

Validación de método cromatográfico por HPLC de la valoración e identificación del (1-(1 β , 16 α)-21-(acetiloxi)-11-hidroxi-2'-metil-5'H-pregna-1,4-dieno[17,16-d]oxazol-3,20-diona) en Deflazacort materia prima

Validation of the HPLC chromatographic method for the evaluation and identification of (1-(1 β , 16 α)-21-(acetyloxy)-11-hydroxy-2'-methyl-5'H-pregna-1,4-dieno[17, 16-d]oxazole-3,20-diona) in Deflazacort raw material

Maya Alejandra Parga¹, Natalia Afanasjeva²

Resumen

Introducción. Deflazacort es un glucocorticoide ozaxolínico sintético derivado de la prednisolona, posee propiedades antiinflamatorias y actúa como inmunosupresor, es la materia prima utilizada como principio activo de productos comercializados en formas farmacéuticas como comprimidos y suspensiones orales. **Objetivo.** Validar la metodología analítica por cromatografía líquida de alta eficiencia, para la identificación y valoración del (1-(1 β ,16 α)-21-(acetiloxi)-11-hidroxi-2'-metil-5'H-pregna-1,4-dieno[17,16-d] oxazol-3,20-diona) en Deflazacort materia prima en condiciones del clima tropical. **Metodología.** Utilizando como fase móvil una mezcla isocrática de metanol y agua en proporción de 80:20 con flujo de 1,1mL/min, la columna empleada fue Luna® de 5 μ m C8 100Å 250 x 4,6mm, detector de matriz de diodos a una longitud de onda de 245nm. **Resultados.** Para la linealidad se obtuvo un coeficiente de correlación $R \geq 0,999$, el coeficiente de variación no superó el RSD del 2,0% en la repetibilidad del sistema y en precisión intermedia entre analistas se identificó un valor de RSD < 3,0%, en exactitud se encontró un porcentaje de recuperación de 98,9%. **Conclusiones.** El método es lineal, preciso, exacto, robusto para un flujo de 1,21mL/min y no para un flujo de 0,99mL/min ya que no cumple

1. Programa académico de química, grupo GI-CAT, Universidad del Valle, Cali-Colombia
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3897-536X>
Google Scholar: https://scholar.google.com/citations?user=_TIUpPEAAAAJ&hl=es

2. Departamento de Química, Universidad del Valle, Cali-Colombia, grupo GI-CAT
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6184-1458>
Google Scholar: <https://scholar.google.es/citations?user=KNi0mt0AAAAJ&hl=es>

Correspondencia: mayra.parga@correounivalle.edu.co

el parámetro de tiempo de retención. En las pruebas de desempeño el Deflazacort mostró una baja estabilidad cuando fue expuesto a degradación por hidrólisis básica con soluciones de hidróxido de sodio 1,0 N y 0,1 N. La muestra y el estándar en solución mostraron ser estables a temperatura ambiente por dos horas y refrigerados por tres horas.

Palabras claves: cromatografía líquida de alta presión, fármacos inmunosupresores, estadística y datos numéricos, métodos analíticos.

Abstract

Introduction. Deflazacort (DFZ) is a synthetic oxazolinic glucocorticoid derived from prednisolone, it has anti-inflammatory properties and acts as an immunosuppressant, is the raw material used as the active ingredient of products marketed in pharmaceutical forms such as tablets and oral suspensions. **Objective.** Validate the methodology analytical by high performance liquid chromatography (HPLC), for the identification and assessment of (1-(1 β ,16 α)-21-(acetyloxy)-11-hydroxy-2'-methyl-5'H-pregna-1,4 -dieno[17,16-d] oxazol-3,20-diona) in Deflazacort raw material under tropical climate conditions. **Methodology.** Using as mobile phase an isocratic mixture of methanol and water in a ratio of 80:20 with a flow of 1, 1mL/min, the column used was Luna® 5 μ m C8 100Å 250 x 4.6mm, diode array detector at a wavelength of 245nm. **Results.** For linearity, a correlation coefficient $R \geq 0.999$ was obtained, the coefficient of variation did not exceed the RSD of 2.0% in the repeatability of the system and in intermediate precision between analysts, an RSD value <3.0% was identified, in accuracy a recovery percentage of 98.9% was found. **Conclusions.** The method is linear, precise, exact, robust for a flow of 1.21mL/min and not for a flow of 0.99mL/min since it does not meet retention time. In the performance tests, Deflazacort showed low stability when exposed to degradation by basic hydrolysis with 1.0 N and 0.1 N NaOH solutions. The sample and the standard in solution showed to be stable at room temperature for two hours and refrigerated for three hours.

Keywords: high pressure liquid chromatography, immunosuppressive drugs, statistics and numerical data, analytical methods.

Introducción

Deflazacort (DFZ) es un glucocorticoide oxazolínico sintético derivado de la prednisolona (1-4), el cuál fue patentado en el año 1966 (4). Químicamente conocido (5) como 1-(1 β ,16 α)-21-(acetiloxi)-11-hidroxi-2'-metil-5'-H-pregna-1,4-dieno[17,16-d]oxazol-3,20-diona (Figura 1), posee propiedades antiinflamatorias y actúa como inmunosupresor (1-3,5), es utilizado ampliamente en pacientes con artritis reumatoide, distrofia muscular de Duchenne, asma bronquial, síndrome nefrítico, rechazo de trasplante, sarcoidosis, artritis crónica juvenil entre otras (2,5-12). Deflazacort es la materia prima utilizada como principio activo (API) de productos comercializados en formas farmacéuticas como comprimidos y suspensiones orales (8).

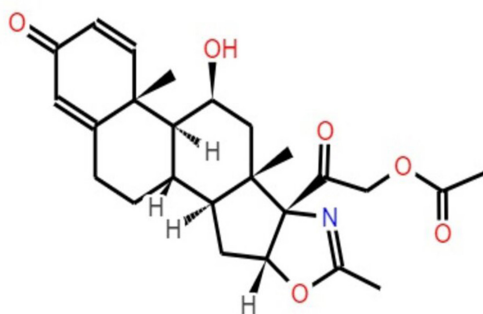


Figura 1. Estructura química del glucocorticoide oxazolínico sintético.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha determinado una serie de pautas generales que deben cumplir los diferentes

países para la correcta fabricación de medicamentos. En Colombia las recomendaciones las establece el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) (13). Dentro de las regulaciones en la industria farmacéutica se hace indispensable contar con métodos analíticos validados que permitan la identificación y cuantificación de los compuestos mayoritarios en las materias primas, los cuales están generalmente relacionados en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) o en la Farmacopea Británica (BP), siendo las anteriores las oficialmente aceptadas en Colombia (14). Las farmacopeas contienen las monografías de análisis para sustancias y preparaciones magistrales, asegurando así la calidad, seguridad, inocuidad, eficacia del producto y el cumplimiento de las buenas prácticas tanto de manufactura (BPM) como de laboratorio (BPL), teniendo como finalidad el evitar la presencia en el mercado de medicamentos nocivos, perjudiciales e ineficaces que puedan alterar las condiciones en la salud de los consumidores(15-18). En la literatura se conocen pocos métodos para determinar Deflazacort en materia prima, sin embargo, se ha logrado estimar en sus diferentes formas farmacéuticas y en muestras de suero humano usando técnicas como cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) método altamente sensible (19) y la espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-VIS) con resultados precisos, exactos y robustos (3, 7, 9, 20). Actualmente, en el laboratorio de control de calidad se

lleva un análisis de rutina para identificación y cuantificación del Deflazacort con una técnica “In-House” ya que ésta no se encuentra descrita en las farmacopeas oficiales (7), por tal motivo se hizo necesario validar dicha metodología en condiciones del clima tropical con el fin de garantizar resultados confiables siguiendo los lineamientos de la guía del “Consejo Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos de los Productos Farmacéuticos para uso humano (ICH)” (21) y el capítulo <1225> “Validación de los procedimientos de farmacopeicos” de la USP (22). La USP agrupa en cuatro categorías los métodos de análisis armonizado con la guía ICH Q2(R1) (21), (23): Categoría I: procedimientos donde se cuantifiquen principios activos y conservantes en productos farmacéuticos; categoría II: procedimientos para determinar impurezas o productos de degradación en productos farmacéuticos; categoría III: procedimientos de evaluación de pruebas de desempeño (disolución, liberación de fármacos), categoría IV: pruebas de identificación (22).

Materiales y metodos

Se utilizó como muestra la materia prima Deflazacort del fabricante Zhejiang Xianju Junye Pharmaceutical Co. Ltd., un estándar de trabajo de Deflazacort del mismo proveedor, el cual fue caracterizado y estandarizado en el laboratorio donde se llevó a

cabo la validación, con potencia de 100,0% en base húmeda (BH). Los reactivos usados para las pruebas de degradación del objeto de investigación fueron metanol grado cromatográfico y peróxido de hidrógeno 30% marca Honeywell, hidróxido de sodio de Merck, ácido clorhídrico 37% de Sharlau, y el agua se purificó usando un sistema de gradiente Millipore Milli-Q.

Para el pesaje de los compuestos se utilizó la balanza Secura 225D-1S Sartorius y en los estudios de degradación se utilizó una estufa UNB500 Memmert C507.0481, baño termostático WNB 14 Memmert L411.1372, una nevera Refrimag y un ultrasonido 8894R-DT, los parámetros se evaluaron en los cromatógrafos líquidos QSM-R Waters Acquity Arc. con una bomba CHM K16V-CH359G, detector FTN-RB17VSM085N, Vanquish Core Thermo Scientific, equipado con una bomba VC-P20-A Thermo Scientific con un detector VC-D11-A Thermo Scientific y Cromatógrafo líquido Dionex Ultimate 3000 UHPLC con una bomba LPG-3400SD acoplado a un detector de diodos (24) UV DAD-3000. Los programas utilizados para el procesamiento de cada uno de los ensayos fueron Empower 3 Software Buil 3471 (R) (25) y Chromeleon Datasystem V. 7.3 Build 60919 (R) (26), la columna utilizada fue tipo Luna® de 5µm C8 100Å 250 x 4,6mm a una temperatura de 40°C ± 5°C, volumen de inyección 20 µL, longitud de onda de detección 245nm, utilizando como fase móvil una mezcla isocrá-

tica de metanol-agua en proporción 80:20 respectivamente y un flujo de 1,1mL/min.

Preparación de las soluciones de trabajo para la metodología de validación

a) Fase móvil: se realizó una mezcla isocrática en el equipo de HPLC de metanol y agua en proporción 80:20.

b) Solución diluyente: se realizó una mezcla de metanol y agua en proporción 50:50.

c) Solución blanco: se usó como blanco la solución diluyente, de la cual una porción fue filtrada por membrana Durapore 0,45 μ m de fluoruro de polivinilideno (PVDF) hidrofílica para garantizar la ausencia de material particulado y posteriormente fue transferida a un vial ámbar para HPLC.

d) Soluciones estándar 1 y 2 (Std 1 y Std 2): en un balón volumétrico de 100,00 \pm 0,10 mL se pesó con exactitud 30,0 \pm 0,1 mg de Deflazacort estándar de trabajo, a continuación, se adicionó 50,00 \pm 0,50 mL de metanol grado HPLC y se llevó al ultrasonido durante 5 minutos. El estándar posteriormente se dejó en reposo a temperatura ambiente y se completó a volumen con el mismo solvente. De la solución anterior se tomó una alícuota de 5,000 \pm 0,015 mL, la cual se transfirió a un balón volumétrico de 25,00 \pm 0,04 mL, completando a volumen con diluyente y mezclando para homogenizar. Finalmen-

te, se realizó una filtración por membrana Durapore PVDF de 0,45 μ m (concentración teórica final = 0,06 mg/mL).

e) Solución muestra: Esta preparación se llevó a cabo con el mismo procedimiento descrito de los Std 1 y Std 2, pero utilizando el compuesto Deflazacort materia prima.

Validación del método cromatográfico.

Con el fin de evaluar la confiabilidad, la veracidad y coherencia del método de análisis, se realizó la validación, proceso mediante el cual con estudios de laboratorio se evalúa que las características asociadas al rendimiento del procedimiento cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas (22). De acuerdo con lo anterior se definió como Categoría I la técnica de análisis de cuantificación de Deflazacort en materia prima y se determinó el esquema de validación evaluando parámetros de idoneidad o adecuabilidad del sistema, especificidad, linealidad del sistema, exactitud, precisión relacionada a la repetibilidad del sistema, precisión relacionada con la repetibilidad del método, precisión intermedia y robustez.

Con el fin de prolongar la vida útil del inyector y de la columna, reducir el desgaste y preservar la integridad de los sistemas cromatográficos en las industrias farmacéuticas se debe tener en cuenta una correcta preparación de la muestra (27) y la filtración de las mismas con el fin de garantizar que estas se encuentren libre de material particulado

(28). Específicamente los filtros utilizados no deben generar señales que puedan interferir con la identificación y cuantificación del analito de interés y no deben absorber en dichas superficies, por tal motivo, en este trabajo se realizó la prueba de filtros. También siguiendo los lineamientos del capítulo de la USP (29) se verificó que el sistema cromatográfico es adecuado para el análisis previsto con la prueba de idoneidad del sistema.

Prueba de filtros.

De la solución del blanco se filtró una cantidad aproximada de 1,5 mL por membrana HV (Durapore) PVDF de 0,45 μm y otra cantidad de muestra igual se dejó sin filtrar, ambas soluciones se transfirieron a viales diferentes. Se preparó una solución estándar de Deflazacort a 0,06mg/L de acuerdo con el procedimiento descrito antes y se llevó una alícuota de 1,5 mL sin filtrar a un vial, de la solución restante se tomaron seis muestras de la misma cantidad, cada una se filtró por membrana HV (Durapore) PVDF de forma individual. En tres de estas muestras se descartaron los primeros 0,5 mL y en los otros tres 1,0 mL. Se inyectó seis veces el estándar sin filtrar y una vez el resto de soluciones al equipo HPLC.

Idoneidad o adecuabilidad del sistema.

Se prepararon los estándares (Std 1 y Std 2), y el equipo HPLC se programó con la siguiente secuencia de inyecciones: blanco

(1 vez), estándar uno, Std 1 (6 veces) y estándar dos, Std 2 (4 veces).

Estabilidad de las soluciones.

Se determinó la estabilidad de soluciones a cero horas para estándares 1 y 2 preparadas y para tres muestras de solución siguiendo los lineamientos descritos previamente en d) y e).

Para la estabilidad a una, dos, tres y cuatro horas, se preparó solución Std 1 y Std 2. Las muestras y el estándar Std 2 (de la estabilidad a cero horas) se inyectaron al equipo al cabo de una, dos, tres y cuatro horas, las cuales se habían almacenado a condiciones de temperatura ambiente (25°C) y refrigeradas (2-8)°C. Se siguió un flujo de inyección descrito en el parámetro de adecuabilidad para los estándares Std 1 y Std 2, para las muestras una inyección.

Parámetros evaluados de desempeño del método.

Especificidad (E) y selectividad (S)

La especificidad y selectividad del método analítico se refieren a la capacidad de estimar correctamente el analito en presencia de impurezas, productos de degradación y componentes en la matriz (22). Este parámetro fue evaluado mediante estudios de degradación forzada (22, 30-32) siendo también indicadores de estabilidad (23). Las soluciones para muestra control, hidró-

lisis ácida, hidrólisis básica y oxidación se prepararon pesando en un balón volumétrico de $100,00 \pm 0,10$ mL $30,0 \pm 0,1$ mg de Deflazacort muestra, a continuación, se les adicionó $50,00$ mL $\pm 0,50$ mL de metanol grado HPLC y se llevaron al ultrasonido durante 5 minutos, y posterior a esto, se realizaron los diferentes tratamientos:

- Muestra control: no se realizó ninguna degradación.
- Hidrólisis ácida: se adicionó $1,000 \pm 0,007$ mL de HCl 1,0 N y se sometió a calentamiento a 80°C por 30 min. A continuación, se neutralizó con $1,000 \pm 0,007$ mL NaOH 1,0N.
- Hidrólisis básica: se adicionó $1,000 \pm 0,007$ mL de NaOH 1,0N y se sometió a calentamiento a 80°C por 30 min. A continuación, se neutralizó con $1,000 \pm 0,007$ mL HCl 1,0N.
- Oxidación: se adicionó $1,000 \pm 0,007$ mL de H_2O_2 0,3% y se sometió a calentamiento a 80°C por 30 min.
- Termólisis: en un frasco transparente se pesó aproximadamente $30,0 \pm 0,1$ mg de Deflazacort muestra y se sometió a 100°C durante 24 horas, luego de este tiempo, se adicionó $50,00$ mL $\pm 0,50$ mL de metanol grado HPLC y se llevó al ultrasonido durante 5 minutos.

- Fotólisis: en un balón volumétrico de $100,00 \pm 0,10$ mL se pesó $30,0 \pm 0,1$ mg de Deflazacort muestra y se expuso a la luz UV durante 24 horas, luego de este tiempo, se adicionó $50,00$ mL $\pm 0,50$ mL de metanol grado HPLC y se llevó al ultrasonido durante 5 minutos.

- Muestra blanco: en un balón volumétrico de $50,00 \pm 0,50$ mL se agregó $25,00 \pm 0,10$ mL de diluyente, luego se adicionó $1,000 \pm 0,007$ mL de HCl 1,0N, $1,000 \pm 0,007$ mL y $1,000 \pm 0,007$ mL de H_2O_2 0,3%, se completó a volumen con diluyente y se transfirió una porción filtrada por membrana HV (Durapore) PVDF de $0,45 \mu\text{m}$ a un vial para HPLC.

Después del tiempo de exposición cada una de las muestras se completó a volumen con metanol grado HPLC, se continuó con el procedimiento descrito para la preparación de soluciones y en el equipo se programó una inyección por cada una de las muestras con un tiempo de corrida de 60 min en el cromatógrafo.

Linealidad del sistema (L)

Linealidad del sistema se relaciona con la capacidad para obtener resultados directamente proporcionales en un intervalo definido a la concentración del analito. El objetivo de determinar este parámetro se

relaciona que se pueda describir de manera lineal la relación de concentración en función de la respuesta (22). Para evaluar el parámetro de linealidad se estableció como rango de concentración de 0,054mg/mL a 0,066mg/mL de estándar de Deflazacort, cada una de las soluciones estándar se preparó por triplicado. Posterior a esto, se siguió una secuencia de inyecciones para blanco (1 vez), Std 1 (6 veces), Std 2 (2 veces) y muestras de compuesto (1 vez).

Exactitud (Ex)

Es la proximidad entre los resultados obtenidos y el valor verdadero (22). La exactitud se analizó partir de la linealidad del sistema con tres puntos 90%, 100% y 110% de la concentración nominal del método para la valoración de Deflazacort.

Precisión (P)

(P) representa el grado de concordancia de los resultados obtenidos (22). Se determinó con el parámetro de la repetibilidad del sistema a partir de seis inyecciones de la solución estándar analítica de trabajo 0,06mg/mL, por otra parte, para la determinación de la repetibilidad del método y la precisión intermedia se utilizaron equipos diferentes con concentración analítica de trabajo para Deflazacort 0,06mg/mL y dos analistas ejecutaron el proceso de preparación de dos series en diferentes días. El equipo se programó con el siguiente flujo de inyecciones: muestra blanco (1 vez), estándar 1

(6 veces), estándar 2 (4 veces) y muestra del compuesto (1 vez).

Robustez (R)

Es la medida de la capacidad de un método de no ser afectado por variaciones pequeñas como cambios de analista, equipos, entre otras (22). Se determinó con una variación del $\pm 10\%$ del flujo nominal (0,99-1,21) mL/min, en dos días y dos equipos diferentes.

Resultados

Tabla 1. Resultados obtenidos para prueba de eficiencia de filtros.

Muestra	M1 ⁽¹⁾	M2 ⁽¹⁾	M3 ⁽¹⁾	RSD, %	M1 ⁽²⁾	M2 ⁽²⁾	M3 ⁽²⁾	RSD, %
Resultado, %	99,2	98,3	99,0	0,5	98,6	99,2	99,2	0,3

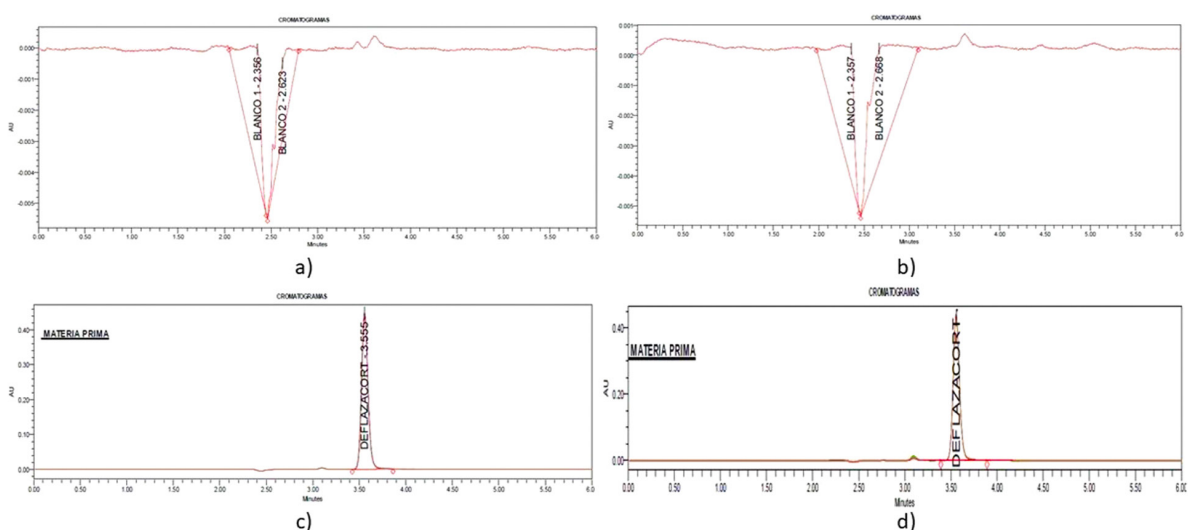


Figura 2. Cromatogramas de prueba de filtros para: a) blanco filtrado, b) blanco sin filtrar, c) estándar Deflazacort sin filtrar, d) estándar Deflazacort filtrado.

Tabla 2. Resultados para pruebas de adecuabilidad del sistema.

Muestra	Tiempo de retención, Tr, min	Área del pico	Platos teóricos, N	Asimetría	Factor de retención, k
Std 1	3,56	2177156	12985	1,1	2,6
Std 1	3,56	2183210	12954	1,1	2,6
Std 1	3,56	2176569	12949	1,1	2,6
Std 1	3,56	2163511	12872	1,1	2,6
Std 1	3,56	2168779	12988	1,1	2,6
Std 1	3,56	2176612	12864	1,1	2,6
Std 2	3,56	2184132	12834	1,1	2,6
Std 2	3,56	2170239	12828	1,1	2,6
Std 2	3,56	2166845	12845	1,1	2,6
Std 2	3,56	2176073	12747	1,1	2,6

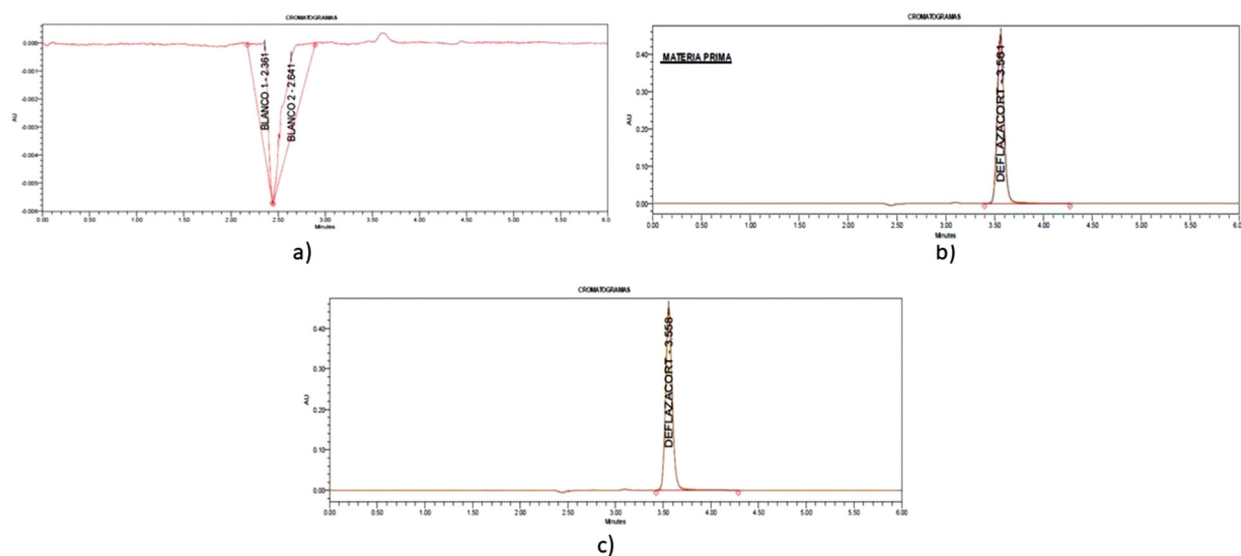


Figura 3. Cromatogramas de determinación de adecuabilidad para: a) blanco, b) estándar uno, c) estándar dos.

Tabla 3. Resultados de adecuabilidad para pruebas de estabilidad de soluciones de estándar Std1 a diferentes tiempos (h: horas).

Prueba de estabilidad de Std 1 a diferentes tiempos	Tiempo de retención, Tr, min	Platos teóricos, N	Asimetría	Factor de retención, k	RSD, %
a 0 h	3,5	11978	1,0	2,5	0,3
a 1 h	3,6	13343	1,0	2,6	0,6
a 2 h	3,6	13818	1,0	2,6	0,7
a 3 h	3,6	13765	1,0	2,6	0,4
a 4 h	3,6	13772	1,0	2,6	0,5

Tabla 4. Resultados de porcentaje de correlación y porcentaje de recobro de estabilidad de soluciones.

Prueba	Correlación, r, %	Recobro, %	Prueba	Contenido, %	Recobro, %	RSD, %
Std 2 amb (1 h)	99,4	100,6	M1 amb (1 h)	99,0	99,6	0,4
Std 2 ref (1 h)	99,0	100,2	M1 ref (1 h)	99,0	99,6	0,6
Std 2 amb (2 h)	100,6	101,8	M1 amb (2 h)	98,8	99,4	0,5
Std 2 ref (2 h)	98,5	99,7	M1 ref (2 h)	98,6	99,4	0,5
Std 2 amb (3 h)	96,1	97,3	M1 amb (3 h)	97,0	97,6	0,5
Std 2 ref (3 h)	98,3	99,5	M1 ref (3 h)	98,2	98,8	0,1
Std 2 amb (4 h)	94,5	95,6	M1 amb (4 h)	91,5	92,1	1,2
Std 2 ref (4 h)	95,3	96,5	M1 ref (4 h)	95,0	95,6	0,8

amb: temperatura ambiente, ref: refrigerado, h: horas

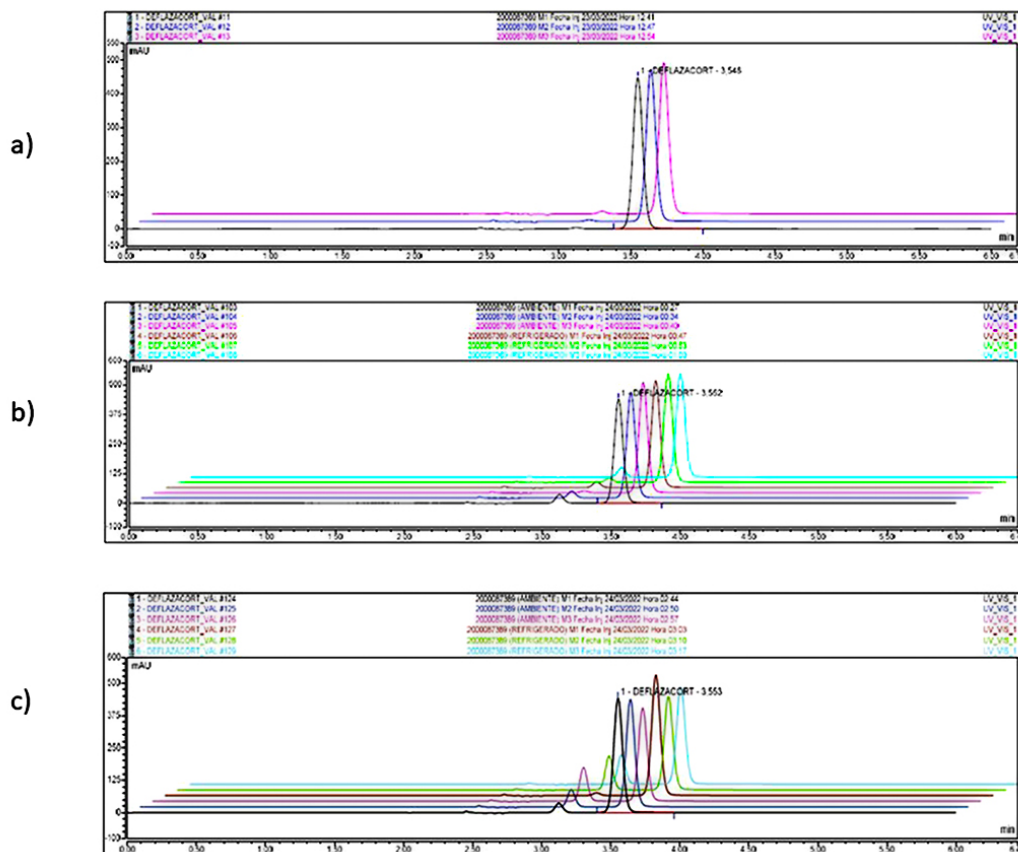


Figura 4. Cromatogramas de pruebas de estabilidad: a) muestras a cero horas (0h), b) muestras a tres horas (3h), c) muestras a cuatro horas (4h).

Tabla 5. Resultados para pruebas de especificidad y selectividad.

Tratamiento	Degradación, %	Resolución, %	Ángulo de pureza	Ángulo de umbral
Prueba de control	N/A	3,8	0,041	0,243
HCl 1,0 N, 50 °C, 30 min	41,7	3,8	0,056	0,235
HCl 0,1 N, 50 °C, 30 min	18,2	3,9	0,044	0,241
NaOH 1,0 N, 50 °C, 30 min	99,1	2,4	1,599	1,289
NaOH 0,1 N, 50 °C, 30 min	99,8	3,2	10,073	6,513
H ₂ O ₂ 0,3 %, 50 °C, 30 min	0,3	3,7	0,044	0,246
Termólisis, 24 Horas	1,6	3,7	0,044	0,241
Fotólisis UV, 24 Horas	0,0	3,7	0,043	0,253

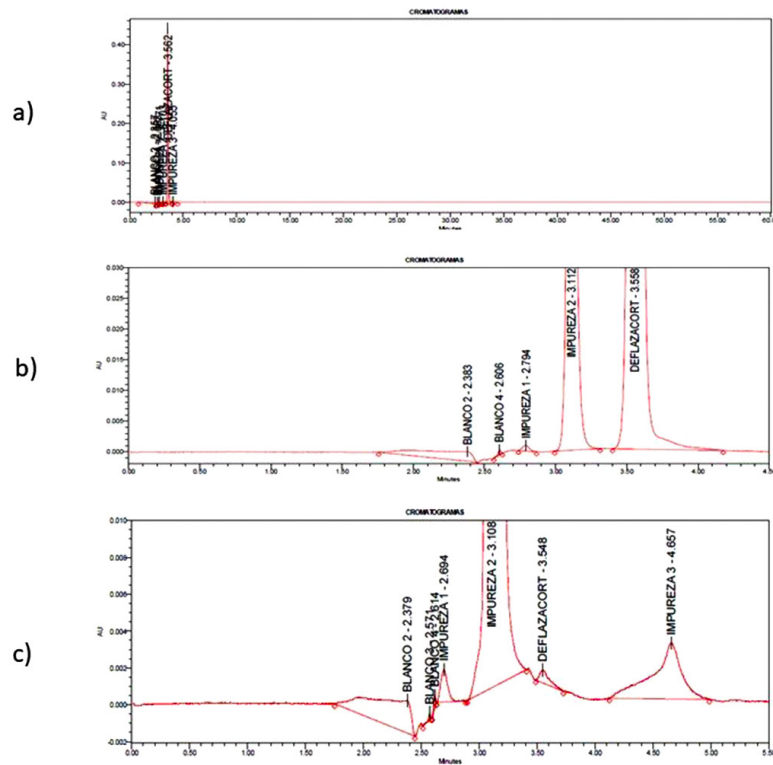


Figura 5. Cromatogramas de pruebas después de estrés: a) control, b) con HCl 0,1N, c) con NaOH 0,1N.

Tabla 6. Resultados estadísticos de la prueba de linealidad.

Ecuación recta de regresión	$y=(3,420 \times 10^7)x+(8,187 \times 10^4)$
Pendiente	$3,420 \times 10^7$
Desviación estándar de la pendiente	$4,057 \times 10^5$
Límite superior 95% de la pendiente	$3,508 \times 10^7$
Límite inferior 95% de la pendiente	$3,362 \times 10^7$
Valor del test de student de la pendiente	84,312
Intercepto	$8,187 \times 10^4$
Desviación estándar del intercepto	$2,450 \times 10^4$
Límite superior 95% del intercepto	$1,350 \times 10^5$
Límite inferior 95% del intercepto	$2,873 \times 10^4$
Valor del test de student intercepto	3,300
Suma residual de cuadrados	$5,170 \times 10^8$
Desviación estándar residual	$6,306 \times 10^3$
Error estándar relativo	0,3%
Coefficiente de correlación	0,999

$$t_{tab}(13, 0,025): 2,160$$

Tabla 7. Resultados de ausencia de error sistemático.

Nivel de concentración, %	Error sistemático, %			Dispersión aleatoria, %		
	M1	M2	M3	M1	M2	M3
90	M1=99,1	M2=99,3	M3=99,3	-0,3	-0,1	-0,2
100	M1=99,1	M2=99,2	M3=99,4	0,0	0,2	0,4
110	M1=98,5	M2=98,6	M3=98,2	-0,3	-0,1	-0,6
95	-	-	-	0,0	-0,1	0,0
105	-	-	-	0,3	0,4	0,3

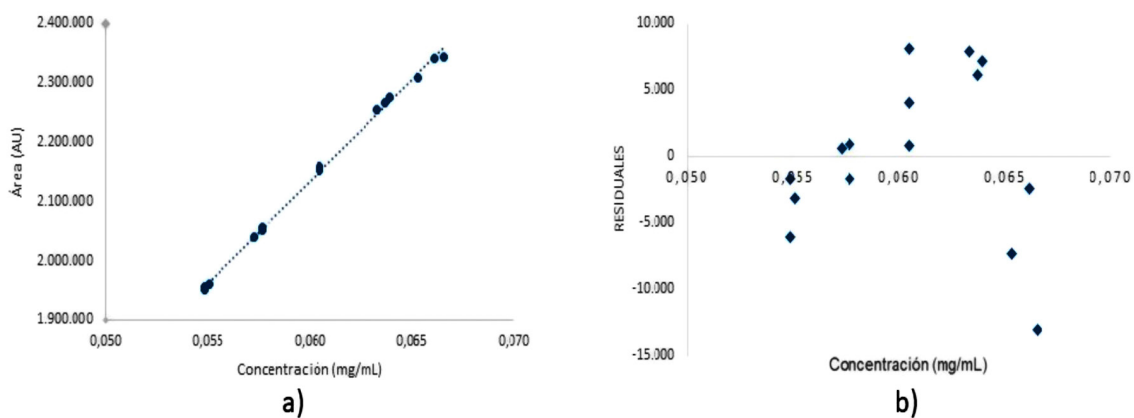


Figura 6. a) Curva de regresión lineal, b) Dispersión aleatoria de los residuos vs concentración (mg/mL).

Tabla 8. Resultados de porcentaje de recuperación evaluados en parámetro de exactitud.

Nivel de concentración, %	Recuperación Deflazacort, %				RSD, %
	M1	M2	M3	x	
90	M1=99,1	M2=99,3	M3=99,3	x = 99,2%	0,1
100	M1=99,1	M2=99,2	M3=99,4	x = 99,2%	0,2
110	M1=98,5	M2=98,6	M3=98,2	x = 98,4%	0,2

Tabla 9. Resultados de las pruebas de precisión.

Prueba	Tipo	RSD, %
Repetibilidad del sistema	Analista 1 serie 1	0,3
Repetibilidad del sistema	Analista 1 serie 2	0,1
Repetibilidad del sistema	Analista 2 serie 1	0,2
Repetibilidad del sistema	Analista 2 serie 2	0,9
Repetibilidad del método	Analista 1 serie 1	0,9
Repetibilidad del método	Analista 1 serie 2	0,6
Repetibilidad del método	Analista 2 serie 1	1,6
Repetibilidad del método	Analista 2 serie 2	1,2
Precisión intermedia	Analista 1 y 2	1,2
Promedio analista 1	99,9%	-
Promedio analista 2	99,7%	-
Diferencia absoluta	0,2%	-

Tabla 10. Resultados de la prueba de robustez.

Prueba	Platos teóricos, N	Factor de retención, k'	Asimetría	Contenido, %	RSD, %	Tiempo de retención, Tr, min
Robustez con un flujo de 0,99 (mL/min)	13857	2,9	1,0	99,6	0,1	3,9
Robustez con un flujo de 1,21 (mL/min)	12811	2,2	1,0	98,1	1,2	3,2

Discusión de resultados

Resultados de prueba de filtros. Los resultados de la prueba de filtros se presentan en la tabla 1, en donde se evaluó la eficiencia del filtro 0,45 μm No. cat. FSFM25P-VH0045 teniendo en cuenta la recuperación del analito (22) y la ausencia de interferencias, las cuales pueden distorsionar la señal del analito evitando su identificación y provocando un error sistemático (33). Los datos obtenidos fueron satisfactorios ya que

no se observaron señales que interfirieran en la cuantificación e identificación del analito (Figura 2), los porcentajes de recuperación para las muestras preparadas con condición (1) y (2) se calcularon conforme a la ecuación (Ec.1) y estuvieron en el rango de 98,0% - 102,0 % con una desviación estándar relativa $\text{RSD} \leq 2,0$ % baja, lo cual indica que los filtros no retienen el analito de interés y que son adecuados para el análisis propuesto, para el estándar sin filtrar el RSD fue de 0,1%.

$$\% \text{ recuperación prueba de filtros} = \frac{A_{Std F}}{A_{Std}} \times 100 \quad \text{Ec. (1)}$$

Verificación de idoneidad del sistema.

La adecuabilidad o idoneidad de un sistema cromatográfico se verificó con el fin de garantizar que el método es adecuado para el análisis previsto en este caso para identificación y cuantificación de Deflazacort en materia prima. Los datos obtenidos para las pruebas de adecuabilidad o idoneidad se ilustran en la tabla 2.

La calidad de la columna cromatográfica empleada se evaluó a partir de los platos teóricos (N). En la literatura no se encontró un valor aceptable para el método en estudio ya que este dato depende de cada sustancia empleada, condiciones de operación, caudal, temperatura de fase móvil, calidad del relleno, longitud de la columna entre otras (29), por lo cual, se comparó con el mínimo de 1000 platos establecidos en el laboratorio donde se realizó la validación, adicional, se han revisado algunas validaciones para moléculas similares como el medicamento prednisolona donde se recomienda la especificación que N no debe ser menos de 500 platos teóricos (34, 35). Los resultados obtenidos tanto para el estándar Std1 y Std2 presentaron similitud, ambos con valores por encima de 12000 lo que nos indica que la columna tiene su funcionalidad eficiente, ya que a mayor N mejor es la separación (36). También se puede observar en la Figura 3 que la señal obtenida en

cromatogramas no se encuentra solapada y presenta una adecuada definición. Otro parámetro de evaluar la adecuabilidad es la asimetría de las señales en cromatogramas, para picos perfectamente simétricos el resultado esperado es igual a 1, donde se obtiene una curva gaussiana, sin embargo, en la práctica se aceptan valores menores que 1,5 (37), conforme a los datos obtenidos se observó un ligero fenómeno de asimetría el cual no afecta la confiabilidad del método ya que no supera el límite establecido. También se determinó como parámetro de idoneidad el factor de retención (k) que representa el número de moléculas que en momento de equilibrio químico pasan a la fase estacionaria de la columna respecto a las moléculas que se encuentran en la fase móvil (36). El resultado obtenido de factor k fue de 2,6 siendo conforme a la especificación de (2-10) (37). El estándar uno se inyectó seis veces de acuerdo con lo recomendado (29) y el valor de RSD fue de 0,3% con respecto a las áreas obtenidas. La correlación para el estándar dos fue de 99,7% con una desviación estándar de 0,35 y un %RSD del 0,35. La elución del analito estuvo alrededor 3 a 4 min.

Evaluación de estabilidad de las soluciones.

Como pruebas preliminares se evaluó la estabilidad de las soluciones, este parámetro no está incluido como pauta de validación en

las guías ICH, en condiciones de ambiente y refrigeración a diferentes tiempos, permite determinar el tiempo y las condiciones en que el analito es estable sin que se vea afectada la cuantificación, veracidad y precisión del procedimiento (38). Los resultados de estabilidad de soluciones de Std1 se observan en la tabla 3.

El estándar uno se usó como patrón de comparación en cada una de las corridas con una concentración aproximada de 0,06mg/mL, verificando el cumplimiento de los parámetros de adecuabilidad para cada intervalos de tiempo y condición de almacenamiento, con el estándar 2 se calculó el porcentaje de correlación (r , %) y el porcentaje de recobro para cada periodo de tiempo estudiado como se muestra en la tabla 4, obteniendo resultados satisfactorios para la cuantificación del analito a temperatura ambiente hasta dos horas y analito refrigerado hasta tres horas ya que el % de correlación y el % de recobro entre el contenido promedio de la frecuencia y el dato inicial se mantuvieron entre 98,0 % y 102,0% (38). En la frecuencia de 3 horas (muestra a T ambiente) y 4 horas tanto para la muestra a T ambiente como para analito refrigerado se observa que el % de correlación y % recobro no se cumple (figura 4), lo que indica degradación o descomposición en la muestra (38).

También se determinó el valor de porcentaje del contenido promedio en base seca del compuesto objeto de investigación te-

niendo en cuenta la humedad calculada de 0,1240% y porcentaje de recobro para las muestras como se observa en la tabla 4. Se verificó a su vez el cumplimiento para la cuantificación del analito al intervalo de tiempo de dos horas y tres horas (analito refrigerado) con el resultado de $RSD < 2,0\%$. En el ensayo realizado para el intervalo de tiempo de 4 horas se visualiza la degradación de la muestra.

Especificidad y selectividad del método.

Los resultados obtenidos en las muestras sometidas a condiciones de degradación se compararon con un blanco y una muestra control como se muestra en la tabla 5. Con las pruebas de estrés (39), se confirmó que el método es específico y selectivo ya que se identificó inequívocamente el analito de interés (40). El tiempo de elución del analito estuvo alrededor de 3,6 min y no se estimó una coelución en el mismo tiempo. En este tipo de pruebas el criterio de aceptación para la degradación del ingrediente activo recomendado es del 10 al 20% (41). El tratamiento de la muestra con hidrólisis ácida de HCl 1,0 N presentó un porcentaje de degradación de 41,7% excediendo el límite de degradación permitido, debido a esto, se disminuyó la concentración del agente degradante a 0,1 N y se realizó tratamiento a una nueva muestra con un porcentaje de degradación de 18,2 % dentro del límite, demostrando que el analito en escenarios de hidrólisis ácida en concentraciones bajas es estable, sin embargo, a concentraciones altas no lo es.

La muestra con hidrólisis básica con NaOH 1,0 N presentó un porcentaje de degradación de 99,1%, cuando se disminuyó la concentración NaOH a 0,1 N mostró un resultado de degradación mayor de 99,8%, lo que confirma que la molécula de Deflazacort es inestable en condiciones de estrés de hidrólisis básica en concentraciones altas y bajas (ver figura 5c). Para la hidrólisis básica se obtiene una desacetilación del Deflazacort (figura 1), de acuerdo a la literatura el producto de degradación corresponde al 21-desacetyl Deflazacort. En la prueba de oxidación el porcentaje de degradación de Deflazacort fue de 0,3%, en termólisis de 1,6% y para fotólisis 0,0%, demostrando que la molécula investigada de glucocorticoide oxaxolínico presenta una naturaleza estable cuando se somete a estos tipos de ensayos de estrés. Para cada uno de los ensayos la resolución encontrada es mayor a 1,5 evidenciándose una adecuada separación (36). La pureza espectral del analito de interés es demostrada en las pruebas de degradación forzada obteniendo valores de ángulo de pureza < ángulos de umbral, un ángulo de pureza inferior que el umbral indica que no hay evidencia de coelución (42). En la hidrólisis básica con NaOH 1,0 N y NaOH 0,1 N, se obtuvo un valor ángulo de pureza > ángulo de umbral indica coelución.

Pruebas de linealidad. En la tabla 6 se muestran los resultados estadísticos de la prueba de linealidad utilizando el método de patrones de referencia, mediante el análisis de regresión de la relación entre la concentración frente a la respuesta del equipo (figura

6), donde, se calculó la pendiente, coeficiente de correlación, intersección con el eje de ordenadas y la suma de los cuadrados residuales (22), las cuales se dedujeron con ayuda del software Microsoft Excel 2016 utilizando como variable independiente las concentraciones y como dependiente las áreas bajo la curva de las señales cromatográficas. Las concentraciones establecidas para determinar el parámetro de linealidad fueron de 90%, 95%, 100%, 105% y 110%. Se determinó la prueba t para la pendiente y el intercepto con un nivel de significancia del 5% evaluando las hipótesis de $H_0: \beta \leq 0$ vs $H_1: \beta > 0$, para ambos parámetros se obtuvieron valores experimentales de 84,312 y 3,300 respectivamente. Al comparar estos datos con el valor crítico tabulado de 2,160 se cumple $t_{\text{calc}} > t_{\alpha/2}$ por tal motivo se rechaza H_0 y se acepta H_1 concluyendo con una confianza del 95% que el modelo lineal es apropiado ya que la pendiente, el intercepto son mayores que cero (43) y con un coeficiente de correlación 0,999. Se realizó también la determinación de porcentaje del error sistemático de acuerdo con la ecuación 2 para los niveles de concentración de 90%, 100% y 110% de Deflazacort (%DFZ), donde la correlación entre la muestra del estándar y cada una de las inyecciones de los niveles evaluados estuvo entre 98% y 102%. A partir de las áreas experimentales cromatográficas se estimó la dispersión aleatoria alrededor de la línea cero, lo que demuestra la ausencia de un patrón sistemático garantizando un modelo estadístico válido (figura 6) y los datos se relacionan en la tabla 7.

$$\% DFZ = \frac{A MP}{A Std} \times \frac{P Std}{100,0 mL} \times \frac{5,0 mL}{25,0 mL} \times \frac{Pot Std}{100} \times \frac{100,0 mL}{P MP} \times \frac{25,0 mL}{5,0 mL} \times \frac{100}{Pot MP} \times 100 \quad \text{Ec. (2)}$$

Exactitud. El parámetro de exactitud fue evaluado respecto al estándar de referencia con un mínimo de nueve determinaciones sobre tres niveles de concentración 90%, 100% y 110% (17, 21), a partir de las soluciones preparadas en la prueba de linealidad teniendo en cuenta el porcentaje de recuperación (22), los datos de exactitud se enseñan en la tabla 8.

La metodología es exacta ya que los porcentajes de recuperación se encuentran dentro del rango establecido de 98% a 102% para cada uno de los niveles y la desviación estándar menor o igual al 2%.

Precisión. La precisión se evaluó con dos analistas verificando la repetibilidad del sistema a partir de seis inyecciones del estándar uno al 100% de la concentración de trabajo (22), los resultados demuestran la repetibilidad de resultados ya que el valor de $RSD < 2,0\%$ y el cumplimiento de los parámetros de adecuabilidad. La precisión intermedia se llevó a cabo usando diferentes equipos, los datos obtenidos comprueban la precisión para el método cromatográfico ya que el RSD entre analista 1 y analista 2 no fue mayor al 2,0%, adicional se aplicó el criterio de aceptación de Horwitz (ecuación 3 y 4), donde se indica que la relación de (P HORRAT) debe estar entre 0,5% y 2,0% (38) con un resultado del 1,8%. La diferen-

cia absoluta encontrada entre las medias de los dos analistas fue de 0,2%.

$$RSD_H \% = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad \text{Ec (3)}$$

$$P_{Horrat} = \frac{RSD}{RSD_H} \quad \text{Ec (4)}$$

Robustez. Este parámetro se determinó modificando el flujo de prueba a 0,99 y 1,21 ml/min, los datos obtenidos se presentan en la tabla 10. El método es robusto para el cambio de flujo a 1,21 mL/min evaluado, garantizando en todos los casos los parámetros de adecuabilidad del sistema. El método no es robusto para el cambio de flujo a 0,99 mL/min evaluado, debido a que no cumple tiempo de retención de Deflazacort.

Se encontró que a incrementos repentinos de presión en el cromatógrafo pueden comprimir el empaque de la columna, lo cual disminuye la eficiencia de la misma, además, el tiempo de acondicionamiento de sistema debe ser de al menos hasta 30 minutos previo al valoración e identificación a la primera inyección.

Conclusiones

Se demostró que mediante la metodología propuesta por cromatografía HPLC para la valoración de (1-(1 β ,16 α)-21-(acetiloxi)-11-hidroxi-2'-metil-5'H-pregna-1,4-dieno[17,16-d]

oxazol-3,20-diona en Deflazacort materia prima presenta un comportamiento lineal en el rango de 0,054-0,066 mg/mL con un coeficiente de correlación 0,999, el método demostró ser exacto, preciso y reproducible ya que cumplió los criterios de aceptación y parámetros de idoneidad de ICH y USP para la validación de métodos analíticos generando resultados analíticos veraces en condiciones de uso real en laboratorio.

La exposición del analito a soluciones básicas puede generar hidrólisis de la molécula. Las soluciones preparadas tanto de las soluciones estándares como muestras son estables por un periodo de 2 horas a temperatura ambiente y hasta máximo tres horas refrigeradas, sólo si se almacenan en frascos herméticos presentan una estabilidad hasta. El método no se vio afectado a cambios de equipo, analista y condiciones de tiempo.

Conflicto de interés. El manuscrito no presenta conflicto de interés.

Fuente de financiación. El proyecto no tuvo financiación externa. El proyecto recibió aportes de las entidades participantes, apoyo en especie (equipos y muestras por parte de la empresa), el tiempo de profesor fue reconocido por la Universidad del Valle.

Agradecimientos. A los químicos L. Moreno y B. Flórez por colaboración y asesoría profesional.

Referencias

1. Huber EW, Barbuch RJ. Spectral analysis and structural identification of a major deflazacort metabolite in man. *Xenobiotica*. 1995;25(2):175–83.
2. Markham A, Bryson HM. Deflazacort A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Efficacy. *Drugs*. 1995;50(2):317–33.
3. Özkan Y, Savaşer A, Taş Ç, Uslu B, Özkan SA. Drug dissolution studies and determination of deflazacort in pharmaceutical formulations and human serum samples by RP-HPLC. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 2003;26(13):2141–56.
4. Singhai N, Dubey R. Development and Characterization of Deflazacort Nanoparticles for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *People's J of S.Res*. 2021;14(2).
5. Cuffini SL, Ellena JF, Mascarenhas YP, Ayala AP, Sielser HW, Filho JM, et al. Physicochemical characterization of deflazacort: Thermal analysis, crystallographic and spectroscopic study. *Steroids*. 2007;72(3):261–9.
6. Chourasiya Y, Maheshwari R, Tekade RK. Current developments in excipient science: Implication of quantitative selection of each excipient in product development. *Basic Fundamentals of Drug Delivery*. Elsevier; 2018. p. 29–83.
7. Scremin A, Piazzon M, Silva MAS, Kuminek G, Correa GM, Paulino N, et al. Spectrophotometric and HPLC determination of deflazacort in pharmaceutical dosage forms. *Brazilian J Pharm Sci*. 2010;46(2):281–7.
8. Patel M, Jebaliya H, Dabhi B, Jadeja Y, Jani N, Desai D, et al. Chromatography method transfers from HPLC to a new generation instrument UPLC and studies on force degradation behavior of deflazacort. *Der Pharm Lett*. 2015;7(2):142–9.
9. Raju CK, Pandey AK, Ghosh K, Pola A, Goud SK, Jaywant MA, et al. Isolation and structural characterization of novel photolytic degradation impurities of Deflazacort using Q-TOF, 2D-NMR and FTIR. *J Pharm Biomed Anal*. 2017;133:82–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.11.005>
10. Parente L. Deflazacort: Therapeutic index, relative potency and equivalent doses versus other corticosteroids. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2017;18(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40360-016-0111-8>

11. Bylo M, Farewell R, Coppentrath VA, Yogaratnam D. A Review of Deflazacort for Patients with Duchenne Muscular Dystrophy. *Ann Pharmacother.* 2020;54(8):788–94.
12. McDonald CM, Sajeev G, Yao Z, McDonnell E, Elfring G, Souza M, et al. Deflazacort vs prednisone treatment for Duchenne muscular dystrophy: A meta-analysis of disease progression rates in recent multicenter clinical trials. *Muscle and Nerve.* 2020;61(1):26–35.
13. López A. E, Ramírez G. G, Iglesias G. A. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos: una muerte anunciada. *Nova.* 2004;2(2):94.
14. Resolución 00001606 del Ministerio de Salud y Protección Social del 02 de mayo de 2014.
15. Moreno LB, Romeu CR, Torrez G. Validación del método cromatográfico para estudios de estabilidad del ciprofloxacino clorhidrato 0,2 % gota ótica. *Revista Cubana de Farmacia.* 2022;55(1):1–14.
16. Borges LG. Evaluación de los métodos analíticos para el control de calidad de ampicilina y oxacilina. *Revista Cubana de Farmacia.* 2019;52(1):1–21.
17. Rodríguez DP, Orta IA, Pérez YS, López GJ. Quality defects during the marketing of pharmaceutical products and the role of regional regulatory authorities. *Revista Cubana de Farmacia.* 2021;54(3):1–16.
18. Yapar EA, Özdemirhan ME. An Overview on Pharmacopoeias in the World and Monograph Elaboration Techniques. *Univers J Pharm Res.* 2020;5(3):57–64.
19. Guevara M, Mogollón L, Iglesias A, Yupanqui H, Bermúdez A. Estimación de Vitamina D en mujeres con osteopenia y osteoporosis en Cundinamarca-Colombia, por medio de extracción en fase sólida, cromatografía líquida de alta resolución y análisis multivariado. *Nova.* 2003;1(1):72.
20. Corrêa GM, Bellé LP, Bajerski L, Borgmann SHM, Cardoso SG. Development and validation of a reversed-phase HPLC method for the determination of deflazacort in pharmaceutical dosage forms. *Chromatographia.* 2007;65(9–10):591–4.
21. European Medicines Agency. ICH Topic Q2. Validation of analytical procedures: test and methodology. *Encycl Toxicol Third Ed.* 1995;2(June 1995):1070–2.
22. Farmacopea de los Estados Unidos de América (2022). General Chapter, <1225> Validación de procedimientos farmacopeicos. USP-NF. Rockville, MD: Farmacopea de los Estados Unidos de América.
23. Bor M, Guilarte A, Guzmán L, Mendoza KMW. Validación de un método por RP-HPLC para la determinación de Tiocolchicósido en tabletas. *Afinidad.* 2018;75(581).
24. Bermúdez PhD M, Carrillo Bsc Y. Diagnóstico de Homocistinuria y Deficiencia de Adenilosuccinato Liasa a Través de Técnicas Químicas, Bioquímicas y Moleculares. *Nova.* 2005;3(3):46.
25. Waters. Empower 3 Software. 2010; 2010.
26. Inc,Thermo Fisher Scientific D. Chromeleon 7, Chromatography data system. 2009.
27. Chen Y, Xia L, Liang R, Lu Z, Li L, Huo B, et al. Advanced materials for sample preparation in recent decade. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2019;120:115652. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115652>
28. Fischer Scientific. Por qué la filtración de muestras y de la fase móvil es esencial para el análisis de HPLC. Thermo Fischer Scientific. 2022. Tomo 22.036. Folio 17. Inscripción 1a, C.I.F. B-84498955
29. Farmacopea de los Estados Unidos de América (2022). General Chapter, <621> Cromatografía.USP-NF. Rockville, MD: Farmacopea de los Estados Unidos de América.
30. Farias FF, Martins VAP, Yano HM, Trujillo LM, Pinto E. Forced degradation studies to identify organic impurities in pharmaceuticals: A brazilian perspective. *Rev Ciencias Farm Básica e Apl.* 2021;42:1–13.
31. Thorat SS, Gupta A. Basic Concept of Stability Profile and Stress Degradation Pathway of Pharmaceutical Formulations: A Review. *J Biol Chem Chron.* 2018;4(3):34–42.
32. Bhaskar R, Ola M, Agnihotri V, Chavan A, Girase H. Current Trend in Performance of Forced Degradation Studies for Drug Substance and Drug Product's. *J Drug Deliv Ther.* 2020;10(2-s):149–55.
33. Verbić T, Dorkó Z, Horvai G. Selectivity in analytical chemistry. *Rev Roum Chim.* 2013;58(7–8):569–75.
34. Avila J. Validación del método analítico de contenido e identificación de prednisolona sodio fosfato (base) en prednisolona 5mg/ml solución oral. [Internet]. Universidad Nacional de Trujillo; 2012. Available from: [https://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/10406/Amaya Hilario Carmen Victoria.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/10406/Amaya%20Hilario%20Carmen%20Victoria.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

35. Divyashree S, Veena MK, Channabasavaraj KP. Method Validation for Simultaneous Estimation of Prednisolone and Abiraterone Acetate by RP-HPLC. *J Chronother Drug Deliv.* 2016;7:41–9.
36. Díaz EM, San Cristóbal M, Alarcón B, Córdoba C, Legaz M. Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Prácticas de laboratorio y cuestiones teórico-prácticas. Parte II. Práctica de laboratorio: análisis cuantitativo básico. *Reduca (Biología).* 2011;4(3):33–47.
37. Sierra N, Gómez G. Desarrollo y validación de una metodología por cromatografía líquida de alta eficiencia para la determinación simultánea de piperacilina sódica y tazobactam sódico en inyectables para uso humano. *Rev Colomb Ciencias Químico-Farmacéuticas.* 2014;43(1):5–21.
38. Krueve A, Rebane R, Kipper K, Oldekop ML, Evard H, Herodes K, et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part II [Internet]. Vol. 870, *Analytica Chimica Acta.* Elsevier B.V.; 2015. 8–28 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.016>
39. Ruiz DJ, Afanasjeva N. Método de cuantificación enzimática con DNS para β -mananasa en soya y en un aditivo nutricional. *Cienc y Agric.* 2022;19(3):57–72.
40. European Medicines Agency. ICH Q1A (R2). Stability testing of new drug substances and drug products. 2003.
41. Cámara MS., Guerrero F, Alasino A., Caro Y., De Zan MM. Desarrollo y validación de un método analítico indicativo de estabilidad por CLAR para la evaluación de la pureza cromatográfica y la cuantificación simultánea de ibuprofeno y su compuesto relacionado 4-isobutilacetofenona en materias primas. *Rev Mex Ciencias Farm.* 2017;48(4°):59. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57956617007>
42. Waters. How do you set up the Purity Thresholds in Empower 3? [Internet]. Waters knowledge base. 2021. Available from: https://support.waters.com/KB_Inf/Empower_Breeze/WKB11215_How_do_you_set_up_the_Purity_Thresholds_in_Empower_3
43. Llinas S H. Regresión Lineal simple: Pruebas de hipótesis. Estadística básica y avanzada. Rpubs. Ed. Universidad del Norte, 2021.