



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
EDETATO DISÓDICO EN UNA SUSPENSIÓN OFTÁLMICA POR
CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

THALÍA ITZEL REBÓN GUTIÉRREZ



MÉXICO, D.F.

2013

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **MARÍA DEL SOCORRO ALPÍZAR RAMOS**
VOCAL: **JUAN MANUEL RODRÍGUEZ**
SECRETARIO: **DANIEL GARCÍA ESCANDÓN**
1er. SUPLENTE: **SILVIA REYES SALINAS**
2° SUPLENTE: **MARÍA EUGENIA IVETTE GÓMEZ SÁNCHEZ**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE CONTROL FÍSICO-QUÍMICO

DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD

ALCON LABORATORIOS S.A. DE C.V.

ASESOR DEL TEMA:

Q.B.P. Daniel García Escandón

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.F.B. María de la Luz Espinosa Colín

SUSTENTANTE:

Thalía Itzel Rebón Gutiérrez

CONTENIDO

1. Introducción	7
1.1 Objetivos	7
1.2 Marco teórico	7
1.2.1 Validación del Método Analítico	7
1.2.2 Edetato Disódico	9
1.2.3 Suspensión oftálmica	10
1.2.4 Cromatografía	10
1.2.4.1 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR ó HPLC)	11
1.2.5 Parámetros de Desempeño	16
2. Procedimiento Analítico	19
3. Reactivos, Materiales y Equipos	21
3.1 Reactivos	21
3.2 Materiales	21
3.3 Equipos	21
4. Metodología	22
4.1 Precisión	22
4.1.1 Precisión del Sistema y Adecuabilidad del Sistema	22
4.1.2 Precisión del Método (Exactitud y Repetibilidad)	23
4.2 Linealidad	23
4.2.1 Linealidad del Sistema	23
4.2.2 Linealidad del Método	25
4.3 Especificidad	26
4.3.1 Interferencia de Blanco	26
4.3.2 Interferencia de productos de degradación del analito	26
4.4 Pruebas Límite	27
4.4.1 Límite de Detección	27
4.4.2 Límite de Cuantificación	29
4.5 Precisión Intermedia	30
4.6 Tolerancia	31
4.7 Robustez	31
4.8 Estabilidad Analítica de la Muestra	32
5. Resultados	33
5.1 Precisión	33
5.1.1 Precisión del Sistema	33
5.1.2 Precisión del Método	34
5.2 Linealidad	35
5.2.1 Linealidad del Sistema	35
5.2.2 Linealidad del Método	36
5.3 Especificidad	37

5.3.1	Interferencia de Blanco	37
5.3.2	Interferencia de productos de degradación del analito	38
5.4	Pruebas Límite	45
5.4.1	Límite de Detección	45
5.4.2	Límite de Cuantificación	46
5.5	Precisión Intermedia	47
5.6	Tolerancia	48
5.7	Robustez	49
5.8	Estabilidad Analítica de la Muestra	50
6.	Fórmulas	52
6.1	Algoritmo para la cuantificación de Edetato Disódico en muestras de suspensión oftálmica	52
6.2	Algoritmo para la cuantificación de Edetato Disódico en el estándar de trabajo	52
6.3	Media aritmética	52
6.4	Desviación estándar	52
6.5	Coefficiente de variación	52
6.6	Pendiente	52
6.7	Ordenada al origen	53
6.8	Coefficiente de determinación	53
6.9	Intervalo de Confianza para la pendiente	53
6.10	Intervalo de Confianza para la ordenada al origen	53
6.11	Intervalo de Confianza para la media poblacional	53
6.12	Coefficiente de variación de la regresión	53
7.	Análisis de Resultados	54
7.1	Precisión	54
7.1.1	Precisión del Sistema	54
7.1.2	Precisión del Método	54
7.2	Linealidad	54
7.2.1	Linealidad del Sistema	54
7.2.2	Linealidad del Método	55
7.3	Especificidad	55
7.3.1	Interferencia de Blanco	55
7.3.2	Interferencia de productos de degradación del analito	55
7.4	Pruebas Límite	56
7.4.1	Límite de Detección	56
7.4.2	Límite de Cuantificación	56
7.5	Precisión Intermedia	57
7.6	Tolerancia	57
7.7	Robustez	58
7.8	Estabilidad Analítica de la Muestra	58
8.	Conclusiones	59

9. Anexos	60
9.1 Áreas obtenidas durante el análisis	60
9.1.1 Precisión	60
9.1.1.1 Precisión del Sistema	60
9.1.1.2 Precisión del Método	60
9.1.2 Linealidad	61
9.1.2.1 Linealidad del Sistema	61
9.1.2.2 Linealidad del Método	62
9.1.3 Especificidad	63
9.1.3.1 Interferencia de productos de degradación del analito	63
9.1.4 Pruebas Límite	66
9.1.4.1 Límite de Detección	66
9.1.4.2 Límite de Cuantificación	67
9.1.5 Precisión Intermedia	68
9.1.6 Tolerancia	69
9.1.7 Robustez	70
9.1.8 Estabilidad Analítica de la Muestra	72
10. Referencias	76

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Objetivos.

- Determinar de manera experimental la confiabilidad del método para cuantificar Edetato Disódico en una suspensión oftálmica con concentración de 0.01% por cromatografía de líquidos de alta resolución.
- Demostrar experimentalmente que el método de análisis ME.C01.2ATP.4804.R01.WI “Ensayo de Edetato Disódico por HPLC”, cumple con los parámetros de validación establecidos en la “Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Q.F.B.’s” y el Protocolo de Validación.

1.2 Marco Teórico

1.2.1 Validación del método analítico ^{1, 2, 5, 9, 10, 11}

A través de los años, químicos analistas en las áreas farmacéuticas y biomédicas han aprendido cómo demostrar que sus métodos pueden garantizar resultados confiables. Después de la llegada de las Buenas Prácticas de Laboratorio, se conoce esta evaluación como validación de métodos analíticos.

La validación del método analítico es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada. Es el proceso usado para confirmar que el procedimiento analítico empleado para una prueba en específico es adecuado para su uso.

Los resultados de la validación del método analítico pueden ser usados para juzgar la calidad, confiabilidad y consistencia de los resultados analíticos; es una parte integral de cualquier buena práctica de análisis.

Los métodos analíticos necesitan ser validados o revalidados:

- Antes de su introducción al uso rutinario.
- Siempre que las condiciones cambien para el cual el método ha sido validado.

- Siempre que el método se haya cambiado y el cambio está fuera del alcance original del método.

La validación de un método analítico permite conseguir objetivos técnicos y al mismo tiempo exigencias legales en la industria farmacéutica y en la de fabricación de sustancias activas.

La NOM-059-SSA1-2006, “Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos”, indica que los métodos analíticos que no sean farmacopeicos deben ser validados de acuerdo a un protocolo aprobado y que sean utilizados para: Evaluación de fármacos y aditivos, Evaluación de producto a granel, en proceso y terminado, Validaciones y Estudios de Estabilidad.

Existen 3 tipos de validación:

Validación prospectiva

Se define como aquella que establece mediante la evidencia documentada obtenida en forma experimental, si un proceso se comporta consistentemente. Su desarrollo requiere de la elaboración previa de un protocolo experimental. Es indispensable cuando los productos son estériles, nuevos, en el caso particular de nuestro país también cuando se pretende exportar a la Unión Americana y la Comunidad Económica Europea, ya que en estos países es la única aceptada.

Validación retrospectiva

Es aquella que se aplica cuando se cuenta con la evidencia documentada de que el sistema desempeña lo que se propuso hacer, basada en la revisión y análisis histórico de la información del proceso.

Validación concurrente

Establece la evidencia documentada de que el proceso hace lo que se propuso hacer, basada en los resultados obtenidos de lotes destinados para la venta de producto y generados durante el desarrollo del proceso. Este tipo de validación es empleada en casos de fabricación esporádica, de fabricación de productos de alto riesgo o en maquilas.

1.2.2 Edetato Disódico ^{3, 4, 13}

Un excipiente se define como cualquier sustancia, distinta del ingrediente farmacéutico activo o del producto farmacéutico, que ha sido evaluada de manera apropiada respecto a su seguridad y que se incluye en un sistema de liberación de fármacos para ayudar al procesamiento del mismo durante su fabricación; para proteger, mantener o mejorar la estabilidad, biodisponibilidad o aceptación por parte del paciente; para ayudar a la identificación del producto o mejorar cualquier otro atributo general de seguridad y eficacia del sistema de liberación de fármacos durante el almacenamiento o el uso.

El edetato disódico es un excipiente usado como un agente quelante en un amplio rango de preparaciones farmacéuticas, incluyendo enjuague bucal, preparaciones oftálmicas, y preparaciones tópicas, típicamente a concentraciones de entre 0.005 y 0.1% p/v.

Forma complejos estables solubles en agua con iones alcalinotérreos y metales pesados. La forma quelada tiene pocas de las propiedades del ion libre, y por esta razón los agentes quelantes son descritos como “removedores” de iones de la solución, un proceso conocido como secuestro. La estabilidad de complejo metal-edetato depende del ión metálico y del pH.

El edetato disódico es asociado con pocos efectos adversos cuando es usado como excipiente en formulaciones farmacéuticas.

También, la biodisponibilidad tópica de los fármacos oftálmicos ha sido reportada que aumenta, mejorando la permeabilidad en la córnea con sustancias apropiadas (como edetato disódico o BAC), los cuales son conocidos como promotores de la absorción.

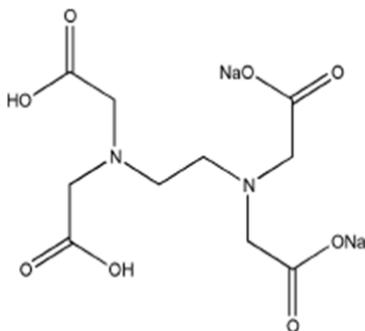


Fig. 1 Estructura química de Edetato Disódico

1.2.3 Suspensión Oftálmica ^{8, 14}

Las suspensiones oftálmicas son preparaciones líquidas estériles que contienen partículas sólidas dispersas en un vehículo líquido destinadas a la aplicación ocular. Es imperativo que tales suspensiones contengan el fármaco en forma micronizada para evitar la irritación y la excoiación de la córnea.

El principio activo insoluble debe responder a una granulometría especial. En la práctica se aceptan, con un tamaño de partícula de 90.0 por ciento menor de 10 μ m, 99.0 por ciento menor de 20 μ m y ninguna partícula que supere las 50 μ m. En estas formulaciones es importante el uso de polisorbatos, ya que los mismos favorecen la suspendibilidad de los principios activos.

1.2.4 Cromatografía ^{6, 7}

Según define la IUPAC, “La Cromatografía es un método, usado primariamente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra se mueve. La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido retenidos sobre un sólido o un gel. La fase estacionaria puede estar extendida como una capa o distribuida como una película, etc. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa”.

Las clasificaciones permiten un estudio más ordenado de tópicos. Se clasifican las modalidades cromatográficas en función de varios parámetros.

- **La naturaleza de la fase móvil.** Si la fase móvil es un gas, la modalidad cromatográfica se denomina gaseosa (GC) y si es un líquido, cromatografía líquida (LC). A este último grupo pertenecen la cromatografía en capa delgada (TLC), la cromatografía líquida en columna abierta, y la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). A pesar de las diferencias entre las distintas modalidades, los principios que representan la separación son los mismos en todos los casos.
- **La naturaleza de la fase estacionaria.** Si la fase estacionaria es un sólido y la fase móvil un líquido, la cromatografía se denomina cromatografía líquido-sólido (LSC). Análogamente, existirán una cromatografía líquido-líquido (LLC), gas-líquido (GLC) y gas sólido (GC).
- **El fenómeno que ocurre dentro de la columna.** Así, la cromatografía puede clasificarse en modalidades de afinidad y por tamaño molecular. Entre las

primeras se encuentran la cromatografía en fase normal, en fase ligada y la de intercambio iónico. Entre las segundas se encuentran la GPC y GFC. En las modalidades de afinidad, el analito interactúa directa o indirectamente, a través del solvente, con la fase estacionaria, mientras que en las separaciones por tamaño molecular no existe ninguna interacción con la fase estacionaria.

- **La cantidad de muestra aplicada.** Si la cromatografía seleccionada para una separación no destruye la muestra (TLC, HPLC o columna abierta) es posible recuperar el analito separado de su matriz a la salida de la columna. Aumentando la cantidad de muestra es posible obtener desde microgramos hasta kilogramos de una sustancia pura en una sola corrida.

1.2.4.1 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR ó HPLC) ^{7,8}

La cromatografía de líquidos de alta resolución, como cualquier otro método cromatográfico, es una herramienta sumamente útil para el análisis cuantitativo de mezclas de sustancias. El rápido crecimiento que este método analítico ha experimentado en las últimas décadas, si bien se debe a diversos factores, se basa fundamentalmente en la simplicidad con la cual se obtienen por HPLC resultados cuantitativos. Actualmente el HPLC es capaz de cuantificar tanto impurezas en muy bajas concentraciones como macrocomponentes con niveles de precisión tan bajos como 0.5%, y aún menores. Como todo método de análisis cuantitativo, está compuesto de diversos pasos, estos son:

- **Muestreo.** El muestreo es una etapa crítica en todo método de análisis. Los líquidos pueden muestrearse directamente, previa homogeneización, y los sólidos o semisólidos deben someterse a algún procedimiento que permita asegurar que la muestra extraída sea representativa.
- **Preparación de la muestra.** La preparación de las muestras es una etapa decisiva en todo método de análisis en especial en la determinación de microcomponentes (trazas) y en los casos donde la matriz que rodea al analito es muy compleja. La naturaleza de la muestra dicta el modo básico de preparar la solución a inyectar. Si la muestra es líquida puede inyectarse directamente previa filtración, en cambio si es un sólido es necesario triturarlo y homogeneizarlo apropiadamente, y posteriormente las sustancias a analizar presentes en la matriz sólida deben solubilizarse en un solvente adecuado.

- **Inyección de la muestra.** Habitualmente, el volumen de inyección se selecciona de acuerdo a la longitud y diámetro de la columna que se desea utilizar.
- **Separación Cromatográfica.** Los errores cromatográficos resultan de la interacción del analito con el instrumento, de la descomposición del analito o de la separación en sí misma. La interacción del analito con el equipo cromatográfico o con la fase móvil es un fenómeno bastante raro. Las deficiencias en la separación pueden surgir del desarrollo de los métodos de análisis o de su aplicación rutinaria. Para minimizar estos errores se deben controlar los parámetros cromatográficos, los cuales son: factor de capacidad (k'), factor de coeio y resolución (R).
- **Detección.** Los errores más comunes que surgen de la detección se refieren a la falta de estabilidad, sensibilidad o linealidad. Estos problemas son poco frecuentes con los detectores UV debido a la simplicidad de la detección ultravioleta y al desarrollo que los mismos han experimentado en los últimos años. En la selección de las condiciones óptimas para la cuantificación en HPLC utilizando un detector UV deben considerarse la longitud de onda de trabajo, el ancho de banda instrumental y la constante de tiempo del detector.
- **Integración de la Señal.** La señal generada por el detector se transmite a los registradores o integradores. Los primeros grafican el pico y su área debe medirse manualmente, mientras los segundos transforman la señal analógica en digital, calculan el área o altura de los picos y efectúan una serie de operaciones programadas generando finalmente un reporte analítico.
- **Cálculo de la concentración del analito.** La concentración de analito en la muestra se puede calcular por diferentes métodos, a saber:
 - Normalización interna
 - Estándar externo
 - Estándar interno
 - Estándar agregado

La selección del método más adecuado depende del tipo de muestra, del nivel de precisión requerido y de la existencia o no de sustancias de referencia.

La migración diferencial en la CLAR es resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil. Dichos componentes se separan en la columna y al salir de ésta son conducidos por la fase

móvil en el orden en que emergieron, hacia un detector donde se registra una respuesta proporcional a su cantidad, sus concentraciones y sus tiempos de retención en la columna. El cromatograma resultante muestra cada compuesto que sale de la columna en forma de picos simétricos con un tiempo de retención característico por lo que este tiempo puede emplearse para identificar el compuesto.

La separación entre dos picos, o resolución, depende tanto de la selectividad como de la eficiencia cromatográfica.

La selectividad es una función de la retención que la molécula tiene a lo largo del proceso de separación, y está reflejado por el factor de capacidad (k').

$$k' \frac{t}{t_0} - 1 \text{ ó } k' \frac{t - t_0}{t_0}$$

La selectividad de una columna, también referida como retención relativa o separación entre picos (α), es la relación entre los factores de capacidad (k') de dos picos adyacentes:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \text{ ó } \alpha = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0}$$

Por su parte, la eficiencia es un indicador del ensanchamiento de un pico durante su separación, y está reflejada por el número de platos teóricos (N) de la columna en donde se realiza el proceso cromatográfico:

$$N = 16 \left(\frac{t}{W} \right)^2$$

Donde:

t = Tiempo de retención de la sustancia

W = Ancho de la base del pico obtenido extrapolando los lados del pico hasta la línea base, en las mismas unidades de tiempo que t .

Por lo anterior, la resolución (R) puede expresarse en términos de selectividad y eficiencia de la siguiente manera:

$$R = \frac{N}{4} (\alpha - 1) \left(\frac{k}{1 + k} \right)$$

En donde k es el promedio de k'_1 y k'_2 .

Esta ecuación permite controlar la resolución (R) variando el factor de selectividad (α), la eficiencia de la columna (N), o bien, el factor de capacidad (k').

Equipo

Un cromatógrafo de líquidos de alta resolución consta de las siguientes partes:

- a) **Sistema de Bombeo.** Tiene por objeto impulsar la fase móvil a través de la columna y debe cumplir ciertas especificaciones como reproducibilidad y precisión, manteniendo un flujo laminar y de velocidad constante.
- b) **Sistema de Inyección.** Un factor muy importante para obtener una buena resolución en la separación es la adecuada introducción de la muestra en el sistema. La manera ideal de introducir o inyectar la muestra es en forma de "paquete" pequeño ya que esto ayuda en la obtención de picos simétricos y angostos.
- c) **Detector.** Puede ser de dos tipos: Tipo 1.- Aquellos que miden alguna propiedad de la fase móvil, y Tipo 2.- Aquellos que miden alguna propiedad del analito. La selección del detector estará basada en las propiedades del o los solutos que se deseen analizar.
- d) **Columna.** Se considera a la columna como parte fundamental de la cromatografía ya que es en ésta, donde se va a llevar a cabo la separación. El material de empaque seleccionado dependerá básicamente de la separación que se desee hacer. Las dimensiones de una columna dependerán también del tipo de separación que se desee hacer.
- e) **Registrador de señales.** Al emerger un compuesto ya separado en la columna y pasar por el detector, la señal que provoca en éste debe ser registrada por un graficador, un integrador o un sistema computarizado de procesamiento de datos. El uso de integradores electrónicos evita los errores en la medición de las áreas. Estos integradores registran las señales e imprimen el área de los picos en forma numérica. Por último, el empleo de una computadora y el software adecuado puede facilitar el procesamiento de los datos, desde el algoritmo empleado para la integración, hasta la construcción de curvas de calibración y cuantificación de los picos.

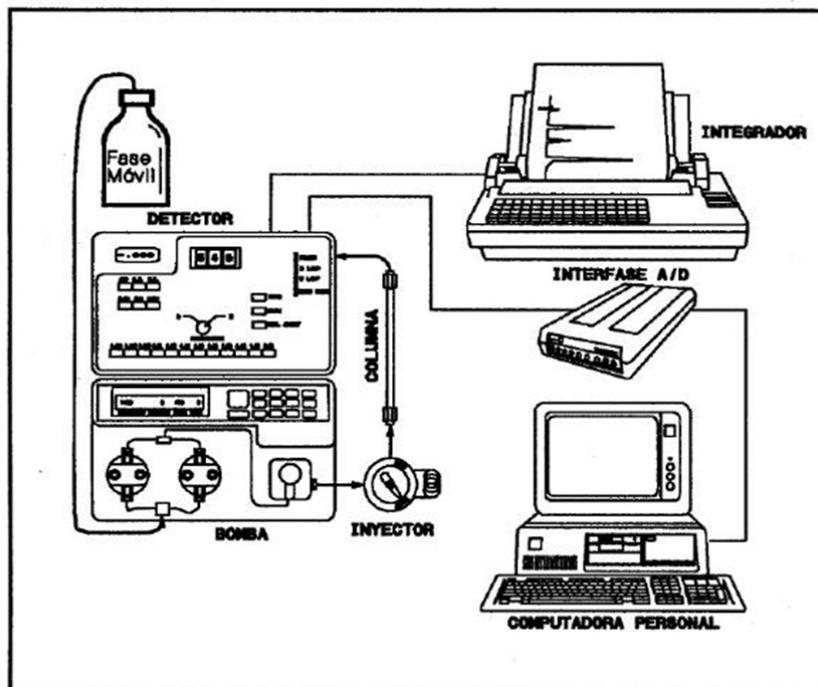


Fig. 2 Esquema de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

Es conveniente preparar una curva de calibración a concentraciones adecuadas, a las condiciones especificadas para el fármaco en análisis, así como inyectar blancos para poder detectar alguna posible interferencia.

Para asegurar la efectividad del sistema, es necesario someterlo a una prueba antes de utilizarse. La esencia de este tipo de pruebas es el concepto de que el equipo en general, las partes electrónicas, las operaciones analíticas y la muestra, constituyen un sistema analítico completo el cual puede someterse a una prueba general de funcionamiento del sistema.

Algunas veces es útil establecer un factor de coleo para limitar el máximo permisible con relación a la asimetría del pico. El factor de coleo T , se define como la relación de la distancia del ancho del pico, $W_{0.05}$, dividido entre dos veces la distancia, f , del máximo del pico hacia el lado izquierdo del pico. Estas distancias deben medirse a un punto que corresponda a un 5 por ciento de la altura partiendo de la línea base. Para un pico simétrico el factor de coleo es la unidad y el valor de T aumenta conforme el coleo va siendo más pronunciado. El cálculo se expresa por la fórmula:

$$\text{Factor de Coleo} = T = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

1.2.5 Parámetros de Desempeño ¹

En función de la aplicación analítica de un método, la siguiente tabla indica los parámetros de desempeño a estudiar:

Parámetro de Desempeño	Contenido/ Potencia/ Valoración	Pruebas de Impurezas		Identificación
		Contenido/ Valoración	Límite	
Precisión/ Adecuabilidad del Sistema	SI	SI	SI	*
Linealidad del Sistema	SI	SI	NO	NO
Especificidad	SI	SI	SI	SI
Exactitud y Repetibilidad	SI	SI	NO	NO
Linealidad del Método	SI	SI	NO	NO
Precisión Intermedia	SI	SI	NO	NO
Estabilidad Analítica de la Muestra	*	*	NO	NO
Límite de Detección	NO	NO	SI	NO
Límite de Cuantificación	NO	SI	NO	NO
Robustez	*	*	*	NO
Tolerancia	*	*	*	NO

*Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método.

1.- La falta de especificidad de un método analítico, puede ser compensada por otra alternativa analítica de soporte, como por ejemplo cromatografía de capa fina.

2.-También es definido como un estudio de tolerancia.

3.- Un método que es exacto y lineal, por definición es específico al placebo analítico o a los otros componentes de la muestra.

PRECISIÓN

Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o una referencia.

LINEALIDAD

Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado.

ESPECIFICIDAD

Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra.

EXACTITUD

Concordancia entre el valor obtenido empleando el método y el valor de referencia

REPETIBILIDAD.

Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista usando los mismos instrumentos y métodos.

PRECISION INTERMEDIA

Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas, en distintos días.

ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA.

Propiedad de una muestra, preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

LÍMITE DE DETECCIÓN

Mínima cantidad de analito en una muestra la cual puede ser detectada pero no cuantificada como un valor exacto.

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Mínima cantidad de analito en una muestra, la cual puede ser determinada cuantitativamente con una precisión y exactitud definida; bajo condiciones experimentales normales.

ROBUSTEZ.

Capacidad del método analítico a mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método.

TOLERANCIA.

Reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos, por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación, como puede ser: equipos, columnas. Se refiere a factores externos del método.

2. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

Cuantificación de Edetato Disódico Dihidratado

El ensayo utiliza la complejación de edetato disódico con el ión cúprico (Cu^{2+}) para formar Edetato Cúprico el cual absorbe a 254nm. El edetato cúprico es analizado usando una columna C18 y una fase móvil que contiene Acetato de Tetrabutilamonio. Las sales de tetrabutilamonio son usadas para asociarse con el edetato cúprico e incrementar la lipo-afinidad y generar una separación de los iones de cobre no complejados.

Preparación de la muestra.

Pesar 1.5 g de muestra en un matraz volumétrico de 10.0 mL, adicionar 100 μL de solución de sulfato de cobre, diluir y llevar al aforo con agua purificada. Mezclar bien las muestras y dejar reposar por lo menos 10 minutos. Después de que el paso de la complejación está completo, es necesario centrifugar todas las muestras de la suspensión antes de inyectar. Transferir una porción de la muestra al tubo de prueba. Centrifugar por 30 minutos a 3500 rpm hasta que el sobrenadante sea claro. Se transfiere el sobrenadante a un vial para HPLC para inyección. Se realiza la inyección de la muestra por HPLC a 254 nm.

Preparación del estándar de Trabajo.

El estándar se prepara pesando 50 mg de estándar de referencia secundario de Edetato disódico en un matraz volumétrico de 50.0 mL y se lleva al aforo con agua purificada. Se toma una alícuota de 2.5 mL de la solución anterior y se transfiere a un matraz volumétrico de 25.0 mL, diluir con agua purificada. Por último, se toma una alícuota de 3.0 mL de la solución anterior y se transfiere a un matraz volumétrico de 20.0 mL, adicionar 200 μL de la solución de sulfato de cobre, diluir y llevar al foro con agua purificada. Dejar reposar por lo menos 10 minutos. Se realiza la inyección del estándar por HPLC a 254 nm.

Preparación del blanco de reactivo.

El blanco se prepara adicionando 100 μ L de Sulfato de Cobre a un matraz volumétrico de 10mL y se lleva al aforo con agua purificada. Se realiza la inyección del blanco por HPLC a 254 nm.

Equipo

Sistema HPLC con detector UV capaz de operar a 214nm.

Columna para HPLC YMC-Pack, ODS-AM 150x4.6mm S-5 μ m, 12mm.

Parámetros Cromatográficos del Sistema :

Platos teóricos	N Mayor ó igual a 2000
Factor de Coleo	T Menor o igual a 2.0
RSD:	$\leq 2\%$

Condiciones Cromatográficas :

Velocidad de Flujo 1.0 mL/min, para columnas YMC y Phenomenex

El pico de edetato disódico presenta un tiempo de retención aproximado de entre 4 a 8 minutos.

Volumen de inyección 20 μ L

Longitud de onda 254 nm

3. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

3.1 Reactivos

- Estándar de edetato disódico
- Buffer de tetrabutilamonio pH 4.5
- Sulfato de cobre
- Acetato de sodio trihidratado
- Hidróxido de tetrabutilamonio 40% acuoso
- Acetonitrilo HPLC
- Ácido acético glacial
- Peróxido de hidrógeno 30%
- Ácido clorhídrico concentrado
- Hidróxido de amonio 28.0-30.0%

3.2 Materiales

- Matraces volumétricos de 10.0mL, 20.0mL, 25.0mL, 50.0mL, 100.0mL y 200.0mL.
- Pipetas volumétricas de 1.0mL, 2.0mL, 2.5mL, 3.0mL, 4.0mL, 5.0mL, 6.0mL, 7.0mL, 8.0mL, 10.0mL y 15.0mL.
- Micropipeta de 1000 μ L
- Tubos de ensayo
- Tubos para centrifuga
- Viales para HPLC

3.3 Equipos

- HPLC Waters Modelo Alliance 2695.
- Centrifuga Beckman Modelo X22 Allegra.
- Balanza Analítica Mettler Toledo Modelo XS205DU.
- Potenciómetro Beckman Modelo ϕ 720.
- Estufa de Temperatura Variable Lindenberg Blue Modelo V0914A.

4. METODOLOGÍA

4.1 PRECISIÓN

4.1.1 PRECISIÓN DEL SISTEMA Y ADECUABILIDAD DEL SISTEMA.

PROCEDIMIENTO

Un analista debe preparar por lo menos un sextuplicado de soluciones a la concentración nominal de trabajo del estándar 0.015 mg/ml (100% del analito en estudio) preparadas por diluciones independientes, utilizando estándar de referencia secundario de edetato disódico.

Solución stock de 1 mg/mL de edetato disódico dihidratado (Solución A).

Pesar exactamente aproximadamente 50 mg de estándar de edetato disódico en un matraz volumétrico de 50.0 mL, adicionar agua purificada, solubilizar y llevar al aforo con agua purificada. La concentración final aproximada será de 1.0mg/mL.

Solución Estándar 0.1 mg/mL de edetato disódico dihidratado (Solución B).

Transferir una alícuota de 2.5 mL de la Solución A (1.0 mg/mL) a un matraz volumétrico de 25.0 mL, diluir y llevar al aforo con agua purificada. La concentración final es de 0.1 mg/mL.

Solución Estándar de Trabajo 0.015 mg/mL de edetato disódico (Solución C).

Transferir una alícuota de 3.0 mL de la Solución B (0.1 mg/mL) a un matraz volumétrico de 20.0 mL, adicionar 200 µL de solución de sulfato de cobre, diluir y llevar al aforo con agua purificada. Dejar por lo menos 10 minutos para la completa complejación cobre-EDTA antes de usar. La concentración final es de 0.015 mg/mL de edetato disódico

REPORTE DE DATOS.

Tabular los resultados y calcular los siguientes datos estadísticos:

- Media de los datos.
- Desviación estándar.
- Coeficiente de variación o desviación estándar relativa (%RSD).
- Adecuabilidad del Sistema.

4.1.2 PRECISIÓN DEL MÉTODO (EXACTITUD Y REPETIBILIDAD).

PROCEDIMIENTO

Determinar que la respuesta al 100 % del analito es precisa en presencia de excipientes.

Preparar 6 muestras independientes de producto adicionado al 100 % de acuerdo con el método analítico e inyectar una vez.

Transferir una alícuota de 2.0 g de la muestra de producto terminado a un matraz volumétrico de 20.0 mL, adicionar una alícuota de 1.0 mL de la Solución B. Adicionar 200 μ L de la solución de sulfato de cobre, diluir y llevar a volumen con agua purificada. Mezclar bien y dejar en reposo por lo menos 10 minutos. Centrifugar por 30 minutos a 3500 rpm hasta que el sobrenadante sea claro. Transferir a un vial para inyección en HPLC.

REPORTE DE DATOS

Tabular los resultados y calcular los siguientes datos estadísticos:

- Media de los datos.
- Desviación estándar.
- Coeficiente de variación o desviación estándar relativa (% RSD).

En la determinación de Precisión reportar:

- % de Recobro
- Intervalo de confianza de la media poblacional IC(μ).

4.2 LINEALIDAD

4.2.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

PROCEDIMIENTO

Preparar una curva con 5 niveles de concentración de estándar, por triplicado.

La curva será construida con los siguientes niveles de concentración: 50 %, 75 %, 100 %, 125 % y 150 %, siendo las concentraciones las siguientes: 0.0075, 0.01125, 0.015, 0.01875 y 0.0225 mg/mL aproximadamente.

Solución stock de 1.0 mg/mL de edetato disódico dihidratado (Solución A).

Pesar exactamente aproximadamente 50 mg de estándar de edetato disódico

dihidratado en un matraz volumétrico de 50.0 mL, adicionar agua purificada, solubilizar y llevar al aforo con agua purificada. La concentración final aproximada será de 1.0mg/mL.

Solución Estándar 0.075 mg/mL de edetato disódico (Solución D).

Transferir un alícuota de 15.0 mL de la Solución A (1.0 mg/mL) a un matraz volumétrico de 200.0 mL, diluir y llevar al aforo con agua purificada. La concentración final es de 0.075 mg/mL.

A partir de esta última solución preparar la curva de linealidad de acuerdo con la Tabla No I.

Tabla No. I Curva para Linealidad del Sistema

Nivel %	Alícuota de Solución D (0.075mg/mL) (mL)	Volumen adicionado de sulfato cúprico (µL)	Volumen final aforo con agua (mL)	Conc. teórica final (mg/mL)
50	2.0	200	20	0.00750
75	3.0	200	20	0.01125
100	4.0	200	20	0.01500
125	5.0	200	20	0.01875
150	6.0	200	20	0.02250

REPORTE DE DATOS

Tabular los resultados y calcular los siguientes datos estadísticos:

- Pendiente (b_1) de la curva.
- Intercepto en Y u ordenada al origen (b_0).
- Relación respuesta vs concentración para cada punto de la curva.
- % de RSD para el cálculo de la relación respuesta/concentración para el conjunto de curvas.
- Intervalo de confianza para la pendiente IC (β_1).
- Coeficiente de determinación (r^2) y Coeficiente de correlación (r).

4.2.2 LINEALIDAD DEL METODO.

PROCEDIMIENTO

Esta prueba se realiza preparando una curva de calibración con producto adicionado con estándar de edetato disódico en tres niveles de concentración (50 %, 100 % y 150 %) correspondientes a 0.0075, 0.015 y 0.0225 mg/mL de EDTA. De acuerdo con la Tabla No. II.

Solución stock de 1.0 mg/mL de edetato disódico dihidratado (Solución A).

Pesar exactamente aproximadamente 50 mg de estándar de EDTA en un matraz volumétrico de 50.0 mL, adicionar agua purificada, solubilizar y llevar al aforo con agua purificada. La concentración final aproximada será de 1.0mg/mL.

Solución Estándar 0.05 mg/mL de edetato disódico (Solución E).

Transferir una alícuota de 5.0 mL de la Solución A (1.0 mg/mL) a un matraz volumétrico de 100.0 mL, diluir y llevar al aforo con agua purificada. La concentración final es de 0.05 mg/mL.

Tabla No. II Linealidad del Método

Nivel %	Cantidad de muestra (0.10mg/mL) (g)	Cantidad de EDTA en muestra (mg)	Alícuota de Solución E (0.05mg/mL) (mL)	Cantidad de EDTA adicionado (mg)	Cantidad total de EDTA (mg)	Volumen de solución de sulfato cúprico (μ L)	Volumen final aforo con agua (mL)	Conc. teórica final (mg/mL)
50	1.0	0.1	1.0	0.05	0.15	200	20.0	0.00750
100	1.0	0.1	4.0	0.20	0.30	200	20.0	0.0150
150	1.0	0.1	7.0	0.35	0.45	200	20.0	0.0225

REPORTE DE DATOS

Tabular los resultados y calcular los siguientes datos estadísticos:

- Pendiente (b_1)
- Intercepto en Y u ordenada al origen (b_0)
- Coeficiente de determinación (r^2) y Coeficiente de correlación (r).
- % de Recobro
- CV
- Relación cantidad adicionada vs cantidad recuperada
- Intervalo de confianza para la pendiente IC (β_1)
- Intervalo de confianza para ordenada al origen IC(β_0)
- Intervalo de confianza para la media poblacional IC(μ)

4.3 ESPECIFICIDAD.

4.3.1 INTERFERENCIA DE BLANCO

PROCEDIMIENTO

Determinar la respuesta de agua purificada, Fase Móvil y Blanco, en condiciones cromatográficas normales.

REPORTE DE DATOS

- Anexar cromatogramas de cada muestra analizada de acuerdo al método.

4.3.2 INTERFERENCIA DE PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DEL ANALITO

PROCEDIMIENTO

Determinar la respuesta por triplicado del estándar de trabajo (0.015 mg/mL) y de la muestra, y someter a 4 vías de degradación, de acuerdo a la Tabla No. III.

Tabla No. III Condiciones a evaluar en la prueba de Especificidad.

Vía de degradación	Condición de análisis	Volumen adicionado de reactivo (µL)
Básica (NH ₄ OH 30%)	2 horas, 80°C	200
Ácida (HCl conc.)	2 horas, 80°C	200
Calor	5 horas y 24 horas, 80°C	NA
Peróxido al 30%	1 hora, 80°C	200

REPORTE DE DATOS

- Anexar cromatogramas de cada muestra analizada de acuerdo al método. Se debe incluir la respuesta de la solución estándar intacta.
- Las respuestas pueden ser sobrepuestas para ser comparadas y observar las diferentes señales del analito en estudio y sus posibles productos de degradación.

4.4 PRUEBAS LÍMITE

4.4.1 LÍMITE DE DETECCIÓN

PROCEDIMIENTO

Preparar una curva con 7 niveles de concentración estándar, por triplicado.

La curva será construida con los siguientes niveles de concentración: 0.5%, 1%, 2%, 4%, 6%, 8% y 10%, siendo las concentraciones las siguientes: 0.000075, 0.00015, 0.0003, 0.0006, 0.0009, 0.0012 y 0.0015 mg/mL aproximadamente.

Solución Stock Estándar 1.0mg/mL de edetato disódico dihidratado (Solución A).

Pesar exactamente aproximadamente 50 mg de estándar de edetato disódico dihidratado en un matraz volumétrico de 50.0 mL, adicionar agua purificada y solubilizar. Llevar al aforo con agua purificada. La concentración final aproximada será de 1.0 mg/mL de edetato disódico.

Solución Estándar 0.075 mg/mL de edetato disódico (Solución D).

Transferir un alícuota de 15.0 mL de la Solución A (1.0 mg/mL) a un matraz volumétrico de 200.0 mL, diluir y llevar al aforo con agua purificada. La concentración final es de 0.075 mg/mL.

Solución Estándar 0.00375 mg/mL de edetato disódico (Solución F).

Transferir una alícuota de 5.0mL de la Solución D (0.075 mg/mL) a un matraz volumétrico de 100.0mL, diluir y llevar al aforo con agua purificada. La concentración final es de 0.00375 mg/mL.

A partir de esta última solución, preparar la curva de linealidad de acuerdo con la Tabla No. IV.

Tabla No. IV Curva para Límite de Detección.

Nivel %	Alícuota de Solución F (0.00375 mg/mL) (mL)	Volumen adicionado de sulfato de cobre (μ L)	Volumen final aforar con agua (mL)	Concentración teórica (mg/mL)
0.5	0.5	250	25	0.000075
1	1.0	250	25	0.00015
2	2.0	250	25	0.0003
4	4.0	250	25	0.0006
6	6.0	250	25	0.0009
8	8.0	250	25	0.0012
10	10.0	250	25	0.0015

REPORTE DE DATOS

Tabular los resultados y calcular los siguientes datos estadísticos:

- Pendiente
- Intercepto Y

- Relación respuesta/concentración
- %RSD para el cálculo de relación respuesta/concentración para todos los puntos de la curva.
- Coeficiente de correlación para respuesta contra concentración.
- Calcular el límite de detección con la siguiente ecuación:

$$\frac{3.3 \times S_{b_0}}{b_1}$$

4.4.2 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

PROCEDIMIENTO

Preparar una curva con 5 niveles de concentración estándar, por triplicado.

La curva será construida con los siguientes niveles de concentración: 2%, 4%, 6%, 8% y 10%, siendo las concentraciones las siguientes: 0.0003, 0.0006, 0.0009, 0.0012 y 0.0015 mg/mL aproximadamente.

Solución Stock Estándar 1.0mg/mL de edetato disódico dihidratado (Solución A).

Pesar exactamente aproximadamente 50 mg de estándar de edetato disódico dihidratado en un matraz volumétrico de 50.0 mL, adicionar agua purificada y solubilizar. Llevar al aforo con agua purificada. La concentración final aproximada será de 1.0 mg/mL de edetato disódico.

Solución Estándar 0.075 mg/mL de edetato disódico (Solución D).

Transferir un alícuota de 15 mL de la Solución A (1.0 mg/mL) a un matraz volumétrico de 200.0 mL, diluir y llevar al aforo con agua purificada. La concentración final es de 0.075 mg/mL.

Solución Estándar 0.00375 mg/mL de edetato disódico (Solución F).

Transferir una alícuota de 5.0mL de la Solución D (0.075 mg/mL) a un matraz volumétrico de 100.0mL, diluir y llevar al aforo con agua purificada. La concentración final es de 0.00375 mg/mL.

A partir de esta última solución, preparar la curva de linealidad de acuerdo con la Tabla No. V.

Tabla No. V Curva para Límite de Cuantificación.

Nivel %	Alícuota de Solución F (0.00375 mg/mL) (mL)	Volumen adicionado de sulfato de cobre (μ L)	Volumen final aforar con agua (mL)	Concentración teórica (mg/mL)
2	2.0	250	25	0.0003
4	4.0	250	25	0.0006
6	6.0	250	25	0.0009
8	8.0	250	25	0.0012
10	10.0	250	25	0.0015

REPORTE DE DATOS

Tabular los resultados y calcular los siguientes datos estadísticos:

- Pendiente
- Intercepto Y
- Relación respuesta/concentración
- %RSD para el cálculo de relación respuesta/concentración para todos los puntos de la curva.
- Coeficiente de correlación para respuesta contra concentración.
- Calcular el límite de cuantificación con la siguiente ecuación:

$$\frac{10 \times S_{b_0}}{b_1}$$

4.5 PRECISION INTERMEDIA.

PROCEDIMIENTO

Determinar el % de activo en muestras de producto terminado por triplicado, por 2 diferentes analistas en 2 diferentes días, usando el mismo estándar de referencia y equipo, de acuerdo con el método analítico.

REPORTE DE DATOS.

Tabular los resultados y calcular los siguientes datos estadísticos:

- Media de los datos.
- Desviación estándar.
- Coeficiente de variación o desviación estándar relativa (%RSD).
- Adecuabilidad del Sistema.

4.6 TOLERANCIA

PROCEDIMIENTO

Analizar una muestra de producto final por triplicado de acuerdo con el método analítico, usando una columna como alternativa, por un analista en un mismo día.

La columna alternativa a la usada descrita en el método analítico es una columna Phenomenex Luna ODS(2) de 150 x 4.6 mm, 5 µm.

REPORTE DE DATOS

- Calcular la media de los resultados.
- Desviación estándar
- %CV

4.7 ROBUSTEZ.

PROCEDIMIENTO

Analizar una muestra de producto final por triplicado contra un estándar, modificando los parámetros cromatográficos del método indicados en la Tabla No. VI.

Tabla No. VI Condiciones a evaluar en la prueba de Robustez

Parámetro modificado	Condición base	Condición alternativa	Condición alternativa
Proporción de fase móvil	86% Buffer TBHA pH 4.5 14% Acetonitrilo	80% Buffer TBHA pH 4.5 20% Acetonitrilo	90% Buffer TBHA pH 4.5 10% Acetonitrilo
pH Buffer	4.5	4.0	5.0
Flujo (mL/min)	1.0	0.8	1.2

REPORTE DE DATOS

- Calcular los parámetros cromatográficos de adecuabilidad del sistema para cada condición.
- Reportar el contenido para las muestras de la condición normal de operación y las muestras de las condiciones alternas.
- Diferencia media absoluta entre la condición normal y la condición alterada, menor o igual al 2 % expresada en %.

4.8 ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA

PROCEDIMIENTO

Preparar por triplicado la muestra y el estándar de trabajo, y vaciar en viales. Cuantificar con estándar recientemente preparado en un lapso de tiempo inicial, 24h, 48h y 96h a temperatura ambiente y en refrigeración, en condiciones cromatográficas normales.

REPORTE DE DATOS

- Calcular la media aritmética del análisis inicial (y_0).
- Calcular la media aritmética de cada condición de almacenaje (y_i).
- Calcular la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto al análisis inicial ($|d_i|$).

5. RESULTADOS

5.1 PRECISIÓN

5.1.1 PRECISIÓN DEL SISTEMA

Tabla No. VII Respuestas Analíticas obtenidas en el estudio de Precisión del sistema.*

	CONC STD mg/ ml	FR SISTEMA CONC STD / ÁREA
STD 1	0.01525473	1.1329E-07
STD 2	0.01525473	1.1268E-07
STD 3	0.01525473	1.1278E-07
STD 4	0.01525473	1.1308E-07
STD 5	0.01525473	1.1321E-07
STD 6	0.01525473	1.1260E-07
MEDIA =		1.1294E-07
RSD ó CV =		0.26

*Las áreas con las que se realizaron los cálculos se encuentran en la Tabla No.XIX.

Criterio de aceptación :

- %CV \leq 1.5 %

0.26 \leq 1.5 % **CUMPLE**

5.1.2 PRECISIÓN DEL MÉTODO

Tabla No. VIII Porcentajes de recobro para calcular la Precisión del Método.*

	PORCIENTO RECOBRO (normalizado al 100%)
LM 100% M1	99.5%
LM 100% M2	99.7%
LM 100% M3	99.5%
LM 100% M4	98.7%
LM 100% M5	100.0%
LM 100% M6	99.3%
MEDIA =	99.4%
Recobro =	-0.005511
RSD ó CV =	0.43%

*Las áreas con las que se realizaron los cálculos se encuentran en la Tabla No.XX.

Criterio de aceptación :

- Recobro < 2 % ó Recobro de todos los valores \pm 2 %
- CV < 2 %
- Intervalo (μ) debe contener al 100 o el promedio aritmético de recobro se incluya en el intervalo de 98-102%

Recobro : -0.005511 < 2% **CUMPLE**

%RSD ó CV: 0.43% < 2% **CUMPLE**

Intervalo (μ): 99.0 a 99.9 **CUMPLE**

5.2 LINEALIDAD

5.2.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Tabla No. IX Concentraciones y Respuestas para el cálculo de la linealidad del sistema.*

	CONC. mg/mL	F/R
STD 1	0.007627	1.135322E-07
	0.007627	1.131856E-07
	0.007627	1.131273E-07
STD 2	0.011441	1.134544E-07
	0.011441	1.130848E-07
	0.011441	1.139622E-07
STD 3	0.015255	1.132914E-07
	0.015255	1.126820E-07
	0.015255	1.127810E-07
STD 4	0.019068	1.135909E-07
	0.019068	1.134843E-07
	0.019068	1.132439E-07
STD 5	0.022882	1.137037E-07
	0.022882	1.133802E-07
	0.022882	1.132871E-07

*Las áreas con las que se realizaron los cálculos se encuentran en la Tabla No.XXI.

Criterio de aceptación :

- Pendiente (b_1)	8810142.177557	NA
- Intercepto (b_0)	204.591805	NA
-Intervalo de confianza al 95 %		
Pendiente	8769265.50 a 8851018.85	No incluye al cero
- % error de y-intercepto del punto medio	0.000023	\leq 5%
- Coef. de correlación (r)	0.9999700	$r \geq$ 0.9925
- Coef. determinación (r^2)	0.99994002	$r^2 \geq$ 0.985
- %CV de la relación RESP/CONC	0.16%	CV \leq 2%

CUMPLE

5.2.2 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Tabla No. X Áreas y Recobros obtenidos para el cálculo de Linealidad del Método.*

	mg /mL Adicionados	mg/mL Recuperados	% Recobro
50%	0.158900	0.157266	99.0
	0.157145	0.154144	98.1
	0.158219	0.155334	98.2
100%	0.311747	0.310038	99.5
	0.311343	0.310460	99.7
	0.311960	0.310352	99.5
150%	0.461637	0.460401	99.7
	0.464987	0.460961	99.1
	0.464998	0.463269	99.6

*Las áreas con las que se realizaron los cálculos se encuentran en la Tabla No.XXII.

		Criterio de aceptación :
-Pendiente (b_1) =	1.000567	NA
-Ordenada al origen (b_0)=	-0.0022554	NA
-IC (β_1) =	0.993788 a 1.007346	Debe contener al uno
-IC (β_0) =	-0.004529 a 0.000018	Debe contener al cero
- Coeficiente de determinación (r^2)=	0.9999426	$r^2 \geq 0.985$
- CV %recobro=	0.63%	CV < 2%
- %Recobro para todos los puntos	99.2%	98% a 102%
- %CV y/x de la regresión lineal =	0.35%	CV < 2%

CUMPLE

5.3 ESPECIFICIDAD

5.3.1 INTERFERENCIA DE BLANCO

Se analizaron muestras de Blanco, Agua y Fase Móvil. Se obtuvieron sus respectivos cromatogramas.

Blanco

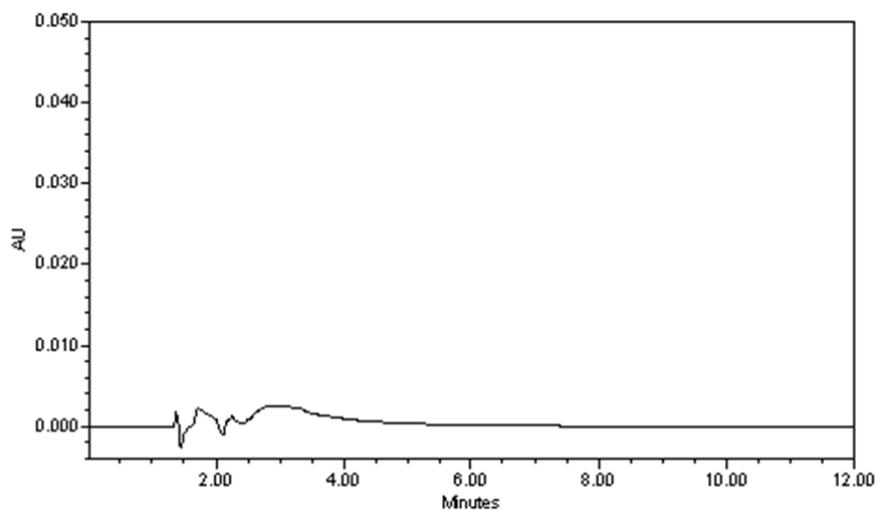


Fig. 3 Cromatograma de Blanco en condiciones normales.

Agua

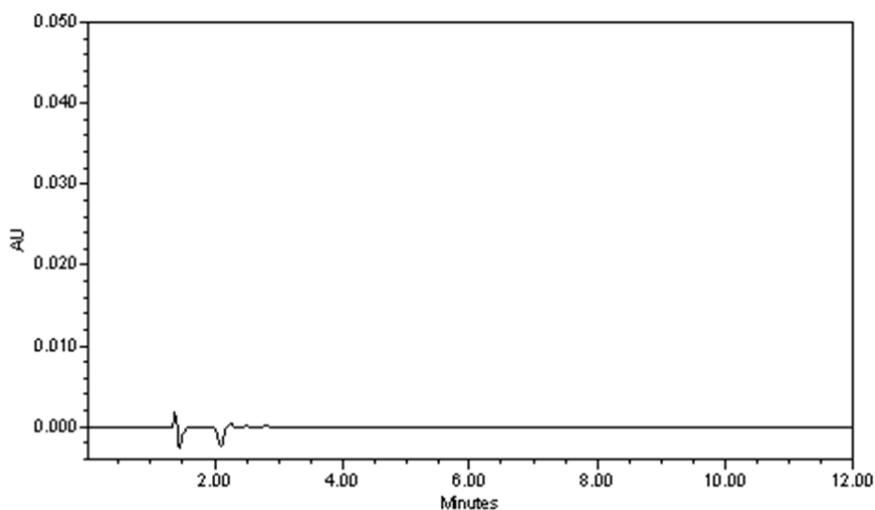


Fig 4 Cromatograma de Agua

Fase Móvil

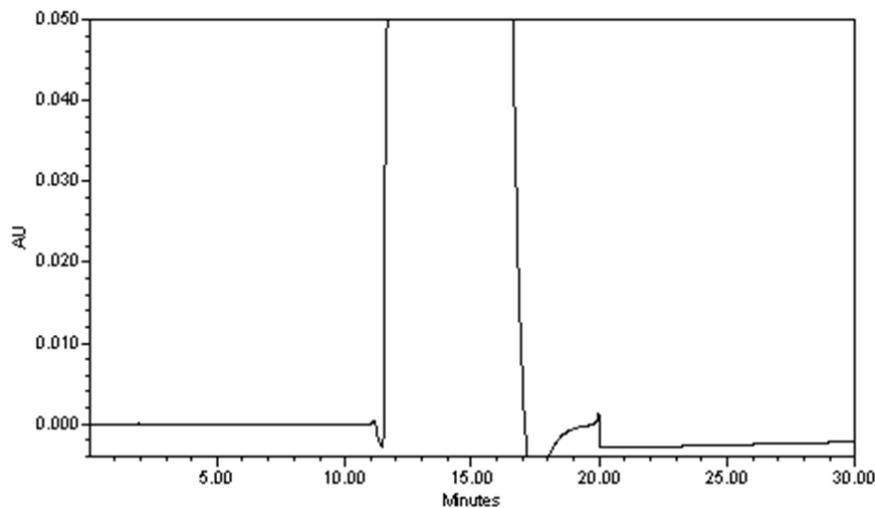


Fig. 5 Cromatograma de Fase Móvil

Criterio de aceptación :

No se detecta ninguna señal que interfiera con el analito.

CUMPLE.

5.3.2 INTERFERENCIA DE PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN

Se analizaron por triplicado el estándar de trabajo y una muestra de producto terminado de la suspensión oftálmica las cuales se sometieron a cuatro vías de degradación: Ácido, Base, Oxidación y Calor.

Estándar de trabajo sin degradar

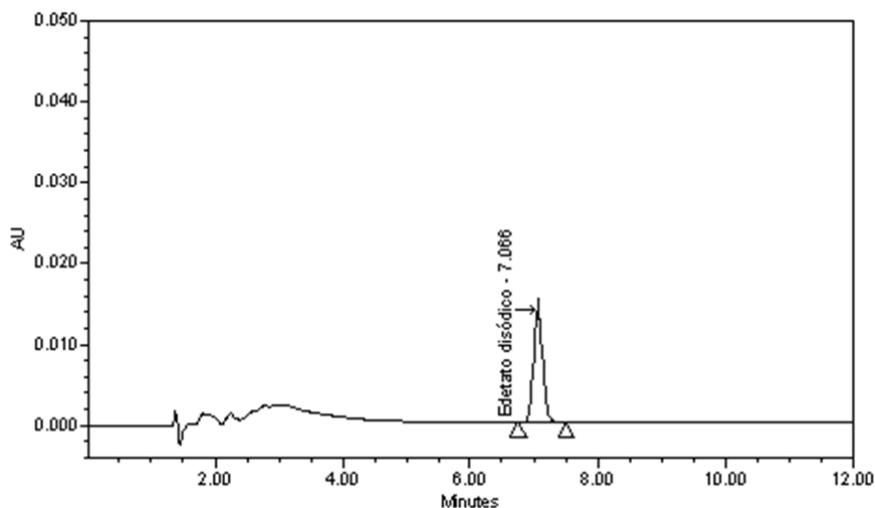


Fig. 6 Cromatograma del estándar de trabajo en condiciones normales

Estándar de trabajo degradado por vía ácida

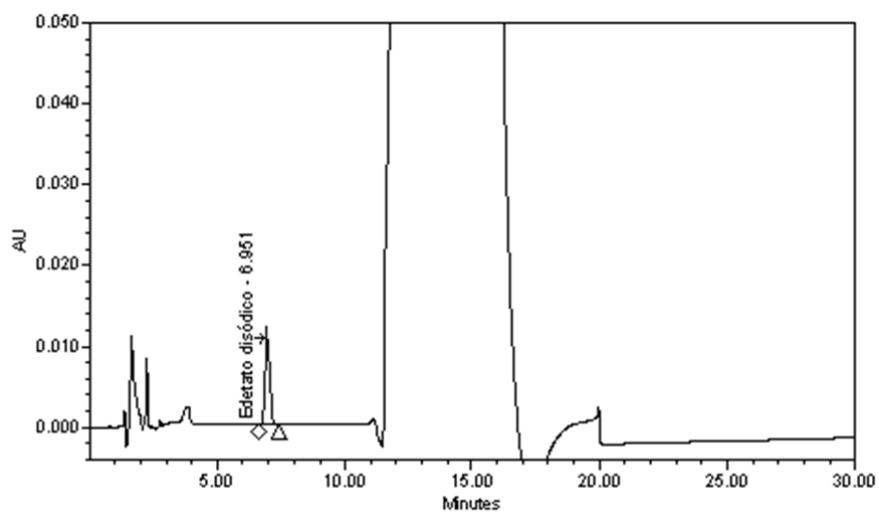


Fig. 7 Cromatograma del estándar de trabajo degradado con HCl concentrado, durante 2 horas a 80°C.

Estándar de trabajo degradado por vía básica

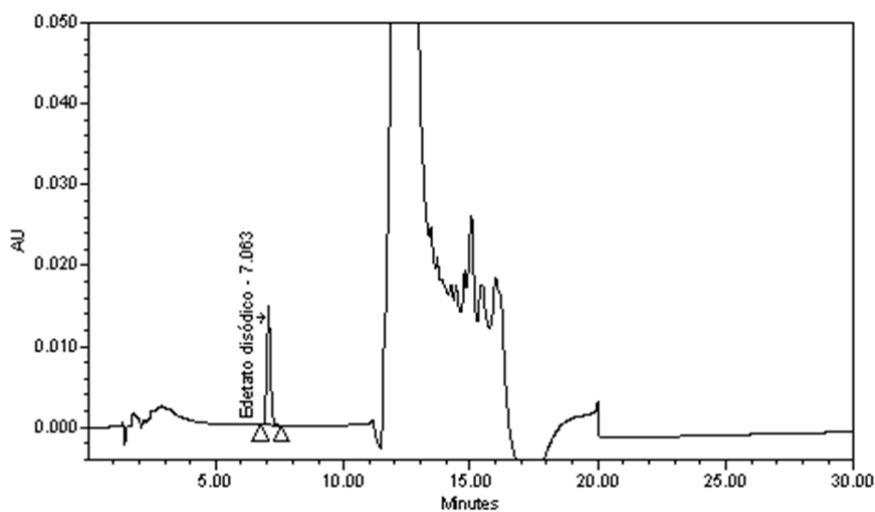


Fig. 8 Cromatograma del estándar de trabajo degradado con NH₄OH al 30%, durante 2 horas a 80°C.

Estándar de trabajo degradado por vía de oxidación

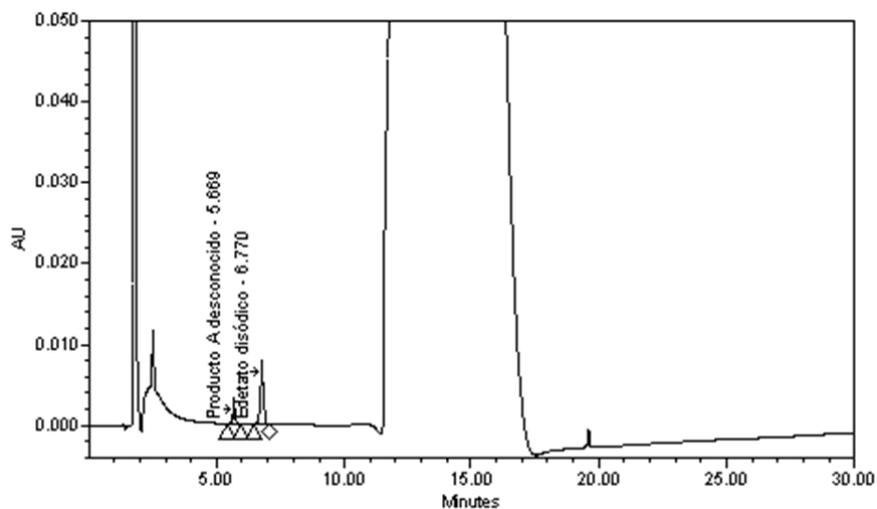


Fig. 9 Cromatograma del estándar de trabajo degradado con H_2O_2 al 30%, durante 1 hora a $80^\circ C$.

Estándar de trabajo degradado por vía de calor

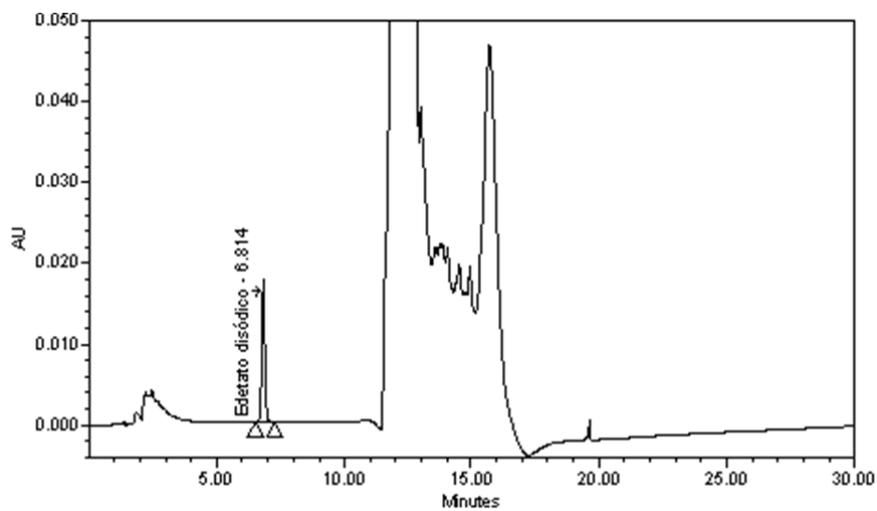


Fig. 10 Cromatograma del estándar de trabajo degradado con calor a $80^\circ C$ durante 5 horas.

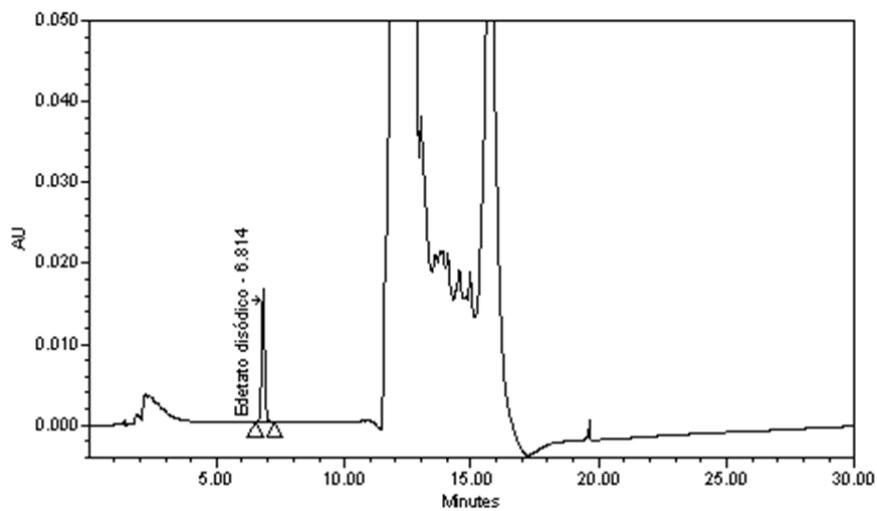


Fig. 11 Cromatograma del estándar de trabajo degradado con calor a 80°C durante 24 horas.

Muestra de suspensión oftálmica sin degradar

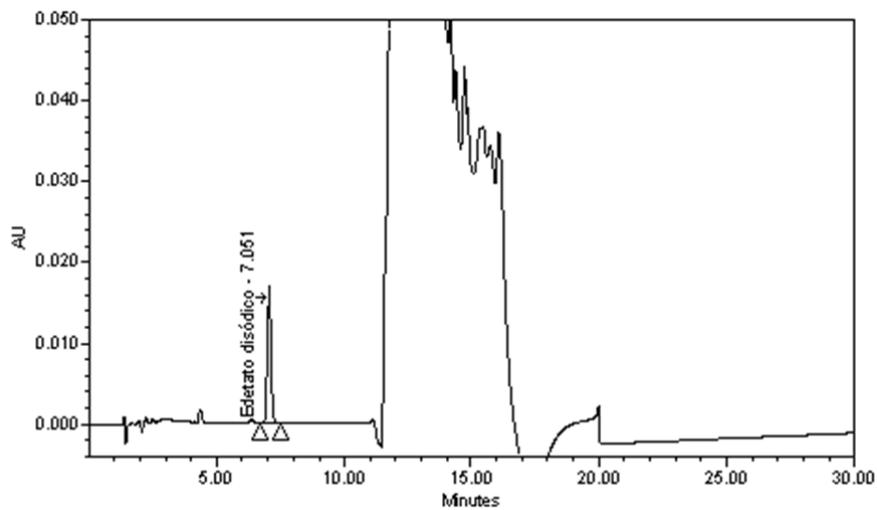


Fig. 12 Cromatograma de la muestra de suspensión oftálmica en condiciones normales.

Muestra de suspensión oftálmica degradada por vía ácida

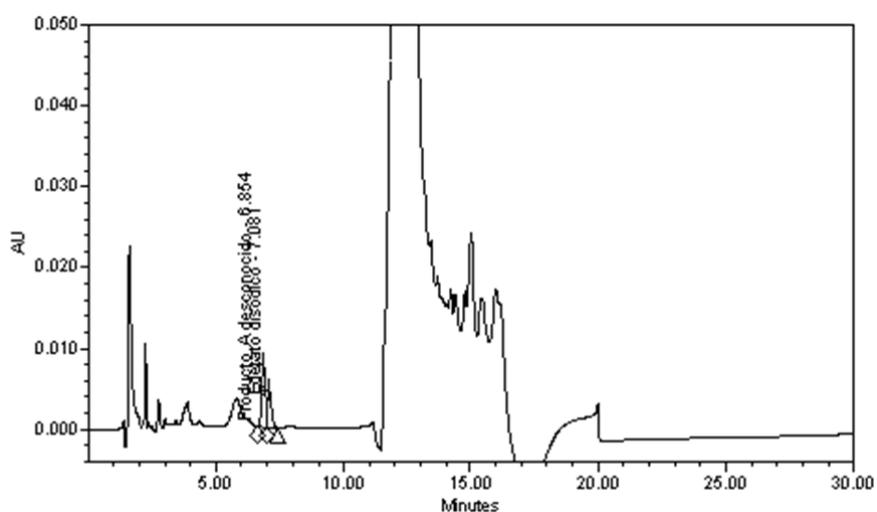


Fig. 13 Cromatograma de la muestra de suspensión oftálmica degradada con HCl concentrado, durante 2 horas a 80°C.

Muestra de suspensión oftálmica degradada por vía básica

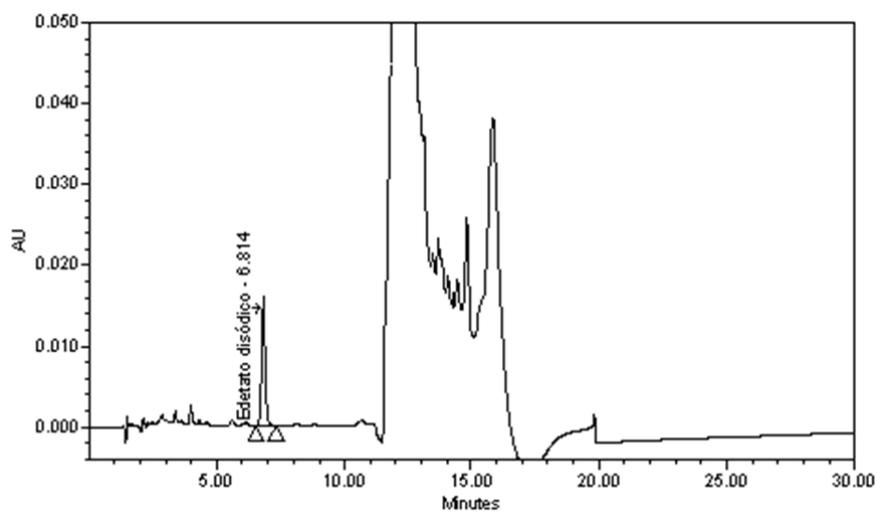


Fig. 14 Cromatograma de la muestra de suspensión oftálmica degradada con NH_4OH al 30%, durante 2 horas a 80°C.

Muestra de suspensión oftálmica degradada por vía de oxidación

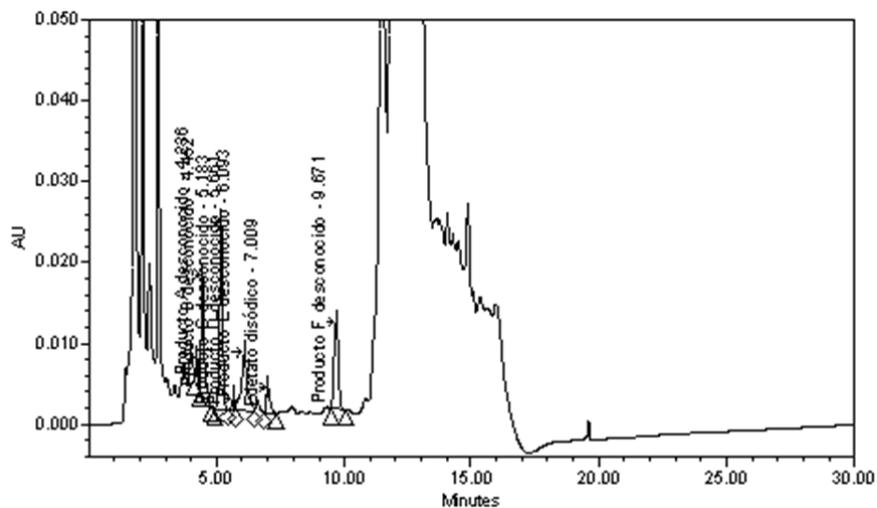


Fig. 15 Cromatograma de la muestra de suspensión oftálmica degradada con H_2O_2 al 30%, durante 1 hora a $80^\circ C$.

Muestra de suspensión oftálmica degradada por vía de calor

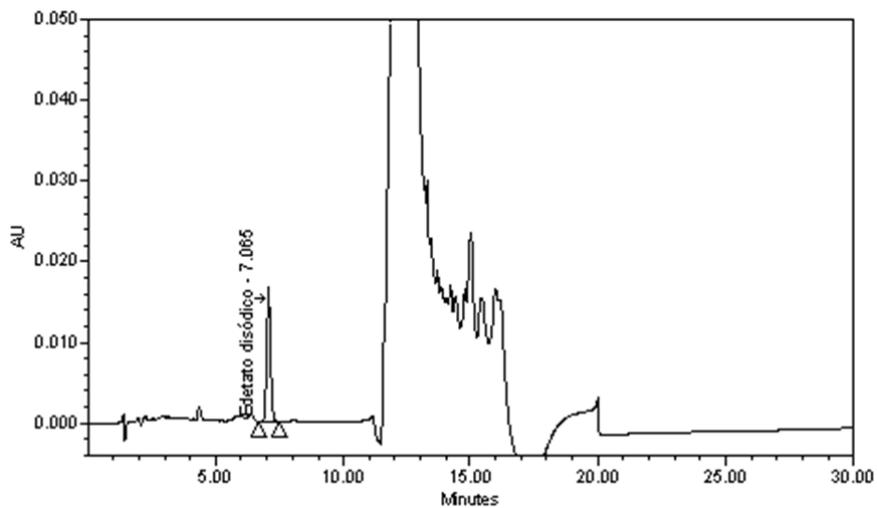


Fig. 16 Cromatograma de la muestra de suspensión oftálmica degradada con calor a $80^\circ C$ durante 5 horas.

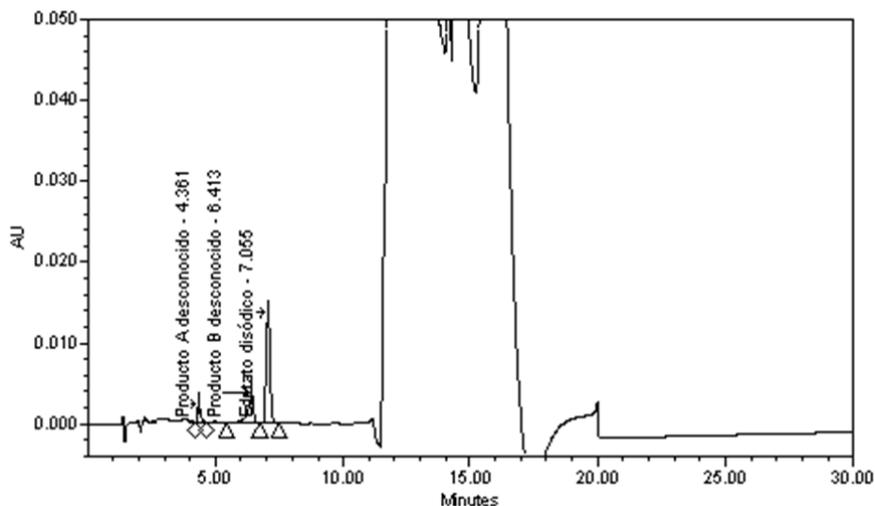


Fig. 17 Cromatograma de la muestra de suspensión oftálmica degradada con calor a 80°C durante 24 horas.

Criterio de aceptación :

Las señales obtenidas en cada vía de degradación, no deben interferir con la señal del analito en estudio.

CUMPLE.

La respuesta o señal del analito, puede decrecer o incrementarse, independientemente de otras señales, como indicación de degradación.

Todos los picos en el cromatograma deben ser etiquetados, incluyendo cualquier desconocido.

Las áreas del estándar de trabajo del control, de la degradación de vía ácida, básica, oxidación y calor a las 5 y 24 horas se encuentran en las Tablas No. XXIII, XXV, XXVII, XXIX, XXXI y XXXIII, respectivamente.

Las áreas de la muestra de la suspensión oftálmica del control, de la degradación de vía ácida, básica, oxidación y calor a las 5 y 24 horas se encuentran en las Tablas No. XXIV, XXVI, XXVIII, XXX, XXXII y XXXIV, respectivamente.

5.4 PRUEBAS LÍMITE

5.4.1 LÍMITE DE DETECCIÓN

Tabla No. XI Respuestas analíticas obtenidas en el estudio de Límite de Detección.*

	Concentración (mg/mL)	F/R SISTEMA CONC STD/AREA
0.5%	0.000075	6021498
	0.000075	4107555
	0.000075	4412407
1%	0.000151	7214399
	0.000151	5372030
	0.000151	6527818
2%	0.000302	7214067
	0.000302	7398304
	0.000302	6741215
4%	0.000604	8192577
	0.000604	8432152
	0.000604	9089738
6%	0.000905	8619150
	0.000905	8857730
	0.000905	8874740
8%	0.001207	8550282
	0.001207	8477217
	0.001207	8846105
10%	0.001509	8940526
	0.001509	8862259
	0.001509	8824815

*Las áreas con las que se realizaron los cálculos se encuentran en la Tabla No.XXXV.

Criterio de aceptación :

Pendiente (b_1) =	9106766.41	NA
Ordenada al origen (b_0) =	-411.4690476	NA
Coefficiente de determinación (r^2) =	0.998477	$r^2 \geq 0.985$
Coefficiente de correlación (r) =	0.999238	$r \geq 0.987$

CUMPLE.

$$LD = \frac{3.3 * Sb_0}{b_1} = 0.00002508 \text{ mg/mL}$$

b_1

5.4.2 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Tabla No. XII Respuestas analíticas obtenidas en el estudio de Límite de Cuantificación.*

	Concentración Std (mg/mL)	F/R SISTEMA CONC STD/AREA
2%	0.000302	7214067
	0.000302	7398304
	0.000302	6741215
4%	0.000604	8192577
	0.000604	8432152
	0.000604	9089738
6%	0.000905	8619150
	0.000905	8857730
	0.000905	8874740
8%	0.001207	8550282
	0.001207	8477217
	0.001207	8846105
10%	0.001509	8940526
	0.001509	8862259
	0.001509	8824815

*Las áreas con las que se realizaron los cálculos se encuentran en la Tabla No.XXXVI.

Criterio de aceptación :

Pendiente (b_1) =	9187810.026	NA
Ordenada al origen (b_0) =	-502.6066667	NA
Coefficiente de determinación (r^2) =	0.997456	$r^2 \geq 0.985$
Coefficiente de correlación (r) =	0.998727	$r \geq 0.987$

CUMPLE.

$$LC = \frac{10 * Sb_0}{b_1} = 0.0001365 \text{ mg/mL}$$

5.5 PRECISIÓN INTERMEDIA

Tabla No. XIII Porcentaje de recobros para el cálculo de la Precisión Intermedia.*

		ANALISTA	
		1	2
D I A	1	108.7	110.5
		108.1	110.4
		107.1	109.4
	2	107.4	107.8
		107.5	107.9
		106.6	110.8

Media = 108.5 %

S = 1.431 %

%CV = 1.3 %

Tabla No. XIV Coeficiente de variación de todos los resultados para la Precisión Intermedia.*

		ANALISTA		CV
		1	2	
D I A	1	0.75	0.46	1.22
		2	0.55	
	CV		0.69	1.22

*Las áreas con las que se realizaron los cálculos se encuentran en las Tablas No. XXXVII, XXXVIII, XXXIX y XL.

Criterio de aceptación :

%CV de todos los resultados \leq 2%

CUMPLE.

5.6 TOLERANCIA

Tabla No. XV Porcentajes de recobro obtenidos para la determinación de la Tolerancia del Método.*

Condición	Base	Alterada
COLUMNA	YMC	PHENOMENEX LUNA
	112.7	113.0
	112.8	113.0
	112.8	113.3

*Las áreas con las que se realizaron los cálculos se encuentran en las Tablas No. XLI y XLII.

n = 6

Media = 112.9 %

S = 0.21 %

%CV = 0.19 %

Criterio de aceptación :

%CV ≤ 2%

CUMPLE.

5.7 ROBUSTEZ

Tabla No. XVI Porcentajes de recobros obtenidos para la determinación de la Robustez del método.*

Condición	Base		Alterada			% di
Flujo	1.0 mL/min		0.8 mL/min			
Resultado	108.7	%	-	109.7	% =	1.0
Flujo	1.0 mL/min		1.2 ml/min			
Resultado	108.7	%	-	110.6	% =	1.9
Fase móvil	Buffer-ACN (86:14)		Buffer-ACN (80:20)			
Resultado	107.8	%	-	108.7	% =	0.9
Fase móvil	Buffer-ACN (86:14)		Buffer-ACN (90:10)			
Resultado	107.8	%	-	109.3	% =	1.6
pH Buffer	pH 4.5		pH 4.0			
Resultado	104.7	%	-	104.1	% =	0.5
pH Buffer	pH 4.5		pH 5.0			
Resultado	104.7	%	-	106.4	% =	1.7

*Las áreas con las que se realizaron los cálculos se encuentran en las Tablas No. XLIII – LI.

Criterio de aceptación :

$$|di| \leq 2 \%$$

Flujo 0.8 mL/min **CUMPLE.**

Flujo 1.2 mL/min **CUMPLE.**

Buffer-ACN 80:20 **CUMPLE.**

Buffer-ACN 90:10 **CUMPLE.**

pH 4.0 **CUMPLE.**

pH 5.0 **CUMPLE.**

5.8 ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA

Tabla No. XVII Porcentajes de recobro para determinar la Estabilidad Analítica de la muestra de la suspensión oftálmica a 24, 48 y 96 horas, a refrigeración y temperatura ambiente.*

Inicial	24 horas		48 horas		96 horas	
	T.A %	Refrigeración %	T.A %	Refrigeración %	T.A %	Refrigeración %
111.8%	112.6	112.1	113.5	112.0	111.5	111.9
	di %		di %		di %	
	T.A %	Refrigeración %	T.A %	Refrigeración %	T.A %	Refrigeración %
	0.7	0.3	1.7	0.2	0.4	0.1

* Las áreas con las que se realizaron los cálculos se encuentran en las Tablas No. LIII, LVI, LVII, LX, LXI, LXIV y LXV.

Criterio de aceptación :

$$|di| \leq 2 \%$$

24 horas a temperatura ambiente

CUMPLE.

24 horas en refrigeración

CUMPLE.

48 horas a temperatura ambiente

CUMPLE.

48 horas en refrigeración

CUMPLE.

96 horas a temperatura ambiente

CUMPLE.

96 horas en refrigeración

CUMPLE.

Tabla No. XVIII Porcentajes de recobro para determinar la Estabilidad Analítica del estándar de trabajo a 24, 48 y 96 horas, en refrigeración y a temperatura ambiente.*

Inicial	24 horas		48 horas		96 horas	
	T.A %	Refrigeración %	T.A %	Refrigeración %	T.A %	Refrigeración %
99.3%	98.2	97.5	101.6	100.2	97.8	97.8
	di %		di %		di %	
	T.A %	Refrigeración %	T.A %	Refrigeración %	T.A %	Refrigeración %
	1.1	1.8	2.2	0.9	1.5	1.5

*Las áreas con las que se realizaron los cálculos se encuentran en las Tablas No. LII, LIV, LV, LVIII, LIX, LXII y LXIII.

Criterio de aceptación :

$$|di| \leq 2 \%$$

24 horas a temperatura ambiente **CUMPLE.**

24 horas en refrigeración **CUMPLE.**

48 horas a temperatura ambiente **CUMPLE.**

48 horas en refrigeración **CUMPLE.**

96 horas a temperatura ambiente **CUMPLE.**

96 horas en refrigeración **CUMPLE.**

6. FÓRMULAS

6.1 Algoritmo para la cuantificación de edetato disódico en muestras de suspensión oftálmica

$$\frac{\text{Área Muestra}}{\text{Área STD}} \times \frac{\text{Conc. STD } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)}{\text{Conc. teórica Muestra } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)} \times \frac{\text{Peso teórico (g)}}{\text{Peso real Muestra (g)}} \times \text{Densidad } \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right) \times 100$$
$$= \% \text{ de Recobro de Edetato Disódico}$$

Donde:

Conc. Teórica Muestra = 0.015mg/mL

Peso teórico = 1.5g

Densidad = 1.0162mg/mL

6.2 Algoritmo para la cuantificación de edetato disódico en el estándar de trabajo

$$\frac{\text{Área STD mta}}{\text{Área STD}} \times \frac{\text{Conc. STD } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)}{\text{Conc. STD mta } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)} \times 100 = \% \text{ de Recobro de Edetato Disódico}$$

6.3 Media aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

6.4 Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

6.5 Coeficiente de variación

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$$

6.6 Pendiente

$$b_1 = \frac{n\sum xy - \sum x \sum y}{n\sum x - (\sum x)^2}$$

6.7 Ordenada al origen

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

6.8 Coeficiente de determinación

$$r^2 = \frac{\{[n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]\}^2}{[(n\sum x^2) - (\sum x)^2][n(\sum y^2) - (\sum y)^2]}$$

6.9 Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$$

$$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}}$$

6.10 Intervalo de confianza para la ordenada al origen

$$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_0}$$

$$S_{b_0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

6.11 Intervalo de confianza para la media poblacional

$$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

6.12 Coeficiente de variación de regresión

$$CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}} \times 100$$

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

7.1 PRECISIÓN

7.1.1 PRECISIÓN DEL SISTEMA

La prueba de Precisión del sistema fue evaluada a partir de seis preparaciones con la concentración que representa el 100% de la muestra procesada para su medición. La desviación estándar relativa para el edetato disódico es de 0.26%. El criterio de aceptación es de 2%, por lo que se cumple con él para este analito, y se concluye que el sistema es preciso para la cuantificación de edetato disódico.

7.1.2 PRECISIÓN DEL MÉTODO

Se evaluó la precisión del método a través de la preparación de una serie de 6 muestras de producto adicionado con solución estándar de edetato disódico al 100%. Se analizaron de acuerdo a las condiciones establecidas en el método analítico.

Los porcentajes de recobro para edetato disódico dan un promedio de 100.0% y un C.V.= 0.43%. Todos los valores están contenidos dentro de la especificación de recobro de 98% a 102%. Por lo tanto, el método es preciso y exacto.

7.2 LINEALIDAD

7.2.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Para esta prueba se realizó una curva estándar del analito, en cinco niveles de concentración: 50%, 75%, 100%, 125% y 150%. Los datos que se obtuvieron fueron analizados mediante la ecuación de mínimos cuadrados de la relación concentración-respuesta, dando los siguientes resultados:

- El coeficiente de determinación (r^2)= 0.99994002, cuyo valor debe ser mayor o igual a 0.985.
- El coeficiente de correlación (r)= 0.9999700, cuyo valor debe ser mayor o igual a 0.9925.
- Intervalo de confianza de la pendiente IC (β_1)= 8769265.500475 a 8851018.854638, el intervalo no incluye el cero.
- El error del intercepto en el punto medio de la curva, es 0.000023 %, el cual debe ser menor o igual a 5%.

Todos los parámetros se encuentran dentro de los criterios de aceptación, por lo tanto, el sistema es lineal en el rango de las concentraciones analizadas para la cuantificación de edetato disódico.

7.2.2 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Se realizó una curva de calibración de producto con estándar adicionado. Por lo que se usó una muestra de producto terminado de la suspensión oftálmica y se diluyó al 50%. Se tomó una alícuota de 1.0 g y se transfirió a un matraz volumétrico de acuerdo con lo descrito en el protocolo Se adicionó la alícuota correspondiente a cada nivel de concentración. Se realizaron tres niveles de concentración 50%, 100% y 150%. Se obtuvieron los siguientes resultados:

- El coeficiente de determinación (r^2)= 0.9999426, cuyo valor es mayor de 0.985.
- Intervalo de confianza de la pendiente IC (β_1)= 0.993788 a 1.007346, el cual incluye el uno.
- Intervalo del Intercepto IC (β_0) = -0.004529 a 0.000018, el cual incluye el cero.
- El CV de la regresión = 0.35 % el cual es menor de 2 %.
- El % de recobro de todos los puntos se encuentran en el rango de 100 % \pm 2%.

Todos los parámetros se encuentran dentro de los criterios de aceptación, por lo tanto, el método es lineal en este rango para cuantificar edetato disódico.

7.3 ESPECIFICIDAD

7.3.1 INTERFERENCIA DE BLANCO

Se analizaron muestras de Agua, Fase Móvil y Blanco. Se obtuvieron sus cromatogramas y se observó que no se detecta ninguna señal que interfiera con el analito.

7.3.2 INTERFERENCIA DE PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DEL ANALITO

Se analizaron por triplicado el estándar de trabajo y una muestra de producto terminado de la suspensión oftálmica las cuales se sometieron a cuatro vías de degradación: Ácido, Base, Oxidación y Calor.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó que las señales obtenidas en cada vía de degradación, no interfirieron con la señal del analito en estudio.

En el caso de la degradación ácida, básica, la oxidación y calor durante 24 horas, se observó que la respuesta del analito decreció como indicación de su degradación, tanto en el estándar de trabajo como en la muestra de la suspensión oftálmica. En el caso de calor durante 5 horas, no se observó degradación.

Por lo tanto se puede concluir que se obtuvo una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra, es decir que el método analítico es específico para la cuantificación de edetato disódico.

7.4 PRUEBAS LÍMITE

7.4.1 LÍMITE DE DETECCIÓN

El límite de detección se calculó de acuerdo a la fórmula:

$$\frac{3.3 \times S_{b_0}}{b_1}$$

El valor obtenido es de 0.00002508 mg/mL

El valor del coeficiente de determinación (r^2)= 0.998477, el cual es mayor o igual de 0.985.

El valor del coeficiente de correlación (r)= 0.999238, el cual es mayor o igual a 0.987.

Por lo que el método tiene un límite de detección.

7.4.2 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

El límite de cuantificación se calculó de acuerdo a la fórmula:

$$\frac{10 \times S_{b_0}}{b_1}$$

El valor obtenido es de 0.000137 mg/mL.

Para el caso del límite de cuantificación se consideró al nivel 2 % que corresponde a la concentración de 0.000302 mg/mL.

El valor del coeficiente de determinación (r^2)= 0.997456, el cual es mayor o igual a 0.985.

El valor del coeficiente de correlación (r)= 0.998727, el cual es mayor o igual a 0.987.

Por lo tanto, el método tiene un límite de cuantificación.

7.5 PRECISIÓN INTERMEDIA

Se analizó una serie de muestras de producto terminado de la suspensión oftálmica por triplicado. La prueba se realizó con dos analistas en dos días diferentes para establecer la variación entre analistas y días, obteniendo los siguientes resultados:

Para la cuantificación de Edetato disódico:

- El día 1, analista 1 se obtuvo CV = 0.75 %.
- El día 1, analista 2 se obtuvo CV = 0.61 %.
- El día 2, analista 1 se obtuvo CV = 0.46 %.
- El día 2, analista 2 se obtuvo CV = 1.53 %.
- El CV del día 1 analistas 1 y 2 fue de 0.1.22 %.
- El CV del día 2 analistas 1 y 2 fue de 1.34 %
- El CV del analista 1 día 1 y 2 fue de 0.69 %.
- El CV del analista 2 día 1 y 2 fue de 1.22 %.

El %CV total de todas las muestras = 1.32 %, el cual cumple con la especificación de igual o menor al 2 %, por lo tanto, el método es preciso por reproducibilidad, para la cuantificación de edetato disódico, no teniendo impacto en el análisis de las muestra el día o analista.

7.6 TOLERANCIA

Esta prueba se realizó mediante el análisis por triplicado de una muestra de producto terminado de la suspensión oftálmica, y comparando dos columnas en diferentes días. Las columnas que se compararon fueron Columna YMC-Pack, ODS-AM 150x4.6mm S-5um, 12mm y Columna Phenomenex Luna 5 μ C18(2) 100A 150x4.6mm.

El resultado del coeficiente de variación obtenido entre estos dos equipos fue de CV= 0.19 %, que cumple con el criterio de aceptación de no mayor de 2 %.

Este resultado permite establecer la tolerancia del método al cambio de columna al momento de reproducir el método en diferentes condiciones.

De esta manera, el resultado del CV de la precisión intermedia y el CV de la prueba de tolerancia permiten establecer la tolerancia del método al cambio de analistas, de día y de equipo, ya que en todos los casos el CV es menor del 2%.

El método es tolerante a los cambios y condiciones probadas.

7.7 ROBUSTEZ

Esta prueba se realizó analizando una muestra por triplicado de producto terminado de la suspensión oftálmica, modificando: la velocidad de flujo de 1.0mL/min a 0.8mL/min y 1.2 mL/min, la proporción de fase móvil de Buffer de Hidróxido de Tetrabutilamonio- Acetonitrilo 86:14 a 80:20 y 90:10, y modificando el pH del Buffer de 4.5 a 4.0 y 5.0.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la prueba de robustez, la variación probada en la velocidad de flujo no tiene impacto significativo en la cuantificación de Edetato disódico así como también el cambio en la proporción de fase móvil y el cambio de pH probados del Buffer. El método resultó ser robusto a estas variaciones.

7.8 ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA

Esta prueba se realizó analizando por triplicado una muestra de producto terminado de la suspensión oftálmica y del estándar de trabajo con las siguientes condiciones de almacenaje: Temperatura ambiente y Refrigeración a lapsos de tiempo inicial, 24h, 48h y 96h, que se analizaron contra una solución de referencia recientemente preparada.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba de estabilidad, la respuesta conservó su integridad fisicoquímica y la concentración del analito durante los lapsos de tiempo establecidos y bajo las condiciones especificadas, por lo que se puede concluir que la muestra es estable a temperatura ambiente y refrigeración a las 96 horas.

8. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluye que el método analítico para la cuantificación de edetato disódico en la suspensión oftálmica probada de concentración 0.01% por cromatografía de líquidos de alta resolución, cumple con los parámetros de desempeño de validación y se determina que el método es lineal, exacto, preciso, reproducible, tiene un límite de detección que tiene un valor de 0.00002508mg/mL, y de cuantificación, el cual es 0.0001365mg/mL, específico, tolerante al cambio de columna, robusto al cambio en la velocidad de flujo de 0.8mL/min y 1.2mL/min, en la proporción de fase móvil de Buffer-ACN 80:20 y 90:10, y al cambio de pH de 4.0 y 5.0, y que la muestra es estable a temperatura ambiente y refrigeración a las 96 horas. De acuerdo a los lineamientos básicos establecidos en la “Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de QFB’S” y del Protocolo de Validación.

9. ANEXOS

9.1 Áreas obtenidas durante el análisis

9.1.1 PRECISIÓN

9.1.1.1 PRECISIÓN DEL SISTEMA

Tabla No. XIX Áreas del analito obtenidas para la Precisión del sistema

#	NombreMuestra	Área	Concentración (mg/mL)
1	PS EDTA 100% M1	134652.8	0.015255
2	PS EDTA 100% M2	135381.0	0.015255
3	PS EDTA 100% M3	135262.1	0.015255
4	PS EDTA 100% M4	134902.2	0.015255
5	PS EDTA 100% M5	134750.7	0.015255
6	PS EDTA 100% M6	135478.4	0.015255

9.1.1.2 PRECISIÓN DEL MÉTODO

Tabla No. XX Áreas del analito obtenidas para la Precisión del método

#	NombreMuestra	Área	Peso de la muestra (g)
1	PM EDTA 100% M1	150145.1	1.0232
2	PM EDTA 100% M2	150349.1	1.0194
3	PM EDTA 100% M3	150297.2	1.0252
4	PM EDTA 100% M4	148550.6	1.0135
5	PM EDTA 100% M5	150211.9	1.0090
6	PM EDTA 100% M6	148815.1	1.0006

9.1.2 LINEALIDAD

9.1.2.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Tabla No. XXI Áreas del analito obtenidas para la Linealidad del Sistema

#	NombreMuestra	Área	Concentración (mg/mL)
1	LS EDTA 50% M1	67179.2	0.007627
2	LS EDTA 50% M2	67384.9	0.007627
3	LS EDTA 50% M3	67419.6	0.007627
4	LS EDTA 75% M1	100842.3	0.011441
5	LS EDTA 75% M2	101171.9	0.011441
6	LS EDTA 75% M3	100392.9	0.011441
7	LS EDTA 100% M1	134652.8	0.015255
8	LS EDTA 100% M2	135381.0	0.015255
9	LS EDTA 100% M3	135262.1	0.015255
10	LS EDTA 125% M1	167865.6	0.019068
11	LS EDTA 125% M2	168023.2	0.019068
12	LS EDTA 125% M3	168379.9	0.019068
13	LS EDTA 150% M1	201242.4	0.022882
14	LS EDTA 150% M2	201816.6	0.022882
15	LS EDTA 150% M3	201982.4	0.022882

9.1.2.2 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Tabla No. XXII Áreas del analito obtenidas para la Linealidad del método

#	NombreMuestra	Área	Peso de la muestra (g)
1	LM EDTA 50% M1	76160.4	1.0169
2	LM EDTA 50% M2	74648.9	1.0004
3	LM EDTA 50% M3	75224.8	1.0105
4	LM EDTA 100% M1	150145.1	1.0232
5	LM EDTA 100% M2	150349.1	1.0194
6	LM EDTA 100% M3	150297.2	1.0252
7	LM EDTA 150% M1	222962.5	1.0017
8	LM EDTA 150% M2	223233.8	1.0332
9	LM EDTA 150% M3	224351.3	1.0333

9.1.3 ESPECIFICIDAD

9.1.3.1 INTERFERENCIA DE PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DEL ANALITO

Tabla No. XXIII Áreas del analito obtenidas por el estándar de trabajo para la condición inicial

#	NombreMuestra	Áreas	Concentración (mg/mL)
1	Std Control M1	140381.7	0.015077
2	Std Control M2	140892.9	0.015077
3	Std Control M3	140425.9	0.015077

Tabla No. XXIV Áreas del analito obtendias por la muestra de la suspensión oftálmica para la condición inicial

#	NombreMuestra	Área	Peso de la muestra (g)
1	Muestra Control M1	169225.7	1.5808
2	Muestra Control M2	159837.3	1.5157
3	Muestra Control M3	167487.1	1.5253

Tabla No. XXV Áreas del analito obtenidas por el estándar de trabajo en la degradación vía ácida

#	NombreMuestra	Área	Concentración (mg/mL)
1	Std Ácido M1	138403.8	0.01509
2	Std Ácido M2	135501.5	0.01509
3	Std Ácido M3	138501.5	0.01509

Tabla No. XXVI Áreas del analito obtenidas por la muestra de la suspensión oftálmica en la degradación vía ácida

#	NombreMuestra	Área	Peso de la muestra (g)
1	Muestra Ácido M1	51076.1	1.5094
2	Muestra Ácido M2	48419.5	1.5507
3	Muestra Ácido M3	49538.8	1.5160

Tabla No. XXVII Áreas del analito obtenidas por el estándar de trabajo en la degradación vía básica

#	NombreMuestra	Área	Concentración (mg/mL)
1	Std Base M1	140381.1	0.01509
2	Std Base M2	141704.1	0.01509
3	Std Base M3	139370.1	0.01509

Tabla No. XXVIII Áreas del analito obtenidas por la muestra de la suspensión oftálmica en la degradación vía básica

#	NombreMuestra	Área	Peso de la muestra (g)
1	Muestra Base M1	152797.1	1.5095
2	Muestra Base M2	154782.3	1.5032
3	Muestra Base M3	158882.9	1.5142

Tabla No. XXIX Áreas del analito obtenidas por el estándar de trabajo en la degradación vía oxidación

#	NombreMuestra	Área	Concentración (mg/mL)
1	Std Peróxido M1	61913.0	0.01501
2	Std Peróxido M2	65073.6	0.01501
3	Std Peróxido M3	70242.7	0.01501

Tabla No. XXX Áreas del analito obtenidas por la muestra de la suspensión oftálmica en la degradación vía oxidación

#	NombreMuestra	Área	Peso de la muestra (g)
1	Muestra Peróxido M1	33001.0	1.5059
2	Muestra Peróxido M2	36313.6	1.5060
3	Muestra Peróxido M3	39195.8	1.5183

Tabla No. XXXI Áreas del analito obtenidas por el estándar de trabajo en la degradación vía calor durante 5 horas

#	NombreMuestra	Área	Concentración (mg/mL)
1	Std Calor 5h M1	146085.4	0.01501
2	Std Calor 5h M2	146598.3	0.01501
3	Std Calor 5h M3	147176.5	0.01501

Tabla No. XXXII Áreas del analito obtenidas por la muestra de la suspensión oftálmica en la degradación vía calor durante 5 horas

#	NombreMuestra	Área	Peso de la muestra (g)
1	Muestra Calor 5h M1	161875.2	1.5328
2	Muestra Calor 5h M2	158067.2	1.5049
3	Muestra Calor 5h M3	159901.4	1.5180

Tabla No. XXXIII Áreas del analito obtenidas por el estándar de trabajo en la degradación vía calor durante 24 horas

#	NombreMuestra	Área	Concentración (mg/mL)
1	Std Calor 24h M1	136605.8	0.01501
2	Std Calor 24h M2	144847.9	0.01501
3	Std Calor 24h M3	154485.4	0.01501

Tabla No. XXXIV Áreas del analito obtenidas por la muestra de la suspensión oftálmica en la degradación vía calor durante 24 horas

#	NombreMuestra	Área	Peso de la muestra (g)
1	Muestra Calor 24h M1	143523.0	1.5279
2	Muestra Calor 24h M2	147510.5	1.5578
3	Muestra Calor 24h M3	157404.9	1.5098

9.1.4 PRUEBAS LÍMITE

9.1.4.1 LÍMITE DE DETECCIÓN

Tabla No. XXXV Áreas del analito obtenidas para la determinación del Límite de Detección

#	NombreMuestra	Área	Concentración (mg/mL)
1	LD EDTA 0.5% M1	454.3	0.000075
2	LD EDTA 0.5% M2	309.9	0.000075
3	LD EDTA 0.5% M3	332.9	0.000075
4	LD EDTA 1% M1	1088.6	0.000151
5	LD EDTA 1% M2	810.6	0.000151
6	LD EDTA 1% M3	985.0	0.000151
7	LD EDTA 2% M1	2177.1	0.000302
8	LD EDTA 2% M2	2232.7	0.000302
9	LD EDTA 2% M3	2034.4	0.000302
10	LD EDTA 4% M1	4944.8	0.000604
11	LD EDTA 4% M2	5089.4	0.000604
12	LD EDTA 4% M3	5486.3	0.000604
13	LD EDTA 6% M1	7803.4	0.000905
14	LD EDTA 6% M2	8019.4	0.000905
15	LD EDTA 6% M3	8034.8	0.000905
16	LD EDTA 8% M1	10321.4	0.001207
17	LD EDTA 8% M2	10233.2	0.001207
18	LD EDTA 8% M3	10678.5	0.001207
19	LD EDTA 10% M1	13490.6	0.001509
20	LD EDTA 10% M2	13372.5	0.001509
21	LD EDTA 10% M3	13316.0	0.001509

9.1.4.2 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Tabla No. XXXVI Áreas del analito obtenidas para la determinación del Límite de Cuantificación

#	NombreMuestra	Área	Concentración (mg/mL)
1	LC EDTA 2% M1	2177.1	0.000302
2	LC EDTA 2% M2	2232.7	0.000302
3	LC EDTA 2% M3	2034.4	0.000302
4	LC EDTA 4% M1	4944.8	0.000604
5	LC EDTA 4% M2	5089.4	0.000604
6	LC EDTA 4% M3	5486.3	0.000604
7	LC EDTA 6% M1	7803.4	0.000905
8	LC EDTA 6% M2	8019.4	0.000905
9	LC EDTA 6% M3	8034.8	0.000905
10	LC EDTA 8% M1	10321.4	0.001207
11	LC EDTA 8% M2	10233.2	0.001207
12	LC EDTA 8% M3	10678.5	0.001207
13	LC EDTA 10% M1	13490.6	0.001509
14	LC EDTA 10% M2	13372.5	0.001509
15	LC EDTA 10% M3	13316.0	0.001509

9.1.5 PRECISIÓN INTERMEDIA

Tabla No. XXXVII Áreas del analito obtenidas para la Precisión Intermedia del Analista 1 en el Día 1

#	NombreMuestra	Área	Peso de la muestra (g)
1	PI EDTA A1D1 M1	154504.2	1.5084
2	PI EDTA A1D1 M2	155458.3	1.5270
3	PI EDTA A1D1 M3	153250.3	1.5186

Tabla No. XXXVIII Áreas del analito obtenidas para la Precisión Intermedia del Analista 2 en el Día 1

#	NombreMuestra	Área	Peso de la muestra (g)
1	PI EDTA A2D1 M1	158755.6	1.5152
2	PI EDTA A2D1 M2	158837.0	1.5060
3	PI EDTA A2D1 M3	152060.2	1.5282

Tabla No. XXXIX Áreas del analito obtenidas para la Precisión Intermedia del Analista 1 en el Día 2

#	NombreMuestra	Área	Peso de la muestra (g)
1	PI EDTA A1D2 M1	155899.1	1.5208
2	PI EDTA A1D2 M2	156176.4	1.5223
3	PI EDTA A1D2 M3	153111.9	1.5047

Tabla No. XL Áreas del analito obtenidas para la Precisión Intermedia del Analista 2 en el Día 2

#	NombreMuestra	Área	Peso de la muestra (g)
1	PI EDTA A2D2 M1	156438.1	1.5202
2	PI EDTA A2D2 M2	156633.5	1.5207
3	PI EDTA A2D2 M3	159015.6	1.5043

9.1.6 TOLERANCIA

Tabla No. XLI Áreas del analito obtenidas para la Tolerancia con la columna base.

#	NombreMuestra	Área	Peso de la muestra (g)
1	TOL BAS EDTA M1	154214.2	1.5203
2	TOL BAS EDTA M2	153636.0	1.5128
3	TOL BAS EDTA M3	153626.8	1.5131

Tabla No. XLII Áreas del analito obtenidas para la Tolerancia con el cambio de columna

#	NombreMuestra	Área	Peso de la muestra (g)
1	TOL EDTA CAM COL M1	153888.3	1.5203
2	TOL EDTA CAM COL M2	153104.1	1.5128
3	TOL EDTA CAM COL M3	153495.5	1.5131

9.1.7 ROBUSTEZ

Tabla No. XLIII Áreas del analito obtenidas para la Robustez para la velocidad de flujo inicial de 1.0mL/min

#	NombreMuestra	Área	Peso de la muestra (g)
1	ROB F1.0 EDTA M1	154998.2	1.5085
2	ROB F1.0 EDTA M2	154346.8	1.5078
3	ROB F1.0 EDTA M3	156251.6	1.5116

Tabla No. XLIV Áreas del analito obtenidas para la Robustez en el cambio de velocidad de flujo de 0.8mL/min

#	NombreMuestra	Área	Peso de la muestra (g)
1	ROB F0.8 EDTA M1	193036.3	1.5085
2	ROB F0.8 EDTA M2	193164.0	1.5078
3	ROB F0.8 EDTA M3	194906.3	1.5116

Tabla No. XLV Áreas del analito obtenidas para la Robustez en el cambio de velocidad de flujo de 1.2mL/min

#	NombreMuestra	Área	Peso de la muestra (g)
1	ROB F1.2 EDTA M1	128708.4	1.5085
2	ROB F1.2 EDTA M2	128918.3	1.5078
3	ROB F1.2 EDTA M3	129994.4	1.5116

Tabla No. XLVI Áreas del analito obtenidas para la Robustez en la proporción de fase móvil inicial de Buffer-ACN 86:14

#	NombreMuestra	Área	Peso de la muestra (g)
1	ROB FM 86:14 EDTA M1	155974.1	1.5152
2	ROB FM 86:14 EDTA M2	154483.8	1.5063
3	ROB FM 86:14 EDTA M3	154532.3	1.5067

Tabla No. XLVII Áreas del analito obtenidas para la Robustez en el cambio de la proporción de fase móvil de Buffer-ACN 80:20

#	NombreMuestra	Área	Peso de la muestra (g)
1	ROB FM 80:20 EDTA M1	157417.7	1.5152
2	ROB FM 80:20 EDTA M2	156583.5	1.5063
3	ROB FM 80:20 EDTA M3	156537.4	1.5067

Tabla No. XLVIII Áreas del analito obtenidas para la Robustez en el cambio de la proporción de fase móvil de Buffer-ACN 90:10

#	NombreMuestra	Área	Peso de la muestra (g)
1	ROB FM 90:10 EDTA M1	154067.3	1.5152
2	ROB FM 90:10 EDTA M2	152493.4	1.5063
3	ROB FM 90:10 EDTA M3	152573.1	1.5067

Tabla No. XLIX Áreas del analito obtenidas para la Robustez con el pH inicial del Buffer de 4.5

#	NombreMuestra	Área	Peso de la muestra (g)
1	ROB pH 4.5 EDTA M1	153967.3	1.5182
2	ROB pH 4.5 EDTA M2	149227.5	1.5125
3	ROB pH 4.5 EDTA M3	150806.8	1.5290

Tabla No. L Áreas del analito obtenidas para la Robustez en el cambio de pH del Buffer de 4.0

#	NombreMuestra	Área	Peso de la muestra (g)
1	ROB pH 4.0 EDTA M1	148557.8	1.5182
2	ROB pH 4.0 EDTA M2	144066.4	1.5125
3	ROB pH 4.0 EDTA M3	145652.6	1.5290

Tabla No. LI Áreas del analito obtenidas para la Robustez en el cambio de pH del Buffer de 5.0

#	NombreMuestra	Área	Peso de la muestra (g)
1	ROB pH 5.0 EDTA M1	156498.7	1.5182
2	ROB pH 5.0 EDTA M2	151388.8	1.5125
3	ROB pH 5.0 EDTA M3	153127.4	1.5290

9.1.8 ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA

Tabla No. LII Áreas del analito obtenidas en la condición inicial para el estudio de Estabilidad analítica para el estándar de trabajo

#	NombreMuestra	Áreas	Concentración (mg/mL)
1	STD T0	140381.7	0.015077
2	STD T0	140892.9	0.015077
3	STD T0	140425.9	0.015077

Tabla No. LIII Áreas del analito obtenidas en la condición inicial para el estudio de Estabilidad analítica para la suspensión oftálmica

#	NombreMuestra	Áreas	Peso de la muestra (g)
1	EDTA T0 M1	158461.6	1.5259
2	EDTA T0 M2	154059.3	1.5168
3	EDTA T0 M3	162483.4	1.5561

Tabla No. LIV Áreas del analito obtenidas a las 24 horas a temperatura ambiente del estándar de trabajo

#	NombreMuestra	Áreas	Concentración (mg/mL)
1	STD 24h	141543.3	0.015077
2	STD 24h	140803.0	0.015077
3	STD 24h	140799.8	0.015077

Tabla No. LV Áreas del analito obtenidas a las 24 horas en refrigeración del estándar de trabajo

#	NombreMuestra	Áreas	Concentración (mg/mL)
1	STD 24h R	139462.3	0.015077
2	STD 24h R	140225.0	0.015077
3	STD 24h R	140263.7	0.015077

Tabla No. LVI Áreas del analito obtenidas a las 24 horas a temperatura ambiente de la muestra de la suspensión oftálmica

#	NombreMuestra	Áreas	Peso de la muestra (g)
1	EDTA 24h M1	161450.0	1.5259
2	EDTA 24h M2	158497.0	1.5168
3	EDTA 24h M3	165201.4	1.5561

Tabla No. LVII Áreas del analito obtenidas a las 24 horas en refrigeración de la muestra de la suspensión oftálmica

#	NombreMuestra	Áreas	Peso de la muestra (g)
1	EDTA 24h R M1	158820.7	1.5259
2	EDTA 24h R M2	159387.6	1.5168
3	EDTA 24h R M3	165126.8	1.5561

Tabla No. LVIII Áreas del analito obtenidas a las 48 horas a temperatura ambiente del estándar de trabajo

#	NombreMuestra	Áreas	Concentración (mg/mL)
1	STD 48h	140555.5	0.015077
2	STD 48h	140288.4	0.015077
3	STD 48h	140283.9	0.015077

Tabla No. LIX Áreas del analito obtenidas a las 48 horas en refrigeración del estándar de trabajo

#	NombreMuestra	Áreas	Concentración (mg/mL)
1	STD 48h R	139015.5	0.015077
2	STD 48h R	138403.8	0.015077
3	STD 48h R	138053.6	0.015077

Tabla No. LX Áreas del analito obtenidas a las 48 horas a temperatura ambiente de la muestra de la suspensión oftálmica

#	NombreMuestra	Áreas	Peso de la muestra (g)
1	EDTA 48h M1	155437.7	1.5259
2	EDTA 48h M2	155447.6	1.5168
3	EDTA 48h M3	159995.5	1.5561

Tabla No. LXI Áreas del analito obtenidas a las 48 horas en refrigeración de la muestra de la suspensión oftálmica

#	NombreMuestra	Áreas	Peso de la muestra (g)
1	EDTA 48h R M1	154164.8	1.5259
2	EDTA 48h R M2	154208.2	1.5168
3	EDTA 48h R M3	156407.2	1.5561

Tabla No. LXII Áreas del analito obtenidas a las 96 horas a temperatura ambiente del estándar de trabajo

#	NombreMuestra	Áreas	Concentración (mg/mL)
1	STD 96h	140810.5	0.015077
2	STD 96h	140413.9	0.015077
3	STD 96h	140540.0	0.015077

Tabla No. LXIII Áreas del analito obtenidas a las 96 horas en refrigeración del estándar de trabajo

#	NombreMuestra	Áreas	Concentración (mg/mL)
1	STD 96h R	140766.9	0.015077
2	STD 96h R	140449.5	0.015077
3	STD 96h R	140517.6	0.015077

Tabla No. LXIV Áreas del analito obtenidas a las 96 horas a temperatura ambiente de la muestra de la suspensión oftálmica

#	NombreMuestra	Áreas	Peso de la muestra (g)
1	EDTA 96h M1	159650.2	1.5259
2	EDTA 96h M2	158969.3	1.5168
3	EDTA 96h M3	162319.3	1.5561

Tabla No. LXV Áreas del analito obtenidas a las 96 horas en refrigeración de la muestra de la suspensión oftálmica

#	NombreMuestra	Áreas	Peso de la muestra (g)
1	EDTA 96h R M1	160230.1	1.5259
2	EDTA 96h R M2	*	1.5168
3	EDTA 96h R M3	164418.2	1.5561

*En esta muestra no se obtuvo respuesta, ya que había una burbuja en el sistema al momento del análisis.

10. REFERENCIAS

- 1.- Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C., “Guía de Validación de Métodos Analíticos”, México, 2002.
- 2.- LabCompliance, www.labcompliance.com/methods/meth_val.htm, 2005.
- 3.-“Handbook of Pharmaceutical Excipients”, Pharmaceutical Press, 5th Edition, London, UK, 2006 pp. 255-256.
- 4.- Kaur, I. P., Singh M., Kanwar M., “Formulation and evaluation of ophthalmic preparations of acetazolamide”, *Int J Pharm*, 2000; 199: 119-127.
- 5.- Vessman, Jörgen, “Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1996; 14: 867-869.
- 6.- IUPAC, “Recommendations on Nomenclature for Chromatography”, *Pure Appl. Chem.* 37, 447, (1974).
- 7.-Quattrochi, O.A., de Andrizzi, S.A, Laba, R.F., “Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica”, Laboratorios Dr. Gador Buenos Aires, Argentina, 1992.
- 8.- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 10a Edición, 2011.
- 9.- Ruiz, Jordi y Pérez Pilar, “Validación de Métodos Analíticos. Concepto y Generalidades. Ejemplos Prácticos”, Barcelona, 2007.
- 10.- Alpizar Ramos, María del Socorro y Hernández Baltazar, Efrén, “Formas Farmacéuticas Sólidas”, 2° Edición, Facultad de Química, UNAM, México, D.F., 2009.
- 11.- NOM-059-SSA1-2006, “Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos”.
- 12.- ME.C01.2ATP.4804.R01.WI “Ensayo de Edetato Disódico por HPLC”.
- 13.- Farmacopea de los Estados Unidos de América, <1080> Excipientes Farmacéuticos a Granel, Edición 35, 2012, p. 709.
- 14.- Farmacopea de los Estados Unidos de América, <1151> Formas Farmacéuticas, Edición 34, 2011, p. 772.