



## Desenvolvimento e Validação de Método de Dissolução para Deflazacorte em Comprimidos e Cápsulas Magistrais

Simone Gonçalves CARDOSO \*<sup>1</sup>, Giane Márcia CORREA <sup>2</sup> & Luziane Potrich BELLÉ <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade - CEP 88.040-970 - Florianópolis (SC), Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ). (RS), Brasil

<sup>3</sup> Universidade Federal de Santa Maria - Santa Maria (RS), Brasil.

**RESUMO.** O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método de dissolução para o glicocorticóide deflazacorte em comprimidos e cápsulas manipuladas utilizando método espectrofotométrico. As condições de dissolução estabelecidas foram: 900 mL de HCl 0,1M, como meio de dissolução, utilizando aparato pá para comprimidos e cesta para cápsulas, com velocidade de rotação de 50 rpm. A % de fármaco dissolvido foi avaliada através de espectrofotometria no ultravioleta a 244 nm. O método foi validado e mostrou ser específico, linear, preciso e exato. Adicionalmente, avaliou-se a influência do filtro e a estabilidade do fármaco no meio de dissolução.

**SUMMARY.** "Development and Validation of Dissolution Method for Deflacort in Tablets and Compounding Capsules". The aim of this work was to develop and validate a dissolution test for deflazacort in tablets and compounding capsules using spectrophotometric method. The dissolution established conditions were: 900 mL of 0,1M HCl as dissolution medium, using a paddle apparatus for tablets and basket apparatus for capsules at a stirring rate of 50 rpm. The % drug release was evaluated by UV spectrophotometric method at 244 nm. The method was validated and showed be specific, linear, precise and accurate. In addition, filter influence and drug stability in dissolution medium were also evaluated.

### INTRODUÇÃO

A absorção de fármacos após administração oral, a partir de formas farmacêuticas sólidas, depende da sua liberação da forma farmacêutica, da sua dissolução ou solubilização sob condições fisiológicas e de sua permeabilidade através do trato gastrointestinal <sup>1</sup>. Fatores relacionados ao fármaco e formulação, como solubilidade e natureza química do fármaco, polimorfismo, coeficiente de partição, quiralidade, tamanho de partículas, entre outros, tornam o processo de absorção complexo e variável. Qualquer fator que afete a desagregação ou a dissolução pode afetar a biodisponibilidade do fármaco <sup>2</sup>. Os estudos de dissolução *in vitro* constituem-se em instrumentos essenciais para avaliação das propriedades biofarmacêuticas das

formas farmacêuticas sólidas de uso oral, fornecendo informações úteis tanto para a pesquisa e desenvolvimento quanto para a produção e controle de qualidade. No desenvolvimento farmacotécnico permite avaliar novas formulações e estabelecer correlação com os dados obtidos *in vivo*, através da cinética de dissolução <sup>3</sup>. Durante a fase de produção e controle de qualidade permite detectar desvios de fabricação, uniformidade do produto e reprodutibilidade lote a lote <sup>4</sup>.

Muitos fármacos não possuem monografia oficial, sendo necessário desenvolver ensaios de dissolução que possam prever o comportamento *in vivo* dos mesmos a partir de formas sólidas <sup>3</sup>. Um número crescente de artigos descrevendo o desenvolvimento e validação de métodos de

**PALAVRAS CHAVE:** Deflazacorte, Dissolução, Espectrofotometria, Validação.

**KEY WORDS:** Deflazacort, Dissolution, Spectrophotometry, Validation.

\* Autor a quem correspondência deve ser enviada. E-mail: simonegc@ccs.ufsc.br

dissolução vem sendo descritos na literatura nos últimos anos <sup>5-11</sup>. A avaliação do perfil de dissolução, em três diferentes meios na faixa de pH fisiológico (pH de 1,5 a 7,5), é recomendada como suporte no desenvolvimento e otimização do método de dissolução, bem como no estabelecimento de correlações *in vivo* - *in vitro* <sup>12-14</sup>. Dentre os principais parâmetros que devem ser avaliados no desenvolvimento de um método de dissolução citam-se: influência do processo de filtração, escolha de um método de quantificação que seja preciso e exato, bem como utilização de equipamento calibrado. Para a escolha do meio de dissolução características como pKa, solubilidade e estabilidade do fármaco em função do pH bem como a faixa de dosagem do mesmo devem ser avaliadas <sup>4,14-16</sup>. O deflazacorte (DFZ, Fig. 1) é uma oxazolina sintética derivada da prednisolona, com atividade antiinflamatória e imunossupressiva <sup>17</sup>. Este fármaco possui menos efeitos adversos que outros glicocorticóides e tem sido indicado para o tratamento da artrite reumatóide, asma, miastenia grave, lúpus eritematoso sistêmico, púrpura trombocitopênica, distrofia muscular de Duchenne e transplante de fígado <sup>17-23</sup>.

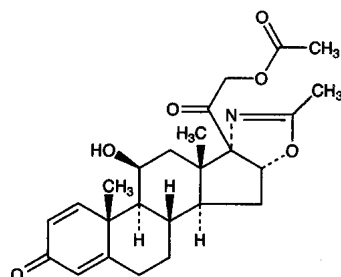


Figura 1. Estrutura química do deflazacorte.

No Brasil cerca de oito diferentes indústrias produzem comprimidos contendo DFZ, totalizando aproximadamente 15 apresentações. Encontra-se disponível, ainda, na forma de cápsulas manipuladas, produzidas por diversas farmácias magistrais em todo o país. Não há, até o momento, monografia para DFZ nos compêndios oficiais. Na literatura científica existe apenas um artigo indicando a aplicação de método por cromatografia líquida para determinação de DFZ em formas farmacêuticas, em amostras de sangue humano e em estudos de dissolução *in vitro* <sup>24</sup>. Neste estudo os autores indicaram as condições de dissolução sem apresentar, no entanto, estudo de perfil de dissolução do fármaco em diferentes meios, como é preconizado na li-

teratura para o desenvolvimento de método de dissolução para fármacos sem monografia oficial <sup>15</sup>. Dados referentes à dissolução em cápsulas também não foram encontrados na literatura consultada.

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar um método adequado para avaliar a dissolução de DFZ em comprimidos e cápsulas manipuladas, utilizando a espectrofotometria no UV, devido à facilidade de execução e menor custo deste método quando comparado à cromatografia líquida.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Amostras e Substância química de referência (SQR)

Foram avaliados comprimidos contendo 30 mg de DFZ e os seguintes excipientes: amido, dióxido de silício, celulose microcristalina, estearato de magnésio e lactose; e cápsulas magistrais contendo 30 mg de DFZ e os seguintes excipientes: estearato de magnésio, carboximetilcelulose, amido e lactose. Utilizou-se, como SQR, matéria-prima adquirida da Natural Pharma Produtos Farmacêuticos Ltda (São Paulo), cuja identidade foi comprovada através de ressonância magnética nuclear de hidrogênios e carbonos. A pureza da SQR utilizada foi avaliada através da determinação da faixa de fusão, infravermelho (IV), cromatografia líquida com detector DAD, e através de análise térmica (DSC e TG) (dados não apresentados).

### Reagentes

Foram empregados os seguintes reagentes: ácido clorídrico fumegante 37% (Tedia®), etanol (Tedia®), fosfato de potássio monobásico (Tedia®), hidróxido de sódio 1N (Merck®). Água ultra-pura foi obtida através do sistema de purificação Labconco Water Pro PS (Missouri, USA).

### Equipamentos

Os estudos de dissolução foram realizados em aparelho de dissolução Pharma Test VK 7000 (Germany) equipado com seis cubas. As análises espectrofotométricas foram realizadas em equipamento Spectronic Genesis 2 UV-VIS (Milton Roy Co., USA), utilizando cubetas de quartzo de 1 cm.

### Desenvolvimento do Teste de Dissolução

Diversas condições de dissolução foram testadas empregando o aparato pá (para comprimidos) e cesta (para cápsulas), com velocidades

de rotação de 50 e 75 rpm, e os seguintes meios de dissolução: água, HCl 0,1M e tampão fosfato pH 6,8, todos em um volume de 900 mL. Os meios foram desgaseificados sob vácuo e foram mantidos a  $37,0 \pm 0,5$  °C. Coletas manuais de 5 mL foram realizadas nos tempos de 5, 10, 15, 30 e 40 min, com a reposição do mesmo volume de meio a  $37,0 \pm 0,5$ °C. As alíquotas coletadas foram filtradas e a concentração de DFZ nos meios de dissolução foi determinada por espectrofotometria na região do ultravioleta. Para cada condição foram calculadas a Eficiência de Dissolução (ED %) com o intuito de comparar os perfis obtidos<sup>25</sup>. Estudos do fármaco, mantido durante 1 h a  $37 \pm 0,5$  °C nos meios de dissolução, foram igualmente realizados para avaliar sua estabilidade nas condições estudadas. Utilizou-se, nesta avaliação, o método por cromatografia líquida, previamente desenvolvido e validado em nosso grupo, devido à sua maior seletividade<sup>26</sup>.

#### **Avaliação da influência do filtro**

Amostras simuladas dos excipientes (ASE) de comprimidos e cápsulas foram preparadas no meio de dissolução e avaliadas por espectrofotometria no UV antes e após o processo de filtração. Papel filtro quantitativo faixa preta (Schleicher & Schuell®) e membrana acetato de celulose com poro 0,45 µm (Phenomenex) foram avaliados neste processo.

#### **Validação do método de quantificação**

*Avaliação da especificidade.* Amostras simuladas dos excipientes (ASE) de comprimidos e cápsulas foram preparadas e submetidas às condições indicadas na Tabela 1, e seus espectros foram traçados na faixa de 200 a 400 nm, para verificar se havia interferência dos excipientes na determinação do DFZ.

Meio	HCl 0,1M
Volume	900 mL
Temperatura	$37 \pm 0,5$ °C
Aparato	Pá (comprimidos) e cesta (cápsulas)
Velocidade de rotação	50 rpm
Volume coletado	5 mL
Tempo de análise	30 min
Temperatura	$37 \pm 0,5$ °C
Método de quantificação	Espectrofotometria no UV, em 244 nm

**Tabela 1.** Condições otimizadas para avaliação da porcentagem dissolvida de deflazacorte em comprimidos e cápsulas.

*Linearidade.* Foi estabelecida através da construção de curvas de calibração, obtidas com soluções da SQR nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 µg/mL, preparadas em HCl 0,1 M, em três diferentes dias.

*Precisão.* Foi avaliada através do desvio padrão relativo (DPR) obtido dos resultados da dissolução realizada com comprimidos e cápsulas, analisados no mesmo dia (intra-dia, n=6) e em um segundo dia (entre-dias), empregando as condições descritas na Tabela 1.

*Exatidão.* Quantidades conhecidas de SQR (5, 10 e 15 µg/mL) foram adicionadas às ASE, que foram submetidas às condições indicadas na Tabela 1, e o percentual de recuperação foi calculado.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### ***Desenvolvimento do método de dissolução***

No desenvolvimento de um método de dissolução diversas condições devem ser avaliadas com o objetivo de escolher as mais adequadas, que apresentem poder discriminativo máximo e permitam detecção de eventuais desvios dos padrões de qualidade inicialmente propostos<sup>3,4</sup>. Nesta etapa de desenvolvimento devem ser avaliados meios que se assemelhem às condições fisiológicas devendo-se considerar, também, fatores como solubilidade do fármaco e sua estabilidade no meio de dissolução<sup>4,15</sup>. Os meios de dissolução comumente utilizados nos testes de dissolução são ácido clorídrico, tampão fosfato e água<sup>15,27</sup>, e estes meios foram avaliados, empregando duas velocidades de rotação diferentes (50 e 75 rpm). Para cada condição foi calculada a Eficiência de Dissolução (ED %), a qual está relacionada com a quantidade real de fármaco que se encontra dissolvido no meio, permitindo comparar os perfis obtidos<sup>25</sup>. Avaliou-se, também, a precisão dos resultados, que é considerado parâmetro de extrema importância para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos nos estudos de dissolução<sup>1</sup>. Conforme resultados apresentados na Tabela 2, os maiores valores de ED % foram obtidos quando se utilizou HCl 0,1M como meio de dissolução, tanto para comprimidos quanto para cápsulas.

Os menores valores de ED% obtidos em tampão fosfato pH 6,8 podem estar relacionados à maior instabilidade do fármaco em condições alcalinas. Estudo de estabilidade realizado com o DFZ neste meio indicou que houve um decréscimo na concentração do fármaco, em torno de 30%, após 1 h a  $37$  °C  $\pm$   $0,5$  °C. Em HCl 0,1M

Forma Farmacêutica	Aparato	Eficiência de Dissolução (ED %)		
		HCl 0,1M	Água	Tampão pH 6,8
Comprimidos	pá	81,3	53,6	59,4
		83,8	65,2	59,3
Cápsulas	cesta	74,3	43,0	43,3
		92,2	57,5	53,0

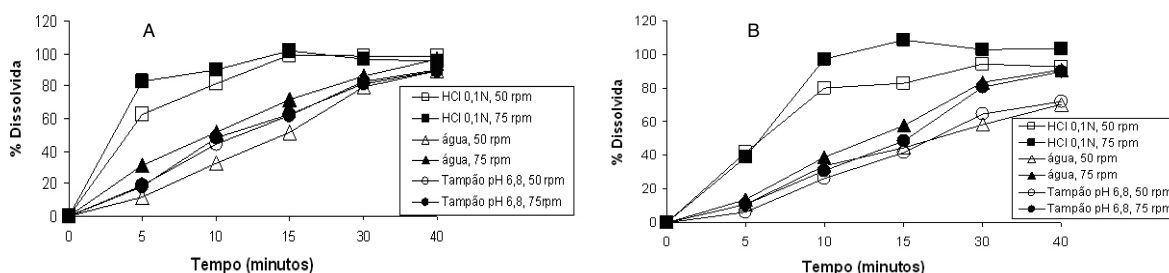
**Tabela 2.** Valores da Eficiência de Dissolução (%) obtidos nas diferentes condições testadas.

os valores experimentais obtidos ficaram dentro da faixa de variação recomendada (98-102%)<sup>4,16</sup>. A % máxima de degradação após 1 h em HCl 0,1 M foi inferior a 3%, demonstrando que o DFZ não se altera significativamente durante o período de execução do teste (30 min). Os baixos valores de ED% obtidos em água podem ser devido à baixa solubilidade do fármaco neste diluente. A água foi, no entanto, avaliada neste estudo por ser o meio indicado em farmacopéias para outros corticóides, como prednisolona<sup>28</sup>, do qual o DFZ é derivado, e prednisona<sup>28,29</sup>. Em relação à rotação verificou-se, para os comprimidos, que não houve diferença significativa entre os valores de ED% em ambas as rotações avaliadas (50 e 75 rpm) (Tabela 2), mas a precisão dos resultados obtidos entre as diferentes cubas (n = 12) foi menor em 50 rpm (RSD < 5%). Para as cápsulas os valores de ED % foram maiores em 75 rpm (Tabela 2), mas a variabilidade entre as cubas foi significativamente superior nesta rotação. De acordo com a literatura<sup>27</sup>, o DPR pode ser de até 20% nos primeiros tempos de análise (até 10 min) e de até 10% nos demais tempos. Na velocidade de 75 rpm os valores de RSD obtidos foram superiores a 25%, em todos os tempos de coleta. Desta forma a velocidade de 50 rpm foi considerada mais adequada, permitindo resultados mais precisos. Na Figura 2 são apresentados os perfis de dissolução obtidos nas diferentes condições avaliadas (2A: comprimidos, 2B: cápsulas).

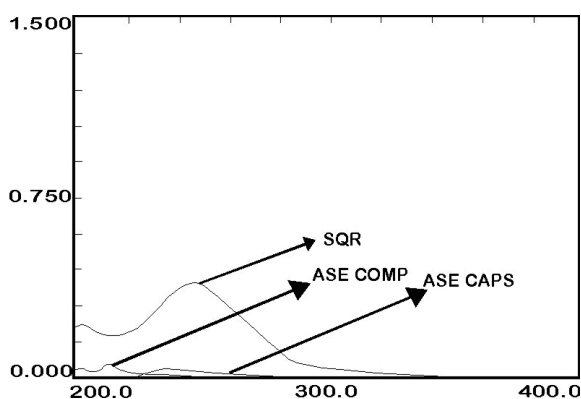
Verifica-se que em HCl 0,1M a % de fármaco liberado em 30 min foi superior a 80%, tanto para comprimidos como para cápsulas, podendo este critério ser adotado para fins de controle de qualidade. A menor % de liberação (em torno de 80%) verificada para as cápsulas pode ser devido à presença de carboximetilcelulose, que aumenta a viscosidade em meios aquosos, atuando como agente modulador da liberação de fármacos<sup>30</sup>, sugerindo poder discriminatório do método. Com base nos resultados apresentados definiram-se como adequadas para avaliar a dissolução do fármaco em comprimidos e cápsulas as condições que estão indicadas na Tabela 1, que foram avaliadas no processo de validação do método.

#### Validação do método de quantificação

Os métodos analíticos mais utilizados para quantificar fármacos em estudos de dissolução são a espectrofotometria no UV/VIS e a cromatografia líquida<sup>27,31</sup>. A espectrofotometria no ultravioleta foi o método escolhido no presente estudo pela sua rapidez de execução e baixo custo. Antes da validação do método de quantificação utilizado para determinar a porcentagem de fármaco dissolvido foram avaliadas a influência do filtro e a estabilidade do DFZ no meio de dissolução<sup>4,15</sup>. A avaliação da influência do filtro no método proposto tem por objetivo verificar se existem alterações significativas na concentração do fármaco ou para verificar se há li-



**Figura 2.** Representação gráfica das porcentagens dissolvidas de deflazacorte em comprimidos (A) e cápsulas (B), nas diversas condições avaliadas.



**Figura 3.** Espectros de absorção na região do UV obtidos com deflazacorte substância química de referência (SQR), e amostras simuladas de excipientes (ASE) de comprimidos (COMP) e de cápsulas (CAPS), após dissolução em HCl 0,1M, a 37 ± 0,5 °C, com rotação de 50 rpm e aparato pá e cesta, para comprimidos e cápsulas, respectivamente.

beração de material para a solução. Observou-se que as leituras das absorvâncias antes e após a filtração com filtro quantitativo ou com membrana de acetato de celulose com poro de 0,45 µm não tiveram diferenças significativas, e o primeiro processo foi escolhido, devido ao menor custo do mesmo. A validação de métodos analíticos utilizados para determinação de características de desempenho, como é o caso dos testes de dissolução, deve incluir a avaliação da especificidade, linearidade, precisão e exatidão <sup>28,31</sup>. Em relação à especificidade verificou-se que

não houve interferência dos excipientes no pico de absorção máxima do DFZ (244 nm) (Fig. 3).

Os resultados da curva de calibração da SQR de DFZ demonstraram correlação linear entre as absorvâncias e as concentrações, na faixa de 5 a 25 µg/mL. A equação da reta para o método foi  $y = 0,00359 x + 0,0064$ , com coeficiente de correlação superior a 0,999, demonstrando a adequada linearidade do método <sup>31</sup>. A análise da variância (ANOVA) realizada sobre os valores das absorvâncias das curvas de calibração demonstrou que a regressão linear foi significativa ( $f$  calculado = 21705 >  $f$  crítico = 4,96,  $P = 0,05$ ), sem desvio da linearidade ( $f$  calculado = 0,32 <  $f$  crítico = 3,71,  $P = 0,05$ ). Os resultados da precisão intra-dia e entre-dias estão apresentados na Tabela 3, onde se verifica que o DPR máximo foi de 5%, os quais estão em acordo com o indicado na literatura <sup>27</sup>. A exatidão, avaliada através da porcentagem de recuperação, foi superior a 95% tanto para comprimidos como para cápsulas (Tabela 4). Segundo Marques <sup>4</sup>, a recuperação deve estar na faixa de 95 a 105%, demonstrando a adequada exatidão do método.

**CONCLUSÃO**

As condições de dissolução otimizadas (900 mL de HCl 0,1M a 37°C ± 0,5 °C, aparato pá para comprimidos e cesta para cápsulas, 50 rpm e 30 min de teste) mostraram-se adequadas para avaliar a % de DFZ liberada dos produtos analisados, podendo ser utilizadas no controle de qualidade de comprimidos e cápsulas de DFZ,

Forma farmacêutica	% Dissolvida/DPR		
	1° dia (n=6)	2° dia (n=6)	Entre-dias (n=2)
Comprimidos	98,2/0,9	96,2/1,6	97,6/1,4
Cápsulas	82,1/4,9	83,4/5,1	82,7/4,8

**Tabela 3.** Valores experimentais referentes à determinação da porcentagem dissolvida de deflazacorte em comprimidos e cápsulas, através da espectrofotometria no ultravioleta. DPR = Desvio Padrão Relativo.

Amostras	Quantidade de SQR (µg)		% de Recuperação	% Média de Recuperação
	Adicionada	Recuperada		
Comprimidos	5,0	5,1	102,0	101,4
	10,0	10,2	102,0	
	15,0	15,1	100,1	
Cápsulas	5,0	4,8	96,0	97,7
	10,0	9,8	98,3	
	15,0	14,8	98,7	

**Tabela 4.** Valores experimentais do teste de recuperação realizado nas amostras simuladas de excipientes de comprimidos e cápsulas de deflazacorte por espectrofotometria na região do UV.

uma vez que não existe monografia oficial para este fármaco. A % de fármaco liberada das formulações foi superior a 80% em 30 min. O método espectrofotométrico foi escolhido em razão da sua simplicidade, rapidez e custo, e mostrou ser específico linear, preciso e exato.

#### REFERÊNCIAS

1. Ansari, M., M. Kazemipour & J. Talebnia (2004) *Diss. Technol.* **8**: 16-24
2. Storpirtis, S.; P.G. Oliveira; D. Rodrigues & D. Maranhão (1999) *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **35**: 1-16.
3. Manadas R., M.E. Pina & F. Veiga (2002) *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **38**: 375-99.
4. Marques, M.R.C. & W. Brow (2002) *Analytica.* **1**: 48-51
5. Menegola, J. & M. Steppe & E.E.S. Schapoval (2007) *Eur. J. Pharm Biopharm.* **67**: 524-30.
6. Breier, A.R., C.S. Paim, M. Steppe & E.E.S. Schapoval (2005) *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **8**: 289-98.
7. Cardoso, S.G., L. Bajerski, M.D. Malesuik & B. Dorfey (2007) *Lat. Am. J Pharm.* **26**: 108-14.
8. Malesuik, M.D., S.G. Cardoso, F.A. Lanzanova, L. Bajerski & E. Dorigoni (2006) *Rev. Cienc. Farm. Bas. Aplicada* **27**: 37-49.
9. Rossi, R.C., C.L. Dias, E.M. Donato, L.A. Martins, A.M. Bergold & P.E. Fröhlich (2007) *Int. J. Pharm.* **338**: 119-24.
10. Rolim, C.M.B., L. Brum Jr, M. Fronza, M.D. Malesuik, L. Bajerski, S.L. Dalmora (2005) *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* **28**: 477-86.
11. Fronza, M., L. Brum Jr, M. Wrasse, T. Barth & S.L. Dalmora (2006) *Acta Farm. Bonaerense* **25**: 117-22.
12. Adams, E., D. Coomans, J. Smeyers-Verbeke & D.L. Massart (2001) *Int. J. Pharm.* **226**: 107-25.
13. Moore, J.W. & H.H. Flanner (1996) *Pharm. Technol.* **20**: 64-74
14. FDA (1997) "Guidance for Industry: Dissolution Testing of Intermediate Release Solid Oral Dosage Forms" Rockville: Center for Evaluation and Reserch, pp. 15-30.
15. Marcolongo, R. (2003) "Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica", Universidade de São Paulo, São Paulo, 127 p.
16. Fortunato, D. (2005) *Dissol. Technol.* **12**: 12-14.
17. Markham, A. & H.M. Bryson (1995) *Drugs* **50**: 317-33.
18. Lippuner, K., J.P. Casez, F.F. Horber & P. Jaeger (1998) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **11**: 3795-802.
19. Ferraris, J.R., P. Sorroche, S. Legal, J. Oyhamburu, P. Brandi, & T. Pasqualini, (1998) *J. Pediatr.* **4**: 533-36.
20. Ferraris, J.R., T. Pasqualini, G. Alonso, S. Legal, P. Sorroche, A.M. Galich & H. Jasper (2007) *Pediatr. Nephrol.* **5**: 734-41.
21. Biggar, W.D., L. Politano, V.A. Harris, L. Pasamano, J. Vajsar, B. Alman, A. Palladino, L.I. Comi & G. Nigro (2004) *Neuromuscul. Disord.* **14**: 476-82.
22. Biggar, W.D., V.A. Harris, L. Eliasoph & B. Alman (2006) *Neuromuscul. Disord.* **16**: 249-55
23. Angelini, C. (2007) *Muscle Nerve* **4**: 424-35.
24. Ozkan, Y., A. Savaser, C. Tas, B. Uslu & S.A. Ozkan (2003) *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **13**: 2141-56.
25. Khan, K.A. & C.T. Rhodes (1975) *J. Pharm. Pharmacol.* **27**: 48-9.
26. Corrêa, G. M., L.P. Bellé, L. Bajerski, S.H.M. Borgmann & S.G. Cardoso (2007) *Chromatographia* **65**: 591-94.
27. Pharmacopeial Previews (2004) *Pharmacopeial forum* **30**: 351-63.
28. *United States Pharmacopeia* (2007) 30<sup>th</sup> Ed., United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD.
29. Farmacopéia Brasileira 4<sup>a</sup> ed. (1996) Atheneu Editora, São Paulo.
30. Lopes. C.M., J.M.S. Lobo & P. Costa (2005) *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **41**: 455-70.
31. Görög, S. (2004) *Anal. Sci.* **20**: 67-82
32. International Conference on Harmonisation (2005) "Validation of Analytical Procedures: text and methodology", ICH, London.