de concordancia de los picos de la solución de referencia con el cromatograma obtenido en análisis inicial.

**6.4.5** Determine la conformidad de los resultados calculando la relación entre la concentración de partida de la solución de referencia con la respuesta del equipo (área), la cual debe estar entre 0,95 – 1.05 y se calcula con la siguiente fórmula.

$$\frac{\text{concentración inicial}}{\text{promedio área inicial}} / \frac{\text{concentración inicial}}{\text{promedio área obtenida}}$$

**6.4.6** Cuando la solución de referencia no cumpla con las especificaciones establecidas se da por concluido el estudio de estabilidad.

#### **6.5 Resultados y reporte del estudio de estabilidad:**

**6.5.1** Los resultados generados se deben guardar en la dirección C: /LabSolutions/Data/EstabilidadSR/E-3 Tabletas/" Fecha de análisis"

**6.5.2** Una impresión del reporte debe almacenarse en el archivo correspondiente.

**6.5.3** Los datos se deben ingresar al Informe de Vigencia de Soluciones de Referencia para Sustancias Relacionadas correspondiente.

### **7. DOCUMENTOS RELACIONADOS:**

**7.1** Protocolo de Verificación del Período de Vigencia de una Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas.

**7.2** Informe de Vigencia de Soluciones de Referencia para Sustancias Relacionadas

### **8. ANEXOS: N/A**

## **Apéndice F. Protocolo de Preparación de Soluciones de Referencia de Sustancias Relacionadas del producto I-3 para la Verificación del Período de Vigencia**

### **1. OBJETIVO:**

**1.1** Establecer un procedimiento para la preparación de las soluciones de referencia para sustancias relacionadas de I-3 empleadas en la verificación del período de vigencia, de acuerdo a las Buenas Prácticas de Manufactura vigentes.

### **2. ALCANCE:**

**2.1** Aplica para todas las soluciones que se preparen con los estándares de referencia empleados en la prueba de sustancias relacionadas de I-3, como parte del Control de Calidad de productos terminados de Calox de Costa Rica.

### **3. RESPONSABLES:**

**3.1** De ejecutar la preparación de las soluciones de referencia para sustancias relacionadas de I-3 en el laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica conforme a lo descrito en este protocolo: Analistas de Control de Calidad.

**3.2** De proporcionar los recursos necesarios y entrenar al personal asignado para ejecutar el protocolo; además de velar por el cumplimiento: Coordinador de Control de Calidad.

### **4. FRECUENCIA:**

**4.1** Las soluciones de referencia se deben preparar cada vez que se desee evaluar su período de vigencia ya sea por cambios en las condiciones del protocolo o debido a la integración de nuevas soluciones de referencia.

### **5. EQUIPOS Y MATERIALES:**

**5.1** Estándar(es) de referencia de la(s) sustancia(s) relacionada(s)

**5.2** Balanza analítica.

**5.3** Bomba de vacío.

**5.4** Cristalería: 1 balón aforado de 100 mL, 40 balones de 25 mL

**5.5** Reactivos: metanol, acetonitrilo y agua purificada

**5.6** Micropipeta

**5.7** Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia Shimadzu LC-2030C

**5.8** Columna C18 No. 50 XBridge 4,6 mm x 150 mm, 3,5 µm

## 6. PROCEDIMIENTO:

### 6.1 Preparación de solventes:

**6.1.1** Fase móvil: En un recipiente de capacidad adecuada prepare una mezcla de acetonitrilo, metanol y agua (53:35:12). Desgasifique y filtre por filtro de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ .

### 6.2 Preparación de la solución de referencia

**6.2.1** Solución estándar: Pese exactamente alrededor de 12 mg de impureza de I-3 estándar de referencia en un balón aforado de 100 mL, diluya con 60 mL de metanol, sonifique por 10 min para disolver, deje enfriar a temperatura ambiente, afore con el mismo solvente y mezcle. **6.2.2** De la solución anterior transfiera una alícuota de 200  $\mu\text{L}$  en un balón aforado de 25 mL y afore con metanol. Repita este paso para un total de 40 alícuotas. Filtre por filtro de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  cada balón a viales (usar viales ámbar para el caso de protección de la luz o envuelva en papel aluminio al almacenar). (Concentración de 0.96  $\mu\text{g/mL}$  de impureza de I-3)

**6.2.3** Almacene 10 viales bajo las siguientes condiciones: -10 a -20° C  $\pm$  0.5 °C, +2 a +8° C  $\pm$  0.5 °C y <25° C  $\pm$  0.5 °C (luz y oscuras). Para efecto de identificación de las condiciones en las muestras se asignará una letra A para <25° C en condiciones de luz, B para <25° C en oscuridad, C para -10 a -20° C y D para 2 a 8° C.

### 6.3 Condiciones del sistema cromatográfico

**6.3.1** Inyecte 10  $\mu\text{l}$  de cada vial con la solución estándar preparada al sistema cromatográfico operando bajo las siguientes condiciones: columna C18 de 4.6 mm x 250 mm de 5,0  $\mu\text{m}$  (se puede sustituir por la columna C18 de XBridge 4,6 mm x 150 mm, 3,5  $\mu\text{m}$  haciendo la modificación correspondiente en el flujo), temperatura de la columna de 30 °C, velocidad de flujo de 1.2 mL/min (1.0 ml/min al utilizar la columna más corta) y a una longitud de onda de 280 nm.

### 6.4 Aptitud del sistema

**6.4.1** Evalúe si la desviación estándar relativa de cinco inyecciones consecutivas cumple con el criterio: No más de 2.0%.

**6.4.2** Evalúe que el índice de pureza de pico sea igual o mayor a 0.

**6.4.3** Se realiza una corrida inicial y durante el estudio se evalúa el grado de concordancia de los picos de la solución de referencia con el cromatograma obtenido en análisis inicial.

**6.4.4** Determine la conformidad de los resultados calculando la relación entre la concentración de partida de la solución de referencia con la respuesta del equipo (área), la cual debe estar entre 0,95 – 1.05 y se calcula con la siguiente fórmula.

$$\frac{\text{concentración inicial}}{\text{promedio área inicial}} / \frac{\text{concentración inicial}}{\text{promedio área obtenida}}$$

**6.4.5** Cuando la solución de referencia no cumpla con las especificaciones establecidas se da por concluido el estudio de estabilidad.

**6.5** Resultados y reporte del estudio de estabilidad:

**6.5.1** Los resultados generados se deben guardar en la dirección C: /LabSolutions/Data/EstabilidadSR/I-3 Tabletas/" Fecha de análisis"

**6.5.2** Una impresión del reporte debe almacenarse en el archivo correspondiente.

**6.5.3** Los datos se deben ingresar al Informe de Vigencia de Soluciones de Referencia para Sustancias Relacionadas correspondiente.

## **7. DOCUMENTOS RELACIONADOS:**

**7.1** Protocolo de Verificación del Período de Vigencia de una Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas.

**7.2** Informe de Vigencia de Soluciones de Referencia para Sustancias Relacionadas

## **8. ANEXOS: N/A**

## **Apéndice G. Protocolo de Preparación de Soluciones de Referencia de Sustancias Relacionadas del producto L-7 para la Verificación del Período de Vigencia**

### **1. OBJETIVO:**

**1.1** Establecer un procedimiento para la preparación de las soluciones de referencia para sustancias relacionadas de L-7 empleadas en la verificación del período de vigencia, de acuerdo a las Buenas Prácticas de Manufactura vigentes.

### **2. ALCANCE:**

**2.1** Aplica para todas las soluciones que se preparen con los estándares de referencia empleados en la prueba de sustancias relacionadas de L-7, como parte del Control de Calidad de productos terminados de Calox de Costa Rica.

### **3. RESPONSABLES:**

**3.1** De ejecutar la preparación de las soluciones de referencia para sustancias relacionadas de L-7 en el laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica conforme a lo descrito en este protocolo: Analistas de Control de Calidad.

**3.2** De proporcionar los recursos necesarios y entrenar al personal asignado para ejecutar el protocolo; además de velar por el cumplimiento: Coordinador de Control de Calidad.

### **4. FRECUENCIA:**

**4.1** Las soluciones de referencia se deben preparar cada vez que se desee evaluar su período de vigencia ya sea por cambios en las condiciones del protocolo o debido a la integración de nuevas soluciones de referencia.

### **5. EQUIPOS Y MATERIALES:**

**5.1** Estándar(es) de referencia de la(s) sustancia(s) relacionada(s).

**5.2** Balanza analítica.

**5.3** Bomba de vacío.

**5.4** Cristalería: 1 balón aforado de 100mL, 1 balón aforado de 25 mL, 2 balones aforados de 50 mL, 40 balones de 100 mL.

**5.5** Reactivos: Fosfato monobásico de potasio, fosfato dibásico de sodio, fosfato monobásico de sodio, ácido fosfórico, acetonitrilo y agua purificada.

**5.6** Micropipeta.

**5.7** Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia Shimadzu LC-2030C

**5.8** Columna C8 No. 44 Symmetry 4,6 mm x 250 mm, 5 µm

## **6. PROCEDIMIENTO:**

### **6.1** Preparación de solventes:

**6.1.1** Solución amortiguadora A: En un recipiente de capacidad adecuada pese 2.76 g de fosfato monobásico de sodio y lleve a volumen hasta un litro de agua purificada. Ajuste el pH a 2,4 con ácido fosfórico.

**6.1.2** Solución amortiguadora B: En un recipiente de capacidad adecuada pese aproximadamente 1.25 g de fosfato monobásico de potasio y 1,5 gramos de fosfato dibásico de sodio, lleve a volumen hasta un litro de agua purificada. El pH resultante de la solución debe estar entre 7.0 y 7.5.

**6.1.3** Solución A: Prepare una mezcla de acetonitrilo y solución amortiguadora B (7:93)  
Solución B: Utilice Acetonitrilo.

**6.1.4** Diluyente: Prepare una mezcla de acetonitrilo y solución amortiguadora A (3:2)

**6.1.5** Fase móvil: Utilice el gradiente señalado en la tabla 1. Filtre y Desgasifique.

**Tabla. 1 Gradiente**

Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)
0	100	0
12	92	8
28	38	62
30	100	0
35	100	0

### **6.2** Preparación de la solución de referencia

**6.2.1** Solución madre del estándar de L-7 (a): Pese con exactitud alrededor de 25 mg de L-7 estándar de referencia en un balón aforado de 25 mL, agregue 17.5 ml de agua purificada, someta a ultrasonido durante 15 min, deje enfriar a temperatura ambiente, diluya a volumen con acetonitrilo y mezcle. (Concentración de 1.0 mg/ml de L-7 (A))

**6.2.2** Solución madre del estándar de L-7 (b): Pese con exactitud alrededor de 25 mg de Hidroclorotiazida estándar de referencia en un balón aforado de 50 mL, agregue 15 ml de

acetonitrilo, someta a ultrasonido durante 15 min, deje enfriar a temperatura ambiente, diluya a volumen con solución amortiguadora A y mezcle. (Concentración de 0.5 mg/ml de L-7 (B))

**6.2.3** Solución estándar madre combinada: Transfiera una alícuota de 20 mL de la solución madre del estándar de L-7 (A) y una alícuota de 10 mL de la solución madre del estándar de L-7 (B) a un balón aforado de 50 mL, agregue 3 mL de acetonitrilo y lleve a volumen con solución amortiguadora A. (Concentración de 0.4 mg/ml de L-7 (A) y 0.1 mg/ml de L-7 (B))

**6.2.4** Solución estándar de Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina: Pese con exactitud alrededor de 10 mg de Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina en un balón aforado de 100 mL, agregue 50 ml de diluyente, someta a ultrasonido durante 10 min, deje enfriar a temperatura ambiente, diluya a volumen con solución amortiguadora A y mezcle. (Concentración de 0.1mg/ml de Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina)

**6.2.5** Solución estándar diluida: Transfiera una alícuota de 1 mL de la solución estándar madre combinada y otra de 1 mL de la solución estándar de Compuesto Relacionado A de L-7 a un balón aforado de 100 ml, diluya con 30 mL de acetonitrilo, lleve a volumen con solución amortiguadora A y mezcle. Repita este paso para un total de 40 alícuotas. Filtre por filtro de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  cada balón a viales (usar viales ámbar para el caso de protección de la luz o envuelva en papel aluminio al almacenar). (Concentración de 4  $\mu\text{g/ml}$  de L-7 (A), 1  $\mu\text{g/ml}$  de L-7 (B) y 1  $\mu\text{g/ml}$  de Compuesto Relacionado A de Benzotiadiazina)

**6.2.6** Almacene 10 viales bajo las siguientes condiciones: -10 a -20° C  $\pm$  0.5 °C, +2 a +8° C  $\pm$  0.5 °C y <25° C  $\pm$  0.5 °C (luz y oscuras). Para efecto de identificación de las condiciones en las muestras se asignará una letra A para <25° C en condiciones de luz, B para <25° C en oscuridad, C para -10 a -20° C y D para 2 a 8° C.

**6.2.7** Solución Límite de cuantificación: Pipetee y transfiera 5,0 mL de la solución estándar diluida a un balón aforado de 50 mL. Agregue 15 mL de acetonitrilo, diluya a volumen con solución amortiguadora A y mezcle.

### 6.3 Condiciones del sistema cromatográfico

**6.3.1** Inyecte 20  $\mu\text{l}$  de cada vial con la solución estándar preparada al sistema cromatográfico operando bajo las siguientes condiciones: columna C8 de 3,9 mm x 150 mm de 5,0  $\mu\text{m}$  (se puede sustituir por la columna C8 de 4,6 mm x 250 mm, 5,0  $\mu\text{m}$  haciendo la modificación correspondiente en el flujo), temperatura de la columna de 35

°C, velocidad de flujo de 1 mL/min (2.3 ml/min al utilizar la columna larga) y a una longitud de onda de 280 nm.

#### 6.4 Aptitud del sistema

**6.4.1** Evalúe si la desviación estándar relativa de cinco inyecciones consecutivas cumple con el criterio: No más de 2.0%

**6.4.2** Evalúe si la relación señal- ruido es no menor a 10 para cada componente de la inyección.

**6.4.3** Evalúe que el índice de pureza de pico sea igual o mayor a 0.

**6.4.4** Se realiza una corrida inicial y durante el estudio se evalúa el grado de concordancia de los picos de la solución de referencia con el cromatograma obtenido en análisis inicial.

**6.4.5** Determine la conformidad de los resultados calculando la relación entre la concentración de partida de la solución de referencia con la respuesta del equipo (área), la cual debe estar entre 0,95 – 1.05 y se calcula con la siguiente fórmula.

$$\frac{\text{concentración inicial}}{\text{promedio área inicial}} / \frac{\text{concentración inicial}}{\text{promedio área obtenida}}$$

**6.4.6** Cuando la solución de referencia no cumpla con las especificaciones establecidas se da por concluido el estudio de estabilidad.

#### 6.5 Resultados y reporte del estudio de estabilidad:

**6.5.1** Los resultados generados se deben guardar en la dirección C: /LabSolutions/Data/EstabilidadSR/L-7 Tabletas/" Fecha de análisis"

**6.5.2** Una impresión del reporte debe almacenarse en el archivo correspondiente.

**6.5.3** Los datos se deben ingresar al Informe de Vigencia de Soluciones de Referencia para Sustancias Relacionadas correspondiente.

### 7. DOCUMENTOS RELACIONADOS:

**7.1** Protocolo de Verificación del Período de Vigencia de una Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas.

**7.2** Informe de Vigencia de Soluciones de Referencia para Sustancias Relacionadas

### 8. ANEXOS: N/A

## **Apéndice H. Protocolo de Preparación de Soluciones de Referencia de Sustancias Relacionadas del producto G-2 para la Verificación del Período de Vigencia.**

### **1. OBJETIVO:**

**1.1** Establecer un procedimiento para la preparación de las soluciones de referencia para sustancias relacionadas de G-2 empleadas en la verificación del período de vigencia, de acuerdo a las Buenas Prácticas de Manufactura vigentes.

### **2. ALCANCE:**

**2.1** Aplica para todas las soluciones que se preparen con los estándares de referencia empleados en la prueba de sustancias relacionadas de G-2, como parte del Control de Calidad de productos terminados de Calox de Costa Rica.

### **3. RESPONSABLES:**

**3.1** De ejecutar la preparación de las soluciones de referencia para sustancias relacionadas de G-2 en el laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica conforme a lo descrito en este protocolo: Analistas de Control de Calidad.

**3.2** De proporcionar los recursos necesarios y entrenar al personal asignado para ejecutar el protocolo; además de velar por el cumplimiento: Coordinador de Control de Calidad.

### **4. FRECUENCIA:**

**4.1** Las soluciones de referencia se deben preparar cada vez que se desee evaluar su período de vigencia ya sea por cambios en las condiciones del protocolo o debido a la integración de nuevas soluciones de referencia.

### **5. EQUIPOS Y MATERIALES:**

**5.1** Estándar(es) de referencia de la(s) sustancia(s) relacionada(s).

**5.2** Balanza analítica.

**5.3** Bomba de vacío.

**5.4** Cristalería: 1 balón aforado de 50 mL, 40 balones de 100 mL.

**5.5** Reactivos: trietilamina, ácido trifluoroacético, acetonitrilo y agua purificada.

**5.6** Micropipeta.

**5.7** Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia Shimadzu LC-2030C

**5.8** Columna C8 No. 44 Symmetry 4,6 mm x 250 mm, 5 µm

## **6. PROCEDIMIENTO:**

### **6.1 Preparación de solventes:**

**6.1.1** Solvente A: En un recipiente de capacidad adecuada prepare una mezcla de acetonitrilo y agua purificada (45:55). Prepare 4L para la preparación de las muestras.

**6.1.2** Fase móvil: En un recipiente de capacidad adecuada prepare una mezcla de trietilamina, ácido trifluoroacético, acetonitrilo y agua purificada (0.1:0.1:45:55). Desgasifique y filtre por filtro de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ . Prepare 2L para la corrida.

### **6.2 Preparación de la solución de referencia**

**6.2.1** Solución estándar: Pese exactamente alrededor de 8 mg de Impureza F de G-2 estándar de referencia en un balón aforado de 50 mL, diluya con 25 mL de acetonitrilo, sonifique por 10 min para disolver, deje enfriar a temperatura ambiente, diluya hasta 50 mL de agua purificada y mezcle. De la solución anterior transfiera una alícuota de 1 mL en un balón aforado de 100 mL y afore con la solución A. Repita este paso para un total de 40 alícuotas.

**6.2.2** Filtre por filtro de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  cada balón a viales (usar viales ámbar para el caso de protección de la luz o envuelva en papel aluminio al almacenar). (Concentración de 0.0016 mg/mL de Impureza F de G-2)

**6.2.3** Almacene 10 viales bajo las siguientes condiciones: -10 a -20° C  $\pm$  0.5 °C, +2 a +8°C  $\pm$  0.5 °C y <25°C  $\pm$  0.5 °C (luz y oscuras). Para efecto de identificación de las condiciones en las muestras se asignará una letra A para <25°C en condiciones de luz, B para <25°C en oscuridad, C para -10 a -20° C y D para 2 a 8°C.

**6.2.4** Solución Resolución: Pese con exactitud una mezcla de 5 mg de G-2 y 15 mg de Impureza F en un balón aforado de 50 mL, agregue 25 mL de acetonitrilo, someta a ultrasonido durante 10 min, deje enfriar a temperatura ambiente, lleve a volumen con agua purificada y mezcle. Transfiera una alícuota de 1 mL de la solución anterior a un balón aforado de 20 mL, lleve a volumen con la solución A y mezcle. (Concentración de 0.005 mg/mL de G-2 y 0.015 mg/mL de Impureza F de G-2)

### **6.3 Condiciones del sistema cromatográfico**

**6.3.1** Inyecte 2  $\mu\text{l}$  de cada vial con la solución estándar preparada al sistema cromatográfico operando bajo las siguientes condiciones: columna C8 de 4.0 mm x 250 mm de 4,0  $\mu\text{m}$  (se puede sustituir por la columna C8 4,6 mm x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$  haciendo la modificación

correspondiente en el flujo), temperatura de la columna de 30 °C, velocidad de flujo de 0.9 mL/min (0.95 ml/min al realizar la sustitución) y a una longitud de onda de 235 nm.

#### 6.4 Aptitud del sistema

**6.4.1** Evalúe si la desviación estándar relativa de cinco inyecciones consecutivas cumple con el criterio: No más de 2.0%

**6.4.2** Evalúe si la resolución entre G-2 y el pico de la impureza F es al menos de 1.8.

**6.4.3** Evalúe que el índice de pureza de pico sea igual o mayor a 0.

**6.4.4** Se realiza una corrida inicial y durante el estudio se evalúa el grado de concordancia de los picos de la solución de referencia con el cromatograma obtenido en análisis inicial.

**6.4.5** Determine la conformidad de los resultados calculando la relación entre la concentración de partida de la solución de referencia con la respuesta del equipo (área), la cual debe estar entre 0,95 – 1,05 y se calcula con la siguiente fórmula.

$$\frac{\text{concentración inicial}}{\text{promedio área inicial}} / \frac{\text{concentración inicial}}{\text{promedio área obtenida}}$$

**6.4.5** Cuando la solución de referencia no cumpla con las especificaciones establecidas se da por concluido el estudio de estabilidad.

#### 6.5 Resultados y reporte del estudio de estabilidad:

**6.5.1** Los resultados generados se deben guardar en la dirección C: /LabSolutions/Data/EstabilidadSR/G-2 Tabletas/" Fecha de análisis"

**6.5.2** Una impresión del reporte debe almacenarse en el archivo correspondiente.

**6.5.3** Los datos se deben ingresar al Informe de Vigencia de Soluciones de Referencia para Sustancias Relacionadas correspondiente.

### 7. DOCUMENTOS RELACIONADOS:

**7.1** Protocolo de Verificación del Período de Vigencia de una Solución de Referencia para Sustancias Relacionadas.

**7.2** Informe de Vigencia de Soluciones de Referencia para Sustancias Relacionadas

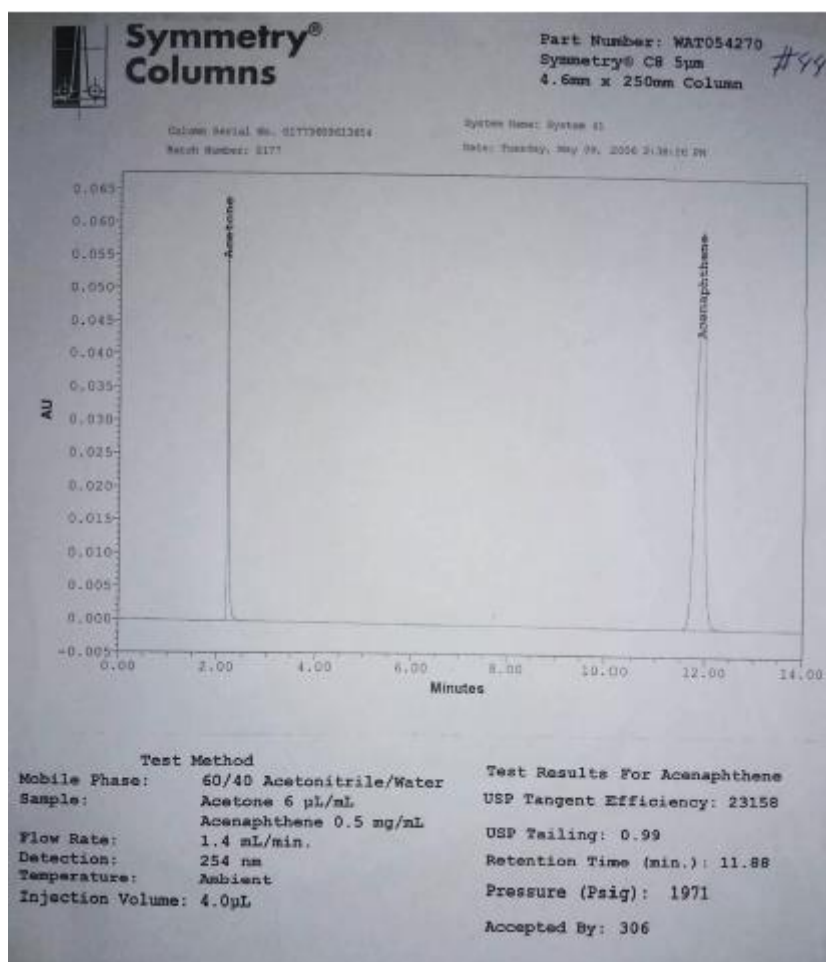
### 8. ANEXOS: N/A

### Apéndice I. Fecha de Verificación del Cromatográfico Líquido Shimadzu LC-2030 3D.

CALOX		APTO PARA SU USO	
		E-026.V1	
Equipo:	HPLC Sistema II		
Ubicación:	Lab. CC	Fecha de Calibración:	Ago, 16
Hecho por:	JGP	Próxima calibración:	May, 17
Rango de calibración:	NA	Resolución:	
Factor de Corrección:	NA		

Fuente: Informe de Verificación del Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución No. R-IVE-165

### Apéndice J. Reporte de Verificación de la Columna C8 Symmetry 4,6mmx250mm, 5µm.



Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.

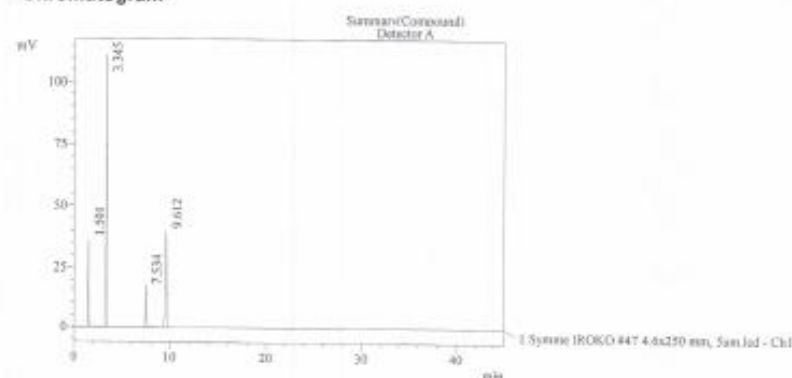
## Apéndice K. Reporte de Verificación de la Columna C18 Symmetry 4,6mm x 250mm, 5µm.

### Verificación de Columna Waters Symmetry #47 4.6x250 mm, 5 µm

#### <Sample Information>

Sample Name : Columna  
 Sample ID : Symme IROKO #47 4.6x250 mm, 5µm  
 Data Filename : Symme IROKO #47 4.6x250 mm, 5µm.lcd  
 Method File Name : Verificación de Columnas.lcm  
 Batch Filename : 23-02-15 Symmetry IROKO.lcb  
 Vial # : 1-1  
 Injection Volume : 1 µL  
 Date Acquired : 2/23/2015 3:01:58 PM  
 Date Processed : 2/25/2015 11:20:17 AM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

#### <Chromatogram>



#### << Detector A >>

ID#1 Compound Name: Unkno1	Ret. Time	Tailing Factor	Resolution(USP)	Tailing Factor(10%)
Symme IROKO #47 4.6x250 mm, 5µm	1.501	1.349	--	1.301
Average	1.501	1.349	--	1.301
%RSD	0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum	1.501	1.349	--	1.301
Minimum	1.501	1.349	--	1.301
Standard Deviation	0.000	0.000	--	0.000

Theoretical Plates(meter)(USP)	Number of Theoretical Plate(USP)
22654	3398
22654	3398
0.000	0.000
22654	3398
22654	3398

ID#2 Compound Name: Acetofenona	Ret. Time	Tailing Factor	Resolution(USP)	Tailing Factor(10%)
Symme IROKO #47 4.6x250 mm, 5µm	3.345	1.187	15.729	1.127
Average	3.345	1.187	15.729	1.127
%RSD	0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum	3.345	1.187	15.729	1.127
Minimum	3.345	1.187	15.729	1.127
Standard Deviation	0.000	0.000	0.000	0.000

Theoretical Plates(meter)(USP)	Number of Theoretical Plate(USP)
69366	10465
69366	10465
0.000	0.000
69366	10465
69366	10465

ID#3 Compound Name: Tolueno	Ret. Time	Tailing Factor	Resolution(USP)	Tailing Factor(10%)
Symme IROKO #47 4.6x250 mm, 5µm	7.534	1.064	24.201	1.055
Average	7.534	1.064	24.201	1.055
%RSD	0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum	7.534	1.064	24.201	1.055
Minimum	7.534	1.064	24.201	1.055
Standard Deviation	0.000	0.000	0.000	0.000

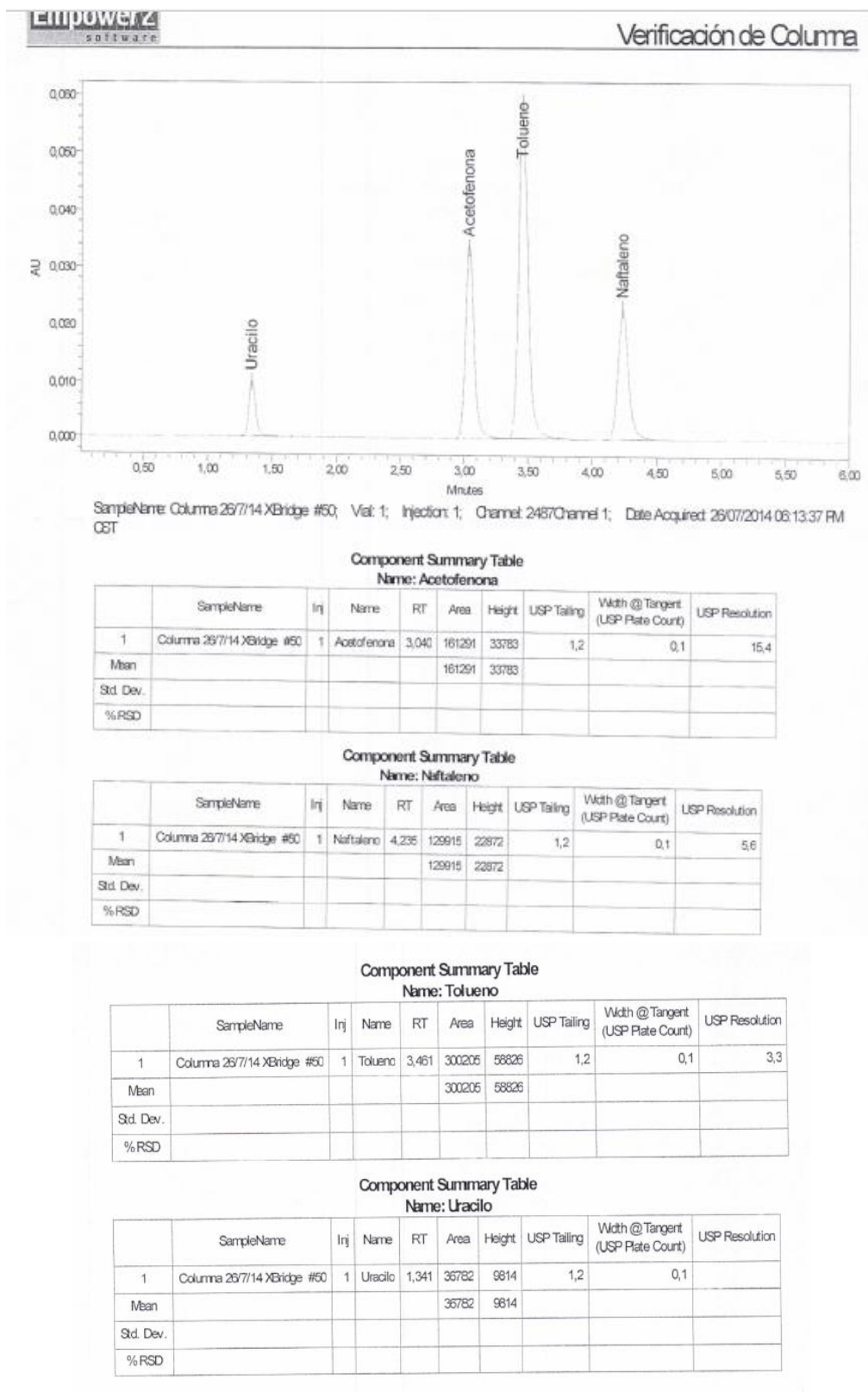
Theoretical Plates/meter(USP)	Number of Theoretical Plate(USP)
130486	19573
130486	19573
0.000	0.000
130486	19573
130486	19573

ID#4 Compound Name: Naftaleno	Ret. Time	Tailing Factor	Resolution(USP)	Tailing Factor(10%)
Symme IROKO #47 4.6x250 mm, 5µm	9.612	1.050	8.609	1.043
Average	9.612	1.050	8.609	1.043
%RSD	0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum	9.612	1.050	8.609	1.043
Minimum	9.612	1.050	8.609	1.043
Standard Deviation	0.000	0.000	0.000	0.000

Theoretical Plates/meter(USP)	Number of Theoretical Plate(USP)
137918	20688
137918	20688
0.000	0.000
137918	20688
137918	20688

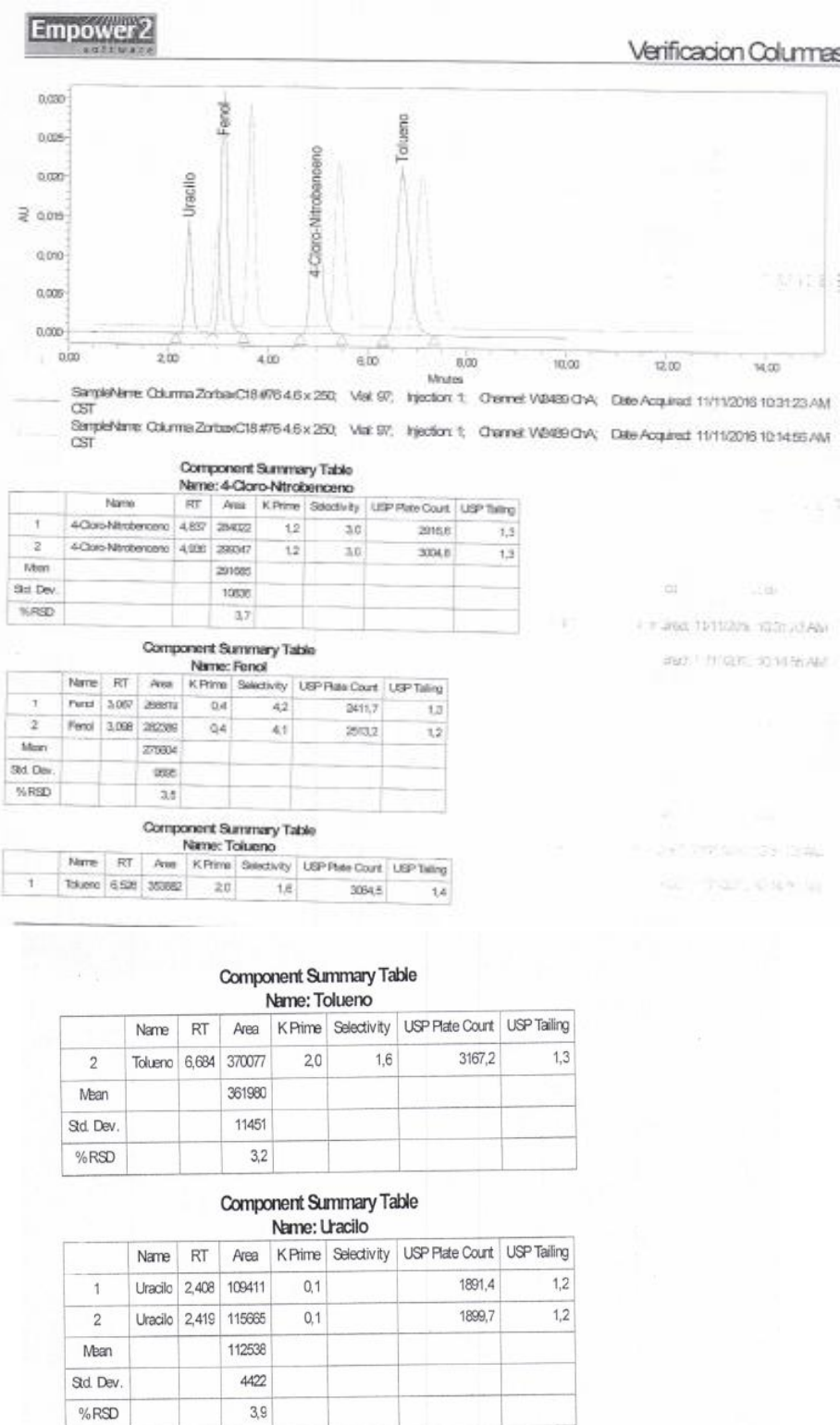
Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.

## Apéndice L. Reporte de Verificación de la Columna C18 XBridge 4,6mm x 150mm, 3.5µm.



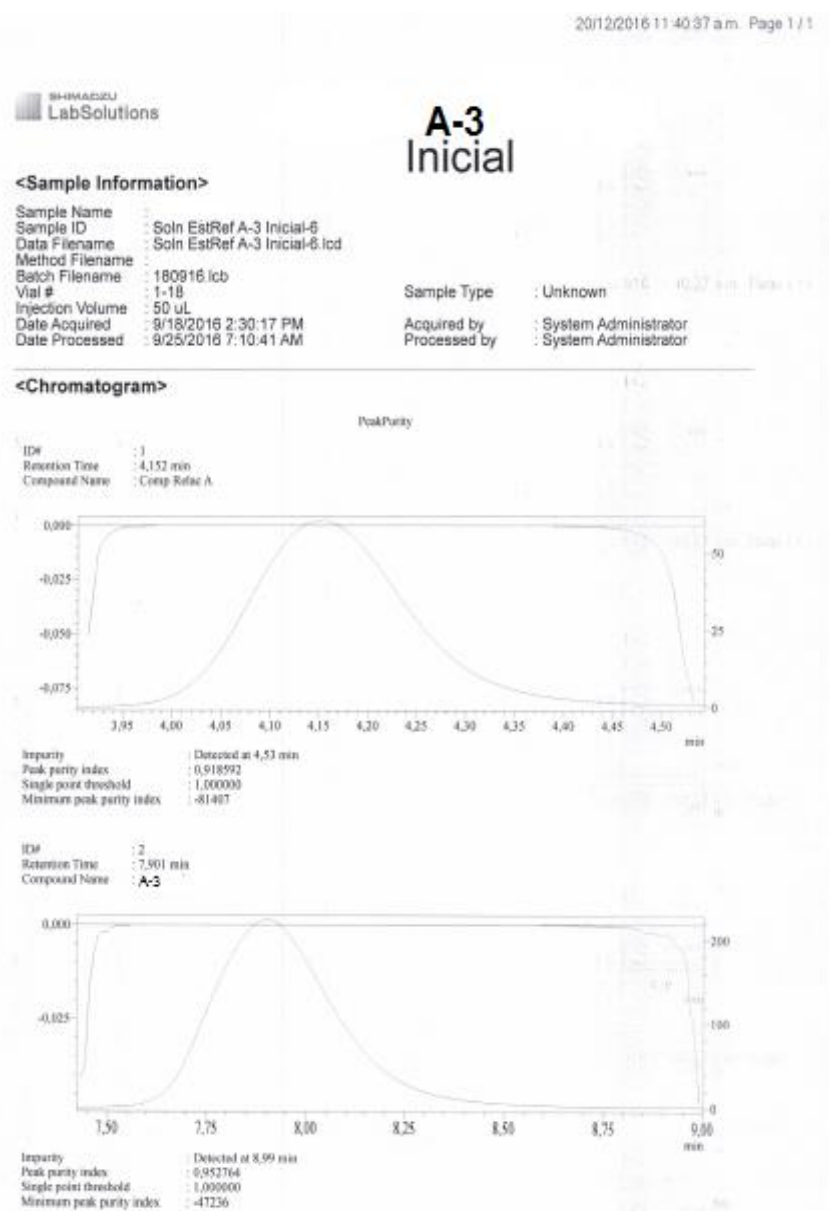
Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.

### Apéndice M. Reporte de Verificación de la Columna C18 Zorbax 4,6mm x 250mm, 3.5µm.



Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.

## Apéndice N. Cromatogramas Iniciales y Finales obtenidos en la Aplicación del Protocolo de Verificación del Período de Vigencia en las Soluciones de Referencia para Sustancias Relacionadas.



Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.





**Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.**

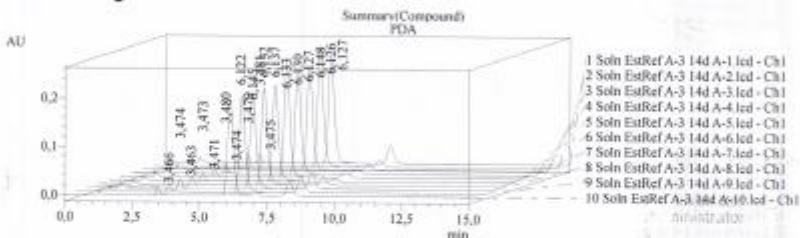


# A-3 14 días

## <Sample Information>

Sample Name :  
 Sample ID : Soin EstRef A-3 14d A-1  
 Data Filename : Soin EstRef A-3 14d A-1.lcd  
 Method Filename :  
 Batch Filename : 021016.lcb  
 Vial # : 1-2  
 Injection Volume : 50 uL  
 Date Acquired : 10/2/2016 5:10:27 PM  
 Date Processed : 10/3/2016 7:22:36 AM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

## <Chromatogram>



<< PDA >>

ID#1 Compound Name: Corra Refac A

Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)	Resolution(USP)
Soin EstRef A-3 14d A-1.lcd		3.5	160288	1.1	
Soin EstRef A-3 14d A-2.lcd		3.5	182518	1.1	
Soin EstRef A-3 14d A-3.lcd		3.5	156686	1.2	
Soin EstRef A-3 14d A-4.lcd		3.5	160117	1.1	
Soin EstRef A-3 14d A-5.lcd		3.5	171585	1.1	
Soin EstRef A-3 14d A-6.lcd		3.5	144476	1.1	
Soin EstRef A-3 14d A-7.lcd		3.5	144147	1.1	
Soin EstRef A-3 14d A-8.lcd		3.5	148026	1.1	
Soin EstRef A-3 14d A-9.lcd		3.5	149332	1.1	
Soin EstRef A-3 14d A-10.lcd		3.5	182286	1.1	
Average		3.5	156486	1.1	
%RSD		0.163	8.027	0.896	
Maximum		3.5	182518	1.2	
Minimum		3.5	144147	1.1	
Standard Deviation		0.0	12561		

ID#2 Compound Name: A-3

Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)	Resolution(USP)
Soin EstRef A-3 14d A-1.lcd		6.1	1448404	1.2	8.2
Soin EstRef A-3 14d A-2.lcd		6.1	1865038	1.3	8.2
Soin EstRef A-3 14d A-3.lcd		6.1	1790957	1.2	8.2
Soin EstRef A-3 14d A-4.lcd		6.1	1501189	1.2	8.2
Soin EstRef A-3 14d A-5.lcd		6.1	1644152	1.2	8.2
Soin EstRef A-3 14d A-6.lcd		6.1	1070849	1.3	8.2
Soin EstRef A-3 14d A-7.lcd		6.1	1102253	1.3	8.2
Soin EstRef A-3 14d A-8.lcd		6.1	1071161	1.3	8.2
Soin EstRef A-3 14d A-9.lcd		6.1	1112112	1.3	8.2
Soin EstRef A-3 14d A-10.lcd		6.1	1072398	1.3	8.2
Average		6.1	1297762	1.3	8.2
%RSD		0.135	8.405	1.030	0.307
Maximum		6.1	1865038	1.3	8.2
Minimum		6.1	1070849	1.2	8.2
Standard Deviation		0.0	277167		

Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.



**Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.**



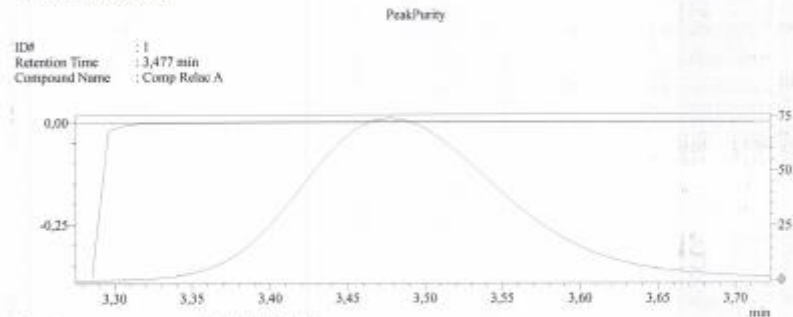


# A-3 14 días

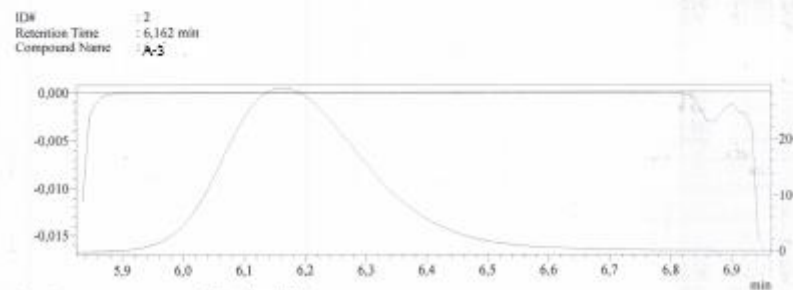
## <Sample Information>

Sample Name	:	Soln EstRef A-3 14d C-1	Sample Type	:	Unknown
Sample ID	:	Soln EstRef A-3 14d C-1	Acquired by	:	System Administrator
Data Filename	:	Soln EstRef A-3 14d C-1.lcd	Processed by	:	System Administrator
Method Filename	:				
Batch Filename	:	021016.lcb			
Vial #	:	1-22			
Injection Volume	:	50 uL			
Date Acquired	:	10/2/2016 10:18:15 PM			
Date Processed	:	10/17/2016 1:20:52 PM			

## <Chromatogram>

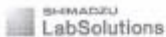


Impurity : Detected at 3.29 min  
Peak purity index : 0.623868  
Single point threshold : 1.000000  
Minimum peak purity index : -376131



Impurity : Detected at 6.95 min  
Peak purity index : 0.983816  
Single point threshold : 1.005090  
Minimum peak purity index : -16183

**Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.**

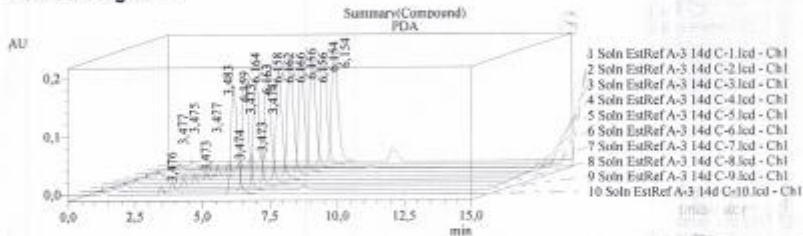


# A-3 14 días

## <Sample Information>

Sample Name :  
 Sample ID : Soln EstRef A-3 14d C-1  
 Data Filename : Soln EstRef A-3 14d C-1.lcd  
 Method Filename :  
 Batch Filename : 021016.lcb  
 Vial # : 1-22  
 Injection Volume : 50 uL  
 Date Acquired : 10/2/2016 10:18:15 PM  
 Date Processed : 10/17/2016 1:20:52 PM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

## <Chromatogram>



<< PDA >>

Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)	Resolution(USP)
Soln EstRef A-3 14d C-1.lcd	3.5	140474	1.2	
Soln EstRef A-3 14d C-2.lcd	3.5	144804	1.2	
Soln EstRef A-3 14d C-3.lcd	3.5	141704	1.2	
Soln EstRef A-3 14d C-4.lcd	3.5	141291	1.2	
Soln EstRef A-3 14d C-5.lcd	3.5	158013	1.2	
Soln EstRef A-3 14d C-6.lcd	3.5	139741	1.2	
Soln EstRef A-3 14d C-7.lcd	3.5	143880	1.2	
Soln EstRef A-3 14d C-8.lcd	3.5	142722	1.2	
Soln EstRef A-3 14d C-9.lcd	3.5	142522	1.2	
Soln EstRef A-3 14d C-10.lcd	3.5	140201	1.2	
Average	3.5	143494	1.2	
%RSD	0.089	3.731	0.21	0.000
Maximum	3.5	158013	1.2	
Minimum	3.5	139741	1.2	
Standard Deviation	0.0	5354		

Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)	Resolution(USP)
Soln EstRef A-3 14d C-1.lcd	6.2	3157840	1.3	8.0
Soln EstRef A-3 14d C-2.lcd	6.2	3095559	1.3	8.0
Soln EstRef A-3 14d C-3.lcd	6.2	3054888	1.3	7.9
Soln EstRef A-3 14d C-4.lcd	6.2	3050001	1.3	8.0
Soln EstRef A-3 14d C-5.lcd	6.2	3271582	1.3	7.9
Soln EstRef A-3 14d C-6.lcd	6.2	3031822	1.3	7.9
Soln EstRef A-3 14d C-7.lcd	6.2	3082626	1.3	7.9
Soln EstRef A-3 14d C-8.lcd	6.2	3044888	1.3	7.9
Soln EstRef A-3 14d C-9.lcd	6.2	3137618	1.3	7.9
Soln EstRef A-3 14d C-10.lcd	6.2	3051520	1.3	7.9
Average	6.2	3107834	1.3	7.9
%RSD	0.068	3.267	0.600	0.310
Maximum	6.2	3271582	1.3	8.0
Minimum	6.2	3031822	1.3	7.9
Standard Deviation	0.0	101542		

Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.

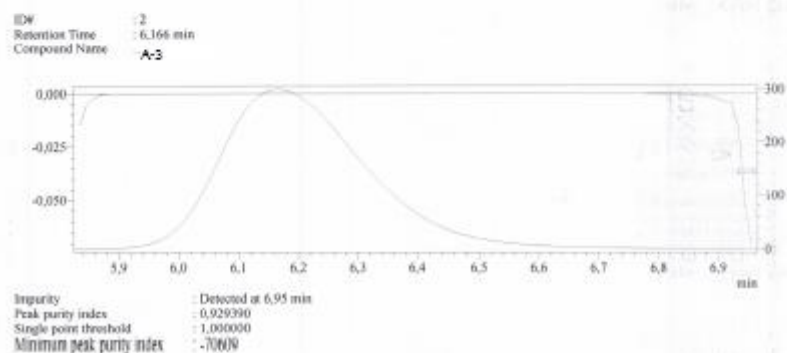
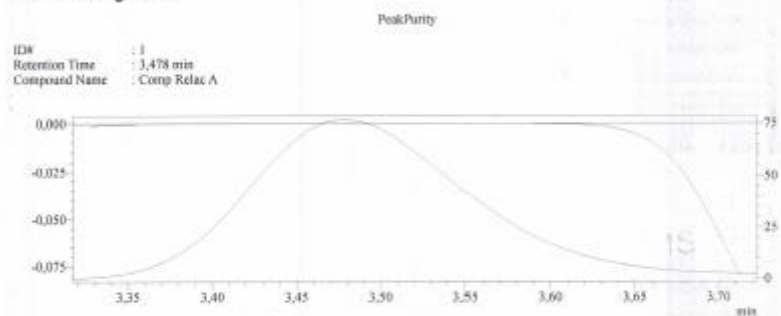
SHIMADZU  
LabSolutions

## A-3 14 días

### <Sample Information>

Sample Name		Sample Type	: Unknown
Sample ID	: Soln EstRef A-3 14d D-1	Acquired by	: System Administrator
Data Filename	: Soln EstRef A-3 14d D-1.lcd	Processed by	: System Administrator
Method Filename	: Amlodipina tab.lcm		
Batch Filename	: 021016.lcb		
Vial #	: 1-32		
Injection Volume	: 50 uL		
Date Acquired	: 10/3/2016 12:52:08 AM		
Date Processed	: 10/3/2016 7:22:56 AM		

### <Chromatogram>



Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.

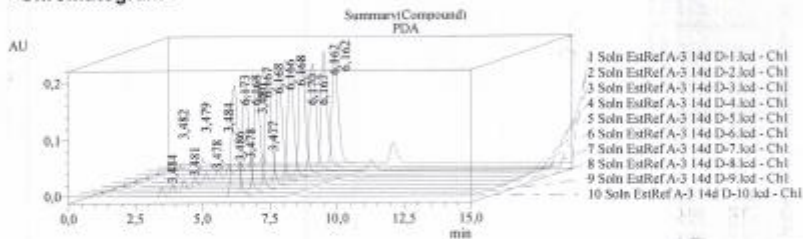


# A-3 14 días

## <Sample Information>

Sample Name :  
 Sample ID : Sols EstRef A-3 14d D-1  
 Data Filename : Sols EstRef A-3 14d D-1.lcd  
 Method Filename :  
 Batch Filename : 021016.lcb  
 Vial # : 1-32  
 Injection Volume : 50 uL  
 Date Acquired : 10/3/2016 12:52:08 AM  
 Date Processed : 10/3/2016 7:22:56 AM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

## <Chromatogram>



### << PDA >>

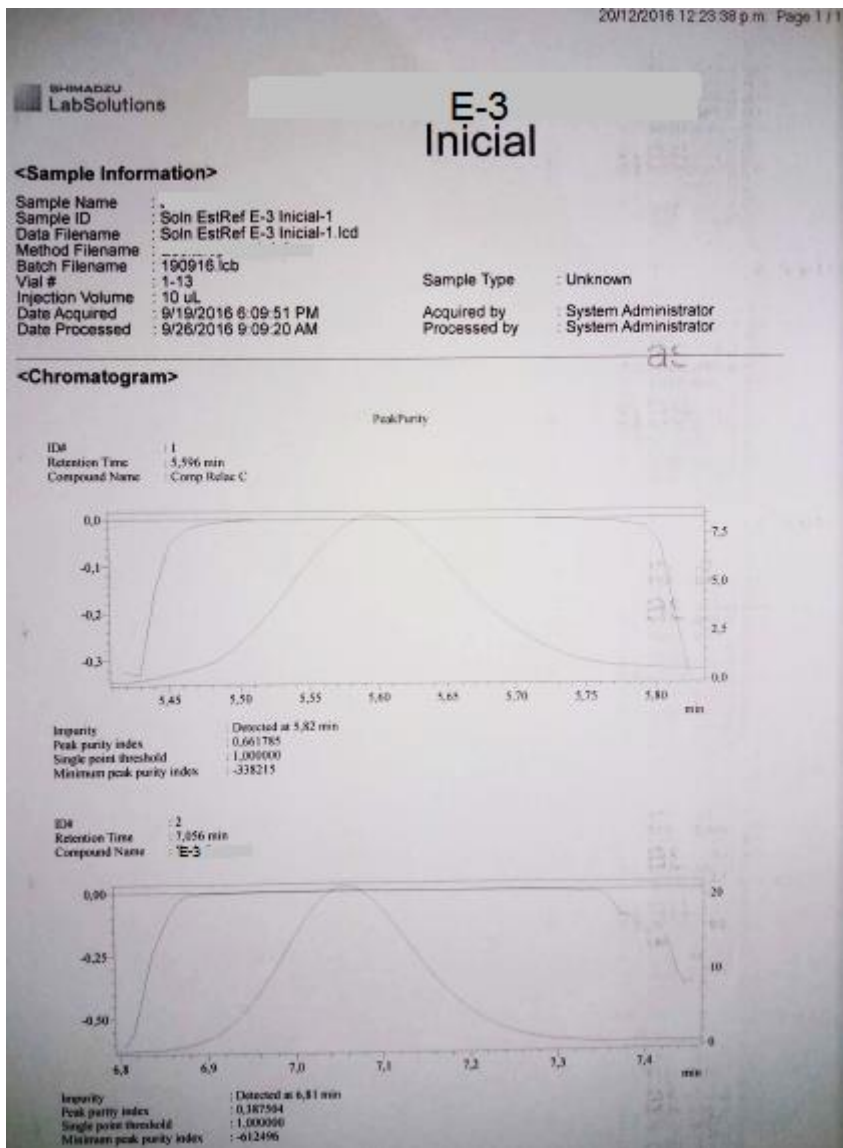
ID#1 Compound Name: Comp Reloc: A

Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)	Resolution(USP)
Sols EstRef A-3 14d D-1.lcd		3.5	142336	1.2	
Sols EstRef A-3 14d D-2.lcd		3.5	151045	1.2	
Sols EstRef A-3 14d D-3.lcd		3.5	145404	1.2	
Sols EstRef A-3 14d D-4.lcd		3.5	158331	1.2	
Sols EstRef A-3 14d D-5.lcd		3.5	151010	1.2	
Sols EstRef A-3 14d D-6.lcd		3.5	142646	1.2	
Sols EstRef A-3 14d D-7.lcd		3.5	144739	1.2	
Sols EstRef A-3 14d D-8.lcd		3.5	147781	1.2	
Sols EstRef A-3 14d D-9.lcd		3.5	146143	1.2	
Sols EstRef A-3 14d D-10.lcd		3.5	147841	1.2	
Average		3.5	147228	1.2	
NRSD		0.088	3.218	0.241	0.000
Maximum		3.5	158331	1.2	
Minimum		3.5	142336	1.2	
Standard Deviation		0.0	4784		

ID#2 Compound Name: A-3

Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)	Resolution(USP)
Sols EstRef A-3 14d D-1.lcd		6.2	3114072	1.3	7.0
Sols EstRef A-3 14d D-2.lcd		6.2	3331554	1.3	7.0
Sols EstRef A-3 14d D-3.lcd		6.2	3082357	1.3	7.0
Sols EstRef A-3 14d D-4.lcd		6.2	3474534	1.4	7.0
Sols EstRef A-3 14d D-5.lcd		6.2	3237864	1.3	7.0
Sols EstRef A-3 14d D-6.lcd		6.2	3159413	1.3	7.0
Sols EstRef A-3 14d D-7.lcd		6.2	3209958	1.3	7.0
Sols EstRef A-3 14d D-8.lcd		6.2	3232774	1.4	7.0
Sols EstRef A-3 14d D-9.lcd		6.2	3211770	1.3	7.0
Sols EstRef A-3 14d D-10.lcd		6.2	3245761	1.4	7.0
Average		6.2	3230008	1.3	7.0
NRSD		0.052	8.444	0.689	0.266
Maximum		6.2	3474534	1.4	7.0
Minimum		6.2	3082357	1.3	7.0
Standard Deviation		0.0	111245		

Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.



Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.

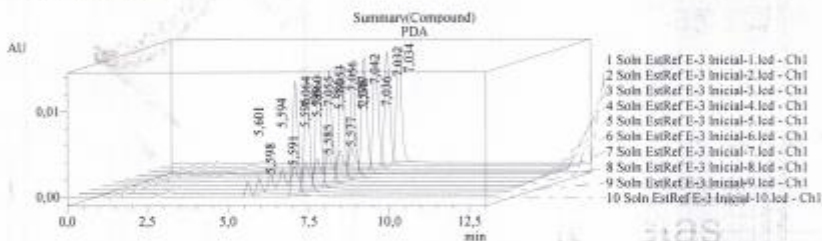


# E-3 Inicial

## <Sample Information>

Sample Name : Soln EstRef E-3 Inicial-1  
 Sample ID : Soln EstRef E-3 Inicial-1  
 Data Filename : Soln EstRef E-3 Inicial-1.lcd  
 Method Filename :  
 Batch Filename : 190916.lcb  
 Vial # : 1-13  
 Injection Volume : 10 uL  
 Date Acquired : 9/19/2016 6:09:51 PM  
 Date Processed : 9/26/2016 9:09:20 AM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

## <Chromatogram>



<< PDA >>

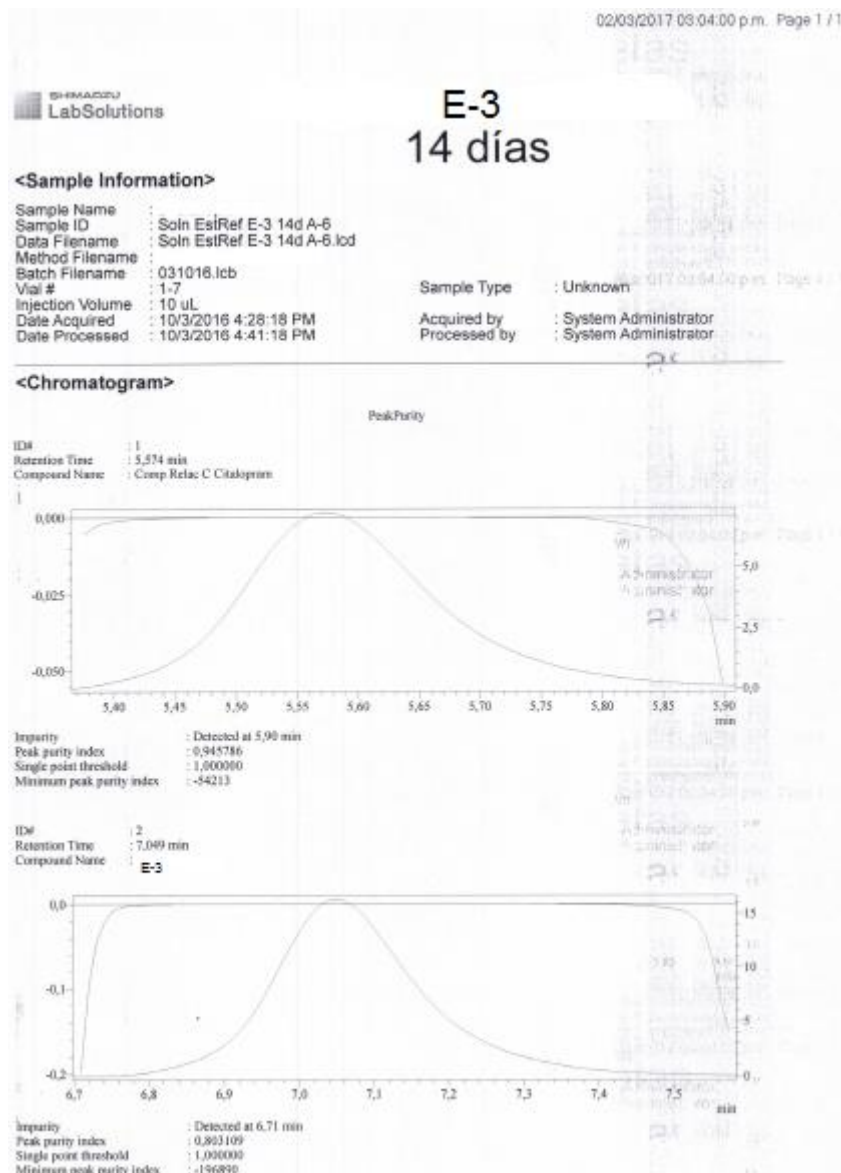
ID#1 Compound Name: Comp Relac. C. Catalogram

Title	Ret. Time	Area	Resolution(USP)
Soln EstRef E-3 Inicial-1.lcd	5.6	16560	--
Soln EstRef E-3 Inicial-2.lcd	5.6	16703	--
Soln EstRef E-3 Inicial-3.lcd	5.6	16547	--
Soln EstRef E-3 Inicial-4.lcd	5.6	16642	--
Soln EstRef E-3 Inicial-5.lcd	5.6	16801	--
Soln EstRef E-3 Inicial-6.lcd	5.6	16840	--
Soln EstRef E-3 Inicial-7.lcd	5.6	16920	--
Soln EstRef E-3 Inicial-8.lcd	5.6	16616	--
Soln EstRef E-3 Inicial-9.lcd	5.6	16247	--
Soln EstRef E-3 Inicial-10.lcd	5.6	16906	--
Average	5.6	16678	--
%RSD	0.153	1.223	0.000
Maximum	5.6	16920	--
Minimum	5.6	16247	--
Standard Deviation	0.0	204	--

ID#2 Compound Name: I E-3

Title	Ret. Time	Area	Resolution(USP)
Soln EstRef E-3 Inicial-1.lcd	7.0	154076	5.1
Soln EstRef E-3 Inicial-2.lcd	7.0	153956	5.1
Soln EstRef E-3 Inicial-3.lcd	7.0	155293	5.1
Soln EstRef E-3 Inicial-4.lcd	7.0	156466	5.1
Soln EstRef E-3 Inicial-5.lcd	7.0	152013	5.1
Soln EstRef E-3 Inicial-6.lcd	7.1	157011	5.1
Soln EstRef E-3 Inicial-7.lcd	7.1	153084	5.1
Soln EstRef E-3 Inicial-8.lcd	7.1	155005	5.1
Soln EstRef E-3 Inicial-9.lcd	7.1	155396	5.1
Soln EstRef E-3 Inicial-10.lcd	7.1	157013	5.1
Average	7.0	154931	5.1
%RSD	0.162	1.075	0.520
Maximum	7.1	157013	5.1
Minimum	7.0	152013	5.1
Standard Deviation	0.0	1666	--

Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.



Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.



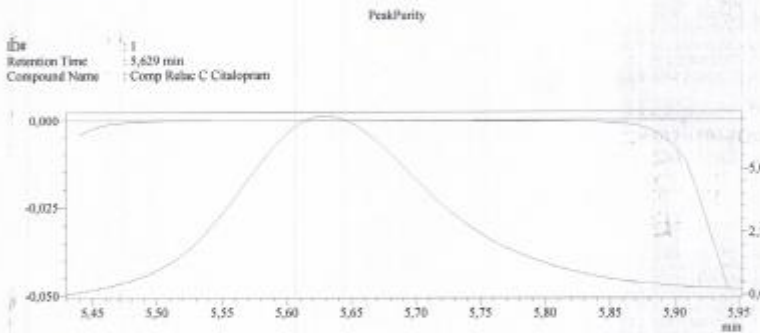


# E-3 14 días

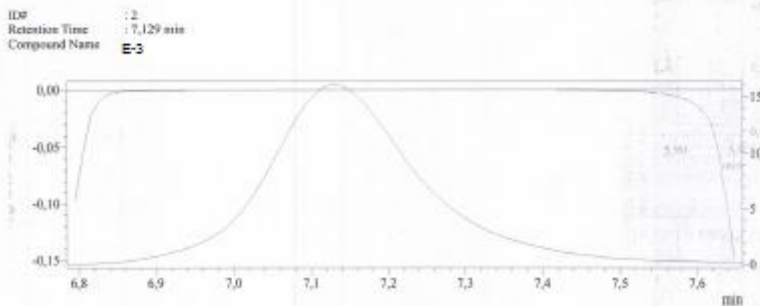
## <Sample Information>

Sample Name	:	Solin EstRef E-3 14d B-6	Sample Type	:	Unknown
Sample ID	:	Solin EstRef E-3 14d B-6	Acquired by	:	System Administrator
Data Filename	:	Solin EstRef E-3 14d B-6.lcd	Processed by	:	System Administrator
Method Filename	:				
Batch Filename	:	031016.lcb			
Vial #	:	1-17			
Injection Volume	:	10 uL			
Date Acquired	:	10/3/2018 8:41:45 PM			
Date Processed	:	10/3/2018 8:54:46 PM			

## <Chromatogram>



Impurity : Detected at 5,94 min  
Peak purity index : 0,951770  
Single point threshold : 1,000000  
Minimum peak purity index : -48230



Impurity : Detected at 7,65 min  
Peak purity index : 0,850687  
Single point threshold : 1,000000  
Minimum peak purity index : -140111

Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.

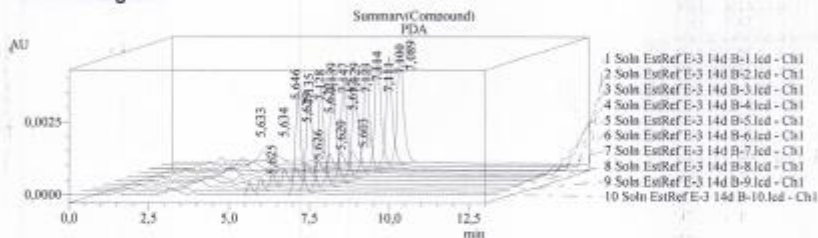


# E-3 14 días

## <Sample Information>

Sample Name : Soln EstRef E-3 14d B-1  
 Sample ID : Soln EstRef E-3 14d B-1  
 Data Filename : Soln EstRef E-3 14d B-1.lcd  
 Method Filename :  
 Batch Filename : 031016.lcb  
 Vial # : 1-12  
 Injection Volume : 10 uL  
 Date Acquired : 10/3/2016 5:35:00 PM  
 Date Processed : 10/3/2016 5:48:02 PM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

## <Chromatogram>



<< PDA >>

ID#1 Compound Name: Comp. Relat. C. Catalog

Title	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)	Number of Theoretical Plate(USP)	Resolution(USP)
Soln EstRef E-3 14d B-1.lcd	5.6	3876	1.2	6018	--
Soln EstRef E-3 14d B-2.lcd	5.6	5150	1.2	5658	--
Soln EstRef E-3 14d B-3.lcd	5.6	5557	1.2	5836	--
Soln EstRef E-3 14d B-4.lcd	5.6	4899	1.2	5910	--
Soln EstRef E-3 14d B-5.lcd	5.6	4714	1.2	5770	--
Soln EstRef E-3 14d B-6.lcd	5.6	4494	1.2	6008	--
Soln EstRef E-3 14d B-7.lcd	5.6	5272	1.2	6003	--
Soln EstRef E-3 14d B-8.lcd	5.6	4760	1.2	5884	--
Soln EstRef E-3 14d B-9.lcd	5.6	4598	1.2	5867	--
Soln EstRef E-3 14d B-10.lcd	5.6	4673	1.2	5975	--
Average	5.6	4709	1.2	5895	--
%RSD	0.212	9.678	1.144	1.980	0.000
Maximum	5.6	5557	1.2	6018	--
Minimum	5.6	3876	1.2	5658	--
Standard Deviation	0.0	464	--	117	--

ID#2 Compound Name: E-3

Title	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)	Number of Theoretical Plate(USP)	Resolution(USP)
Soln EstRef E-3 14d B-1.lcd	7.1	55292	1.2	6518	4.6
Soln EstRef E-3 14d B-2.lcd	7.1	51463	1.2	6457	4.6
Soln EstRef E-3 14d B-3.lcd	7.1	55963	1.2	6558	4.6
Soln EstRef E-3 14d B-4.lcd	7.1	51413	1.2	6455	4.6
Soln EstRef E-3 14d B-5.lcd	7.1	47835	1.2	6413	4.6
Soln EstRef E-3 14d B-6.lcd	7.1	47295	1.2	6535	4.7
Soln EstRef E-3 14d B-7.lcd	7.1	52721	1.2	6653	4.7
Soln EstRef E-3 14d B-8.lcd	7.1	47542	1.2	6562	4.7
Soln EstRef E-3 14d B-9.lcd	7.1	47366	1.2	6564	4.7
Soln EstRef E-3 14d B-10.lcd	7.1	47978	1.2	6590	4.7
Average	7.1	50487	1.2	6530	4.6
%RSD	0.233	6.662	0.672	1.101	0.781
Maximum	7.1	55963	1.2	6653	4.7
Minimum	7.1	47295	1.2	6413	4.6
Standard Deviation	0.0	3363	--	72	--

Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.



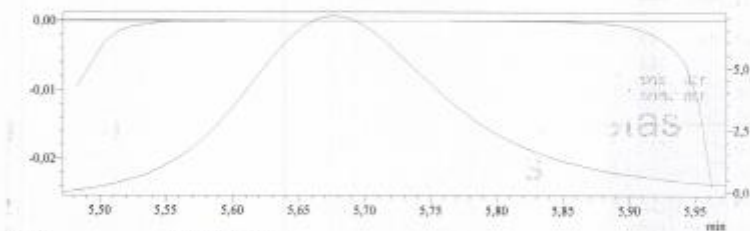
# E-3 14 días

## <Sample Information>

Sample Name	:		Sample Type	:	Unknown
Sample ID	:	Soln EstRef E-3 14d C-6	Acquired by	:	System Administrator
Data Filename	:	Soln EstRef E-3 14d C-6.lcd	Processed by	:	System Administrator
Method Filename	:				
Batch Filename	:	031016.lcb			
Vial #	:	1-27			
Injection Volume	:	10 uL			
Date Acquired	:	10/3/2016 8:55:11 PM			
Date Processed	:	10/3/2016 9:08:12 PM			

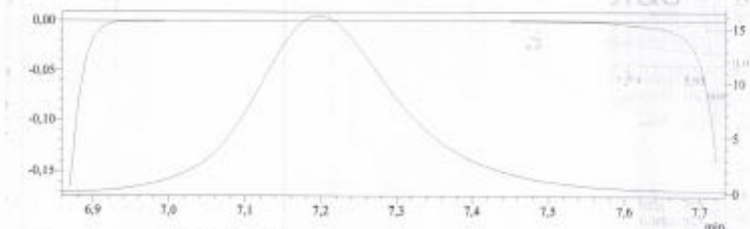
## <Chromatogram>

ID# : 1  
Retention Time : 5.675 min  
Compound Name : Comp Relac C Cholestan



Inpurity : Detected at 5.06 min  
Peak purity index : 0.975913  
Single point threshold : 1.000000  
Minimum peak purity index : -24086

ID# : 2  
Retention Time : 7.196 min  
Compound Name : E-3



Inpurity : Detected at 6.87 min  
Peak purity index : 0.834038  
Single point threshold : 1.000000  
Minimum peak purity index : -165961

**Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.**

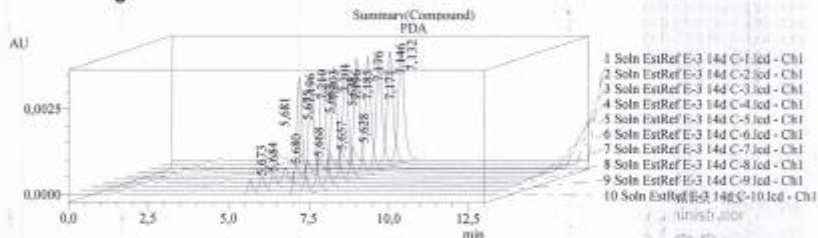


# E-3 14 días

## <Sample Information>

Sample Name :  
 Sample ID : Soln EstRef E-3 14d C-1  
 Data Filename : Soln EstRef E-3 14d C-1.lcd  
 Method Filename :  
 Batch Filename : 031016.lcb  
 Vial # : 1-22  
 Injection Volume : 10 uL  
 Date Acquired : 10/3/2016 7:48:28 PM  
 Date Processed : 10/3/2016 8:01:30 PM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

## <Chromatogram>



<< PDA >>

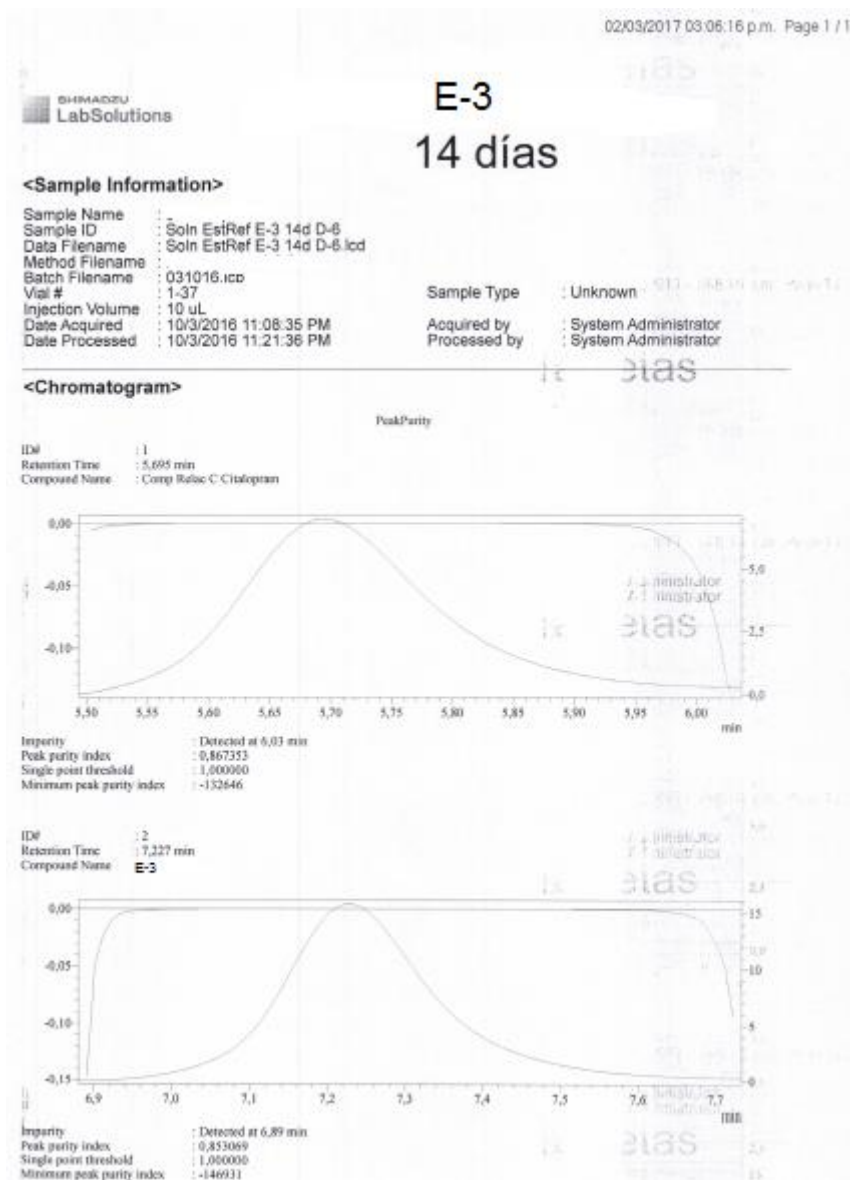
ID#1 Compound Name: Comp Relac: C Chromatogram

Title	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)	Number of Theoretical Plate(USP)	Resolution(USP)
Soln EstRef E-3 14d C-1.lcd	5.6	4408	1.2	5845	--
Soln EstRef E-3 14d C-2.lcd	5.6	4549	1.2	5782	--
Soln EstRef E-3 14d C-3.lcd	5.7	4304	1.2	6033	--
Soln EstRef E-3 14d C-4.lcd	5.7	4734	1.2	5797	--
Soln EstRef E-3 14d C-5.lcd	5.7	4642	1.2	5830	--
Soln EstRef E-3 14d C-6.lcd	5.7	4442	1.2	6024	--
Soln EstRef E-3 14d C-7.lcd	5.7	4608	1.2	5923	--
Soln EstRef E-3 14d C-8.lcd	5.7	4508	1.2	5574	--
Soln EstRef E-3 14d C-9.lcd	5.7	4464	1.2	5940	--
Soln EstRef E-3 14d C-10.lcd	5.7	4528	1.2	5865	--
Average	5.7	4548	1.2	5887	--
%RSD	0.372	3.088	1.614	1.540	0.000
Maximum	5.7	4734	1.2	6033	--
Minimum	5.6	4304	1.2	5782	--
Standard Deviation	0.0	140	--	91	--

ID#2 Compound Name: E-3

Title	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)	Number of Theoretical Plate(USP)	Resolution(USP)
Soln EstRef E-3 14d C-1.lcd	7.1	44915	1.2	6557	4.7
Soln EstRef E-3 14d C-2.lcd	7.1	45616	1.2	6551	4.6
Soln EstRef E-3 14d C-3.lcd	7.2	45247	1.2	6613	4.7
Soln EstRef E-3 14d C-4.lcd	7.2	46631	1.2	6637	4.7
Soln EstRef E-3 14d C-5.lcd	7.2	47849	1.2	6645	4.7
Soln EstRef E-3 14d C-6.lcd	7.2	47237	1.2	6664	4.7
Soln EstRef E-3 14d C-7.lcd	7.2	47215	1.2	6665	4.7
Soln EstRef E-3 14d C-8.lcd	7.2	47164	1.2	6661	4.7
Soln EstRef E-3 14d C-9.lcd	7.2	47925	1.2	6614	4.7
Soln EstRef E-3 14d C-10.lcd	7.2	47188	1.2	6659	4.7
Average	7.2	46617	1.2	6627	4.7
%RSD	0.359	2.160	0.245	0.646	0.519
Maximum	7.2	47849	1.2	6665	4.7
Minimum	7.1	44915	1.2	6551	4.6
Standard Deviation	0.0	1097	--	45	--

Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.



**Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.**



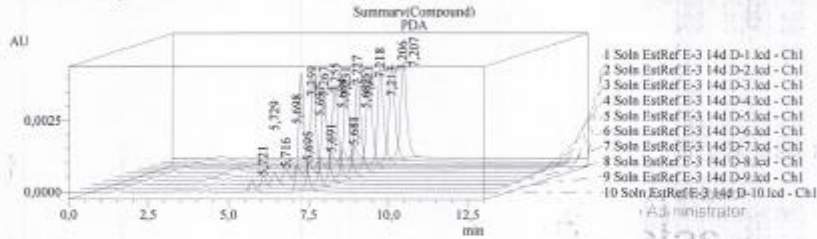
# E-3 14 días

## <Sample Information>

Sample Name :  
 Sample ID : Soln EstRef E-3 14d D-1  
 Data Filename : Soln EstRef E-3 14d D-1.lcd  
 Method Filename :  
 Batch Filename : 031016.lcb  
 Vial # : 1-32  
 Injection Volume : 10 µL  
 Date Acquired : 10/3/2016 10:01:53 PM  
 Date Processed : 10/3/2016 10:14:54 PM

Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

## <Chromatogram>

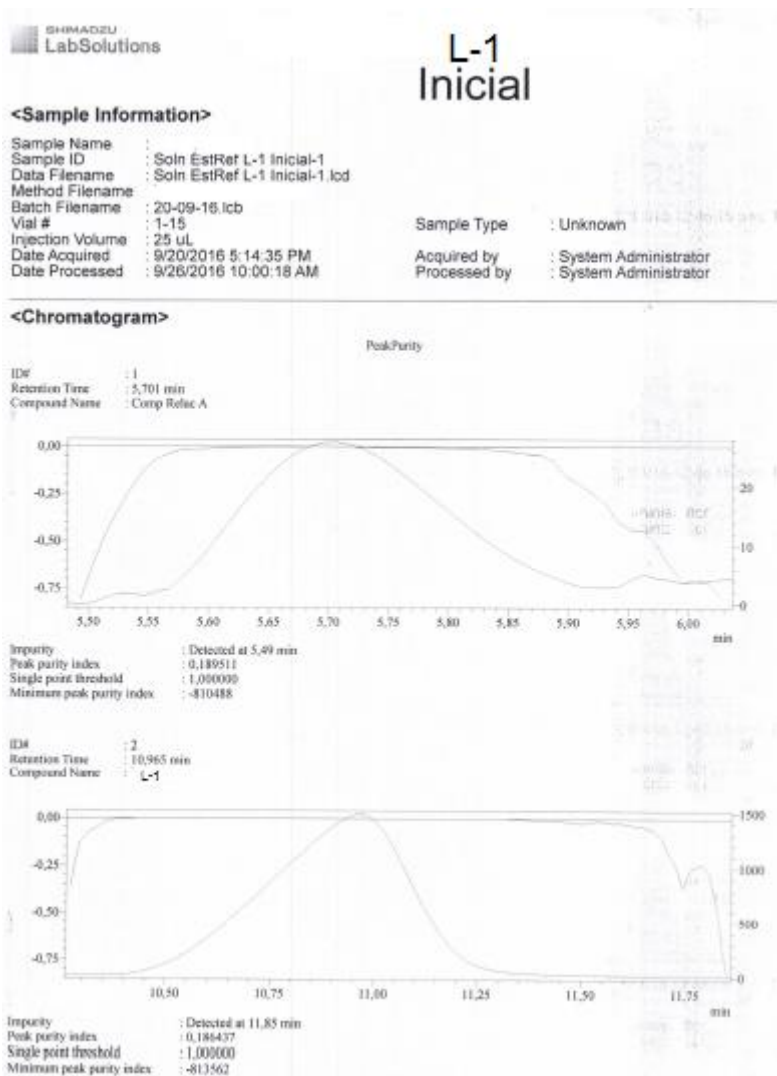


<< PDA >>

ID#1 Compound Name: Comp. Relat. C. Chromatogram	Title	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)	Number of Theoretical Plate(USP)	Resolution(USP)
Soln EstRef E-3 14d D-1.lcd		5.7	4484	1.2	5958	--
Soln EstRef E-3 14d D-2.lcd		5.7	4738	1.2	5875	--
Soln EstRef E-3 14d D-3.lcd		5.7	4758	1.2	5867	--
Soln EstRef E-3 14d D-4.lcd		5.7	4622	1.2	6012	--
Soln EstRef E-3 14d D-5.lcd		5.7	4520	1.2	5916	--
Soln EstRef E-3 14d D-6.lcd		5.7	4499	1.2	5946	--
Soln EstRef E-3 14d D-7.lcd		5.7	4517	1.2	5921	--
Soln EstRef E-3 14d D-8.lcd		5.7	4611	1.2	5819	--
Soln EstRef E-3 14d D-9.lcd		5.7	4914	1.2	5871	--
Soln EstRef E-3 14d D-10.lcd		5.7	4555	1.2	5879	--
Average		5.7	4580	1.2	5906	--
%RSD	0.296		2,072	0.925	0.943	0.000
Maximum		5.7	4738	1.2	6012	--
Minimum		5.7	4484	1.2	5819	--
Standard Deviation		0.0	95	--	56	--

ID#2 Compound Name: E-3	Title	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)	Number of Theoretical Plate(USP)	Resolution(USP)
Soln EstRef E-3 14d D-1.lcd		7.2	46611	1.2	6685	4.7
Soln EstRef E-3 14d D-2.lcd		7.2	47960	1.2	6711	4.7
Soln EstRef E-3 14d D-3.lcd		7.2	46577	1.2	6718	4.7
Soln EstRef E-3 14d D-4.lcd		7.2	46411	1.2	6715	4.7
Soln EstRef E-3 14d D-5.lcd		7.2	46799	1.2	6748	4.7
Soln EstRef E-3 14d D-6.lcd		7.2	45882	1.2	6738	4.7
Soln EstRef E-3 14d D-7.lcd		7.2	46364	1.2	6657	4.7
Soln EstRef E-3 14d D-8.lcd		7.2	47124	1.2	6664	4.7
Soln EstRef E-3 14d D-9.lcd		7.2	52664	1.2	6746	4.7
Soln EstRef E-3 14d D-10.lcd		7.2	57675	1.2	6736	4.7
Average		7.2	48263	1.2	6712	4.7
%RSD	0.205		7,965	0.166	0.491	0.224
Maximum		7.2	57675	1.2	6748	4.7
Minimum		7.2	45882	1.2	6657	4.7
Standard Deviation		0.0	3844	--	33	--

Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.



**Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.**

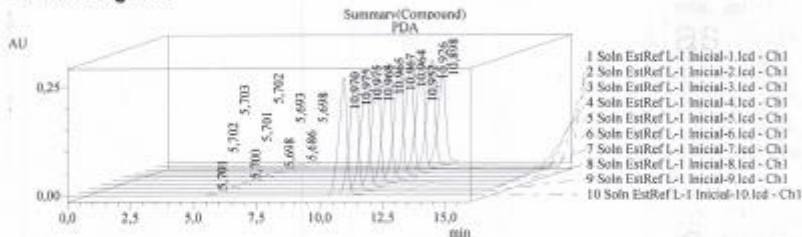


# L-1 Inicial

## <Sample Information>

Sample Name : Soln EstRef L-1 Inicial-1  
 Sample ID : Soln EstRef L-1 Inicial-1.lcd  
 Data Filename : Soln EstRef L-1 Inicial-1.lcd  
 Method Filename :  
 Batch Filename : 20-09-16.icb  
 Vial # : 1-15  
 Injection Volume : 25 uL  
 Date Acquired : 9/20/2016 5:14:35 PM  
 Date Processed : 9/26/2016 10:00:18 AM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

## <Chromatogram>



<< PDA >>

ID#1 Compound Name: Comp Relac A

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)
Soln EstRef L-1 Inicial-1.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	5.7	57754	1.2
Soln EstRef L-1 Inicial-2.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	5.7	56834	1.2
Soln EstRef L-1 Inicial-3.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	5.7	56914	1.2
Soln EstRef L-1 Inicial-4.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	5.7	58144	1.2
Soln EstRef L-1 Inicial-5.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	5.7	58609	1.2
Soln EstRef L-1 Inicial-6.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	5.7	58556	1.2
Soln EstRef L-1 Inicial-7.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	5.7	55182	1.2
Soln EstRef L-1 Inicial-8.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	5.7	57962	1.2
Soln EstRef L-1 Inicial-9.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	5.7	57106	1.2
Soln EstRef L-1 Inicial-10.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	5.7	56159	1.2
Average			5.7	57172	1.2
%RSD			0.091	1.813	0.0
Maximum			5.7	58609	1.2
Minimum			5.7	55182	1.2
Standard Deviation			0.0	1637	-

ID#2 Compound Name: L-1

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)
Soln EstRef L-1 Inicial-1.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	10.9	4399179	0.9
Soln EstRef L-1 Inicial-2.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	10.9	5467187	0.8
Soln EstRef L-1 Inicial-3.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	11.0	5885534	0.8
Soln EstRef L-1 Inicial-4.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	11.0	6160930	0.8
Soln EstRef L-1 Inicial-5.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	11.0	6172151	0.8
Soln EstRef L-1 Inicial-6.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	11.0	6166219	0.8
Soln EstRef L-1 Inicial-7.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	11.0	6226548	0.8
Soln EstRef L-1 Inicial-8.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	11.0	6213596	0.8
Soln EstRef L-1 Inicial-9.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	11.0	6302329	0.8
Soln EstRef L-1 Inicial-10.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	11.0	6294501	0.8
Average			11.0	5919763	0.8
%RSD			0.228	9.928	2.652
Maximum			11.0	6302329	0.9
Minimum			10.9	4399179	0.8
Standard Deviation			0.0	587720	-

Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.



**Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.**

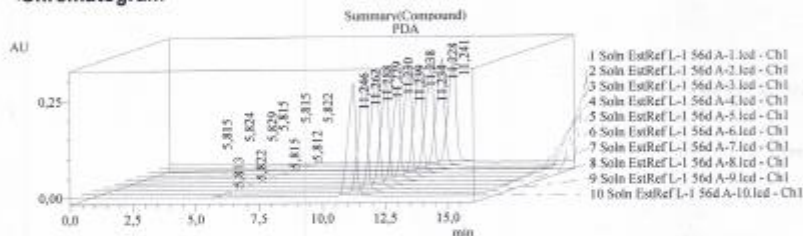


# L-1 56 días

## <Sample Information>

Sample Name : Soln EstRef L-1 56d A-10  
 Sample ID : Soln EstRef L-1 56d A-10.lcd  
 Data Filename : Soln EstRef L-1 56d A-10.lcd  
 Method Filename :  
 Batch Filename : 151116.lcb  
 Vial # : 1-42  
 Injection Volume : 25 uL  
 Date Acquired : 11/15/2016 10:50:23 AM  
 Date Processed : 11/21/2016 9:26:59 AM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

## <Chromatogram>



<< PDA >>

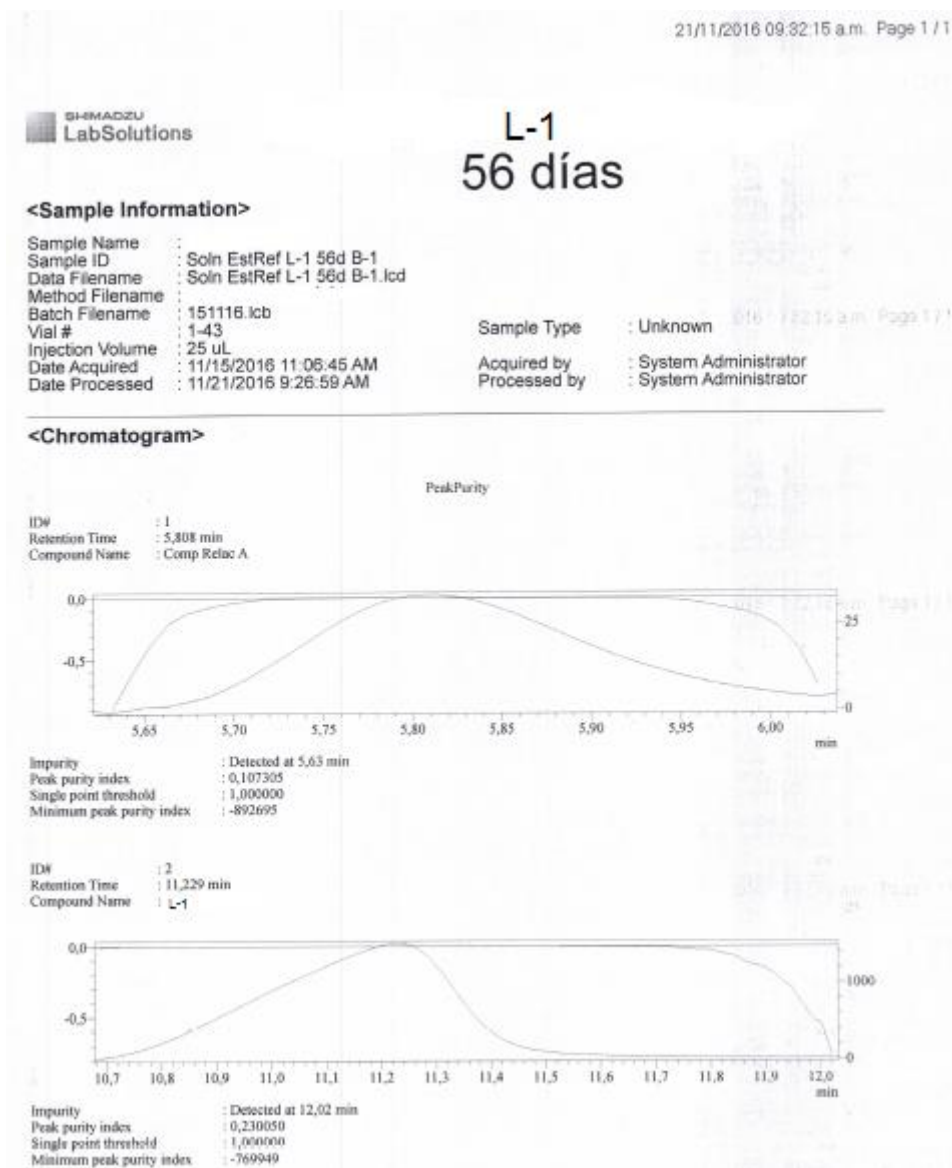
ID#1 Compound Name: Comp Relat: A

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)
Soln EstRef L-1 56d A-1.lcd	Soln EstRef L-1	Soln EstRef L-1	5.8	58500	1.2
Soln EstRef L-1 56d A-2.lcd	Soln EstRef L-1	Soln EstRef L-1	5.8	56708	1.2
Soln EstRef L-1 56d A-3.lcd	Soln EstRef L-1	Soln EstRef L-1	5.8	58488	1.2
Soln EstRef L-1 56d A-4.lcd	Soln EstRef L-1	Soln EstRef L-1	5.8	56409	1.2
Soln EstRef L-1 56d A-5.lcd	Soln EstRef L-1	Soln EstRef L-1	5.8	56030	1.2
Soln EstRef L-1 56d A-6.lcd	Soln EstRef L-1	Soln EstRef L-1	5.8	63671	1.1
Soln EstRef L-1 56d A-7.lcd	Soln EstRef L-1	Soln EstRef L-1	5.8	54790	1.1
Soln EstRef L-1 56d A-8.lcd	Soln EstRef L-1	Soln EstRef L-1	5.8	47394	1.1
Soln EstRef L-1 56d A-9.lcd	Soln EstRef L-1	Soln EstRef L-1	5.8	66272	1.2
Soln EstRef L-1 56d A-10.lcd	Soln EstRef L-1	Soln EstRef L-1	5.8	60169	1.2
Average			5.8	59851	1.2
%RSD			0.096	7.426	0.34
Maximum			5.8	67394	1.2
Minimum			5.8	54790	1.1
Standard Deviation			0.0	4445	-

ID#2 Compound Name: L-1

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)
Soln EstRef L-1 56d A-1.lcd	Soln EstRef L-1	Soln EstRef L-1	11.2	5948453	0.8
Soln EstRef L-1 56d A-2.lcd	Soln EstRef L-1	Soln EstRef L-1	11.2	6048960	0.7
Soln EstRef L-1 56d A-3.lcd	Soln EstRef L-1	Soln EstRef L-1	11.2	6164239	0.7
Soln EstRef L-1 56d A-4.lcd	Soln EstRef L-1	Soln EstRef L-1	11.2	6220791	0.7
Soln EstRef L-1 56d A-5.lcd	Soln EstRef L-1	Soln EstRef L-1	11.2	6291652	0.7
Soln EstRef L-1 56d A-6.lcd	Soln EstRef L-1	Soln EstRef L-1	11.2	5193902	0.8
Soln EstRef L-1 56d A-7.lcd	Soln EstRef L-1	Soln EstRef L-1	11.2	5883741	0.7
Soln EstRef L-1 56d A-8.lcd	Soln EstRef L-1	Soln EstRef L-1	11.2	7134874	0.7
Soln EstRef L-1 56d A-9.lcd	Soln EstRef L-1	Soln EstRef L-1	11.2	5868513	0.7
Soln EstRef L-1 56d A-10.lcd	Soln EstRef L-1	Soln EstRef L-1	11.2	6471139	0.7
Average			11.2	6222620	0.7
%RSD			0.165	8.388	1.034
Maximum			11.2	7134874	0.8
Minimum			11.2	5193902	0.7
Standard Deviation			0.0	334386	-

Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.



Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.

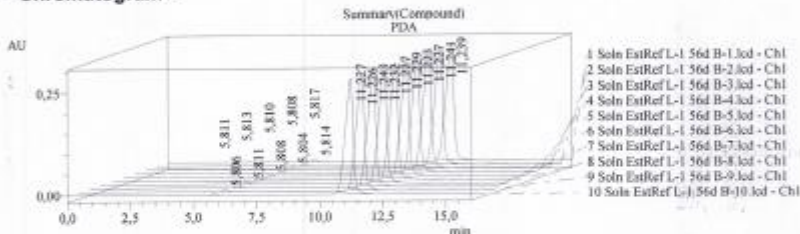


# L-1 56 días

## <Sample Information>

Sample Name :  
 Sample ID : Soln EstRef L-1 56d B-1  
 Data Filename : Soln EstRef L-1 56d B-1.lcd  
 Method Filename :  
 Batch Filename : 151116.lcb  
 Vial # : 1-43  
 Injection Volume : 25 uL  
 Date Acquired : 11/15/2016 11:06:45 AM  
 Date Processed : 11/21/2016 9:26:59 AM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

## <Chromatogram>



### << PDA >>

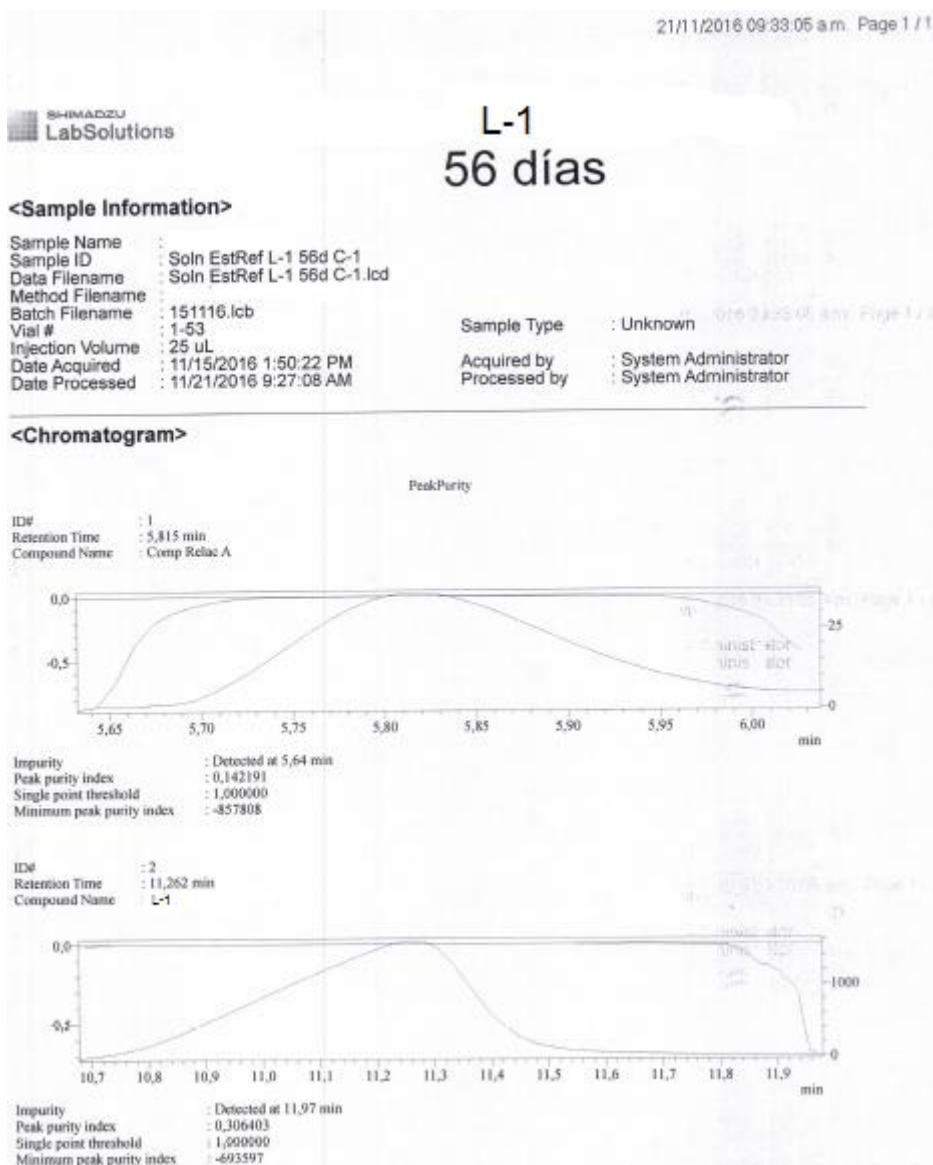
ID#1 Compound Name: Contn Relac A

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)
Soln EstRef L-1 56d B-1.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-1.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-1.lcd	5.8	52102	1.2
Soln EstRef L-1 56d B-2.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-2.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-2.lcd	5.8	51635	1.2
Soln EstRef L-1 56d B-3.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-3.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-3.lcd	5.8	54539	1.2
Soln EstRef L-1 56d B-4.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-4.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-4.lcd	5.8	53523	1.2
Soln EstRef L-1 56d B-5.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-5.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-5.lcd	5.8	53813	1.2
Soln EstRef L-1 56d B-6.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-6.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-6.lcd	5.8	53427	1.2
Soln EstRef L-1 56d B-7.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-7.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-7.lcd	5.8	55146	1.2
Soln EstRef L-1 56d B-8.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-8.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-8.lcd	5.8	54789	1.2
Soln EstRef L-1 56d B-9.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-9.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-9.lcd	5.8	55375	1.2
Soln EstRef L-1 56d B-10.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-10.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-10.lcd	5.8	53796	1.2
Average			5.8	53824	1.2
%RSD			0.064	1.256	0.550
Maximum			5.8	55146	1.2
Minimum			5.8	51635	1.2
Standard Deviation			0.0	1214	1.2

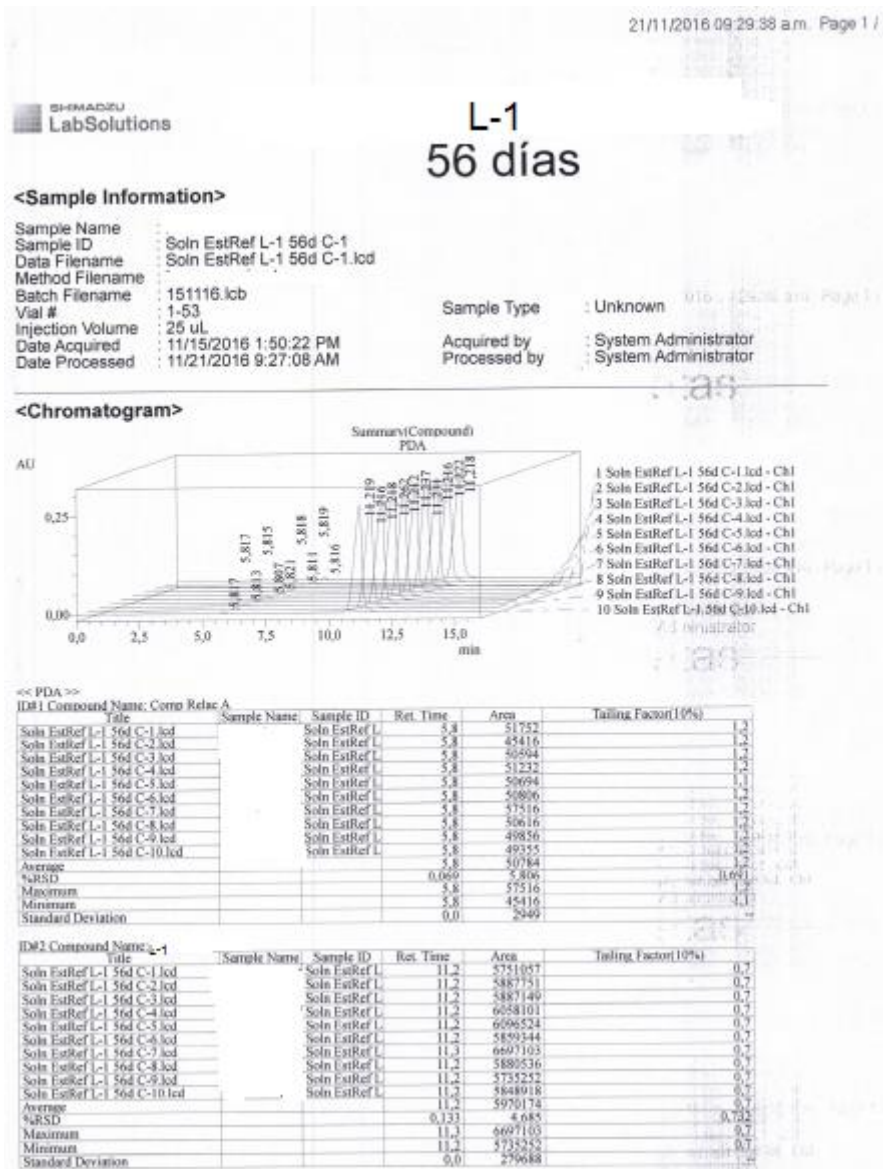
ID#2 Compound Name: L-1

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)
Soln EstRef L-1 56d B-1.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-1.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-1.lcd	11.2	6284994	0.7
Soln EstRef L-1 56d B-2.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-2.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-2.lcd	11.2	6270841	0.7
Soln EstRef L-1 56d B-3.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-3.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-3.lcd	11.2	6255030	0.7
Soln EstRef L-1 56d B-4.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-4.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-4.lcd	11.2	6097022	0.7
Soln EstRef L-1 56d B-5.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-5.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-5.lcd	11.2	6211104	0.7
Soln EstRef L-1 56d B-6.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-6.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-6.lcd	11.2	6179457	0.7
Soln EstRef L-1 56d B-7.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-7.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-7.lcd	11.2	6261323	0.7
Soln EstRef L-1 56d B-8.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-8.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-8.lcd	11.2	6405679	0.7
Soln EstRef L-1 56d B-9.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-9.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-9.lcd	11.2	6214320	0.7
Soln EstRef L-1 56d B-10.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-10.lcd	Soln EstRef L-1 56d B-10.lcd	11.2	6121075	0.7
Average			11.2	6230085	0.7
%RSD			0.064	1.414	0.263
Maximum			11.2	6405679	0.7
Minimum			11.2	6097022	0.7
Standard Deviation			0.0	88109	0.7

Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.



Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.



Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.

SHIMADZU  
LabSolutions

# L-1 56 días

## <Sample Information>

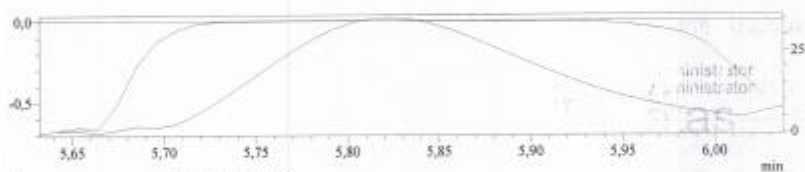
Sample Name :  
Sample ID : Soln EstRef L-1 56d D-1  
Data Filename : Soln EstRef L-1 56d D-1.lcd  
Method Filename :  
Batch Filename : 151116.lcb  
Vial # : 2-9  
Injection Volume : 25 uL  
Date Acquired : 11/15/2016 4:34:21 PM  
Date Processed : 11/21/2016 9:27:16 AM

Sample Type : Unknown  
Acquired by : System Administrator  
Processed by : System Administrator

## <Chromatogram>

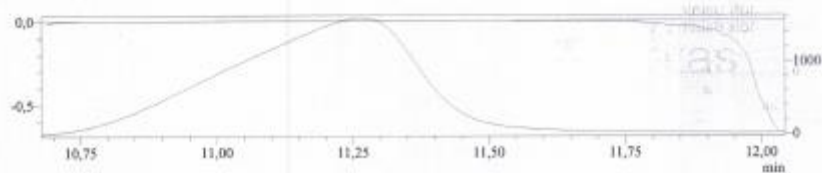
PeakPurity

ID# : 1  
Retention Time : 5,820 min  
Compound Name : Comp Relac A



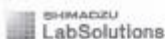
Impurity : Detected at 5,64 min  
Peak purity index : 0,329225  
Single point threshold : 1,000000  
Minimum peak purity index : -670775

ID# : 2  
Retention Time : 11,265 min  
Compound Name : L-1



Impurity : Detected at 12,03 min  
Peak purity index : 0,343246  
Single point threshold : 1,000000  
Minimum peak purity index : -656753

Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.

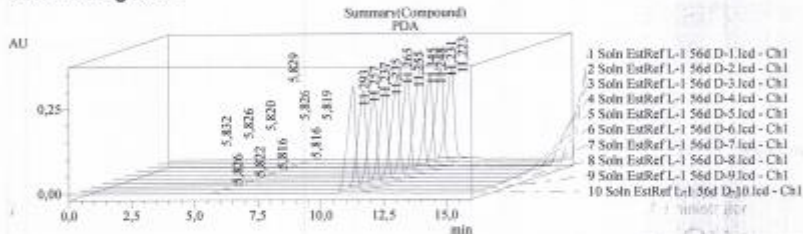


# L-1 56 días

## <Sample Information>

Sample Name :  
 Sample ID : Soln EstRef L-1 56d D-1  
 Data Filename : Soln EstRef L-1 56d D-1.lcd  
 Method Filename :  
 Batch Filename : 151116.lcb  
 Vial # : 2-9  
 Injection Volume : 25 uL  
 Date Acquired : 11/15/2016 4:34:21 PM  
 Date Processed : 11/21/2016 9:27:16 AM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

## <Chromatogram>



<< PDA >>

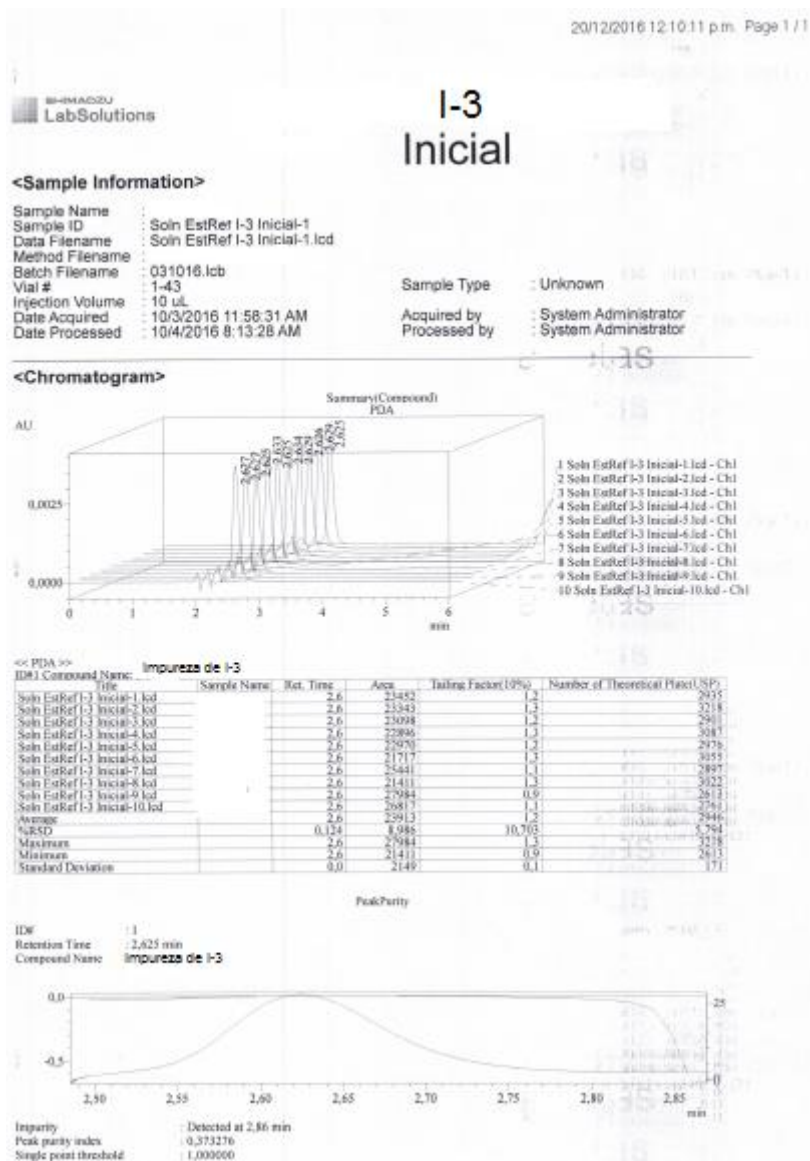
ID#1 Compound Name: Comp Ref: A

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)
Soln EstRef L-1 56d D-1.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	5.8	48997	1.1
Soln EstRef L-1 56d D-2.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	5.8	50267	1.1
Soln EstRef L-1 56d D-3.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	5.8	61976	1.1
Soln EstRef L-1 56d D-4.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	5.8	72752	1.1
Soln EstRef L-1 56d D-5.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	5.8	56669	1.1
Soln EstRef L-1 56d D-6.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	5.8	37608	1.1
Soln EstRef L-1 56d D-7.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	5.8	51199	1.1
Soln EstRef L-1 56d D-8.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	5.8	48875	1.1
Soln EstRef L-1 56d D-9.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	5.8	53683	1.1
Soln EstRef L-1 56d D-10.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	5.8	30258	1.1
Average			5.8	56124	1.1
%RSD			0.093	13.158	0.735
Maximum			5.8	72752	1.1
Minimum			5.8	48875	1.1
Standard Deviation			0.0	7385	0.0

ID#2 Compound Name: L-1

Title	Sample Name	Sample ID	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)
Soln EstRef L-1 56d D-1.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	11.2	5852692	0.7
Soln EstRef L-1 56d D-2.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	11.2	6087580	0.7
Soln EstRef L-1 56d D-3.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	11.2	5943472	0.7
Soln EstRef L-1 56d D-4.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	11.2	8496727	0.7
Soln EstRef L-1 56d D-5.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	11.3	6614812	0.7
Soln EstRef L-1 56d D-6.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	11.3	6732207	0.7
Soln EstRef L-1 56d D-7.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	11.2	6673034	0.7
Soln EstRef L-1 56d D-8.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	11.2	6063126	0.7
Soln EstRef L-1 56d D-9.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	11.3	6466490	0.7
Soln EstRef L-1 56d D-10.lcd	Soln EstRef L	Soln EstRef L	11.3	7159572	0.7
Average			11.3	6549166	0.7
%RSD			0.323	12.190	1.878
Maximum			11.3	8496727	0.7
Minimum			11.2	5852692	0.7
Standard Deviation			0.0	798344	0.0

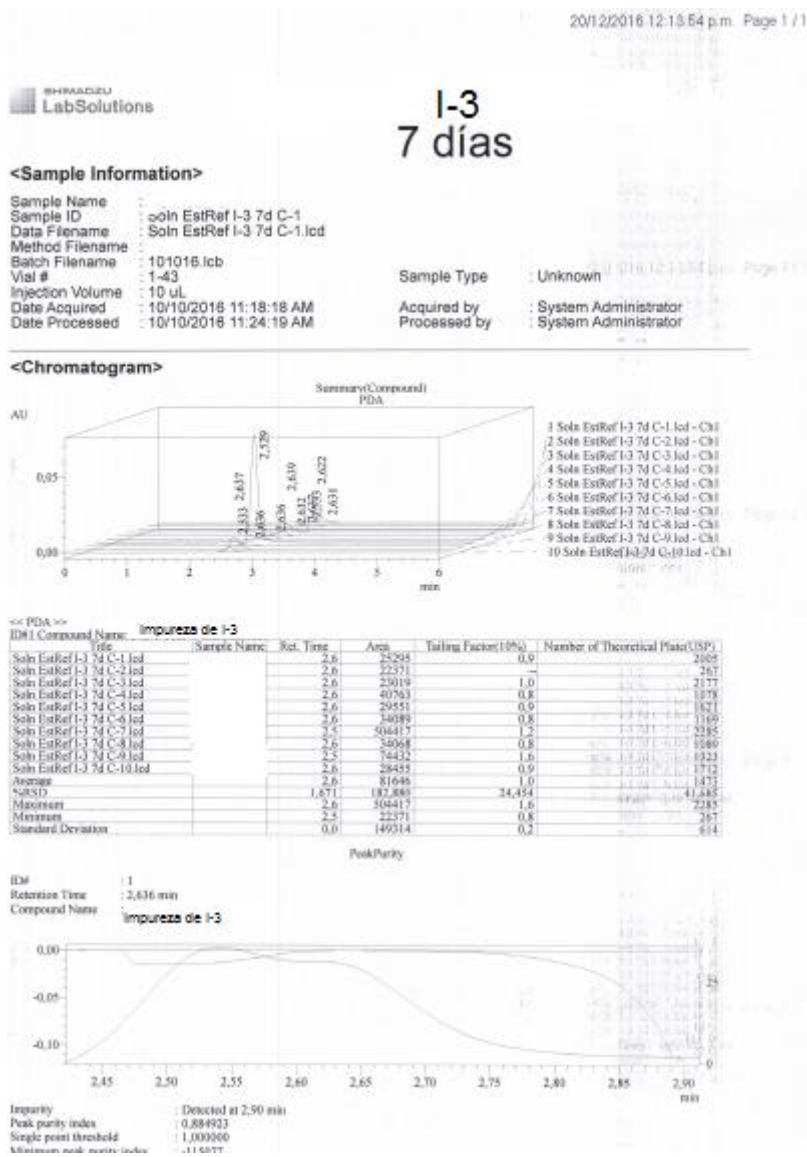
Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.



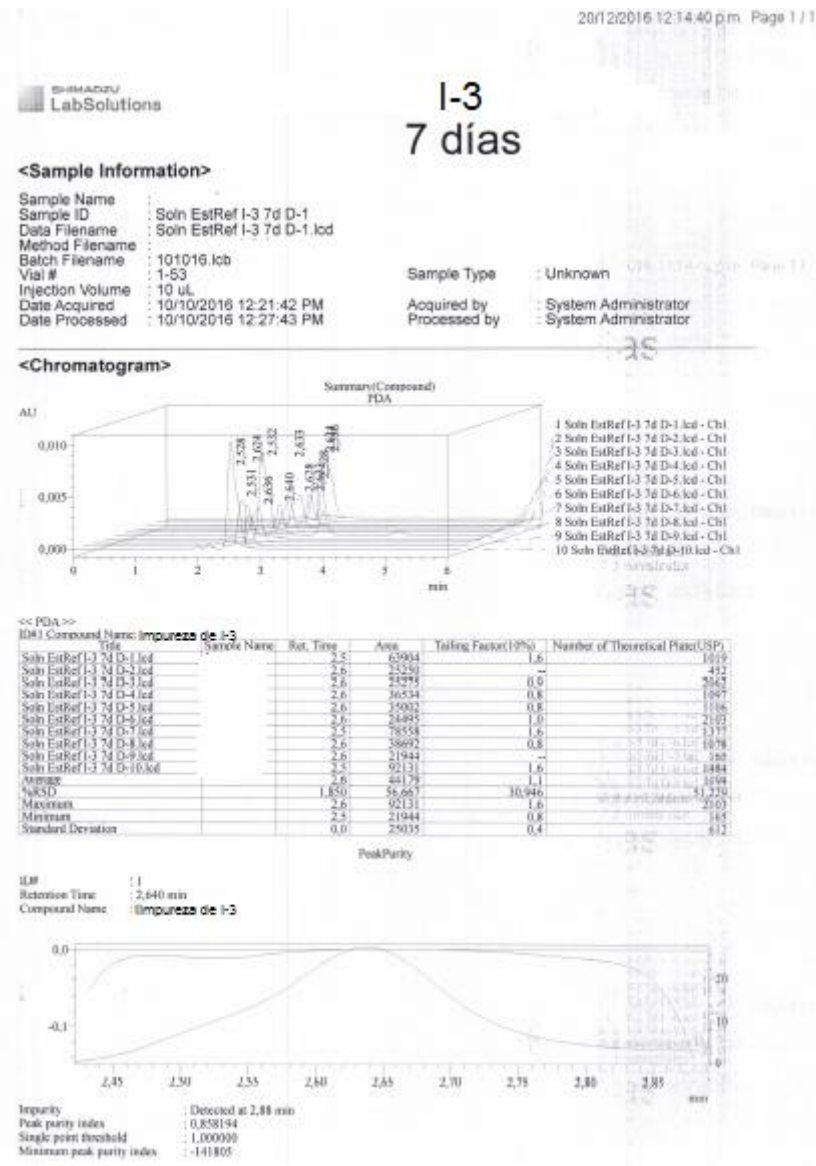
Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.







Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.



Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.

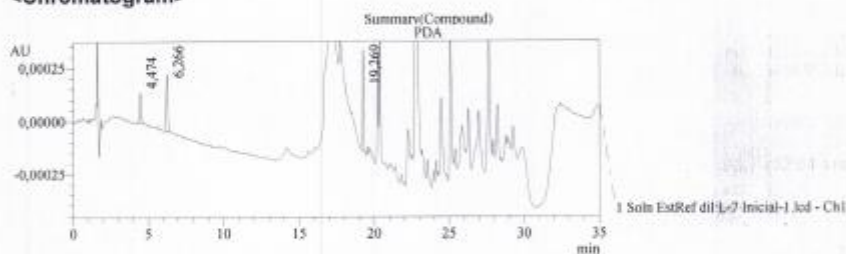


# L-7 Inicial

## <Sample Information>

Sample Name :  
 Sample ID : Soln EstRef dil L-7 Inicial-1  
 Data Filename : Soln EstRef dil L-7 Inicial-1.lcd  
 Method Filename :  
 Batch Filename : 241016.lcb  
 Vial # : 1-14  
 Injection Volume : 20 uL  
 Date Acquired : 10/24/2016 3:14:26 PM  
 Date Processed : 10/31/2016 10:21:40 AM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

## <Chromatogram>



<< PDA >>

ID#1 Compound Name: Compuesto Relacionado A la Benzocetazina	Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)	S/N
Soln EstRef dil L-7 Inicial-1.lcd			4.5	1010	1.1	11.20
Average			4.5	1010	1.1	11.20
%RSD			0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum			4.5	1010	1.1	11.20
Minimum			4.5	1010	1.1	11.20
Standard Deviation			0.0	0	--	10.00

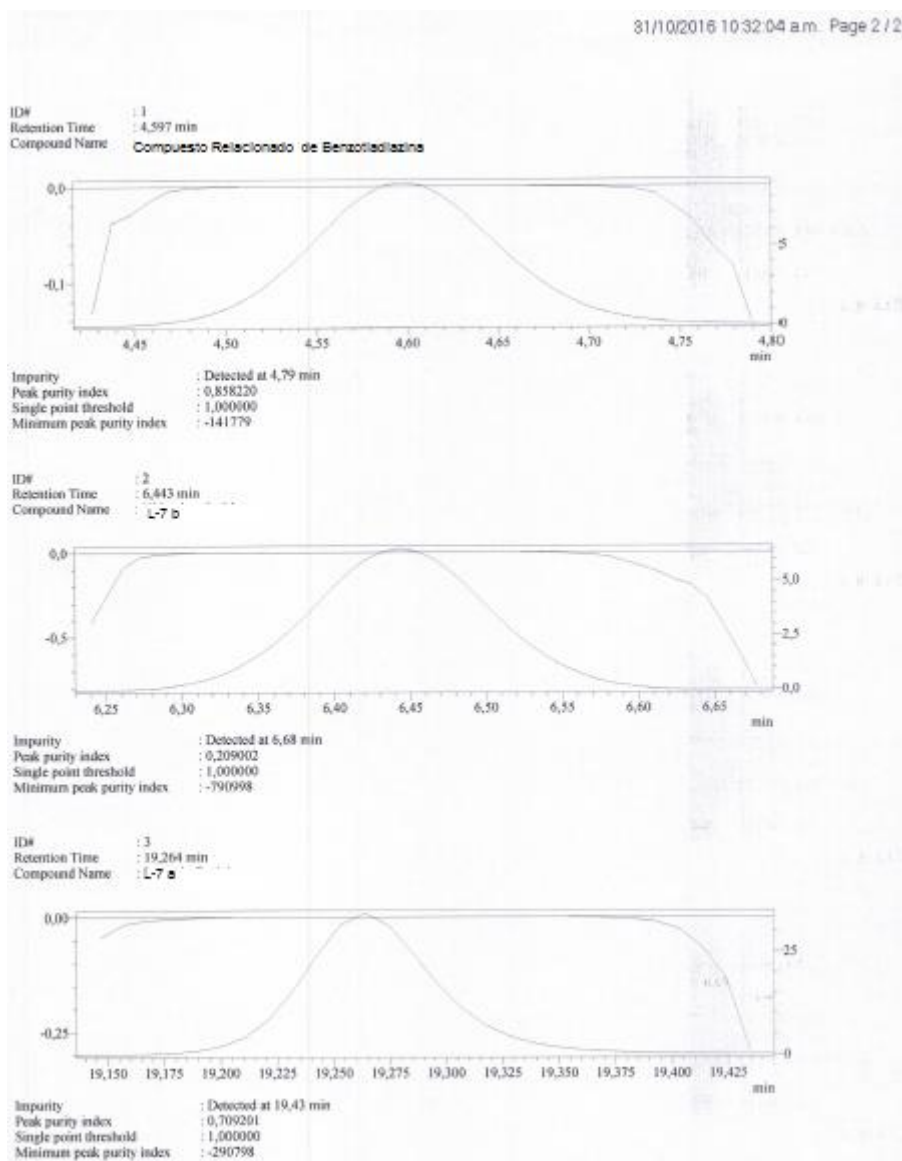
  

ID#2 Compound Name: L-7 b	Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)	S/N
Soln EstRef dil L-7 Inicial-1.lcd			6.3	2108	1.0	12.26
Average			6.3	2108	1.0	12.26
%RSD			0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum			6.3	2108	1.0	12.26
Minimum			6.3	2108	1.0	12.26
Standard Deviation			0.0	0	--	10.00

ID#3 Compound Name: L-7 a	Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)	S/N
Soln EstRef dil L-7 Inicial-1.lcd			19.3	2150	1.0	14.03
Average			19.3	2150	1.0	14.03
%RSD			0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum			19.3	2150	1.0	14.03
Minimum			19.3	2150	1.0	14.03
Standard Deviation			0.0	0	--	10.00

PeakPurity



Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.

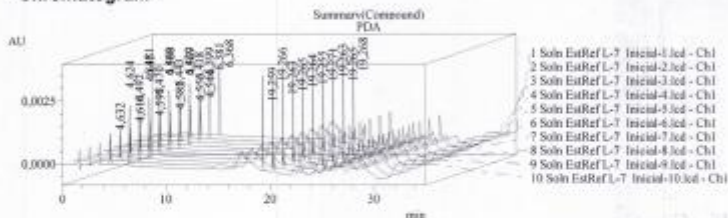


# L-7 Inicial

## <Sample Information>

Sample Name :  
 Sample ID : SoIn EstRef dil L-7 Inicial-1  
 Data Filename : SoIn EstRef dil L-7 Inicial-1.lcd  
 Method Filename :  
 Batch Filename : 241016.lcb  
 Vial # : 1-14  
 Injection Volume : 20 uL  
 Date Acquired : 10/24/2016 3:14:26 PM  
 Date Processed : 10/31/2016 10:08:37 AM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

## <Chromatogram>



<< PDA >>

DM1 Compound Name: **Compuesto Relacionado A de Benzotiazina**

Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)
SoIn EstRef L-7 Inicial-1.lcd		4.3	9255	1.0
SoIn EstRef L-7 Inicial-2.lcd		4.6	9411	1.0
SoIn EstRef L-7 Inicial-3.lcd		4.6	9363	1.0
SoIn EstRef L-7 Inicial-4.lcd		4.6	9245	1.0
SoIn EstRef L-7 Inicial-5.lcd		4.6	9196	1.0
SoIn EstRef L-7 Inicial-6.lcd		4.6	9108	1.0
SoIn EstRef L-7 Inicial-7.lcd		4.6	9299	1.0
SoIn EstRef L-7 Inicial-8.lcd		4.6	9437	1.0
SoIn EstRef L-7 Inicial-9.lcd		4.6	9068	1.0
SoIn EstRef L-7 Inicial-10.lcd		4.6	9207	1.0
Average		4.6	9278	1.0
%RSD		0.652	1.051	0.440
Maximum		4.6	9437	1.0
Minimum		4.3	9068	1.0
Standard Deviation		0.0	98	

DM2 Compound Name: **L-7 b**

Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)
SoIn EstRef L-7 Inicial-1.lcd		6.4	21894	1.0
SoIn EstRef L-7 Inicial-2.lcd		6.4	21110	1.0
SoIn EstRef L-7 Inicial-3.lcd		6.4	21150	1.0
SoIn EstRef L-7 Inicial-4.lcd		6.4	20990	1.0
SoIn EstRef L-7 Inicial-5.lcd		6.4	21094	1.0
SoIn EstRef L-7 Inicial-6.lcd		6.4	21056	1.0
SoIn EstRef L-7 Inicial-7.lcd		6.3	21013	1.0
SoIn EstRef L-7 Inicial-8.lcd		6.3	21234	1.0
SoIn EstRef L-7 Inicial-9.lcd		6.3	21018	1.0
SoIn EstRef L-7 Inicial-10.lcd		6.3	21214	1.0
Average		6.4	21067	1.0
%RSD		0.691	0.609	0.267
Maximum		6.3	21210	1.0
Minimum		6.4	20994	1.0
Standard Deviation		0.0	128	

DM3 Compound Name: **L-7 a**

Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)
SoIn EstRef L-7 Inicial-1.lcd		19.3	16379	1.1
SoIn EstRef L-7 Inicial-2.lcd		19.3	16751	1.1
SoIn EstRef L-7 Inicial-3.lcd		19.3	1668	1.1
SoIn EstRef L-7 Inicial-4.lcd		19.3	1652	1.1
SoIn EstRef L-7 Inicial-5.lcd		19.3	16644	1.1
SoIn EstRef L-7 Inicial-6.lcd		19.3	16594	1.1
SoIn EstRef L-7 Inicial-7.lcd		19.3	16571	1.1

Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)
SoIn EstRef L-7 Inicial-8.lcd		19.3	16797	1.1
SoIn EstRef L-7 Inicial-9.lcd		19.3	16576	1.1
SoIn EstRef L-7 Inicial-10.lcd		19.3	16544	1.1
Average		19.3	16607	1.1
%RSD		0.025	0.720	0.552
Maximum		19.3	16797	1.1
Minimum		19.3	16379	1.1
Standard Deviation		0.0	120	

Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.

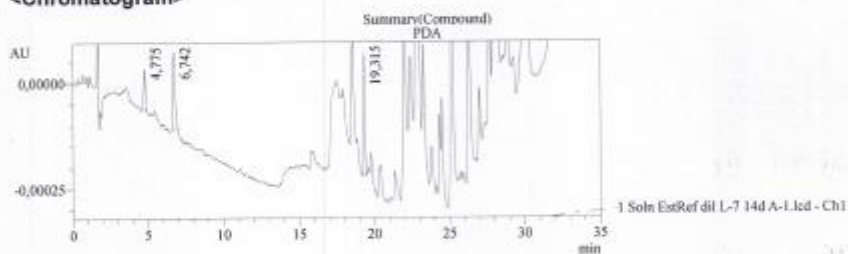


# L-7 14 días

## <Sample Information>

Sample Name : Soln EstRef dil L-7 14d A-1  
 Sample ID : Soln EstRef dil L-7 14d A-1.lcd  
 Data Filename : Soln EstRef dil L-7 14d A-1.lcd  
 Method Filename : 071116.lcb  
 Batch Filename : 1-47  
 Vial # : 20 uL  
 Injection Volume : 11/7/2016 11:09:40 AM  
 Date Acquired : 11/15/2016 7:15:07 AM  
 Date Processed : Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

## <Chromatogram>



<< PDA >>

ID#1 Compound Name: **Compuesto Relacionado A de Benzotriazolizina**

Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)	S/N
Soln EstRef dil L-7 14d A-1.lcd		4.8	817	1.2	10.7
Average		4.8	817	1.2	10.7
%RSD		0,000	0,000	0,000	0,000
Maximum		4.8	817	1.2	10.7
Minimum		4.8	817	1.2	10.7
Standard Deviation		0,0	0	--	10,0

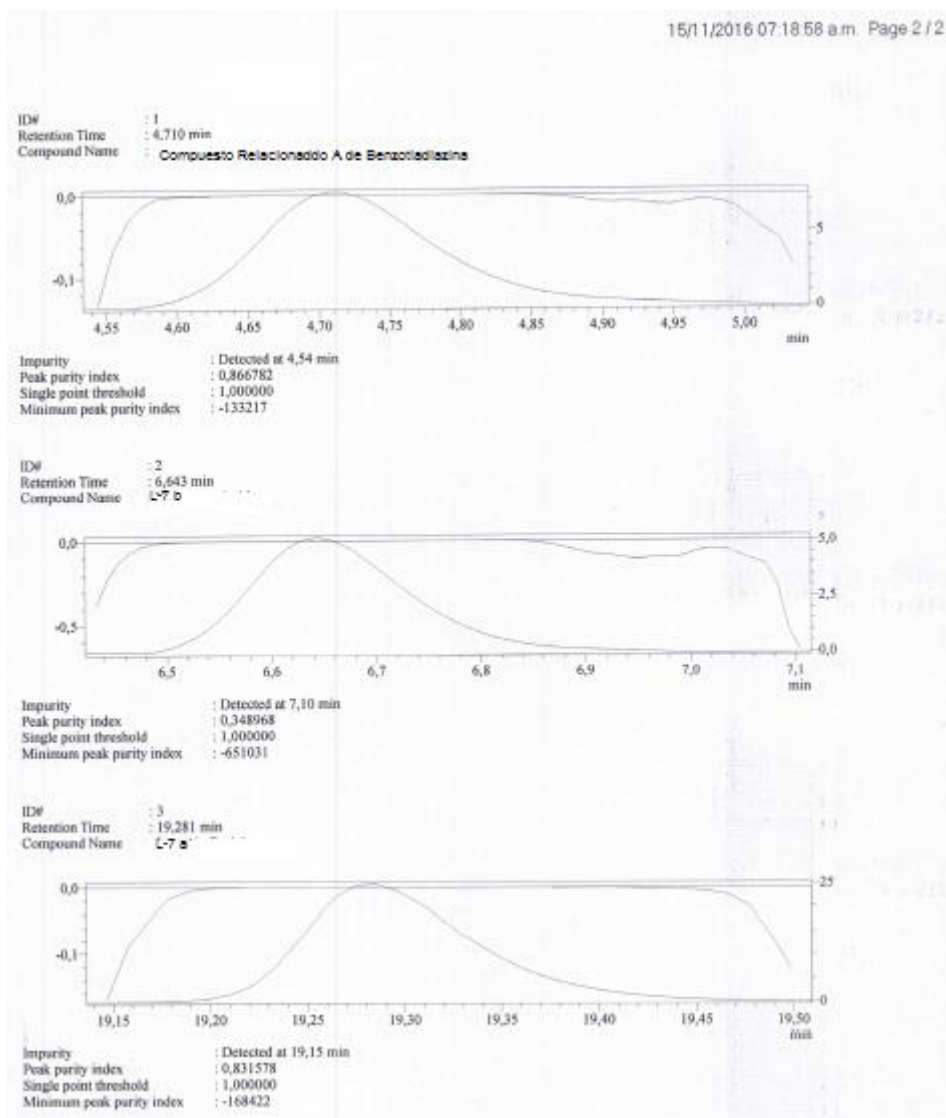
ID#2 Compound Name: **L-7 b**

Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)	S/N
Soln EstRef dil L-7 14d A-1.lcd		6.7	1820	1,1	11,4
Average		6.7	1820	1,1	11,4
%RSD		0,000	0,000	0,000	0,000
Maximum		6.7	1820	1,1	11,4
Minimum		6.7	1820	1,1	11,4
Standard Deviation		0,0	0	--	10,0

ID#3 Compound Name: **L-7 a**

Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)	S/N
Soln EstRef dil L-7 14d A-1.lcd		19.3	1716	1,4	12,3
Average		19.3	1716	1,4	12,3
%RSD		0,000	0,000	0,000	0,000
Maximum		19.3	1716	1,4	12,3
Minimum		19.3	1716	1,4	12,3
Standard Deviation		0,0	0	--	10,0

Peak Purities



Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.

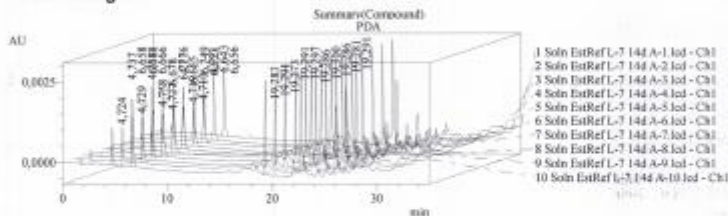


# L-7 14 días

## <Sample Information>

**Sample Name**  
**Sample ID** : Soln EstRef L-7 14d A-8  
**Data Filename** : Soln EstRef L-7 14d A-8.lcd  
**Method Filename**  
**Batch Filename** : 071116-5-b  
**Vial #** : 2-1  
**Injection Volume** : 20 uL  
**Date Acquired** : 11/7/2016 3:52:31 PM  
**Date Processed** : 11/15/2016 8:43:55 AM  
**Sample Type** : Unknown  
**Acquired by** : System Administrator  
**Processed by** : System Administrator

## <Chromatogram>



<< PDA >>

### ID1 Compound Name: Compuesto Relacionado A de Benzotiazina

Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)
Soln EstRef L-7 14d A-1.lcd		4.7	9847	1.3
Soln EstRef L-7 14d A-2.lcd		4.7	9885	1.3
Soln EstRef L-7 14d A-3.lcd		4.7	9885	1.3
Soln EstRef L-7 14d A-4.lcd		4.8	9923	1.3
Soln EstRef L-7 14d A-5.lcd		4.7	9533	1.3
Soln EstRef L-7 14d A-6.lcd		4.8	11270	1.3
Soln EstRef L-7 14d A-7.lcd		4.7	10196	1.3
Soln EstRef L-7 14d A-8.lcd		4.7	11479	1.3
Soln EstRef L-7 14d A-9.lcd		4.7	9030	1.3
Soln EstRef L-7 14d A-10.lcd		4.7	10185	1.3
Average		4.7	10134	1.3
%RSD		0.419	7.301	1.887
Maximum		4.8	11479	1.3
Minimum		4.7	9030	1.3
Standard Deviation		0.0	739	--

### ID2 Compound Name: L-7 b

Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)
Soln EstRef L-7 14d A-1.lcd		6.7	25648	1.3
Soln EstRef L-7 14d A-2.lcd		6.6	25148	1.3
Soln EstRef L-7 14d A-3.lcd		6.7	25032	1.3
Soln EstRef L-7 14d A-4.lcd		6.7	25317	1.3
Soln EstRef L-7 14d A-5.lcd		6.7	25286	1.3
Soln EstRef L-7 14d A-6.lcd		6.7	25817	1.3
Soln EstRef L-7 14d A-7.lcd		6.7	25996	1.3
Soln EstRef L-7 14d A-8.lcd		6.7	26417	1.3
Soln EstRef L-7 14d A-9.lcd		6.7	22241	1.3
Soln EstRef L-7 14d A-10.lcd		6.7	23781	1.3
Average		6.7	25657	1.3
%RSD		0.478	5.995	0.924
Maximum		6.7	26417	1.3
Minimum		6.6	22241	1.3
Standard Deviation		0.0	1419	--

### ID3 Compound Name: L-7 a

Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)
Soln EstRef L-7 14d A-1.lcd		19.3	17930	1.4
Soln EstRef L-7 14d A-2.lcd		19.3	17483	1.4
Soln EstRef L-7 14d A-3.lcd		19.3	17409	1.4
Soln EstRef L-7 14d A-4.lcd		19.3	17700	1.4
Soln EstRef L-7 14d A-5.lcd		19.3	16998	1.4
Soln EstRef L-7 14d A-6.lcd		19.3	19521	1.4
Soln EstRef L-7 14d A-7.lcd		19.3	18067	1.4

Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)
Soln EstRef L-7 14d A-8.lcd		19.3	20071	1.4
Soln EstRef L-7 14d A-9.lcd		19.3	17080	1.4
Soln EstRef L-7 14d A-10.lcd		19.3	18056	1.4
Average		19.3	17969	1.4
%RSD		0.040	3.535	0.299
Maximum		19.3	20071	1.4
Minimum		19.3	16998	1.4
Standard Deviation		0.0	994	--

Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.

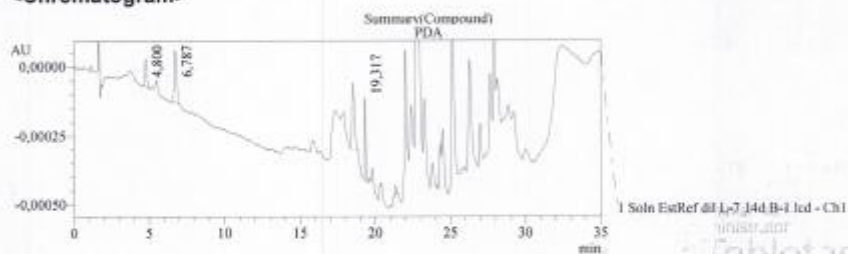


## L-7 14 días

### <Sample Information>

Sample Name :  
 Sample ID : Soln EstRef dil L-7 14d B-1  
 Data Filename : Soln EstRef dil L-7 14d B-1.icd  
 Method Filename :  
 Batch Filename : 071116.icb  
 Vial # : 2-4  
 Injection Volume : 20 uL  
 Date Acquired : 11/7/2016 5:38:38 PM  
 Date Processed : 11/15/2016 7:15:14 AM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

### <Chromatogram>



<< PDA >>

ID#1 Compound Name: **Compuesto Relacionado A deBenzotiazolizina**

Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)	S/N
Soln EstRef dil L-7 14d B-1.icd		4.8	372	1.3	10.8
Average		4.8	372	1.3	10.8
%RSD		0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum		4.8	372	1.3	10.8
Minimum		4.8	372	1.3	10.8
Standard Deviation		0.0	0	--	10.0

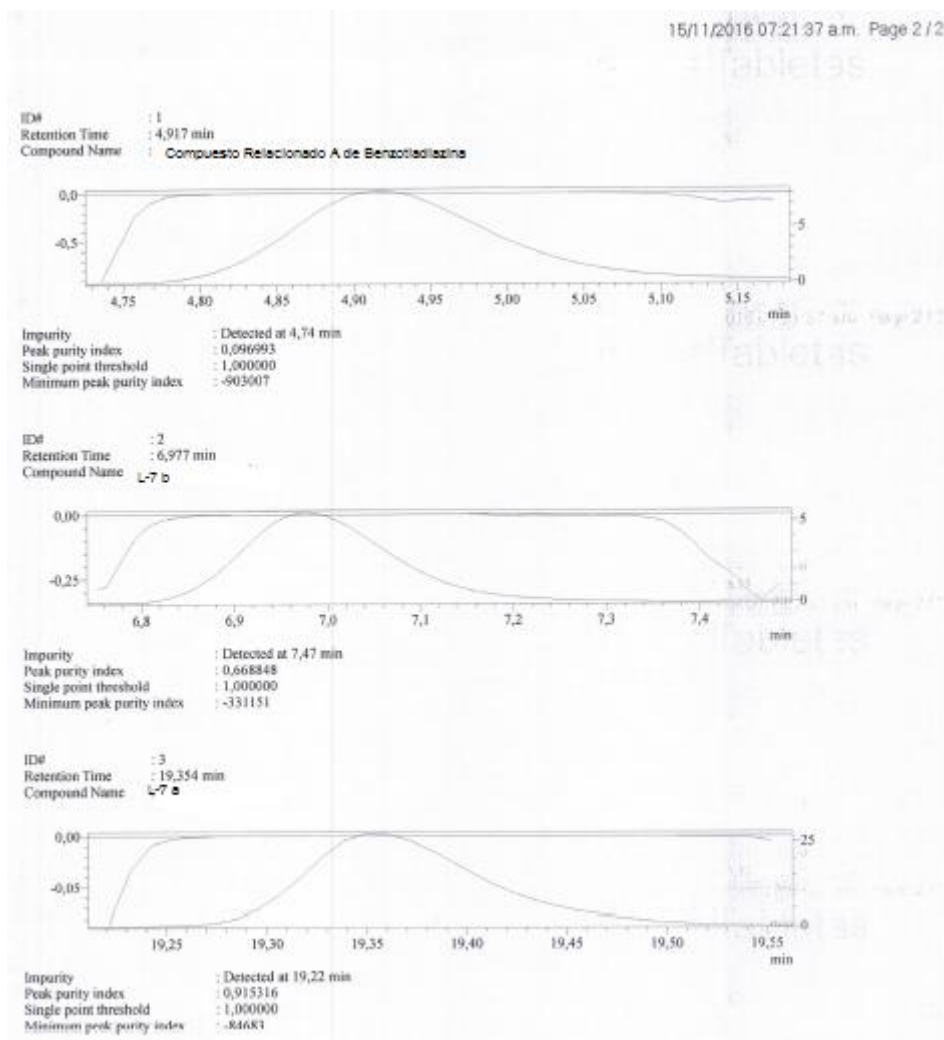
ID#2 Compound Name: **L-7 b**

Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)	S/N
Soln EstRef dil L-7 14d B-1.icd		6.8	1981	1.2	11.5
Average		6.8	1981	1.2	11.5
%RSD		0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum		6.8	1981	1.2	11.5
Minimum		6.8	1981	1.2	11.5
Standard Deviation		0.0	0	--	10.0

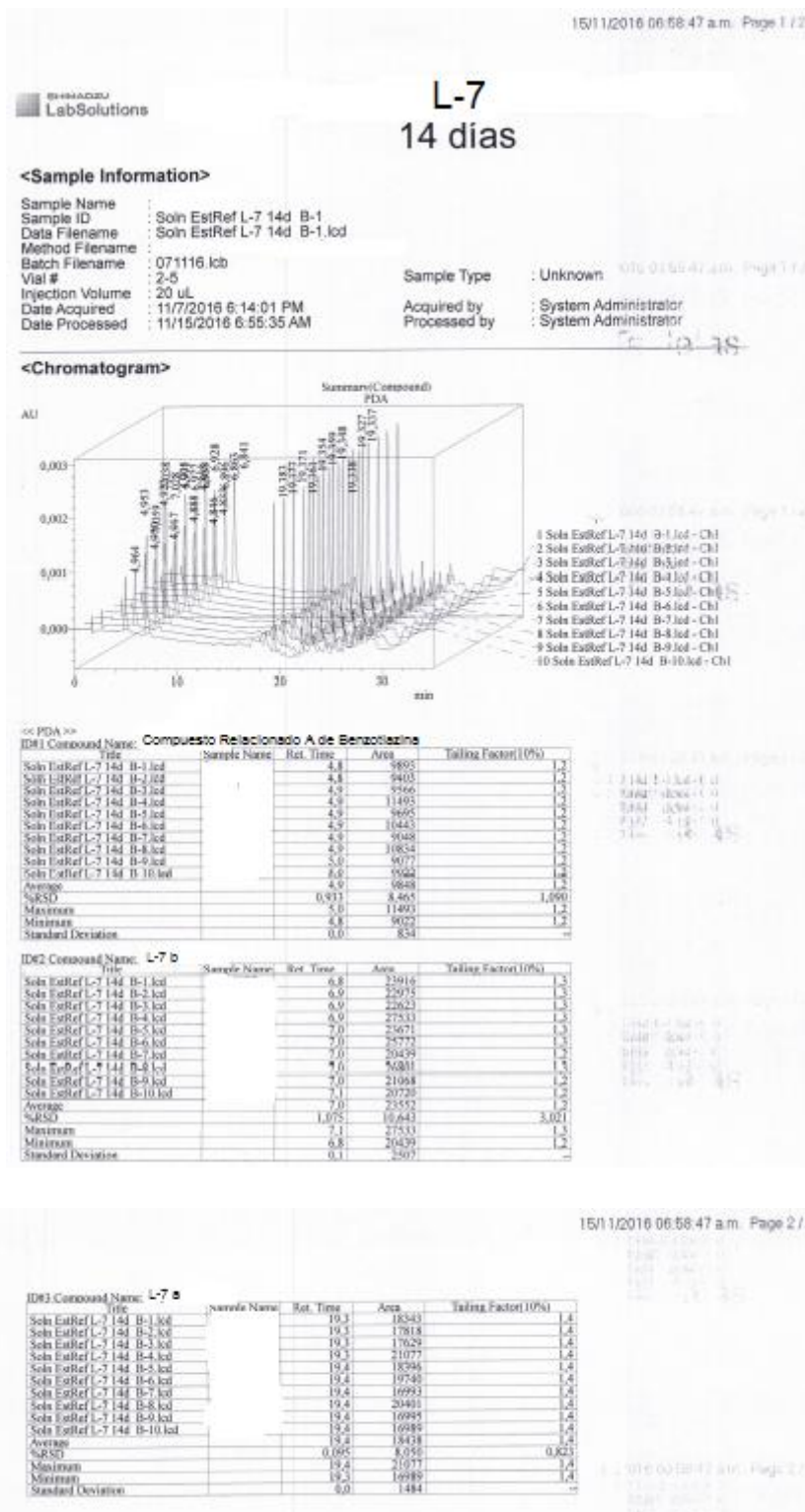
ID#3 Compound Name: **L-7 a**

Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)	S/N
Soln EstRef dil L-7 14d B-1.icd		19.3	1763	1.4	12.3
Average		19.3	1763	1.4	12.3
%RSD		0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum		19.3	1763	1.4	12.3
Minimum		19.3	1763	1.4	12.3
Standard Deviation		0.0	0	--	10.0

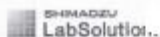
PeakPurity



**Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.**



Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.



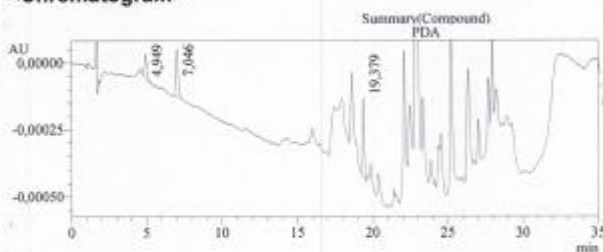
# L-7 14 días

## <Sample Information>

Sample Name :  
 Sample ID : Soln EstRef dil L-7 14d C-1  
 Data Filename : Soln EstRef dil L-7 14d C-1.lcd  
 Method Filename :  
 Batch Filename : 071116.icb  
 Vial # : 2-15  
 Injection Volume : 20 uL  
 Date Acquired : 11/8/2016 12:07:54 AM  
 Date Processed : 11/15/2016 7:23:44 AM

Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

## <Chromatogram>



<< PDA >>

ID#1 Compound Name: **Compuesto Relacionado A de Benzotiazina**

Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)	S/N
Soln EstRef dil L-7 14d C-1.lcd		4.9	804	1.2	10.7
Average		4.9	804	1.2	10.7
%RSD		0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum		4.9	804	1.2	10.7
Minimum		4.9	804	1.2	10.7
Standard Deviation		0.0	0	--	10.0

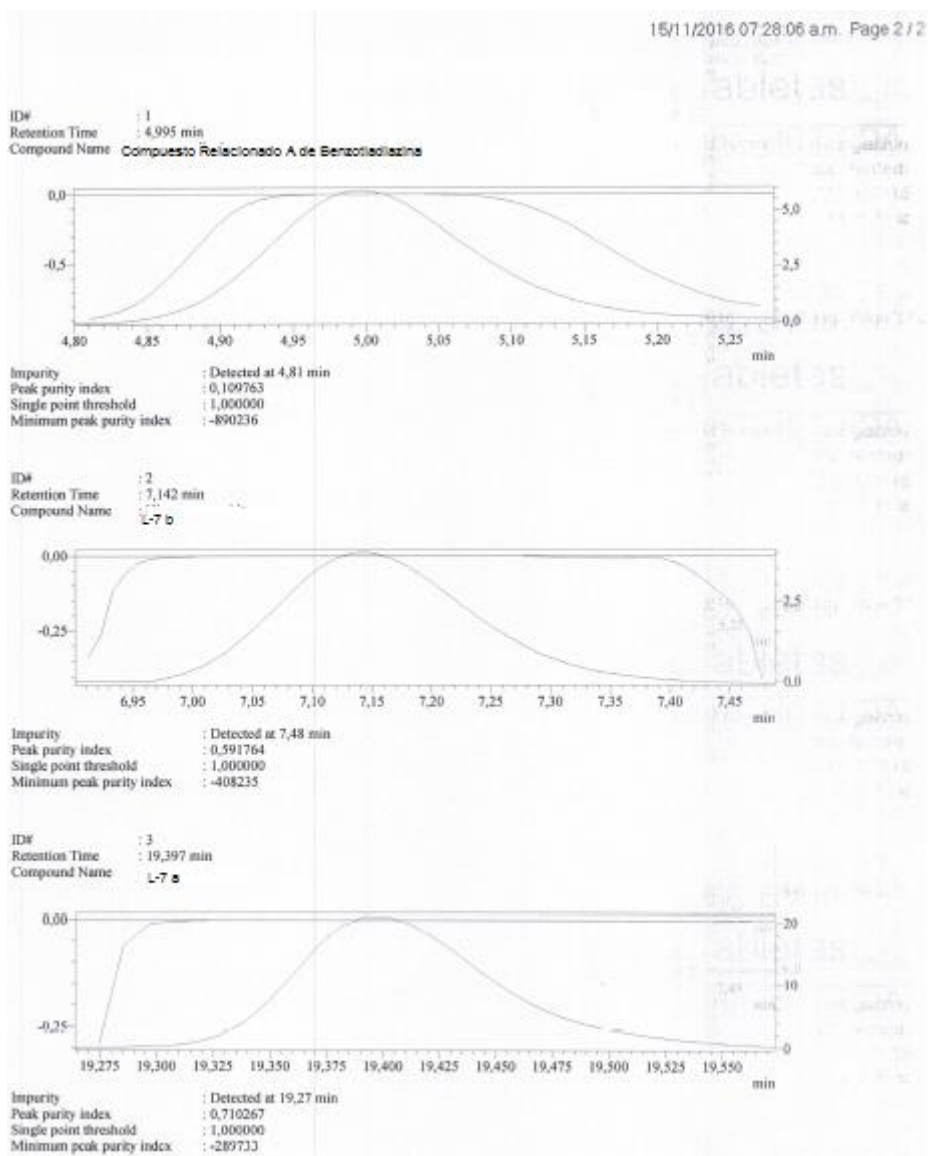
ID#2 Compound Name: **L-7 b**

Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)	S/N
Soln EstRef dil L-7 14d C-1.lcd		7.0	1992	1.2	11.4
Average		7.0	1992	1.2	11.4
%RSD		0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum		7.0	1992	1.2	11.4
Minimum		7.0	1992	1.2	11.4
Standard Deviation		0.0	0	--	10.0

ID#3 Compound Name: **L-7 b**

Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)	S/N
Soln EstRef dil L-7 14d C-1.lcd		19.4	1811	1.3	12.4
Average		19.4	1811	1.3	12.4
%RSD		0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum		19.4	1811	1.3	12.4
Minimum		19.4	1811	1.3	12.4
Standard Deviation		0.0	0	--	10.0

PeakPurity



Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.



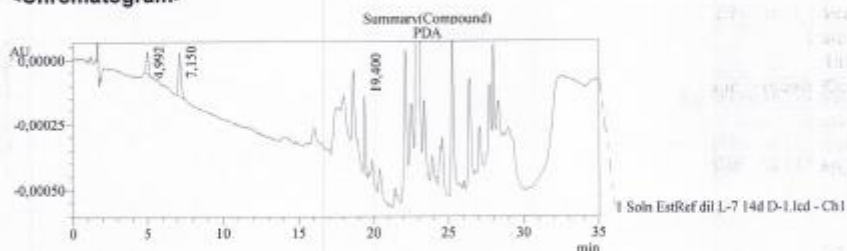


# L-7 14 días

## <Sample Information>

Sample Name : Soln EstRef dil L-7 14d D-1  
 Sample ID : Soln EstRef dil L-7 14d D-1  
 Data Filename : Soln EstRef dil L-7 14d D-1.lcd  
 Method Filename : 071116.lcb  
 Batch Filename : 2-26  
 Injection Volume : 20 uL  
 Date Acquired : 11/8/2016 6:37:04 AM  
 Date Processed : 11/15/2016 7:24:53 AM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

## <Chromatogram>



### << PDA >>

DM1 Compound Name: **Compuesto Relacionado A de Benzotiazina**

Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)	S/N
Soln EstRef dil L-7 14d D-1.lcd		5.0	802	1.1	10.7
Average		5.0	802	1.1	10.7
%RSD		0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum		5.0	802	1.1	10.7
Minimum		5.0	802	1.1	10.7
Standard Deviation		0.0	0	--	10.0

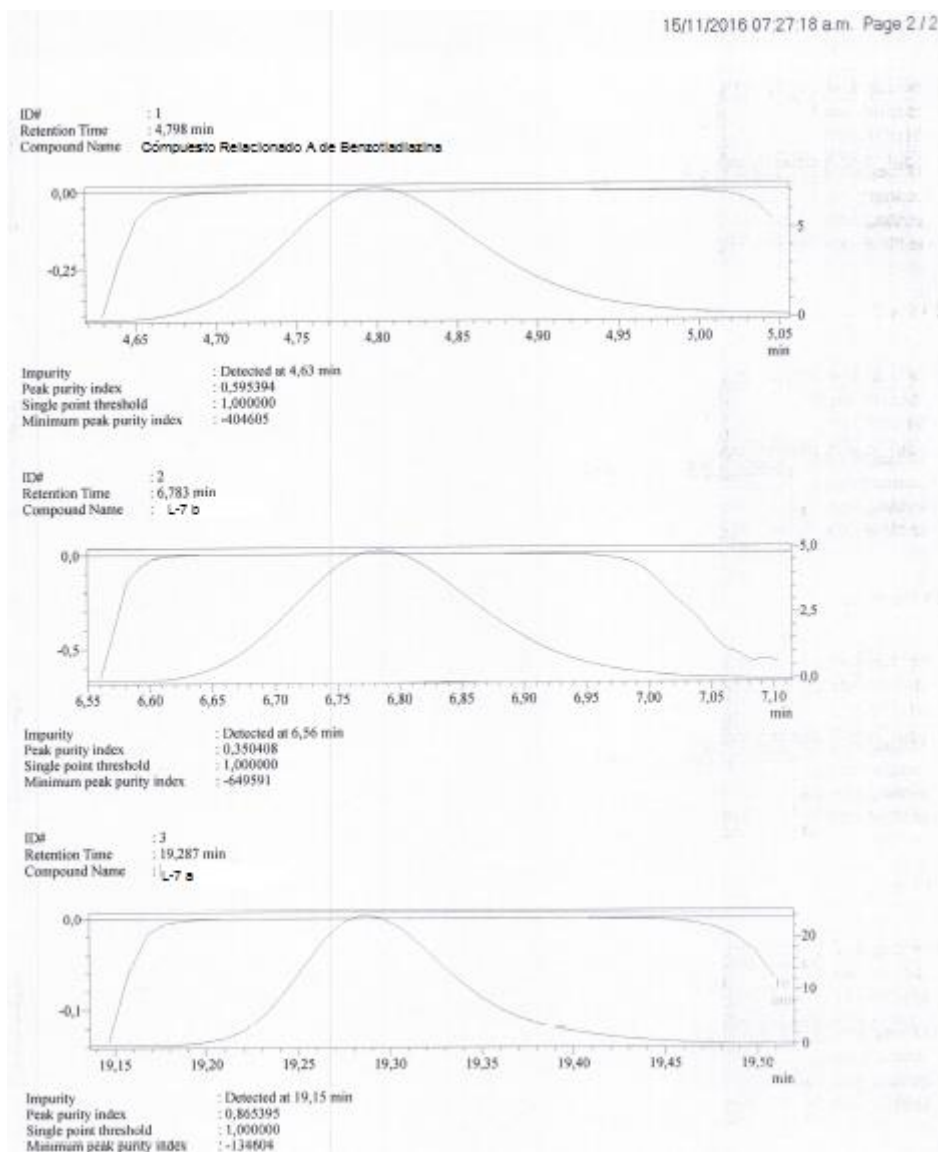
DM2 Compound Name: **L-7 b**

Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)	S/N
Soln EstRef dil L-7 14d D-1.lcd		7.1	2004	1.2	11.3
Average		7.1	2004	1.2	11.3
%RSD		0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum		7.1	2004	1.2	11.3
Minimum		7.1	2004	1.2	11.3
Standard Deviation		0.0	0	--	10.0

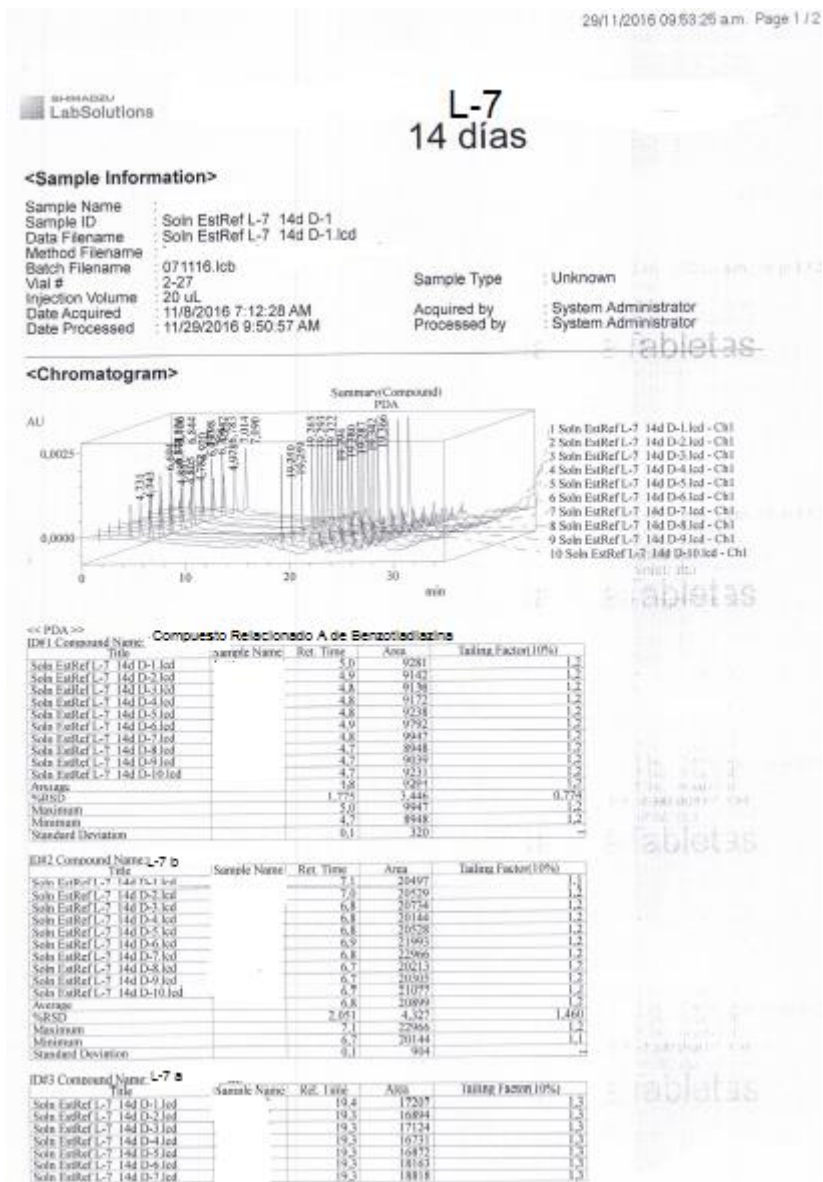
DM3 Compound Name: **L-7 a**

Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)	S/N
Soln EstRef dil L-7 14d D-1.lcd		19.4	1810	1.3	12.3
Average		19.4	1810	1.3	12.3
%RSD		0.000	0.000	0.000	0.000
Maximum		19.4	1810	1.3	12.3
Minimum		19.4	1810	1.3	12.3
Standard Deviation		0.0	0	--	10.0

Peak Purity



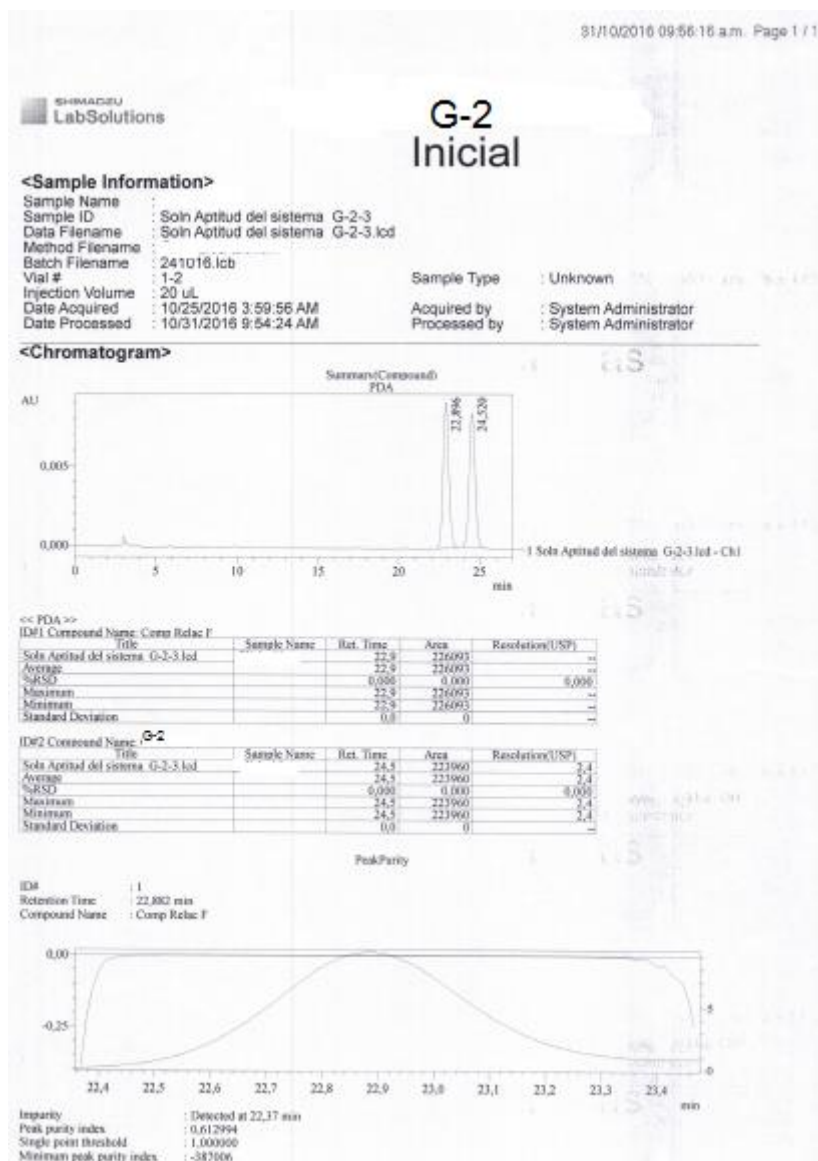
Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.



29/11/2016 09:53:25 a.m. Page 2 / 2

Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Tailing Factor(10%)
SoIn EstRef L-7 14d D-8.lcd		19.3	16579	1.3
SoIn EstRef L-7 14d D-9.lcd		19.3	16626	1.3
SoIn EstRef L-7 14d D-10.lcd		19.3	17298	1.3
Average		19.3	17232	1.3
%RSD		0.193	4.183	0.896
Maximum		19.4	18818	1.3
Minimum		19.3	16579	1.3
Standard Deviation		0.0	721	1.3

Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.



Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.

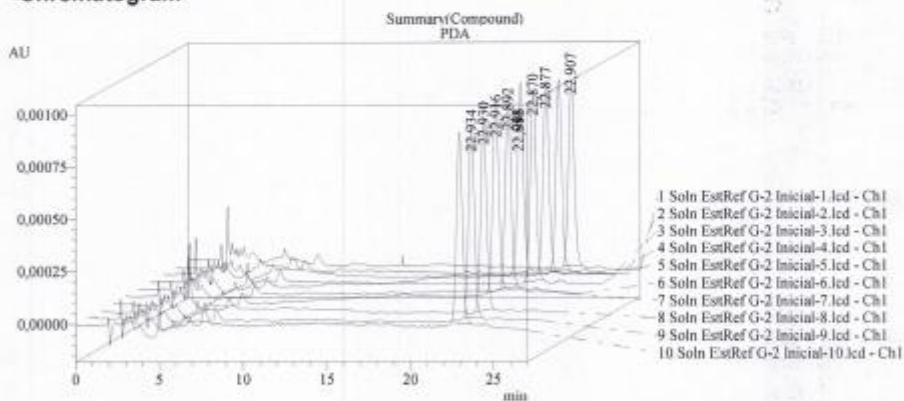


# G-2 Inicial

## <Sample Information>

Sample Name : Soln EstRef G-2 Inicial-1  
 Sample ID : Soln EstRef G-2 Inicial-1  
 Data Filename : Soln EstRef G-2 Inicial-1.lcd  
 Method Filename :  
 Batch Filename : 241016.lcd  
 Vial # : 1-3  
 Injection Volume : 20 uL  
 Date Acquired : 10/25/2016 4:27:16 AM  
 Date Processed : 10/31/2016 9:39:35 AM  
 Sample Type : Unknown  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

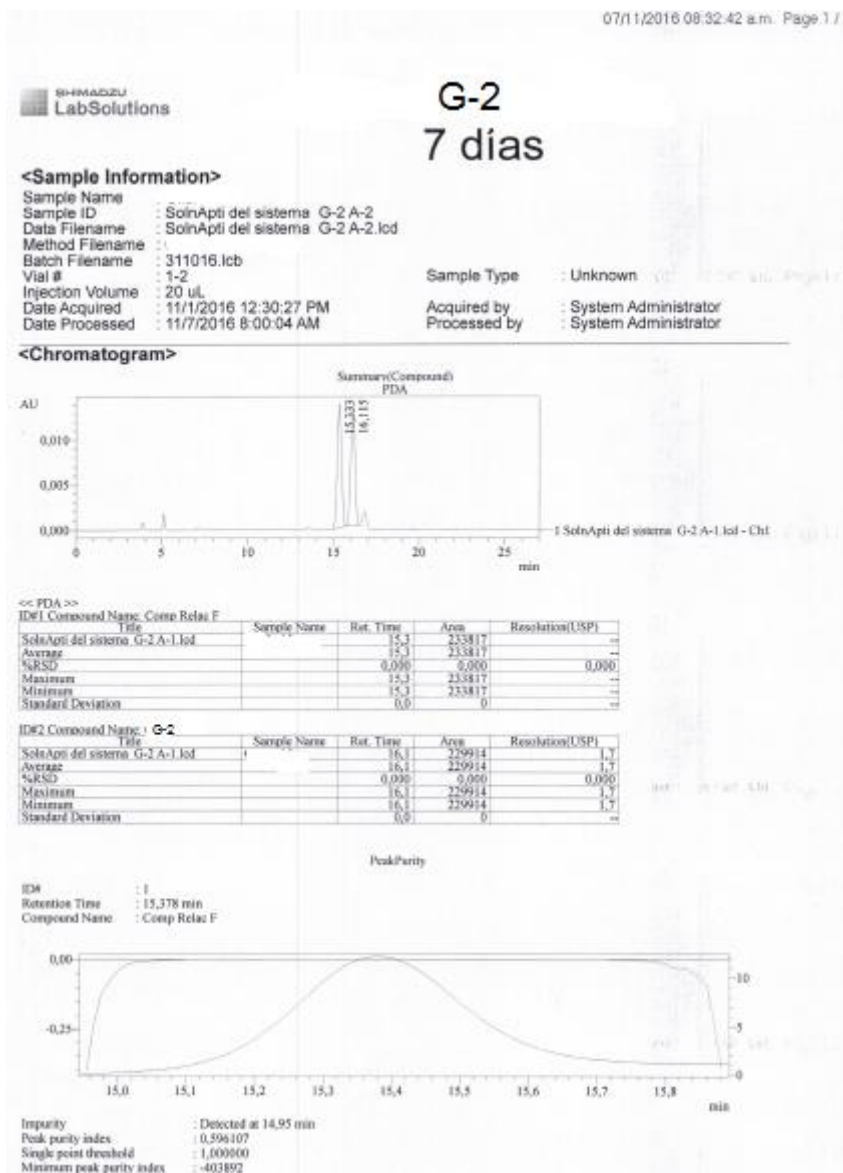
## <Chromatogram>



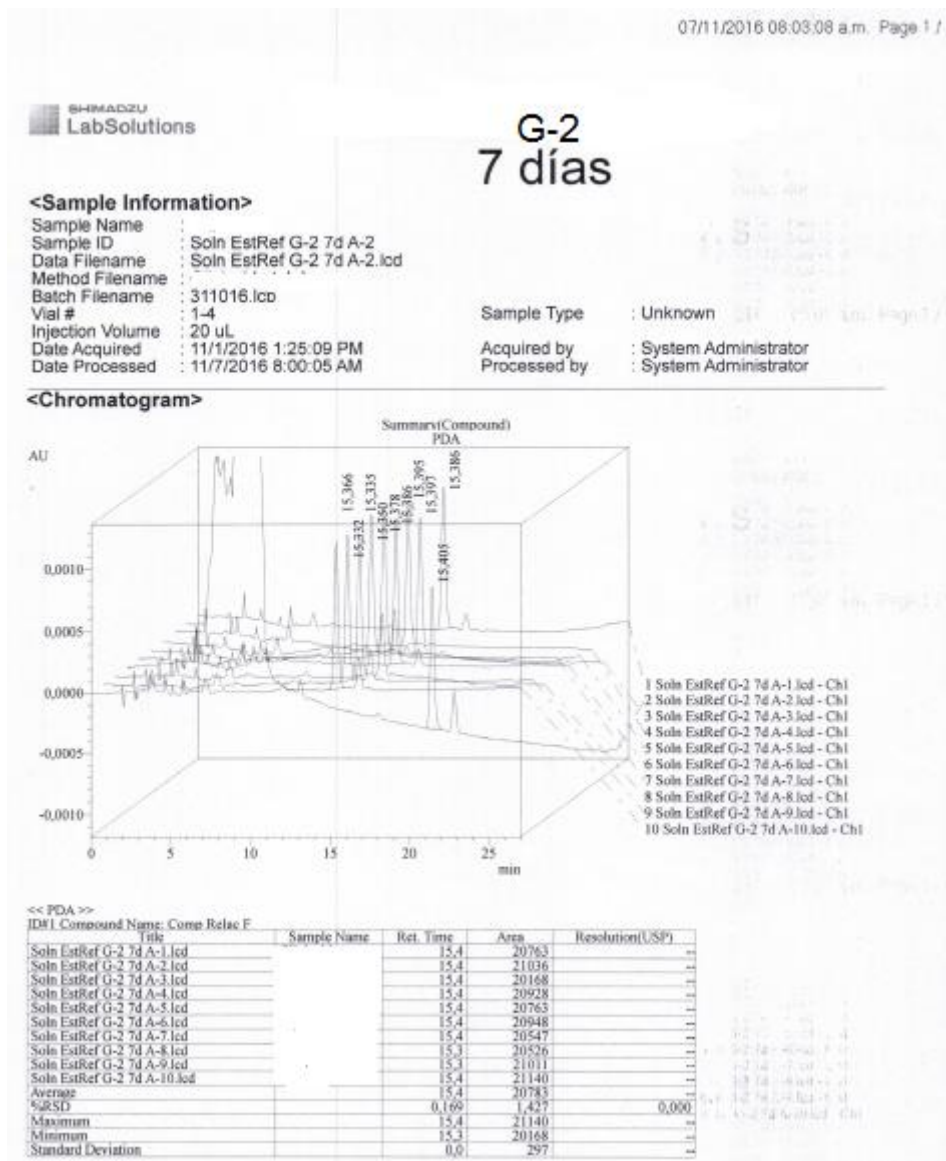
<< PDA >>

Title	Sample Name	Ret. Time	Area	Resolution(USP)
Soln EstRef G-2 Inicial-1.lcd		22.9	22132	
Soln EstRef G-2 Inicial-2.lcd		22.9	22836	
Soln EstRef G-2 Inicial-3.lcd		22.9	22756	
Soln EstRef G-2 Inicial-4.lcd		22.9	22196	
Soln EstRef G-2 Inicial-5.lcd		22.9	23461	
Soln EstRef G-2 Inicial-6.lcd		22.9	22665	
Soln EstRef G-2 Inicial-7.lcd		22.9	22414	
Soln EstRef G-2 Inicial-8.lcd		22.9	22592	
Soln EstRef G-2 Inicial-9.lcd		22.9	22388	
Soln EstRef G-2 Inicial-10.lcd		22.9	22595	
Average		22.9	22504	
%RSD		0.098	1.018	0.000
Maximum		22.9	22836	
Minimum		22.9	22132	
Standard Deviation		0.0	229	

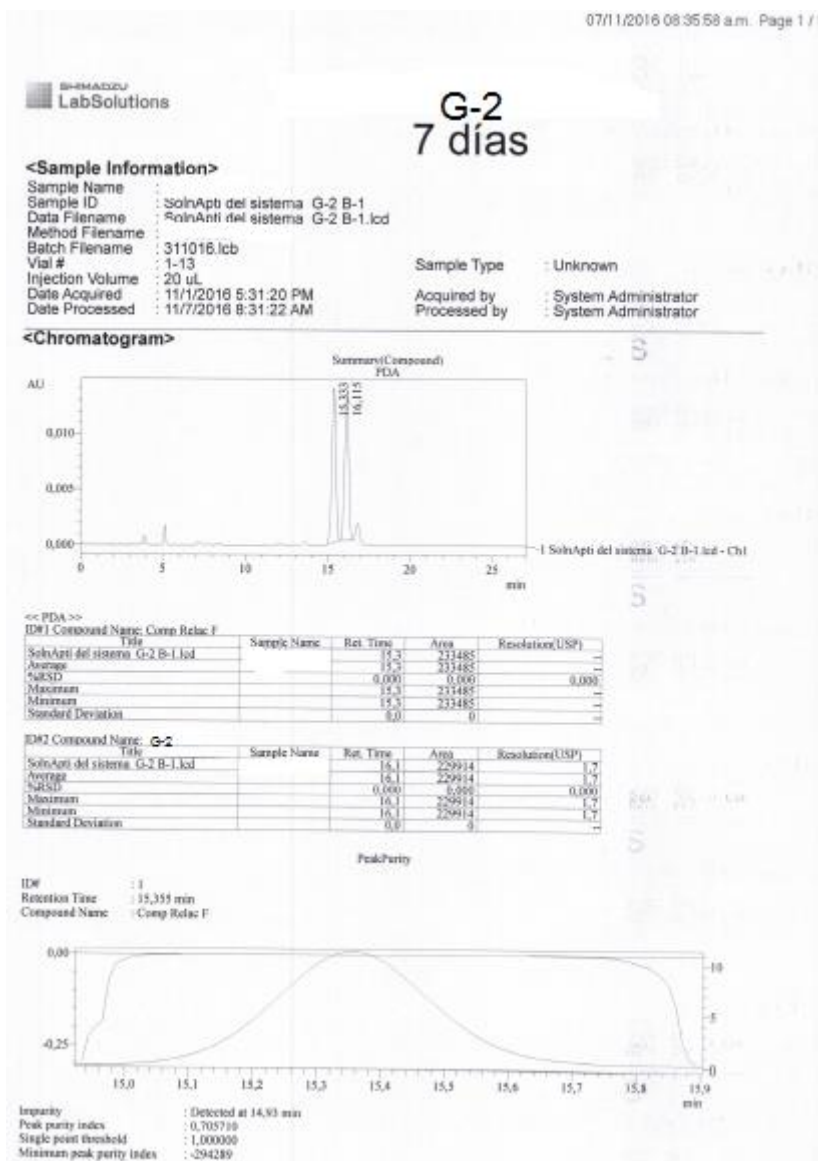
Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.



Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.



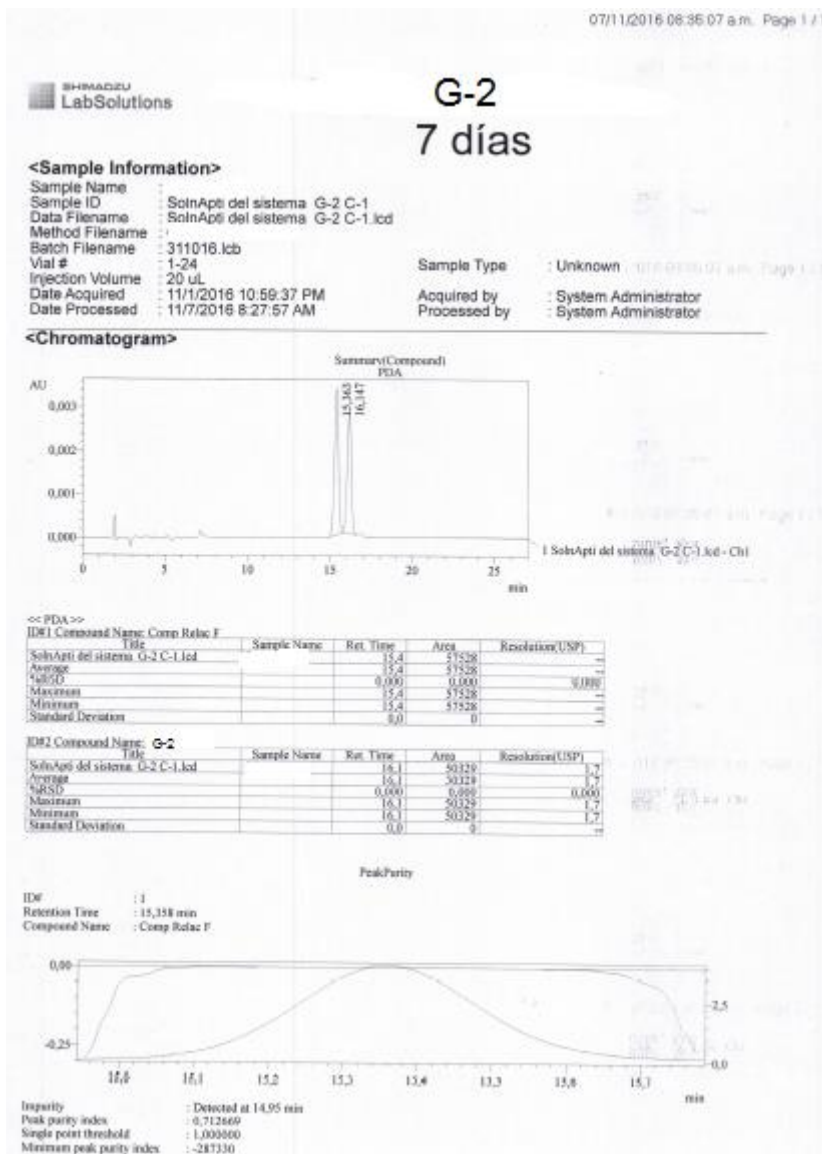
Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.



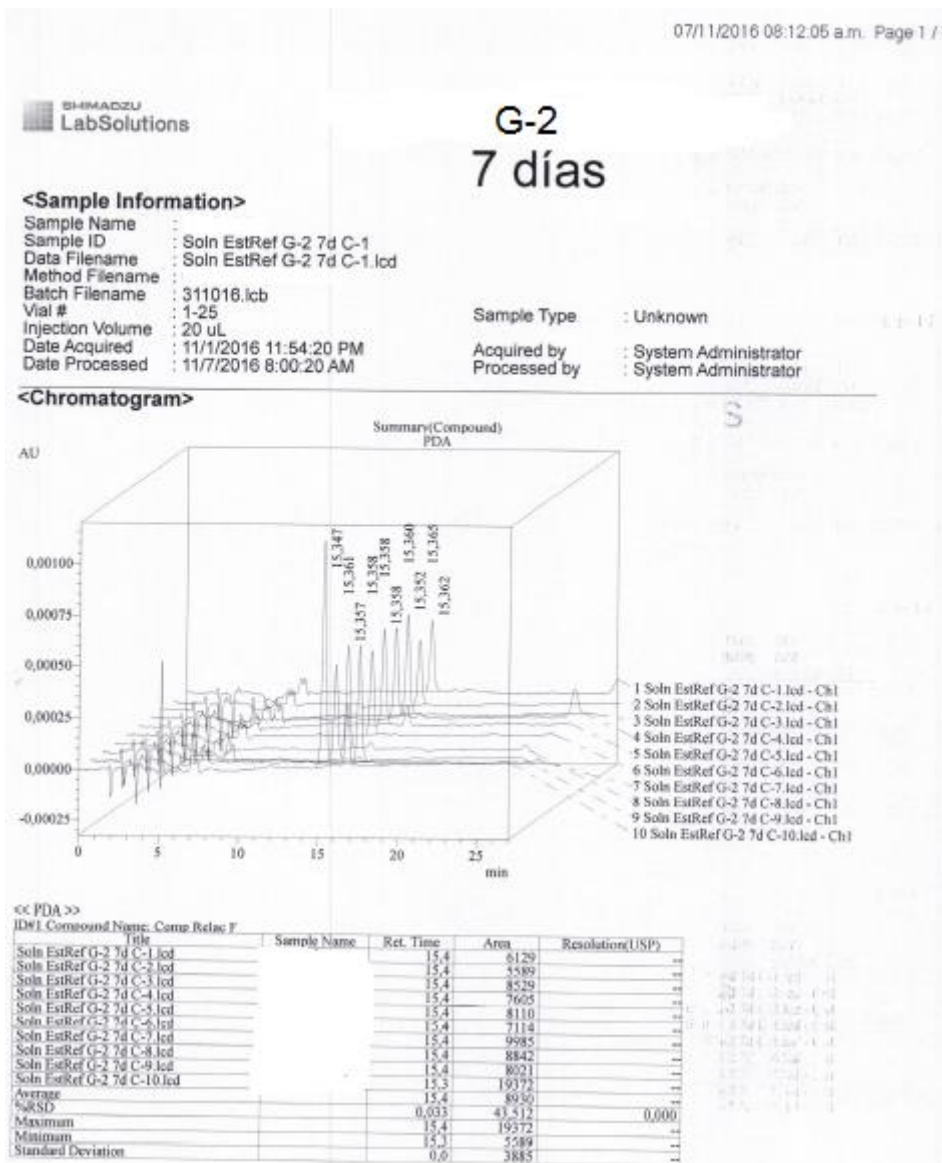
Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.



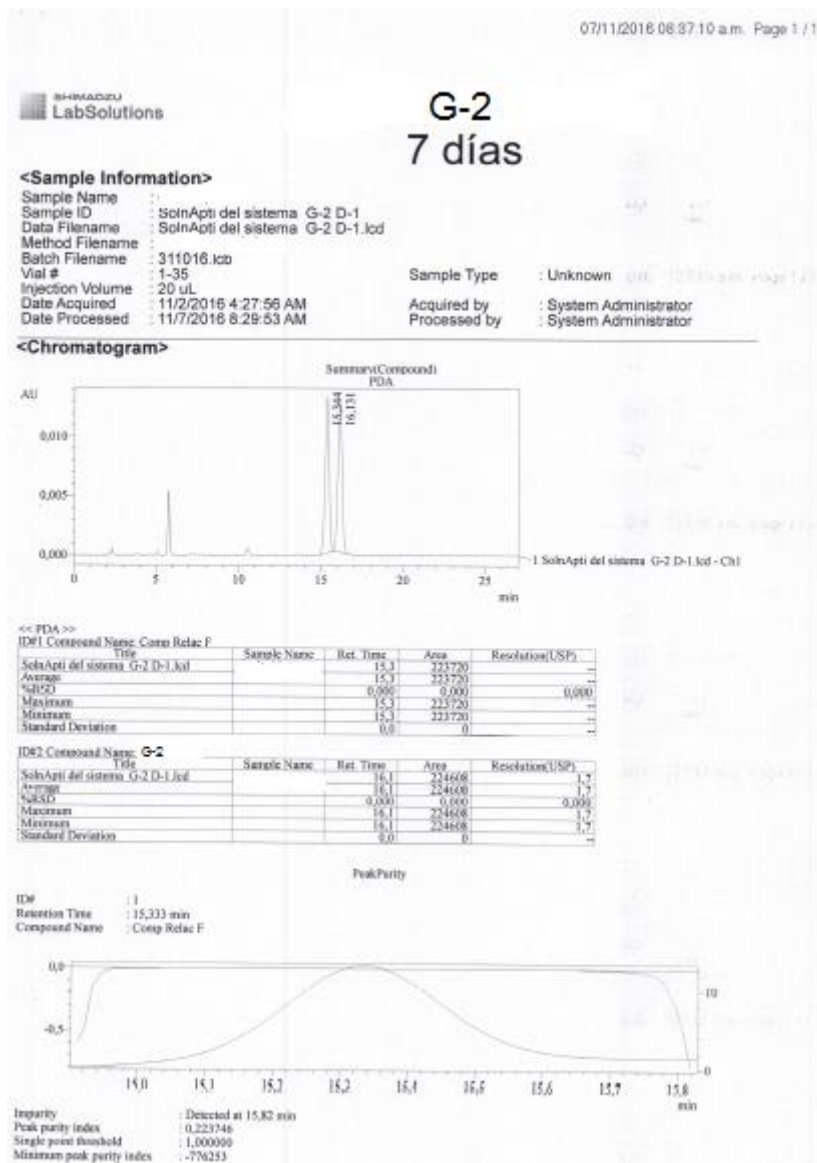
Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.



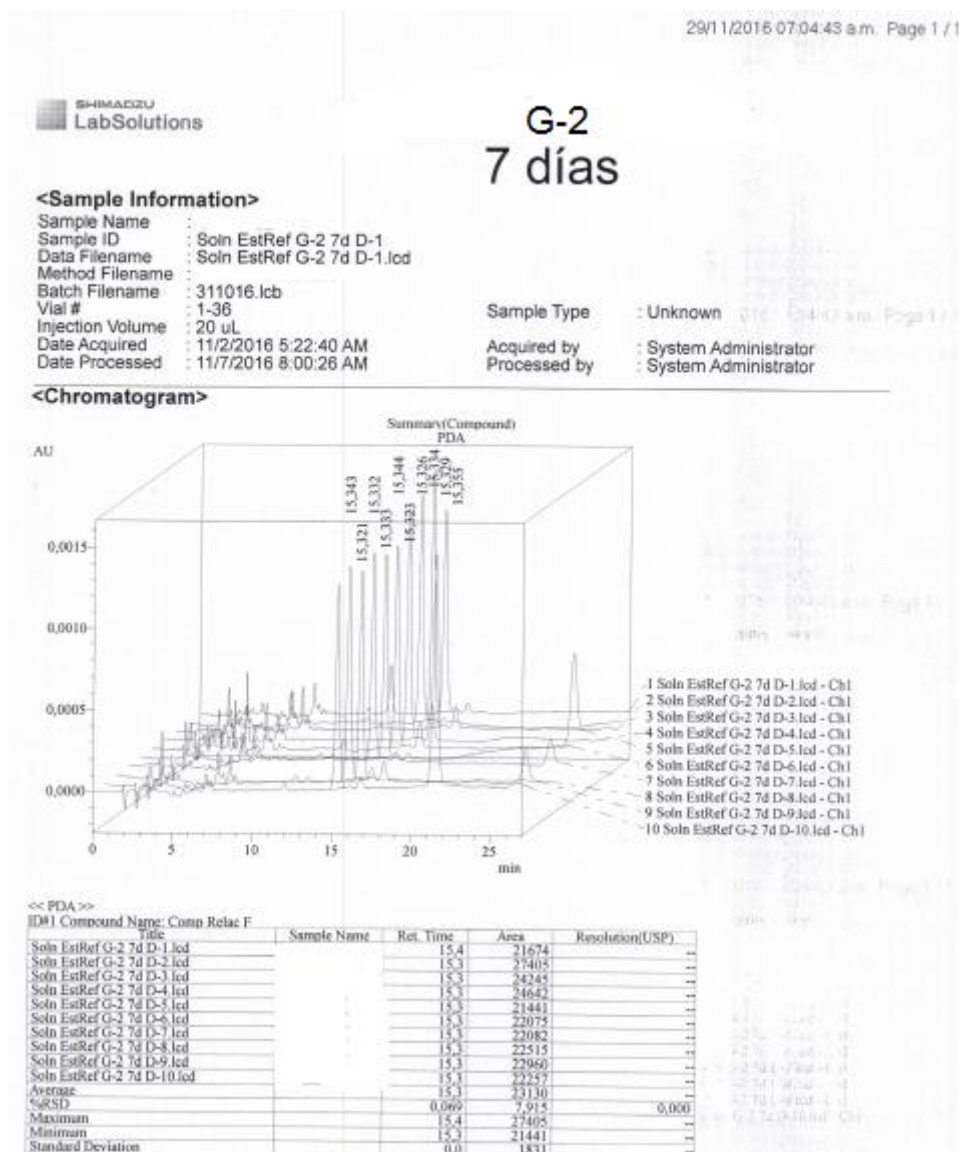
**Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.**



Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.



Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.



Fuente: Laboratorio de Control de Calidad de Calox de Costa Rica.