



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE CLORURO DE ALQUILDIMETILBENCIL-
AMONIO EN UNA FORMULACIÓN OFTÁLMICA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MARÍA DEL CARMEN VICENTE VARGAS



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: GEORGINA MARGARITA MAYA RUIZ

VOCAL: JUAN MANUEL RODRÍGUEZ

SECRETARIO: DANIEL GARCÍA ESCANDÓN

1er. SUPLENTE: ERNESTINA HERNANDEZ GARCÍA

2° SUPLENTE: MARÍA GUADALUPE LEMUS BARAJAS

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE CONTROL FÍSICO-QUÍMICO

DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD

ALCON LABORATORIOS

ALCON MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

Q.B.P. DANIEL GARCÍA ESCANDÓN

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.F.B. MARÍA DE LA LUZ ESPINOSA COLÍN

SUSTENTANTE:

MARÍA DEL CARMEN VICENTE VARGAS

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos los profesores de la facultad que hicieron de mi formación la mejor, por compartirme sus conocimientos y experiencias y sobre todo por darme herramientas para defenderme en el mundo laboral.

A mis amigos por haber compartido esos momentos en la facultad y haber hecho más llevadero el camino, por haber compartido las horas de desvelo, las horas de estudio y las horas de risas, gracias por su amistad.

Gracias a cada una de las personas que hicieron posible el culminar con este proceso con sus aportaciones:

A Alcon Laboratorios que me permitió desarrollar el tema de mi tesis, en especial a todo el personal del laboratorio de control de calidad quienes me dieron la oportunidad de realizar el trabajo experimental de esta tesis, por el apoyo y el aprendizaje.

A Yazmín Hernández quién fue mi mentora en el mundo del análisis químico, por haberme brindado su experiencia, su paciencia y su tolerancia para enseñarme y sobre todo por haberme brindado su amistad, te quiero peque.

A cada uno de los miembros del jurado quienes brindaron su tiempo y cooperación en la revisión de esta tesis para que con su retroalimentación fuera un documento impecable.

A Luz Espinosa por haberse tomado el tiempo en la revisión de la parte escrita de esta tesis y por su cooperación para poder concluir con este proceso.

A la profesora Alpizar Ramos quién fue parte importante en la culminación de mis trámites de titulación, gracias por el apoyo.

Gracias a Ariz, a Caro y a Ale que me ayudaron con pequeños pasos para llegar a concluir con mis trámites de titulación en verdad lo aprecio.

DEDICATORIAS

A **Dios** por haberme permitido llegar a esta etapa de mi vida, seguir avanzando y creciendo día a día. Llegaré hasta donde me lo permitas, siempre buscando más sin darme por vencida, te agradezco por permitirme estar en este mundo.

A **mi mamá** quién ha estado presente todo el tiempo apoyándome y brindándome lo mejor de sí, por darme su cariño incondicional, por ser mi confidente y amiga, por confiar en mí y por no dejarme caer cuando más lo necesite, gracias por ser para mí un ejemplo de fortaleza y por impulsar mi desarrollo profesional te amo.

A **mi padre** quién me ha sido un pilar importante para impulsar mi crecimiento profesional, enseñándome un ejemplo de vida, por confiar en mí y brindarme el apoyo en todo momento. Gracias por todo lo que me has dado, por dar tu mayor esfuerzo para hacer de mí la persona que soy ahora, gracias por amarme como yo te amo a ti.

A mis hermanas: **Lore, Lili, Vero y Moni** que me han enseñado a enfrentar los retos que la vida me ha puesto, por compartirme sus experiencias y por ser para mí un ejemplo a seguir y sobre todo por el apoyo brindado para poder culminar esta etapa de mi vida, gracias por haberse hecho parte de mi vida, las quiero.

A **Yoani** porque cuando más lo necesite fue ese pequeño motor que me ayudo a continuar adelante, quién me escuchaba sin comprender que era lo que realmente pasaba y por darme la fuerza que necesite sin saberlo te quiero mucho mosho.

A **Emmanuel** quién me ha impulsado y apoyado para culminar esta etapa, por hacer de estos últimos años los mejores de mi vida, por el cariño brindado, por compartir tu vida a mi lado y por hacerme ver la vida de manera diferente, gracias por hacer de mi mundo ordinario un mundo maravilloso te amo.

A aquellas personas que ya no están conmigo sin embargo en su momento fueron una motivación para seguir adelante y un apoyo para mí, te dedico esto porque gracias a esa ausencia pude seguir adelante y llegar hasta aquí.

Índice

| | Pág. |
|---|-----------|
| 1. Introducción | 8 |
| 2. Objetivos | 8 |
| 3. Marco Teórico | 9 |
| 3.1. Cromatografía | 9 |
| 3.2. Tipos de Cromatografía | 10 |
| 3.3. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) | 13 |
| 3.4. Proceso Cromatográfico | 14 |
| 3.5. Conformación del Sistema HPLC | 15 |
| 3.5.1. Sistema de Bombeo | 16 |
| 3.5.2. Inyector | 16 |
| 3.5.3. Columnas | 17 |
| 3.5.4. Detectores | 18 |
| 3.6. Parámetros Cromatográficos | 20 |
| 3.7. Validación de Métodos Analíticos | 23 |
| 3.8. Fundamentos (importancia de contar con métodos validados) | 23 |
| 3.9. Tipos de Validación de Métodos Analíticos | 24 |
| 3.9.1. Identidad | 25 |
| 3.9.2. Sustancias Relacionadas o Impurezas | 25 |
| 3.9.3. Valoración o Contenido | 25 |
| 3.10. Parámetros de validación | 26 |
| 3.11. Cloruro de Benzalconio (BAC) | 28 |
| 4. Diseño Experimental | 30 |
| 4.1. Marbete | 30 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2. Reactivos y Materiales | 30 |
| 4.3. Preparación de las soluciones a utilizar | 31 |
| 4.3.1. Buffer de fosfatos pH 3.0 | 31 |
| 4.3.2. Fase móvil: buffer de fosfatos:acetonitrilo 40:60 | 31 |
| 4.3.3. Solución stock de estándar de BAC (1.0mg/mL) | 31 |
| 4.3.4. Estándar de Trabajo BAC (0.02mg/mL) | 31 |
| 4.3.5. Preparación de la muestra | 32 |
| 4.3.6. Placebo | 32 |
| 4.4. Equipos | 32 |
| 4.5. Procedimiento analítico para cada prueba a realizar | 33 |
| 4.5.1. Precisión | 33 |
| 4.5.1.1. Precisión del Sistema | 33 |
| 4.5.1.2. Precisión del Método | 33 |
| 4.5.2. Linealidad del sistema | 34 |
| 4.5.3. Linealidad del método | 35 |
| 4.5.4. Precisión intermedia | 36 |
| 4.5.5. Especificidad | 36 |
| 4.5.6. Estabilidad analítica de la muestra | 37 |
| 4.5.7. Robustez | 38 |
| 4.6. Algoritmos utilizados en los cálculos | 38 |
| 4.6.1. Algoritmo para cuantificar alquildimetilbencil-amonio (BAC) | 38 |
| 4.6.2. Media aritmética | 39 |
| 4.6.3. Desviación estándar | 39 |
| 4.6.4. Coeficiente de variación | 39 |
| 4.6.5. Pendiente | 39 |

| | |
|---|----|
| 4.6.6. Ordenada al origen | 39 |
| 4.6.7. Coeficiente de determinación | 39 |
| 4.6.8. Intervalo de confianza | 40 |
| 4.6.9. Intervalo de confianza para la pendiente | 40 |
| 4.6.10. Intervalo de confianza para la ordenada al origen | 40 |
| 4.6.11. Coeficiente de variación para la regresión | 40 |
| 5. Resultados | 40 |
| 5.1. Precisión del sistema | 40 |
| 5.2. Precisión de método | 41 |
| 5.3. Linealidad del sistema | 42 |
| 5.4. Linealidad del método | 42 |
| 5.5. Precisión Intermedia | 43 |
| 5.6. Especificidad | 43 |
| 5.7. Estabilidad analítica de la muestra | 44 |
| 5.8. Robustez | 44 |
| 6. Discusión de resultados | 45 |
| 7. Conclusiones | 49 |
| 8. Bibliografía | 50 |
| 9. Anexos | 51 |
| 9.1. Procedimiento analítico | 51 |
| 9.2. Áreas obtenidas durante el análisis | 56 |

1. Introducción¹

El propósito de cualquier medición analítica es conseguir datos consistentes, confiables y precisos, resultados incorrectos pueden llevar enormes costos. Si un producto con una medición incorrecta en las especificaciones es comercializado puede ser retirado del mercado, si los contaminantes no son detectados en la muestra estos pueden ser peligrosos, y si los medicamentos son distribuidos con impurezas pueden llegar a tener un impacto negativo en la salud de las personas.

Un reporte con resultados analíticos incorrectos en cualquier momento puede llevar a perder la confianza en resultados futuros, por tanto, cualquier laboratorio debe hacer todo lo posible para garantizar resultados y reportes exactos y confiables. La validación y calificación de procesos y equipos ayudará a cumplir con este objetivo. La validación de métodos analíticos también es importante porque es requisito para muchas regulaciones, estándares de calidad y por políticas de cada compañía para garantizar que el producto que se comercializa cumple con los requerimientos para lo cual fue diseñado.

La validación es un concepto antiguo en los laboratorios analíticos, se debe validar cualquier método analítico antes de usarlo como método de rutina.

2. Objetivos

- 2.1.** Validar el método analítico para la cuantificación de Aquildimetilbencil-amonio (Cloruro de Benzalconio) en una suspensión oftálmica con concentración de 0.01 por ciento, por cromatografía de líquidos de alta resolución.
- 2.2.** Demostrar que el método analítico cumple con los lineamientos establecidos en la guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.

3. Marco teórico

3.1. Cromatografía^{1,2}

La definición “oficial” de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) es la siguiente: “Cromatografía es un método de separación físico en el cual los componentes son separados y distribuidos entre dos fases, una de las fases es estacionaria (fase estacionaria) y la otra (fase móvil) se mueve en una dirección definida. La elución en cromatografía es un procedimiento en el cual la fase móvil es pasada continuamente a través de lo largo de la fase estacionaria y la muestra es alimentada dentro del sistema”.

La técnica es dividida en dos tipos de acorde en el estado físico de la fase móvil: si la fase móvil es gas, la técnica es llamada cromatografía de gases (GC), y si es líquido la técnica es llamada cromatografía de líquidos (LC). Una subclasificación puede hacerse de acuerdo al estado físico de la fase estacionaria: si la fase estacionaria es un sólido de GC la técnica es llamada Cromatografía gas-sólido (CSG) y si es líquido la técnica es llamada Cromatografía gas-líquido (GLC).

El proceso de cromatografía ocurre como resultado de pasos repetidos de absorción/desorción durante el movimiento de los analitos a lo largo de la fase estacionaria. La separación se debe a la diferencia en coeficientes de distribución de los analitos individuales en la muestra. Cuando ambas fases se han escogido en forma apropiada los componentes de la muestra se separan gradualmente en bandas en la fase móvil. Al final del proceso los componentes separados emergen en orden creciente de interacción con la fase estacionaria. El componente menos retardado emerge primero, el retenido más fuertemente eluye al último. El reparto entre las fases aprovecha las diferencias entre las propiedades físicas y/o químicas de los componentes de la muestra. Los componentes adyacentes (picos) se separan cuando el pico que sale después es retardado lo suficiente para impedir la sobre posición con el pico que emergió antes.

Una amplia gama de selección de materiales para las fases móvil y estacionaria, permite separar moléculas que difieren muy poco en sus propiedades físicas y químicas. En un sentido amplio, la distribución de un soluto entre dos fases es el resultado del balance de fuerzas entre las moléculas del soluto y las moléculas de cada fase. Refleja la atracción o

repulsión relativas que presentan las moléculas de los iones de las fases competidoras por el soluto entre sí.

De todas las técnicas utilizadas en los laboratorios analíticos de la industria farmacéutica, la cromatografía es la más usada. En 1997 la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) fue la técnica instrumental más usada en la industria farmacéutica (35%) en segundo lugar estaba la cromatografía de gases (GC) con un 15% y cromatografía de gas/espectroscopia de masas (GC/MS) en sexto lugar con un 6%.

3.2. Tipos de Cromatografía^{2,3}

La cromatografía puede clasificarse de acuerdo al tipo de equilibrio involucrado, mismo que es gobernado por el tipo de fase estacionaria que utiliza. Así la cromatografía puede ser de adsorción, partición, intercambio iónico, exclusión y de afinidad.

3.2.1. Cromatografía de adsorción

La fase estacionaria es un sólido en donde los componentes de la muestra son adsorbidos. La fase móvil puede ser un líquido (cromatografía líquido-sólido) o un gas (cromatografía gas-sólido); los componentes se distribuyen entre dos fases a través de la combinación de los procesos de adsorción y desorción. La cromatografía en capa fina (TLC) es un ejemplo especial de cromatografía por adsorción en la cual la fase estacionaria es una placa, que forma el soporte sólido en un plano inerte.

La cromatografía de adsorción es particularmente adecuada para el análisis de moléculas no ionizadas, insolubles en agua y relativamente simples, que frecuentemente son isómeros o compuestos relacionados. El intervalo de compuestos que pueden separarse se extiende desde los hidrocarburos muy polares hasta compuestos polifuncionales fuertemente polares. Esta cromatografía se ve poco influida por las diferencias en peso molecular y más por los grupos funcionales específicos.

3.2.2. Cromatografía de partición

La fase estacionaria de la cromatografía de partición es un líquido soportado en un sólido inerte. La fase móvil puede ser un líquido (cromatografía de partición líquido-líquido) o un

gas (cromatografía de partición gas-líquido, GLC). La separación se basa en la distinta solubilidad de las sustancias en las dos fases. Esta diferencia de solubilidad se expresa mediante coeficientes de reparto. La cromatografía en papel es un tipo de cromatografía de partición en la cual la fase estacionaria es una capa de agua adsorbida en una hoja de papel.

3.2.3. Cromatografía de intercambio iónico

La separación en la cromatografía de intercambio iónico depende de la adsorción reversible de moléculas de soluto cargadas a una resina con grupos iónicos de carga opuesta. El mecanismo de separación se basa en un equilibrio de intercambio iónico, en la primera etapa es un equilibrio en el cual el intercambiador iónico se encuentra en las condiciones apropiadas de pH y fuerza iónica, lo que permitirá la unión de las moléculas de soluto, los grupos que se intercambian están asociados con sus respectivos contra-iones (usualmente aniones y cationes simples, como cloruro o sodio).

En una segunda etapa se encuentra la muestra y su adsorción, en la cual las moléculas del soluto llevan a cabo el apropiado desplazamiento de carga de los contra-iones y se unen reversiblemente al gel, las sustancias que no se unen son eluidas de la cama del intercambiador usando el buffer inicial. En la tercera etapa se lleva a cabo la desorción de la muestra cambiando las condiciones de elución, al desfavorecer la formación del enlace iónico de las moléculas de la muestra y la cama del intercambiador, esto normalmente se logra aumentando la fuerza iónica del buffer de elución o cambiando su pH.

En la cuarta y quinta etapa corresponde a la remoción de sustancias no eluidas bajo las condiciones experimentales previas y regresar al equilibrio de las condiciones iniciales para la purificación.

La separación de diferentes sustancias se lleva a cabo porque éstas tienen diferentes grados de interacción con el intercambiador iónico debido a diferencias en sus cargas, densidades de carga y distribuciones de carga en su superficie, éstas interacciones pueden ser controladas variando la fuerza iónica y el pH.

3.2.4. Cromatografía de exclusión molecular o permeación

En la cromatografía de exclusión pueden separarse moléculas solvatadas de acuerdo a su tamaño y habilidad de penetrar en una estructura tamiz (la fase estacionaria).

La separación en cromatografía de partición y en cromatografía de intercambio iónico se logra por diferentes interacciones de solutos con la fase móvil y la fase estacionaria. En contraste, la separación en cromatografía de exclusión molecular se lleva a cabo por diferencias en tamaño molecular y la habilidad de diferentes moléculas para penetrar los poros de la fase estacionaria a diferentes tamaños o magnitudes.

La cromatografía de exclusión molecular se usa extensamente para separar preparaciones de macromoléculas de origen biológico, así como para la purificación de polímeros orgánicos sintéticos.

3.2.5. Cromatografía de afinidad

Este tipo de cromatografía utiliza interacciones altamente específicas entre un tipo de moléculas de soluto y una segunda molécula unida covalentemente (inmovilizada) a la fase estacionaria. Por ejemplo la molécula inmovilizada podría ser un anticuerpo específico para una proteína en particular, cuando una muestra cruda que contiene miles de proteínas se pasa a través de la columna sólo una proteína reacciona con el anticuerpo que está unido a la columna, después de lavar todos los otros solutos de la columna, la proteína deseada es desplazada del anticuerpo cambiando el pH, fuerza iónica o polaridad. Las interacciones entre las moléculas del ligando y blanco pueden ser el resultado de interacciones hidrofóbicas o interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals y/o puentes de hidrógeno.

La purificación por afinidad requiere un ligando bioespecífico que puede ser unido covalentemente a una matriz cromatográfica, el ligando acoplado debe tener afinidad específica de enlace hacia las moléculas blanco, y después de lavar el material no unido, la unión entre las moléculas blanco y el ligando debe ser reversible y permitir que las moléculas blanco sean removidas en forma activa.

Algunas interacciones típicas usadas en la cromatografía de afinidad son:

- ⊕ Enzima \Leftrightarrow sustrato análogo, inhibidor, cofactor.
- ⊕ Anticuerpo \Leftrightarrow antígeno, virus, célula.
- ⊕ Lecitina \Leftrightarrow polisacárido, glicoproteína, receptor de superficie celular, célula.
- ⊕ Ácido nucleico \Leftrightarrow secuencia de bases complementaria, histonas, polimerasa de ácidos nucleicos, proteína de unión al DNA.
- ⊕ Hormona, vitamina \Leftrightarrow receptor, proteína acarreadora.
- ⊕ Glutación \Leftrightarrow glutación-S-transferasa o proteína de fusión GST.
- ⊕ Iones metálicos \Leftrightarrow proteínas de fusión poli (his), proteínas nativas con histidina, residuos de cisteína y/o triptófano en sus superficies.

3.3. Cromatografía de Líquidos de alta resolución (HPLC)^{1,2}

La cromatografía de líquidos de alta resolución es la técnica más popular dentro de la industria farmacéutica, esto es debido a los requisitos operacionales de la técnica, en la cromatografía de gases se requiere que el analito sea volátil mientras que para HPLC sólo se requiere la solubilidad de los analitos en la fase móvil. La volatilidad está relacionada inversamente con el peso molecular y con la polaridad de los analitos. En la industria farmacéutica muchos analitos tienden a tener alta polaridad, moléculas solubles en agua, con relativamente bajo peso molecular. Por lo tanto en un sistema HPLC con una fase móvil polar (agua, acetonitrilo o metanol), es idealmente adecuado para un análisis farmacéutico.

La técnica de HPLC es capaz de separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de otros grupos polifuncionales de alto peso molecular. Con la fase móvil líquida interactiva, otro parámetro se encuentra disponible para la selectividad, en adición a una fase estacionaria activa. La separación en HPLC es el resultado de las interacciones específicas entre las moléculas de la muestra con ambas fases, móvil y estacionaria.

Esta técnica ofrece una mayor variedad de fases estacionarias, lo que permite una mayor gama de interacciones selectivas y más posibilidades para la separación. El recobro de las

muestras es fácil en HPLC, las fracciones separadas se recolectan en forma sencilla, colocando un recipiente abierto al final de la columna, el recobro es usualmente cuantitativo y los componentes separados son fácilmente aislados del disolvente de la fase móvil.

En el modo normal de operaciones de partición líquido-líquido, una fase estacionaria polar (por ejemplo: agua, metanol) se usa con una fase estacionaria no polar (por ejemplo, hexano), favorece la retención de compuestos polares y la elución de compuestos no polares y se conoce como cromatografía en fase normal. Si se utiliza una fase estacionaria no polar con una fase móvil polar, entonces los solutos no polares serán retenidos y los solutos polares eluidos. Esto se conoce como cromatografía en fase reversa.

El mecanismo de separación en cromatografía de fase reversa depende de interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de soluto en la fase móvil y el ligando hidrofóbico inmovilizado en la fase estacionaria. La naturaleza actual de las interacciones de unión hidrofóbica asume que la interacción de unión es el resultado de un efecto entrópico favorable. Las condiciones iniciales de unión de la fase móvil usadas en la cromatografía de fase reversa son acuosas lo cual indica un alto grado de estructuras de agua organizadas alrededor de las moléculas de soluto y el ligando inmovilizado. Mientras el soluto que se une al ligando hidrofóbico inmovilizado disminuye el área hidrofóbica expuesta hacia el disolvente, así el grado de organización de la estructura de agua disminuye con un favorable aumento en la entropía del sistema.

3.4. Proceso cromatográfico

En la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) la muestra es inyectada dentro de la fase móvil, pasa a la bomba de alta presión y es transportada a través de la columna dónde se lleva a cabo la separación. La separación es monitoreada a través del detector.

En el diseño de un sistema de cromatografía de líquidos, se tiene que considerar una variedad de puntos:

- ⊕ Una separación eficiente está relacionada con el tamaño de partícula del material de la fase estacionaria. Se requiere mayor presión cuando el tamaño de partícula es reducido.
- ⊕ Con el fin de mantener la resolución alcanzada en la columna, el pico máximo debe ser reducido y restringido lo más que sea posible.
- ⊕ La calidad de los solventes usados en la fase móvil es importante, se requiere grado HPLC y agua desionizada. Se requiere también desgasificar la fase móvil para prevenir la formación de burbujas de aire en la bomba.

3.5. Conformación del sistema HPLC^{1,2}

La instrumentación en HPLC incluye una bomba, un inyector, la columna, el detector y el sistema de datos. El corazón del sistema es la columna, donde se produce la separación, dado que la fase estacionaria se compone de poros del tamaño de micrómetros, se requiere una alta presión de la bomba para mover la fase móvil a través de la columna. El proceso cromatográfico inicia por la inyección del soluto en la parte superior de la columna, la separación de los componentes se produce cuando los analitos y la fase móvil se bombean a través de la columna. Finalmente cada componente eluye de la columna como una banda estrecha (o pico) en el sistema registrador.

La detección de los componentes es importante, esta puede ser selectiva o universal dependiendo del detector utilizado. La respuesta que da cada componente se muestra en la pantalla de un ordenador y es conocido como cromatograma. Para recoger, almacenar y analizar los datos cromatográficos con frecuencia se utiliza un ordenador, un integrador y otros equipos de procesamiento.

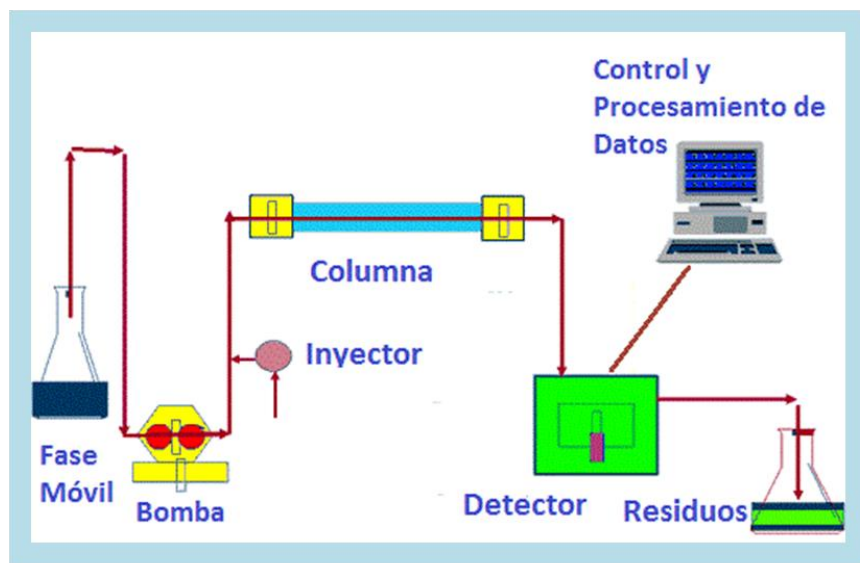


Imagen No. I. Conformación del sistema HPLC.

3.5.1. Sistema de bombeo^{1,2}

La bomba tiene la tarea de proporcionar la fuerza necesaria para empujar a la fase móvil a través de la columna. La presión requerida puede ser tan alta como 6000 psi debido al pequeño diámetro, al material de empaque y a la longitud de la columna. Además de proporcionar la fuerza, la bomba también debe mantener un flujo preciso y constante de fase móvil a fin de proporcionar tiempos de retención reproducibles. Finalmente la bomba debe proporcionar composiciones precisas de fase móvil para establecer la fuerza de elución adecuada para las separaciones en HPLC. La bomba logra todas estas tareas a través de una variedad de diseños.

La mayoría de las bombas en HPLC se basan en el diseño de pistón alternativo, y aunque todavía existen bombas de pistones de una sola cabeza, las más empleadas son las bombas de doble pistón con cabeza oscilante.

3.5.2. Inyector^{1,2}

En HPLC el flujo de corriente es típicamente de presión baja y este flujo debe ser aislado de la muestra, para lograr esto regularmente se utiliza una válvula de varios puertos.

La válvula tiene dos posiciones: cargar e inyectar, en posición de carga el flujo es desviado directamente de la bomba a la columna dejando así el bucle de muestra con una presión

ambiente. El bucle de muestra se carga entonces con la muestra a través de una jeringa manual (inyector manual) o mediante el uso de un dispositivo de carga automática (inyector automático). La válvula se gira a la posición inyectar redirigiendo el flujo de la bomba, a través del bucle de muestra, a la columna.

En el caso de inyecciones manuales, los resultados obtenidos por la carga de un bucle completo garantizan una mayor reproducibilidad de los resultados. Este tipo de inyección se lleva a cabo mediante la carga del bucle con al menos cuatro veces el volumen del bucle. Por ejemplo si la inyección es de 20 μ L el bucle debe ser llenado con al menos 80 μ L, todo el exceso de volumen se desvía y esto asegura un volumen de inyección reproducible.

3.5.3. Columnas^{1,2}

La columna es el corazón del sistema de cromatografía de líquidos. Convencionalmente las columnas son de 100-300mm de largo y poseen un diámetro interno de 3-4.6mm y un diámetro externo de un ¼ de pulgada. En la tabla número 1 se describen las características de los diferentes tipos de columnas que se emplean para la cromatografía de líquidos de alta resolución.

Tabla I. Características de columnas en cromatografía de líquidos.

| Características de columnas en LC con diferentes diámetros internos | | | | |
|---|-----------------------|----------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| Tipo | Diámetro interno (mm) | Flujo (μ l/min) | V _{inj} (μ l) | C _{máx.} en el Detector* |
| Convencional | 4.6 | 1000 | 100 | 1 |
| Diámetro estrecho | 2.0 | 200 | 19 | 5.3 |
| Microbore | 1.0 | 47 | 4.7 | 21.2 |
| Microcapilar | 0.32 | 4.9 | 0.49 | 207 |
| Nano LC | 0.05 | 0.120 | 0.012 | 8464 |

*Basado en columna

Las columnas microcapilares empacadas y nano LC están hechas de 0.05-0.5mm de diámetro interno con tubos de sílice fundida. El empaquetamiento geométrico de estas columnas difiere desde el diámetro mayor de la columna, resultando en una mayor eficacia en la columna.

Con respecto a la geometría de empaquetamiento y eficiencia de la columna, las columnas de diámetro micro son equivalentes a las columnas convencionales excepto en el diámetro interno.

La asimetría de los picos puede deberse a diferentes causas: sobrecarga, resolución insuficiente entre los picos del analito, interacciones no deseadas entre la fase estacionaria y la fase móvil por ejemplo: espacios entre la columna empacada y residuos de grupos funcionales.

3.5.4. Detectores^{1,2}

El detector mide un parámetro físico de la columna, o de los componentes que eluyen en la columna y lo transforma en una señal eléctrica.

Un detector es un dispositivo sensible a la concentración, el cual da una señal que está en función de la concentración del analito en el eluyente o con un dispositivo que sea sensible al flujo de masa, donde la señal es proporcional al flujo de masa del analito.

Características importantes del detector en cromatografía de líquidos:

- ⊕ El ruido es la fluctuación estática de la amplitud sobre la línea base, esto incluye todas las señales del detector, el ruido generalmente se refiere a ruido electrónico.
- ⊕ La detección y determinación de límites la cual es generalmente definida en términos de proporciones de señal-ruido, para lo cual se debe conocer el límite de cuantificación.
- ⊕ La linealidad y el rango lineal, un detector es lineal solo sobre un rango límite.
- ⊕ El tiempo de detección constante, el detector necesita responder suficientemente rápido a los cambios de concentración o de flujo de masa en el efluente, de otra manera los picos son distorsionados.

Después del espectrómetro de masas que es considerado el más importante en cromatografía de líquidos, un número de otros detectores son utilizados con diferentes aplicaciones:

- ⊕ Detector de absorbancia de UV, es el más extensamente usado en cromatografía de líquidos, es un detector específico con una amplia gama de aplicabilidad. La detección se basa en la absorción de fotones por un crómoforo por ejemplo: dobles enlaces, anillos aromáticos y algunos heteroátomos. De acuerdo a la ley de Lambert-Beer el detector de UV es sensible a la concentración.
- ⊕ Detector de fluorescencia es específico y sensible a la concentración, se basa en la emisión de fotones por medio de la excitación electrónica. Se observa especialmente para análisis de sistemas con largos anillos conjugados, por ejemplo: hidrocarburos aromáticos polinucleares y otros derivados. Su aplicabilidad es de alto rango, se han descubierto estrategias de derivatización antes de la columna o después de la columna.
- ⊕ Detección de dispersión de luz evaporada (ELSD) es un detector universal basado en la habilidad de que algunas partículas causan dispersión de fotones cuando son atravesadas por un haz de luz policromática. El líquido que efluye del sistema es nebulizado, el aerosol resultante se dirige a través de un haz de luz. El ESLD es sensible al flujo de masa, que proporciona una respuesta directamente proporcional a la masa de la muestra no volátil analizada, puede detectar compuestos que son transparentes para otras técnicas, es frecuentemente usado en conjunto con LC-MS para obtener un análisis completo de la muestra.
- ⊕ Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR), con flujo continuo se ha designado para detectar flujos bajos de 40-120 μ l. El espectro de NMR frecuentemente se recomienda con el modo de flujo apagado aunque se han reportado aplicaciones con flujo continuo que son buenas.
- ⊕ Índice de refracción es el más universal y menos sensible de todos los detectores para HPLC, es el más fácilmente disponible. Miden los cambios menores en el índice de refracción que ocurren cuando la concentración del analito cambia en la elución. Este detector es universal porque el índice de refracción de una solución se cambia si la temperatura, densidad o concentración cambian.

- ⊕ Espectrómetro de masas (LC/MS) esta combina la versatilidad de separación de HPLC con el poder de identificación estructural del espectrómetro de masas. La dificultad de conjuntar estas dos técnicas se deriva de la incompatibilidad del gran flujo de corriente utilizado en HPLC y los requerimientos de alto vacío para la espectrometría de masas.

3.6. Parámetros Cromatográficos^{1,3}

La concentración del analito se observa en la parte superior del pico cromatográfico C_{\max} es un parámetro importante, relacionado a la dilución en la columna cromatográfica. Este puede estar relacionado con varios parámetros cromatográficos como: la cantidad inyectada, número de platos teóricos en la columna, diámetro interno, longitud y porosidad de la columna y la capacidad de la columna.

A continuación se mencionan los parámetros cromatográficos más importantes en este tipo de cromatografía:

Tiempo de Retención, t_r . Es el tiempo que el soluto permanece en la columna, se mide desde el momento de la inyección hasta la elución del pico, es auxiliar en la identificación de solutos ya que es característico de cada soluto para condiciones de operación establecidas.

Tiempo muerto, t_0 . El tiempo requerido para eluir un soluto que no se retiene en la fase estacionaria, tiempo que el soluto permanece en la fase móvil representa el espacio vacío de la columna.

Número de platos teóricos (N). Cada plato teórico representa un equilibrio teórico de distribución del soluto entre las fases. El número total de platos teóricos de una columna representa el poder de separación de la columna. Una buena columna tiene un número alto de platos teóricos. Se calcula con la siguiente ecuación:

$$N = 5.545 \left(\frac{t_r}{W_{1/2}} \right)^2$$

Donde:

t_r = es el tiempo de retención de la muestra

$W_{1/2}$ = ancho a la mitad de la altura del pico

Resolución (R_s). Se define como la distancia entre los picos (o centros) dividida entre el ancho promedio de las bandas. Si la retención y el ancho de la banda se miden en unidades de tiempo la resolución esta dada por:

$$R_s = \frac{2(t_{r,2} - t_{r,1})}{(W_{b,2} + W_{b,1})}$$

Donde los tiempos de retención y los anchos se expresan en las mismas unidades y

W_b es la porción de la línea base interceptada por las tangentes al pico, para un pico gaussiano es igual a 4.

La resolución mínima aceptable en mezclas sencillas es 1.0, una resolución de 1.5 representa separación de la línea base. La resolución alcanzada en un sistema es proporcional al producto de la selectividad, la eficiencia y la capacidad del sistema, que son los tres más importantes parámetros de control en una columna cromatográfica.

Factor de capacidad. El factor de capacidad o retención k es la cantidad más importante de la cromatografía en columna, relaciona el equilibrio de distribución de la muestra dentro de la columna con las propiedades termodinámicas de la columna y con la temperatura. Es una medida del tiempo transcurrido en la fase estacionaria en relación al tiempo transcurrido en fase móvil. Se define como el cociente de los moles de soluto en la fase estacionaria entre los moles de soluto en la fase móvil:

$$k = \frac{C_s V_s}{C_m V_m}$$

Eficiencia. La eficacia de la columna esta relacionada con el ensanchamiento de la banda que se encuentra en la columna y puede ser calculada:

$$N = 5.54 \left(\frac{V_{r1}}{W_{1/2}} \right)^2$$

V_r es el volumen de retención

Y se expresa como un número de platos teóricos (N) para la columna bajo condiciones experimentales específicas. La eficiencia es conocida frecuentemente como el número de platos teóricos por metro de cama cromatográfica.

A partir de que el valor observado de N depende de factores experimentales tales como la velocidad de flujo y la carga de la muestra, es importante que las comparaciones sean hechas bajo condiciones idénticas.

Selectividad (α). Se define como la habilidad que tiene el sistema de separar los picos, distancia entre dos picos, mejorar la selectividad implica alterar la termodinámica del sistema cromatográfico. La resolución está relacionada de forma lineal con la selectividad y de forma cuadrática con la eficiencia, esto significa que un incremento de cuatro veces en la eficiencia es necesario para duplicar la resolución en condiciones isocráticas.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

Factor de coleo o asimetría. Es una medida de la simetría del pico, es uno para los picos perfectamente simétricos y su valor aumenta a medida que la simetría es más pronunciada. Como consecuencia de la simetría del pico la integración y la precisión son menos confiables.

$$T = \frac{W_{1/2}}{2f}$$

Donde f es la distancia entre el máximo del pico y el borde inicial del pico, a la mitad de la altura del pico desde la línea base.

3.7. Validación de métodos analíticos⁵

La validación de métodos analíticos es parte fundamental del desarrollo de una nueva formulación y de la técnica de análisis de control de calidad de una forma farmacéutica, ya que es durante esta secuencia de pruebas y análisis donde el químico se da cuenta si el estudio, que está siendo evaluado, cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado, así la validación de métodos es el proceso para demostrar que el procedimiento analítico es adecuado para su uso en lo que fue previsto.

Existen diferentes tipos de procedimientos analíticos:

- A. Procedimientos analíticos regulatorios. Es el procedimiento usado para evaluar una característica definida del fármaco o el medicamento.
- B. Procedimiento analítico alternativo. Es un procedimiento analítico validado propuesto por el solicitante para su uso en lugar del procedimiento de análisis normativo.
- C. Procedimiento indicador de estabilidad. Es un procedimiento de análisis cuantitativo validado que puede detectar los cambios con el tiempo en las propiedades pertinentes en el fármaco o medicamento.

Desde el punto de vista de la validación todos los procedimientos analíticos son importantes, en general debemos usar métodos analíticos validados independientemente de si se trata de un análisis durante el proceso, para la liberación, para la aceptación o para estabilidad cada procedimiento de análisis cuantitativo debe de garantizarnos las mínimas variaciones en el ensayo.

3.8. Fundamentos (importancia de contar con métodos validados)^{5,6,7,8,9,10}

De acuerdo a las Buenas Prácticas tanto de Fabricación como de Laboratorio, es necesario que todos los métodos analíticos estén validados.

La validación es un proceso establecido por diferentes entidades regulatorias para la obtención de pruebas documentadas y demostrativas de que un método de análisis es lo suficientemente fiable y reproducible para la obtención de resultados.

En México contamos con la Guía de Validación del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos la cual nos indica las pruebas a realizar según la aplicación de método analítico, así como su respectiva especificación y criterio de aceptación.

La guía está justificada por el Reglamento de Insumos para la Salud artículo 15 donde se dice que un establecimiento destinado a la fabricación de insumos, llevará el control analítico de estos, dicho control deberá incluir la validación de las técnicas empleadas, la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006 “Buenas Prácticas de Fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos” establece los siguientes numerales referentes a la validación de métodos analíticos: 14.5, 14.5.1, 14.5.1.1., 14.5.1.2., 14.5.1.3. y 14.5.1.4., donde se hace referencia a contar con procesos y métodos validados para producto a granel, producto terminado y materia prima.

Norma Oficial Mexicana NOM-164-SSA1-1998 “Buenas prácticas de fabricación para fármacos” numerales 16.1 y 16.1.5 validación de métodos analíticos utilizados por la empresa cuando estos sean no farmacopeicos.

Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005 “Estabilidad de Medicamentos” numerales 5.3, 6.3., 7.3., y 9.3., donde se indica que los parámetros a evaluar y metodología analítica utilizados deben de estar validados. Las regulaciones anteriores, determinan la obligación de validar métodos analíticos en México.

3.9. Tipos de validación de métodos analíticos

La validación de métodos analíticos se dirige a los cuatro tipos más comunes de procedimientos analíticos que son:

- ⊕ Pruebas de identificación,
- ⊕ Pruebas cuantitativas para contenido de impurezas,
- ⊕ Pruebas límite para contenido de impurezas.
- ⊕ Pruebas para cuantificar la cantidad de sustancia activa en un medicamento o fármaco u otro componente seleccionado.

En la actualidad de guía ICH Q2(R1), “Validación de métodos analíticos, texto y metodología” sólo hace referencia a estos cuatro tipos de procedimientos analíticos y señala que aunque existen otros procedimientos analíticos tales como la prueba de disolución o determinación del tamaño de partícula del fármaco, estas no se han abordado en la guía aunque son igualmente importantes a los que se mencionaron.

3.9.1. Identidad

Las pruebas de identificación tienen como finalidad garantizar la identidad de un analito en la muestra esto se logra normalmente mediante la comparación de una característica de la muestra (por ejemplo, un espectro, comportamiento cromatográfico, reactividad química, etc.) con la de un compuesto de referencia.

3.9.2. Sustancias relacionadas e impurezas

Las pruebas de impurezas pueden ser o bien un ensayo cuantitativo o bien una prueba límite. Cualquier prueba tiene por objeto reflejar con precisión las características de pureza de la muestra. Los requisitos de validación varían de acuerdo al tipo de prueba, ya sea cuantitativa o prueba límite.

3.9.3. Valoración o contenido

Las pruebas de ensayo están destinadas a medir el analito presente en una muestra dada, el ensayo representa una medición cuantitativa de los componentes principal (es) en el medicamento. Para la sustancia activa se utilizan características similares de validación así como también para cualquier otro componente seleccionado y puede aplicarse a ensayos asociados a otros procedimientos analíticos como por ejemplo, disolución.

3.10. Parámetros de validación

El objetivo del procedimiento analítico debe quedar claro ya que este regirá las características de validación que necesitan ser evaluadas. Las características típicas de validación que se deben considerar son las siguientes:

- ⊕ **Precisión:** grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente.
- ⊕ **Exactitud:** concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia.
- ⊕ **Repetibilidad:** precisión del método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método.
- ⊕ **Precisión 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.
- ⊕ **Especificidad:** capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra.
- ⊕ **Límite de Detección:** concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.
- ⊕ **Límite de Cuantificación:** concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo condiciones de operación establecidas.
- ⊕ **Linealidad:** habilidad para asegurar que los resultados obtenidos son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado.
- ⊕ **Robustez:** capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método.

En función de la aplicación analítica del método, en la tabla II se indican los parámetros de desempeño a estudiar.

Tabla II. Parámetros de desempeño a evaluar en la validación dependiendo de la aplicación del método analítico.

| Parámetro de Desempeño | Contenido/ Potencia/ Valoración | Pruebas de impurezas | | Identificación |
|--|---------------------------------------|--------------------------|--------|----------------|
| | | Contenido/ Valoración | Límite | |
| Precisión / Adecuabilidad del Sistema | Sí | Sí | Sí | * |
| Linealidad del Sistema | Sí | Sí | No | No |
| Especificidad¹ | Sí ³ | Sí | Sí | Sí |
| Exactitud y Repetibilidad | Sí | Sí | No | No |
| Linealidad del Método | Sí | Sí | No | No |
| Precisión del Método o Precisión Intermedia² | Sí | Sí | No | No |
| Estabilidad analítica de la muestra | * | * | No | No |
| Límite de Detección | No | No | Sí | No |
| Límite de Cuantificación | No | Sí | No | No |
| Robustez | * | * | * | No |
| Tolerancia | * | * | * | No |

*Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método

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

²También es definido como un estudio de tolerancia.

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

En este caso el método analítico para la cuantificación de Alquildimetilbencil-amonio es un método: indicativo de estabilidad y para determinación de contenido, para su validación se realizarán las siguientes pruebas:

- Precisión (método y sistema)
- Linealidad (sistema y método)
- Especificidad
- Estabilidad de la muestra
- Tolerancia
- Robustez.

En la parte experimental se detallan cada una de las pruebas a realizar.

3.11. Cloruro de Benzalconio¹¹

El Cloruro de Benzalconio es una mezcla de cloruros alquilbencildimetilamonio de la fórmula general $[C_6H_5CH_2N(CH_3)_2R]Cl$, donde R representa una mezcla de alquilo, incluyendo todos o alguno de los grupos empezando con $n-C_8H_{17}$ y extendiéndose a través de homólogos mayores, con $n-C_{12}H_{25}$, $n-C_{14}H_{33}$ comprendiendo la porción mayor.

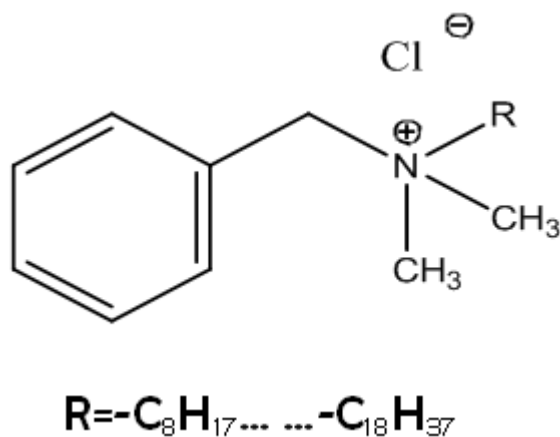


Figura II. Estructura química del cloruro de benzalconio.

Sirve como conservador antimicrobiano, antiséptico, desinfectante, agente solubilizante y agente humectante. El cloruro de benzalconio es un compuesto cuaternario de amonio que en formulaciones farmacéuticas es usado como antimicrobiano, en aplicaciones similares es usado con otros cationes surfactantes como la cetrimida.

En preparaciones oftálmicas el cloruro de benzalconio es uno de los antimicrobianos más extensamente usados en una concentración de 0.01%-0.02% peso/volumen. Frecuentemente es usado en combinación con otros conservadores o excipientes, particularmente con edetato disódico en una concentración 0.1% peso/volumen para mejorar su actividad antimicrobiana contra cepas de *Pseudomonas sp.*

En formulaciones nasales u óticas se usa en una concentración de 0.002-0.02%, a veces en combinación con timerosal en una concentración del 0.002-0.005% peso/volumen.

El cloruro de benzalconio 0.01% peso/volumen también se emplea como conservador en productos parenterales de poco volumen así como también es usado como conservador en productos cosméticos.

El cloruro de benzalconio se produce como un polvo amorfo blanco o blanco amarillento ó un gel espeso o gelatinoso. Es higroscópico, jabonoso al tacto y tiene un olor suave y aromático, sabor muy amargo. Prácticamente insoluble en éter, muy soluble en acetona, etanol (95%), metanol, propanol y agua. En solución acuosa el cloruro de benzalconio forma espuma cuando se agita. Posee una baja tensión superficial lo que le proporciona propiedades como detergente y emulsificante.

Las soluciones de cloruro de benzalconio son activas contra una amplia gama de bacterias, levaduras y hongos. La actividad es más marcada frente a microorganismos Gram (+) que a bacterias Gram (-) y mínima contra endosporas bacterianas y bacterias ácido-alcohol resistentes. La actividad antimicrobiana del cloruro de benzalconio es significativamente dependiente de la composición de la mezcla alquilo homólogo. El cloruro de benzalconio es eficaz contra algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Trichophyton interdigitale*, y *T. rubrum*. Sin embargo, combinado con edetato disódico (0,01-0,1% p/v), alcohol bencílico, feniletanol, o fenilpropanol, la actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa* se incrementa. La actividad antimicrobiana también puede ser mejorada mediante la adición de acetato fenilmercúrico, borato fenilmercúrico, clorhexidina, cetrimida, o m-cresol. En presencia de buffers de citrato y fosfato (pero no borato), la actividad frente a *Pseudomonas sp.* puede reducirse. El cloruro de benzalconio es relativamente inactivo contra las esporas y hongos, pero es activo contra algunos virus, incluido el VIH. Aumenta la actividad inhibitoria con el pH, si bien la actividad antimicrobiana se produce en un intervalo de pH de 4 a 10.

En este método los homólogos son separados de otros excipientes de la formulación por HPLC. La respuesta del BAC es definida como la suma del producto de la multiplicación del área del pico y peso molecular de cada homólogo, incluyendo cualquier hombro frontal a los picos C₁₂, C₁₄, C₁₆ y C₁₈.

Este método es indicativo de estabilidad. Constituye también una identificación positiva para el BAC si el tiempo de retención para cada homólogo de BAC del producto se compara con aquellos del estándar dentro de la reproducibilidad del sistema.

Este método analítico utiliza:

- Una columna Beckman Ultrasphere Cyano de 4.6 mm de D.I. x 150 mm de longitud, 5 μm o equivalente
- Una velocidad de flujo de 1.0 mL/min, con detección a 214 nm,
- Un volumen de inyección de 30 μL .
- Fase móvil Acetonitrilo: Buffer de Fosfatos pH 3.0 en proporción (60:40) respectivamente

4. Diseño Experimental

4.1. Marbete

Cada 100 mL de suspensión contiene:

Cloruro de Benzalconio (conservador) 0.01%

Nota: Las suspensiones deberán ser preparadas por peso, (pesar aproximadamente 2.0g y diluir en 10mL de fase móvil). Las suspensiones deberán ser perfectamente agitadas y mezcladas hasta asegurar que se tiene una mezcla homogénea antes de tomar la muestra.

Densidad de producto 1.0122 g/mL

4.2. Reactivos y materiales

Reactivos

- ⊕ Estándar de Cloruro de Benzalconio (BAC) concentración 1.056mg/mL
- ⊕ Acetonitrilo, HPLC
- ⊕ Hidróxido de sodio (50%) – grado reactivo a equivalente.
- ⊕ Ácido fosfórico (85%) grado reactivo o equivalente.
- ⊕ Placebo de suspensión

- ⊕ Suspensión, producto terminado
- ⊕ Agua desionizada

Materiales

- ⊕ Pipetas volumétricas de 1mL, 2mL, 2.5mL, 5mL, 7mL y 10mL.
- ⊕ Matraces volumétricos de 5mL, 10mL, 20mL, 25mL, 50mL y 100mL.
- ⊕ Vasos de precipitados graduados de 50mL, 100mL, 500mL y 1000mL.
- ⊕ Pipetas graduadas de 1mL, 2mL, 5mL y 10mL.
- ⊕ Probeta graduada de 100mL y 1000mL.

4.3. Preparación de las soluciones a utilizar

4.3.1. Buffer de fosfatos pH 3.0

Pipetear 3.0 mL de ácido fosfórico concentrado (85%) en 1000 mL de agua purificada. Ajustar el pH a 3.0 con hidróxido de sodio al 50%.

4.3.2. Fase móvil: buffer de fosfatos:acetonitrilo 40:60

Buffer de fosfatos:acetonitrilo, mezclar 400 mL de buffer de fosfatos con 600 mL de acetonitrilo, 40:60 v/v, filtrar a través de un filtro de 0.45µm antes de utilizar.

4.3.3. Solución Stock de estándar de BAC (1.0 mg/mL) (Solución A)

A partir de una solución al 10% (100 mg/mL) del estándar de referencia de BAC, pipetear 2.5 mL en un matraz volumétrico de 250 mL, diluir a volumen con agua purificada. Adicionar lentamente para evitar la formación de espuma y se pueda hacer la dilución exacta, mezclar bien.

4.3.4. Estándar de trabajo de BAC (0.02 mg/mL)

De la solución stock del estándar de BAC (1.0 mg/mL), pipetear 2.5 mL y diluir a 25 mL con fase móvil (conc. Aprox. 0.1 mg/mL). Después pipetear 1 mL de la solución de 0.1 mg/mL y diluirla a 5 mL con fase móvil (también se puede preparar 4 mL en 20 mL de fase móvil), para obtener una concentración final aproximada de 0.02 mg/mL.

4.3.5. Preparación de la muestra

Pesar 2g aproximadamente de la suspensión (producto terminado), en un matraz volumétrico de 10 mL, diluir a volumen con fase móvil, equivalente a 0.02mg/mL de BAC.

4.3.6. Placebo

Muestra que contiene todos los componentes de la suspensión excepto el analito en estudio, en este caso es el cloruro de benzalconio. Se prepararon 1000 mL de placebo el cuál contenía todos los excipientes que se utilizan para la elaboración de la suspensión oftálmica excepto el cloruro de benzalconio.

4.4. Equipos

⊕ Balanza analítica

Marca: mettler toledo

Modelo: XS205

⊕ Potenciómetro

Marca: Beckman

Modelo: 720

⊕ Cromatógrafo de líquidos

Marca: Waters

Modelo: 2487

Parámetros de operación del cromatógrafo

Velocidad de flujo 1.0 mL/min.

Longitud de onda del detector 214 nm

Volumen de inyección 30µL

Platos teóricos por columna (N) $C_{12} \geq 1500$

Factor de coe (T) $C_{12} \leq 2.0$

Resolución (R) ≥ 2.0 entre C_{12} y C_{14}

%RDS $\leq 2.0\%$

4.5. Procedimiento analítico para cada prueba a realizar

Se utiliza un sistema de HPLC con un detector de UV capaz de operar a 214 nm, una columna para HPLC Beckman Ultrasphere Ciano ó equivalente, capaz de cumplir con parámetros de adecuabilidad (parámetros cromatográficos del sistema mencionados anteriormente).

4.5.1. Precisión

4.5.1.1. Precisión del Sistema

Un analista debe preparar por lo menos un sextuplicado de soluciones a la concentración nominal de trabajo del estándar 0.02 mg/mL (100% del analito en estudio) preparadas por pesadas independientes o por diluciones utilizando estándar de referencia secundario de Cloruro de Benzalconio.

Partir de una solución stock de 1 mg/mL de Cloruro de Benzalconio (**solución A**).

De la solución A transferir una alícuota de 2.5 mL a un matraz volumétrico de 25 ml. Llevar al aforo con fase móvil. Se tiene una concentración final aproximada de 0.1 mg/mL (**Solución B**).

De la solución B, tomar una alícuota de 4 mL y transferirla a un matraz volumétrico de 20 mL, llevar al aforo con fase móvil. Esta solución final tendrá una concentración final de aproximadamente 0.02 mg/mL.

Criterio sugerido:

$CV \leq 1.5\%$

4.5.1.2. Precisión del Método

Adicionar a un placebo el analito al 100% tomar las alícuotas correspondientes para preparar 6 muestras independientes. Analizar los placebos cargados contra estándar de trabajo de Cloruro de Benzalconio.

Preparar el placebo de cada producto a utilizar. Tomar 2g y depositarlo en un matraz volumétrico de 10 mL, equivalente a 0.02mg/mL de BAC.

Criterio sugerido:

-CV \leq 2.0%

4.5.2. Linealidad del sistema (curva estándar)

Preparar una curva de 5 puntos de estándares.

La curva será construida a las siguientes concentraciones aproximadamente: 0.012, 0.016, 0.020, 0.024 y 0.028 mg/mL. A partir de una solución stock de **1 mg/mL** de Cloruro de Benzalconio (**solución A**)

De la solución **A** transferir una alícuota de 5 mL a un matraz volumétrico de 50 mL. Llevar al aforo con agua desionizada. Se tiene una concentración final aproximada de 0.1 mg/mL (**Solución B**).

De la solución **B** se construye la curva de la linealidad, tomando las alícuotas y llevando a volumen con fase móvil indicados en Tabla No. III.

Tabla No. III. Curva para linealidad del sistema.

| Concentración de la curva % | Alícuota en mL de la solución B Concentración 0.1mg/mL | Volumen final en mL aforo con fase móvil | Concentración Teórica final mg/mL |
|-----------------------------|---|---|-----------------------------------|
| 60 | 3.0 | 25.0 | 0.012 |
| 80 | 4.0 | 25.0 | 0.016 |
| 100 | 5.0 | 25.0 | 0.020 |
| 120 | 6.0 | 25.0 | 0.024 |
| 140 | 7.0 | 25.0 | 0.028 |

Analizar usando un sistema cromatográfico de tal forma que se determine el rango lineal de la respuesta como función de la concentración. Inyectar por triplicado.

Criterio sugerido:

-Intervalo de confianza de la pendiente no debe incluir al cero (β_1)

-Intervalo de confianza de la ordenada debe incluir a cero (β_0)

-Pendiente 2367491 a 234750 no incluye al cero

- % de error de intercepto en Y en el punto medio \leq 5%

- Coeficiente de correlación $(r) \geq 0.9925$
- Coeficiente de determinación $(r^2) \geq 0.985$
- CV $\leq 2\%$ de la relación resp/conc. (sistema tolerante y preciso)

4.5.3. Linealidad del método

Construir una curva de placebos cargados a 3 niveles de concentración (80, 100 y 120%), de acuerdo a los límites de estabilidad que van de 80 a 120%, analizar por triplicado cada punto de la curva contra estándar de concentración conocida.

Añadir al matraz volumétrico de 10 mL el peso establecido en la tabla No. II para tener las concentraciones necesarias de Cloruro de Benzalconio.

Pesar 200 mg de Cloruro de Benzalconio 50% (materia prima) y diluir en un matraz de 50 mL. Llevar al aforo con agua purificada. Se tiene una concentración final aproximada de 2.0 mg/mL transferir una alícuota de 2.5mL a un matraz volumétrico de 100 mL y llevar al aforo con placebo teniendo una concentración final aproximada de 0.05mg/mL (**Solución C**).

De la solución **C** transferir 3.0 g a un matraz de 10 mL. Llevar al aforo con fase móvil. Se tiene una concentración final aproximada de 0.015 mg/mL (**Solución D**).

De la solución **C** transferir 4.0 g a un matraz de 10 ml. Llevar al aforo con fase móvil. Se tiene una concentración final aproximada de 0.020 mg/mL (**Solución E**).

De la solución **C** transferir 5.0 g a un matraz de 10 mL. Llevar al aforo con fase móvil. Se tiene una concentración final aproximada de 0.025 mg/mL (**Solución F**).

Tabla No. IV. Curva para linealidad del método

| Concentración de la curva % | Peso de placebo cargado g | Solución | Volumen final en mL aforo con fase móvil | Concentración Teórica final mg/mL |
|-----------------------------|---------------------------|----------|--|-----------------------------------|
| 80 | 3.0 | D | 10.0 | 0.015 |
| 100 | 4.0 | E | 10.0 | 0.020 |
| 120 | 5.0 | F | 10.0 | 0.025 |

Criterio sugerido

- Intervalo de confianza de la pendiente debe contener al uno
- Intervalo de confianza de la ordenada al origen debe contener al cero
- Coeficiente de determinación (r^2) ≥ 0.985
- % CV de x/y de la regresión lineal $\leq 2\%$ (relación mg recuperados/mg adicionados)
- Recobro $100\% \pm 2.0\%$
- Intervalo de confianza (μ) debe contener al 100% ó que el promedio aritmético se encuentre dentro del rango de 98 – 102%

4.5.4. Precisión Intermedia

Determinar el por ciento de principio activo en muestras de producto al 100% de principio activo por triplicado, por 2 diferentes analistas en 2 diferentes días, usando el mismo estándar de referencia y equipo. Seguir la técnica de preparación para la muestra. Preparar las muestras pesando 2g de producto terminado y diluir en 10mL, equivalente a 0.02mg/mL de BAC.

Criterio de aceptación

- CV $\leq 2\%$

4.5.5. Especificidad

Debido a que no se cuenta con estándares de productos de degradación del Cloruro de Benzalconio se analizará por triplicado placebo, placebo cargado y el principio activo degradado por las cuatro vías (medio ácido, medio básico, oxidación y temperatura a 80°C) con respecto a muestras intactas. Con el fin de observar en los cromatogramas los posibles picos de degradación del principio activo.

El placebo cargado se prepara de la siguiente manera: pesar 200mg de materia prima (al 50%) y transferirlos a un matraz volumétrico de 50mL, llevar al aforo con agua desionizada. Agitar, posteriormente transferir una alícuota de 5mL a un matraz volumétrico de 20mL, llevar al aforo con placebo de la suspensión oftálmica. Tomar de esta última solución una alícuota de 10mL y depositarlos en un matraz volumétrico de 50mL. Llevar al aforo con agua desionizada esta última solución tiene una concentración final de 0.1mg/mL (**Solución G**).

De la solución G se tomarán 2.0 g de muestra equivalente a 0.02mg de BAC, depositándolos en un tubo de vidrio de rosca con tapa de baquelita, para la degradación de la muestra. Al final de la condición de degradación se transvasará la muestra a un matraz volumétrico de 10 mL, realizando enjuagues al tubo de vidrio con fase móvil. Para las condiciones de degradación y forma de preparación de la muestra ver tabla No. V.

Tabla No. V. Condiciones de análisis para prueba de especificidad.

| Vía de Degradación | Condición de Análisis | Vol. adicionado de reactivo | Vol. adicionado de reactivo para detener reacción |
|----------------------|-----------------------|-----------------------------|---|
| Básica (NaOH) | 5H/80°C | 0.5 µL de NaOH 38% | 0.5 µL de HCL conc. |
| Acida (HCL) | 5H/80°C | 0.5 µL de HCL conc. | 0.5 µL de NaOH conc. |
| Calor | 8H/80°C | NA | NA |
| Peróxido | 20 min/80°C | 0.5 µL de Peróxido 30% | NA |

Criterio de aceptación

-% de recobros \pm 2% (placebos cargados CV \leq 2% y placebos degradados cargados).

-No debe interferir ningún pico en el tiempo de retención del principio activo

4.5.6. Estabilidad analítica de la muestra

Preparar tres muestras de producto, vaciar en tres viales cada una para analizar contra un estándar recientemente preparado en lapsos de tiempo inicial, 24 y 48 horas a temperatura ambiente y en refrigeración en las condiciones cromatográficas normales.

Criterio de aceptación

-La diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto de la media aritmética del análisis inicial no debe variar más del 2% (\leq 2%)

4.5.7. Robustez

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

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

| Parámetro modificado | Condición base | Condición Alternativa | Condición Alternativa |
|--------------------------|--|---|---------------------------------------|
| pH de Buffer | 3.0 | 2.5 | 3.5 |
| Proporción de fase móvil | 40% Buffer pH 3.0 60% Acetonitrilo | 35% Buffer pH 3.0 65% Acetonitrilo | 45% Buffer pH 3.0 55% Acetonitrilo |
| Velocidad de Flujo | 1.0 | 0.8 | 1.2 |
| Volumen inyección | 30 µL | 20 µL | 50 µL |
| Columna | Beckman Ultrasphere Cyano de 4.6 mm x 150 mm, 5 micras | Luna CN 5 micras Phenomenex 150 mm x 4.6 mm | NA |

Criterio de aceptación

-Diferencia $\leq 2\%$

-Calcular los parámetros de adecuabilidad del sistema.

4.6. Algoritmos

4.6.1. Algoritmo para la cuantificación de cloruro de benzalconio

$$\% \text{ de Recobro de Cloruro de Benzalconio} = \left[\left(\frac{\text{Área}_m}{\text{Área}_{std}} \right) \left(\frac{C_{std}}{C_m} \right) \right] \times 100$$

Donde:

Área_m = área total de la muestra

Área_{std} = área total del estándar

Y se calculan de la siguiente manera:

Área total = (Área de C₁₂ x PM de C₁₂) + (Área de C₁₄ x PM de C₁₄) + (Área de C₁₆ x PM de C₁₆) + (Área de C₁₈ x PM de C₁₈) g/mol.

Los pesos moleculares (PM) son:

$$C_{12} = 340 \text{ g/mol}$$

$$C_{14} = 368 \text{ g/mol}$$

$$C_{16} = 396 \text{ g/mol}$$

$$C_{18} = 424 \text{ g/mol}$$

4.6.2. Media Aritmética

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

4.6.3. Desviación estándar

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

4.6.4. Coeficiente de variación

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

4.6.5. Pendiente

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

4.6.6. Ordenada al origen

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

4.6.7. Coeficiente de determinación

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

4.6.8. Intervalos de confianza

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

4.6.9. Intervalo de confianza para la pendiente

$$Sb_1 = S_{y/x} \frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

4.6.10. Intervalo de confianza para la ordenada al origen

$$Sb_0 = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\text{mediax})^2}{\sum x^2 - (\sum x) \left(\frac{\sum x}{n}\right)}}$$

4.6.11. Coeficiente de variación de la regresión

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

5. Resultados

5.1. Precisión del sistema

Tabla No. VII. Resultados obtenidos en la precisión del sistema.

| No. De STD | Concentración del Estándar (STD) mg/mL | FR Sistema Concentración de estándar/Área |
|------------|---|--|
| 1 | 0.02112 | 8.046E-11 |
| 2 | 0.02112 | 8.302E-11 |
| 3 | 0.02112 | 8.119E-11 |
| 4 | 0.02112 | 8.062E-11 |
| 5 | 0.02112 | 7.988E-11 |
| 6 | 0.02112 | 8.101E-11 |
| | Media | 8.103E-11 |
| | RDS ó CV | 1.33% |

CV = 1.3% CUMPLE

5.2. Precisión del método

Tabla No. VIII. Resultados obtenidos en la precisión del método.

| No. de Muestra | Porcentaje de recobro (normalizado al 100%) |
|-----------------|--|
| 1 | 100.1% |
| 2 | 101.5% |
| 3 | 101.2% |
| 4 | 100.4% |
| 5 | 101.7% |
| 6 | 100.9% |
| Media | 101.0% |
| Recobro | 0.9% |
| RDS ó CV | 0.6% |

Recobro: 1.0%

CUMPLE

%RDS ó CV: 0.6%

CUMPLE

Intervalo (μ): 100 a 102

CUMPLE

5.3. Linealidad del sistema (curva estándar)

Tabla No. IX. Resultados obtenidos en la linealidad del sistema

| No. de Muestra | Concentración | Respuesta | | Respuesta/Concentración |
|----------------|---------------|-----------|-----------|-------------------------|
| | | Valor | Media | |
| STD 1 | 63.360% | 149357888 | 149890335 | 2365693 |
| | | 150404016 | | |
| | | 149909100 | | |
| STD 2 | 84.480% | 200382960 | 199964771 | 2367007 |
| | | 200545028 | | |
| | | 198966324 | | |
| STD 3 | 105.600% | 250469036 | 250501856 | 2372177 |
| | | 248934176 | | |
| | | 252102356 | | |
| STD 4 | 126.720% | 300671320 | 300113256 | 2368318 |
| | | 300466256 | | |
| | | 299202192 | | |
| STD 5 | 147.840% | 346541264 | 345967649 | 2340149 |
| | | 346809812 | | |
| | | 344551872 | | |

| | | |
|---|-----------------------------|--------|
| Sensitividad (pendiente = b_1) | 2357496 | CUMPLE |
| Intercepto (b_0) | 336002 | CUMPLE |
| Intervalo de confianza al 95% pendiente | | CUMPLE |
| 357496 | ± 9994.88 | |
| 2367491 | a 234750 no incluye al cero | |
| % error de y-intercepto del punto medio | | CUMPLE |
| 0.1% | | |
| Coefficiente de correlación (r) | 1.0000 | CUMPLE |
| Coefficiente de determinación (r^2) | 0.999 | CUMPLE |
| CV de la relación Resp/Conc. | 0.6% | CUMPLE |

5.4. Linealidad del método

Tabla X. Resultados obtenidos en la linealidad del método a los diferentes niveles de concentración.

| Niveles de concentración | Áreas | mg Adicionados | mg Recuperados | % Recobro |
|--------------------------|-----------|----------------|----------------|-----------|
| 80% | 193619844 | 0.01545 | 0.01574 | 101.86 |
| | 191004196 | 0.01536 | 0.01574 | 101.08 |
| | 192501132 | 0.01537 | 0.01565 | 101.82 |
| 100% | 252098868 | 0.02047 | 0.02049 | 100.10 |
| | 255267548 | 0.02045 | 0.02075 | 101.49 |
| | 254880048 | 0.02047 | 0.02072 | 101.20 |
| 120% | 320258772 | 0.02564 | 0.02603 | 101.54 |
| | 321315068 | 0.02562 | 0.02612 | 101.97 |
| | 321030720 | 0.02561 | 0.02610 | 101.92 |

| | | |
|--|-------------------------|--------|
| Pendiente (b_1) = | 1.02149 | CUMPLE |
| Ordenada al origen (b_0) ó Intercepto en Y = | -0.0001 | CUMPLE |
| Intervalo de confianza Pendiente | 1.00 a 1.04 | CUMPLE |
| Ordenada al origen | -0.0005 a 0.0002 | CUMPLE |
| Coefficiente de determinación (r^2) | 0.999 | CUMPLE |
| % CV recobro = | 0.6% | CUMPLE |
| % de recobro para todos los puntos | 98 a 102 | CUMPLE |
| % CV x/y de la regresión lineal | 0.5% | CUMPLE |

5.5. Precisión intermedia

Porcentaje de Cloruro de Benzalconio obtenido durante el ensayo de precisión intermedia.

Tabla No. XI. Porcentaje de BAC cuantificado por analista y por día de trabajo.

ANALISTA

| | | 1 | 2 |
|------------|----------|----------|----------|
| DÍA | 1 | 107.84 | 106.91 |
| | | 107.43 | 106.80 |
| | | 107.59 | 107.88 |
| 2 | 108.99 | 108.76 | |
| | 108.68 | 109.45 | |
| | 109.67 | 109.47 | |

Media = 108.3%

S = 1.01

CV = 0.9 %

Datos obtenidos en el coeficiente de variación durante el ensayo de precisión intermedia.

Tabla No. XII. Resultados obtenidos en el coeficiente de variación por analista y día de trabajo.

ANALISTA

| | | 1 | 2 | CV |
|------------|-----------|----------|----------|-----------|
| DÍA | 1 | 0.19 | 0.55 | 0.43 |
| | 2 | 0.46 | 0.37 | 0.38 |
| | CV | 0.82 | 1.11 | |

5.6. Especificidad

Placebo cargado

Tabla No. XIII. Resultados obtenidos durante el ensayo de especificidad con las diferentes condiciones analizadas.

| Condición | Resultado Base | Resultado con degradación | % Degradado |
|------------------------|-----------------------|----------------------------------|--------------------|
| Sin degradación | 104.37 % | NA | NA |
| NaOH/Calor 5h | 102.61 % | 100.86 % | 1.76 % |
| HCl/Calor 5h | 102.38 % | 100.39 % | 1.99 % |
| Sin degradación | 104.94 % | NA | NA |
| Calor 8h | 103.82 % | 102.70 % | 1.12 % |
| Peróxido/Calor | 75.66 % | 46.66 % | 29.29 % |

Estándar

Tabla No. XIV. Resultados obtenidos en el ensayo de especificidad para el estándar con las diferentes condiciones.

| Condición | Resultado Base | Resultado con degradación | % Degradado |
|----------------|----------------|---------------------------|-------------|
| NaOH/Calor 5h | 94.01 % | 69.50 % | 24.51 % |
| HCl/Calor 5h | 94.96 % | 85.55 % | 9.41 % |
| Calor 8h | 93.38 % | 82.20 % | 11.18 % |
| Peróxido/Calor | 92.53 % | 61.21 % | 31.32 % |

5.7. Estabilidad analítica de la muestra

Tabla No. XV. Porcentaje de recobro obtenido en el ensayo de estabilidad de la muestra.

| Condición inicial | 24 Horas | | 48 Horas | |
|-------------------|----------|---------------|----------|---------------|
| | T. A. | Refrigeración | T. A. | Refrigeración |
| 106.83 % | 106.68 % | 106.30 % | 106.60 % | 106.25 % |
| Diferencia | 0.15 % | 0.53 % | 0.23 % | 0.58 % |

5.8. Robustez

Condiciones modificadas:

Tabla No. XVI. Condiciones modificadas en el ensayo de robustez.

| Variable | Condición Base | Condición Alternativa | |
|----------------------|----------------|-----------------------|------------|
| % Fase (Buffer/ACN) | 40:60 | 35:65 | 45:65 |
| pH Buffer | 3.0 | 2.5 | 3.5 |
| Flujo de Fase | 1 mL/min | 0.8 mL/min | 1.2 mL/min |
| Volumen de Inyección | 30 µL | 20 µL | 50 µL |
| Marca de la Columna | Beckman | Luna CN | |

Tabla No. XVI. Condiciones modificadas en el ensayo de robustez.

| Condición | Resultado Base | | Resultado con condición | | Diferencia | |
|----------------------|----------------|---------|-------------------------|----------|------------|--------|
| | | | 35:65 | 45:55 | -0.95 % | 5.90 % |
| % Fase (Buffer/ACN) | 107.82 % | | 108.77 % | 101.92 % | | |
| | | | | | | |
| pH Fase | pH 2.5 | 107.82% | 108.13 % | | -0.30 % | |
| | pH 3.5 | 108.13% | 109.91 % | | -1.78 % | |
| Volumen de Inyección | 107.83 % | | 20 µL | 107.09 % | 0.74 % | |
| | | | 50 µL | 107.94 % | -0.11 % | |
| Flujo mL/min | 107.83 % | | 0.8 mL/min | 108.17 % | -0.35 % | |
| | | | 1.3 mL/min | 108.26 % | -0.44 % | |
| Marca de la Columna | 110.14 % | | 108.18% | | 1.97 % | |

Para el ensayo de tolerancia (cambio de columna) se analiza una muestra por triplicado contra un estándar utilizando dos diferentes columna por un solo analista el mismo día; se utilizo una columna alterna al método: Luna CN 5 micras Phenomenex 150mm x 4.6mm.

6. Discusión de resultados

Se evaluó la precisión del sistema usando las condiciones de análisis establecidas en el método se obtuvo un $CV = 1.3\%$ en una serie de 6 muestras de solución estándar, teniendo una especificación de $\leq 1.5\%$.

Se preparó una curva estándar del 60 al 140% de la concentración de Cloruro de Benzalconio con respecto la concentración de trabajo (0.02 mg/mL) para verificar la linealidad del sistema. Las concentraciones reales de trabajo en la curva fueron: 63.36%, 84.48%, 105.60%, 126.72% y 147.84%. Obteniendo los siguientes resultados al aplicar la ecuación de mínimos cuadrados de la relación respuesta vs concentración:

- Intervalo de la pendiente IC (β_1)= 2367491 a 2347501, el cual no contiene al cero.
- El error del intercepto en el punto medio de la curva, es **0.14%**, el cual debe ser menor o igual a 5%.
- Se calculó el Coeficiente de determinación (r^2) = **0.99995** cuyo valor debe ser mayor o igual a 0.985.
- El Coeficiente de correlación (r) = **1.0000** cuyo valor debe ser mayor o igual a 0.9925.

Los resultados obtenidos muestran que todos los parámetros se encuentran dentro de los criterios de aceptación.

Se evaluó la precisión del método a través de un placebo adicionado con materia prima Lote 190725 de Cloruro de Benzalconio; tomando 6 pesadas independientes de un solución stock preparada con concentración aproximada de 0.051720 mg/mL; se analizaron bajo las condiciones establecidas en el método analítico.

Los porcentajes de recobro de Cloruro de Benzalconio obtenidos de las 6 determinaciones presentan un $CV = 0.6\%$ y el promedio del porcentaje = **101.0%**; se incluye en el intervalo de la media poblacional y todos los valores están contenidos dentro de la especificación de recobro de 98.0% a 102.0%.

Se analizó un placebo adicionado con Cloruro de Benzalconio materia prima, lote 190725. Se tomaron los pesos respectivos para obtener concentraciones a los niveles de 80%, 100% y 120% de Cloruro de Benzalconio. Obteniéndose los siguientes resultados:

- Intervalo de la pendiente IC (β_1)= 1.00 a 1.04, el cual debe contener al uno.
- Intervalo del Intercepto IC (β_0) = -0.0005 a 0.0002, el cual debe contener al cero.
- Se calculó el Coeficiente de determinación (r^2) = 0.9993 cuyo valor debe ser mayor o igual a 0.985.
- El CV de la regresión = 0.5% el cual debe ser menor de 2.0%.
- El % de recobro de todos los puntos se encuentran en el rango de 100% \pm 2%.

Con los resultados obtenidos podemos observar que todos los parámetros se encuentran dentro de los criterios de aceptación.

Se analizó producto terminado de la suspensión oftálmica, lote **28KR**, a una concentración teórica de 0.01%; cada muestra se analiza según el método. El experimento se realizó con dos analistas en dos días diferentes para establecer la variación entre analistas y días, obteniéndose los siguientes resultados:

- **El día 1, analista 1** se obtuvo **CV = 0.19%**.
- **El día 1, analista 2** se obtuvo **CV = 0.55%**.
- **El día 2, analista 1** se obtuvo **CV = 0.46%**.
- **El día 2, analista 2** se obtuvo **CV = 0.37%**.
- **El CV del día 1** analistas 1 y 2 fue de **0.43%**.
- **El CV del día 2** analistas 1 y 2 fue de **0.38%**.
- **El CV del analista 1** día 1 y 2 fue de **0.82%**.
- **El CV del analista 2** día 1 y 2 fue de **1.11%**.

El CV total de todas las muestras = **0.9%** el cual debe ser menor al 2%.

Estas variaciones de análisis también permiten establecer la tolerancia del método al cambio de analista y de día ya que en todos los casos el CV tanto de día como de analista presentan valores menores al 2 %.

Se evalúa el método a los cambios y condiciones probadas.

Se realizaron pruebas con el placebo, placebo adicionado con materia prima y solución estándar, bajo las siguientes condiciones de análisis: sin degradar, degradación con ácido clorhídrico conc./calor 80°C/5h, hidróxido de sodio 38% conc. aproximada/calor 80°C/5h, calor 8h y peróxido de hidrógeno, terminando las condiciones de degradación, se prepararon las muestras bajo las condiciones de análisis que establece el método.

Los placebos, solución estándar y placebo adicionado a las condiciones de degradación, no presentaron ningún pico de degradación o señal que interfiera con los picos de interés al tiempo de retención que estos eluyen. Por lo que podemos decir que el método si tiene respuesta específica para Cloruro de Benzalconio en la suspensión evaluada.

Bajo el criterio de aplicación de la Guía de validación de métodos analíticos, las pruebas realizadas sustentan la validación propuesta.

Para la evaluación de la robustez de método se realizaron cambios sobre las condiciones de la técnica de análisis, con los resultados obtenidos así como en los parámetros de adecuabilidad del sistema tenemos que:

Con base en los resultados obtenidos, podemos decir que en la condición de cambio de proporción en la fase móvil sí existe diferencia significativa para porcentaje de recobro obtenido puesto que el valor es mayor al 2%, en la proporción de fase móvil buffer de fosfatos/acetonitrilo 45:55.

En el cambio de pH: a pH menor a lo establecido (2.5) cumple con la diferencia de porcentaje de recobro menor al 2% (-0.30%), sí se observan todos los picos identificados, a pH mayor (3.5) se cumple con la diferencia de porcentaje de recobro (-1.78%) observándose además todos los picos correspondientes a Cloruro de Benzalconio. Por lo que el método si resiste un cambio de pH mayor (3.5) y un cambio de pH menor (2.5).

En el cambio de Volumen de Inyección: Cuando se inyectan volúmenes de 20µL la diferencia de porcentaje de recobro respecto a la condición inicial es menor al 2% por lo cual no se considera significativo. Para volumen de inyección de 50µL la diferencia cumple con la especificación (0.11%) observándose todos los picos del principio activo. Por lo tanto el método puede utilizarse cuando se inyectan volúmenes menores o mayores a 30µL.

En el cambio de Velocidad de Flujo: En ambos casos se cumple con la diferencia de porcentaje de recobro (menor a 2%). Por lo tanto el método es factible a utilizarse en un cambio de velocidad de flujo de entre 0.8 a 1.2 mL/min.

En el cambio de Columna: se realizó el cambio de columna Beckman CN a Luna CN bajo las mismas condiciones de análisis, no se observó una diferencia significativa en los porcentajes de recobro entre ambas columnas y los parámetros de adecuabilidad cumplen con los criterios de aceptación, la prueba se realizó variando la proporción de fase móvil de Buffer de fosfatos pH 3.0, acetonitrilo (40:60%) respectivamente a Buffer de fosfatos pH 3.0, acetonitrilo (45:55%), ya que a condiciones normales de análisis no se observan los picos. Por lo cual, se documentará en la técnica correspondiente que al usar la columna Luna CN la proporción de fase móvil deberá modificarse según las condiciones validadas.

En cuanto a los parámetros de adecuabilidad del sistema, en todos los cambios realizados para la prueba de robustez se cumple con el criterio establecido.

Se analizó producto terminado lote **28KR**, a una concentración teórica de 0.01%; según el método. Se determinaron a los siguientes tiempos de análisis: inicial, 24h/temperatura ambiente y refrigeración, 48h/temperatura ambiente y refrigeración, obteniendo los siguientes resultados:

Recobro inicial de 106.68%, recobro a las 24 horas en temperatura ambiente fue de 106.68% con una diferencia de 0.15% respecto a la condición inicial, a las 48 horas se obtuvo un recobro de 106.60% con una diferencia de 0.23%.

En relación a la estabilidad de la muestra en refrigeración tenemos que: el recobro obtenido a las 24 horas fue de 106.30% con una diferencia de 0.54% respecto a la condición inicial, a las 48 horas se obtuvo un recobro de 106.26% con una diferencia de 0.58%.

Por lo cual se establece que la muestra de suspensión es estable en un periodo de 48h, almacenada bajo condiciones de temperatura ambiente o en refrigeración, para su análisis, pues la diferencia de recobro es menor a 2%.

7. Conclusiones

Se realizaron las pruebas necesarias para llevar a cabo la validación del método analítico para la cuantificación de Cloruro de alquildimetilbencil-amonio (cloruro de benzalconio) en una suspensión oftálmica con concentración de 0.01% por cromatografía de líquidos de alta resolución.

Con estas pruebas podemos concluir que:

- ⊕ El sistema es lineal en un rango de concentraciones de 60-140% y es preciso por repetibilidad.
- ⊕ El método es específico para la cuantificación de cloruro de benzalconio.
- ⊕ El método es preciso por repetibilidad.
- ⊕ El método es lineal en un rango de concentraciones de 80-120%.
- ⊕ El método es preciso a cambios de días de análisis y de analista.
- ⊕ El método es robusto al cambio de proporción de fase (35:45), al cambio de pH de 2.5 y 3.5, al cambio de velocidad de flujo de entre 0.8 a 1.2 mL/min, al cambio de volumen de inyección, puede utilizarse cuando se inyectan volúmenes menores o mayores a 30 μ L y es tolerante al cambio de columna probado.
- ⊕ La muestra analítica es estable hasta 48 horas almacenada bajo condiciones de temperatura ambiente o en refrigeración para su análisis.
- ⊕ El método cumple con los lineamientos básicos establecidos por la “Guía de Validación de Métodos Analíticos, del Colegio Nacional de Q.F.B. ’s

8. Bibliografía

- ¹ James M. Miller, Jonathan B. Crowther, “Analytical Chemistry in a GMP environment”, Una guía práctica; Wiley-Interscience John Wiley and Sons, Inc. Estados Unidos de América, 2000, pp. 255-281.
- ² Wilfried M. A. Niessen, “Liquid-Chromatography-Mass Spectrometry”, Tercera Edición, Taylor & Francis Group, Estados Unidos de América 2006, pp. 3-21.
- ³ Romero García Aida Susana, “Cromatografía: curso de métodos”, Instituto de Biotecnología Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F. 2002
- ⁴ John V. Kenkel, “Analytical Chemistry for Technicians”, Tercera Edición, Publicaciones Lewis, Estados Unidos de América 2003, pp. 310-315.
- ⁵ International Conference on Harmonisation, “Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology” (Q2,R1), Noviembre 2005
- ⁶ Norma Oficial Mexicana, NOM-059-SSA1-2006, “Buenas Prácticas de Fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos”, Estados Unidos Mexicanos, 2004.
- ⁷ Norma Oficial Mexicana, NOM-164-SSA1-1998, “Buenas Prácticas de Fabricación para Fármacos, Estados Unidos Mexicanos, 1998.
- ⁸ Norma Oficial Mexicana, NOM-073-SSA1-2005, “Estabilidad de Fármacos y Medicamentos”, Estados Unidos Mexicanos, 2006.
- ⁹ María Araceli García, Evelyn Soberón, Myriam Cortés, Ramón Rodríguez, José Luis Herrera, Alejandro Alcántara, “Métodos Analíticos, Guía de Validación”, Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A. C.
- ¹⁰ Chung Chow Chan, Herman Lam, Y. C. Lee, Xue-Ming Zhang, “Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification”, Wiley Interscience, Estados Unidos de América, 2004, pp. 1-49.
- ¹¹ Raymond C. Rowe, Paul J Sheskey, Paul Weller, “Handbook of Pharmaceutical Excipients”, Cuarta Edición, Pharmaceutical Press, USA, 2003.
- ¹² Reglamento de Insumos para la Salud, México D.F. 1998.
- ¹³ Alcon México, “Procedimiento Analítico”, México D, F, 2009

9. Anexos

9.1.

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

A. Objetivo

Describir el método de ensayo por HPLC para Cloruro de Benzalconio.

B. Introducción

Este método puede ser usado para la identificación y cuantificación de cloruro de benzalconio (BAC) en formulaciones seleccionadas. El cloruro de benzalconio es una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio con fórmula general: $[C_6H_5N(CH_3)_2 R] Cl$, donde R representa una mezcla de alquilos, incluyendo todos o algunos de los grupos empezando con n-C₈H₁₇ y extendiéndose a través de homólogos mayores, con n-C₁₂H₂₅, n-C₁₄H₂₈ y n-C₁₆H₃₃ comprendiendo la proporción mayor.

En este método los homólogos son separados de otros excipientes de la formulación por HPLC, usando una columna ciano y detectados a una longitud de onda 214nm. La concentración del BAC es definido como la suma del producto de la multiplicación del área del pico y peso molecular de cada homólogo, incluyendo cualquier hombro frontal a los picos C₁₂, C₁₄, C₁₆ y C₁₈.

Este método es indicativo de estabilidad, adecuadamente exacto, preciso, específico y sensible para el análisis de BAC. Este procedimiento de análisis constituye también una identificación positiva para el BAC si el tiempo de retención para cada homólogo de BAC del producto se compara con aquellos del estándar dentro de la reproducibilidad del sistema.

C. Reactivos y Soluciones

Reactivos

1. Cloruro de Benzalconio (BAC) – Estándar analítico de referencia 10% p/v
2. Acetonitrilo, HPLC – grado reactivo
3. Solución de Hidróxido de Sodio al 50%
4. Ácido fosfórico (85%) reactivo analítico
5. Agua desionizada

Soluciones

1. Buffer de fosfatos pH 3.0- Pipetear 3.0mL de ácido fosfórico concentrado en 1000mL de agua. Ajustar el pH a 3.0 con hidróxido de sodio al 50%.

- Fase móvil: Buffer de fosfatos:acetonitrilo (40:60), mezclar 400 mL de buffer de fosfatos con 600mL de acetonitrilo, 40:60 (v/v). Filtrar a través de un filtro de 0.45 μm antes de utilizarla.

D. Precauciones

Precauciones en procedimiento

- La gentamicina contiene los cuatro homólogos de cloruro de belzalconio. Para todos los productos, ajustar el tiempo de corrida para asegurar que los homólogos presentes, sean detectados.

Precauciones con reactivos

- Ácido fosfórico (peligro, veneno): es un irritante severo para los ojos y piel e irritante sistémico por inhalación. Evitar la inhalación y el contacto con la piel o los ojos. Usar ventilación adecuada. Lavar los ojos y piel contaminados con grandes cantidades de agua. Lavarse perfectamente después de manipularlo.
- Acetonitrilo (peligro, veneno): inflamable, solvente tóxico. Evitar la exposición a la flama. Enjuagar la piel expuesta con agua. Evitar respirar vapores.
- Hidróxido de sodio (caustico, veneno): venenoso y muy corrosivo para los ojos, piel y membranas mucosas. Evitar la inhalación y contacto con la piel y ojos. Lavar los ojos y piel contaminados con grandes cantidades de agua.
- Cloruro de benzalconio (irritante): en soluciones concentradas, causa irritación extrema en la piel.

E. Equipo

- Sistema HPLC con un detector UV capaz de operar a 214nm.
- Columna para HPLC Beckman Ultrasphere Cyano ó equivalente, capaz de cumplir con parámetros de adecuabilidad.
- Centrifuga capaz de mantener 3000 rpm.

F. Parámetros de operación

| | |
|---------------------------------|--|
| Columna | Columna Beckman ULTRASPHERE Cyano de 4.6 mm D.I x 150 mm de longitud, 5 μm ó equivalente. |
| Velocidad de Flujo | 1.0 mL/min. NO RECIRCULAR FASE MÓVIL |
| Longitud de onda del detector | 214 nm |
| Volumen de inyección | 30 μl |
| Platos teóricos por columna (N) | C ₁₂ \geq 1500 |

| | |
|---------------------|--------------------------------------|
| Factor de coleo (T) | $C_{12} \leq 2.0$ |
| Resolución (R) | ≥ 2.0 entre C_{12} y C_{14} |
| %RSD | $\leq 2.0\%$ |

G. Preparación de estándares

Nota₁: usar fase móvil del sistema como diluyente del estándar de trabajo.

Preparación de la solución Stock del estándar de BAC (1.0 mg/mL)

A partir de la solución al 10% (100 mg/mL) del estándar de referencia de BAC, pipetear 2.5 mL en un matraz volumétrico de 250 mL y diluya el volumen con agua purificada. Adicionar el agua lentamente para evitar la formación de espuma y que se pueda hacer una dilución exacta, mezclar bien. Fecha de caducidad: 6 meses en contenedor ámbar.

Preparación del estándar de trabajo de BAC (0.02 mg/mL)

De la solución stock del estándar de BAC (1.0 mg/mL), pipetear 2.5 mL y diluir a 25 mL con fase móvil. Después pipetear 1 mL de esta solución y diluir a 20 mL con fase móvil. También aplica alícuota de 4 mL y diluir a 20 mL con fase móvil.

H. Preparación de muestra

Usar fase móvil como diluyente de la muestra.

NOTA₂: Las suspensiones, geles y soluciones viscosas, deberán ser preparadas por peso, (pesar aproximadamente 1.0 g y diluir en 5 mL de fase móvil) Las suspensiones deberán ser perfectamente agitadas y mezcladas hasta asegurar que se tiene una mezcla homogénea antes de tomar la muestra. El producto como solución, puede ser preparado por volumen, tomar alícuota según la tabla.

NOTA₃: Algunos productos pueden presentar turbidez cuando son diluidos, las demás preparaciones deberán ser claras.

Preparar la alícuota apropiada del producto en cuestión, en un matraz volumétrico de 10 mL y diluir a volumen con fase móvil ó el diluyente especificado.

I. Procedimiento

- Prueba de adecuabilidad del sistema.

Realizar las pruebas de adecuabilidad del sistema, revisando los siguientes parámetros:

1. Desviación estándar relativa (%RSD)
2. Platos teóricos por columna (N) para homólogo C_{12}
3. Factor de coleo (T) para homólogo C_{12}
4. Resolución entre homólogo C_{12} y C_{14}

Consideraciones importantes:

Se debe obtener una línea base estable en el detector antes de empezar con las inyecciones. Para estabilizar el sistema HPLC y la columna se requiere no más de media hora.

Inyectar una solución estándar de BAC y el producto. Anotar el tiempo de retención del último homólogo de BAC. Inyectar la solución de trabajo del estándar de BAC y determinar la resolución (R), el número de platos teóricos (N), el factor de coeleo (T), y precisión (%RSD).

La respuesta de cinco inyecciones del estándar de BAC debe mostrar una desviación estándar relativa de no más de 2.0%. La respuesta de BAC es el área total del pico de los homólogos de BAC, C₁₂, C₁₄, C₁₆ y C₁₈ (si C₁₈ existe).

La resolución entre pico C₁₂ y el pico C₁₄ debe ser: no menos de 2.0.

El factor de coeleo para el pico C₁₂ debe ser: no más de 2.0.

El número de platos teóricos del pico C₁₂ debe ser: no menos de 1500 platos por columna.

- Análisis de Cloruro de benzalconio

Si la adecuabilidad del sistema es satisfactoria, empezar con el análisis del producto. Empezar con el análisis del producto con dos inyecciones de 30µL del estándar seguidas por seis a ocho inyecciones individuales de los productos y dos inyecciones del estándar. Con el área de los picos, calcular el porcentaje de lo etiquetado de acuerdo a los cálculos.

Requerimientos para la identificación de BAC

La identificación del BAC en las muestras se obtiene comparando los tiempos de retención de cada uno de los homólogos del BAC del estándar con los de las muestras. Si los tiempos de retención son los mismos y están dentro del error experimental, la identificación es positiva.

- Apagado del sistema

Después de la elución del último estándar, lavar el sistema con agua desionizada por aproximadamente 20 minutos. Posteriormente pasar acetonitrilo. Almacenar la columna con éste disolvente.

J. Cálculos

NOTA₄: Los cromatogramas de BAC de algunos productos muestran picos extras que eluyen como hombros frontales a los picos de C₁₂, C₁₄. Estos picos extras son considerados como parte de sus respectivos homólogos para el cálculo del porcentaje. Los homólogos C₁₆ y C₁₈ pueden no estar presentes.

$$\% \text{Etiquetado} = \left[\left(\frac{A_p}{A_s} \right) * \left(\frac{C_s}{C_p} \right) * \left(\frac{P_t}{P_a} \right) * D \right] * 100$$

Donde:

A_p = Respuesta total de BAC en el producto analizado

$$= (MWC_{12} * AC_{12}) + (MWC_{14} * AC_{14}) + (MWC_{16} * AC_{16}) + (MWC_{18} * AC_{18})$$

Donde AC_{12} , AC_{14} , AC_{16} y AC_{18} son las áreas de los picos de los respectivos homólogos, y MWC_{12} , MWC_{14} , MWC_{16} y MWC_{18} son los pesos moleculares de los homólogos C_{12} , C_{14} , C_{16} y C_{18} respectivamente.

NOTA: Incluir hombros frontales de C_{12} , C_{14} , C_{16} y C_{18} como parte del área del pico.

Los pesos moleculares (g/mol) de los homólogos son:

$$C_{12} = 340 \text{ g/mol}$$

$$C_{14} = 368 \text{ g/mol}$$

$$C_{16} = 396 \text{ g/mol}$$

$$C_{18} = 424 \text{ g/mol}$$

A_s = Promedio de la suma de la multiplicación de los productos del área del pico y del peso molecular de cada homólogo de BAC en la soluciones estándar.

$$= \sum \left[\frac{(MWC_{12} * AC_{12}) + (MWC_{14} * AC_{14}) + (MWC_{16} * AC_{16}) + (MWC_{18} * AC_{18})}{2} \right]$$

C_s = Concentración de BAC en el estándar

C_p = Concentración de BAC en el producto

P_t = Peso estimado del producto (peso teórico de la muestra)

P_a = Peso real del producto (peso real de la muestra)

D = Densidad del Producto

K. Referencias

- FWMDOC-05463, (fecha efectiva: 18JUL08) Versión vigente “Analysis of BAC by HPLC”.
- ISO 9001: Versión vigente “Sistemas de Gestión de Calidad-Requisitos”
- ISO 13485: Versión vigente “Productos Sanitarios. Sistemas de Gestión de Calidad. Requisitos para fines Reclamatorios”
- NMX-SSA-14001-1NNC Versión vigente “Sistemas de Gestión Ambiental-Requisitos con orientación para sus usos”

9.2. Áreas obtenidas durante el análisis

9.2.1. Precisión del sistema

Tabla XVIII. Áreas de los estándares de BAC obtenidas en la precisión del sistema.

| Nombre de la muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total | FR |
|----------------------|-----------------|-----------------|------------|-------------|
| STD1 BAC | 494262 | 256635 | 262490760 | 8.046E-11 |
| STD1 BAC | 488200 | 240265 | 254405520 | 8.30171E-11 |
| STD1 BAC | 490168 | 253977 | 260120656 | 8.11931E-11 |
| STD2 BAC | 494979 | 254599 | 261985292 | 8.06152E-11 |
| STD2 BAC | 497528 | 258819 | 264404912 | 7.98775E-11 |
| STD2 BAC | 490414 | 255344 | 260707352 | 8.10104E-11 |
| Media | 492592 | 253273 | 260685749 | 8.10289E-11 |
| Desviación Estándar | 3542.9 | 6600.2 | 3421699.1 | 1.0771E-12 |
| % RSD | 0.72 | 2.61 | 1.31 | 1.33 |

9.2.2. Linealidad del sistema

Tabla XIX. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para linealidad del sistema.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------|-----------------|-----------------|------------|
| STD 60% BAC | 279656 | 147486 | 149357888 |
| STD 60% BAC | 280724 | 149342 | 150404016 |
| STD 60% BAC | 278659 | 149905 | 149909100 |
| STD 80% BAC | 375440 | 197645 | 200382960 |
| STD 80% BAC | 374541 | 198916 | 200545028 |
| STD 80% BAC | 368337 | 200358 | 198966324 |
| STD 100% BAC | 464779 | 251207 | 250469036 |
| STD 100% BAC | 467300 | 244707 | 248934176 |
| STD 100% BAC | 468165 | 252517 | 252102356 |
| STD 120% BAC | 554686 | 304560 | 300671320 |
| STD 120% BAC | 563232 | 296107 | 300466256 |
| STD 120% BAC | 564480 | 291519 | 299202192 |
| STD 140% BAC | 649596 | 341518 | 346541264 |
| STD 140% BAC | 647549 | 344139 | 346809812 |
| STD 140% BAC | 644036 | 341249 | 344551872 |

9.2.3. Precisión del Método (exactitud al 100%)

Tabla XX. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar la precisión del método.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | C ₁₆ | C ₁₈ | Área Total | |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------------|-----------|
| PLACEBO CARGADO 100-1 BAC | 378964 | 202613 | 107139 | 14770 | 252098868 | |
| PLACEBO CARGADO 100-2 BAC | 380170 | 204489 | 109895 | 17074 | 255267548 | |
| PLACEBO CARGADO 100-3 BAC | 379918 | 204072 | 109712 | 16895 | 254880048 | |
| PLACEBO CARGADO 100-4 BAC | 381697 | 203214 | 103113 | 16911 | 252562744 | |
| PLACEBO CARGADO 100-5 BAC | 382383 | 203360 | 110708 | 16909 | 255856484 | |
| PLACEBO CARGADO 100-6 BAC | 380632 | 202495 | 108632 | 15993 | 253732344 | |
| | | | | | Media | 254066339 |
| | | | | | Desviación Estándar | 1520062 |
| | | | | | % RSD | 0.60 |

9.2.4. Linealidad del Método

Tabla XXI. Área del estándar obtenido para la linealidad del método.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------|-----------------|----------------------------|------------|
| STD 1 BAC | 485799 | 257318 | 259864684 |
| STD 1 BAC | 484884 | 256989 | 259432512 |
| STD 1 BAC | 488580 | 256578 | 260537904 |
| STD 1 BAC | 488627 | 256186 | 260409628 |
| STD 1 BAC | 484883 | 256465 | 259239340 |
| STD 1 BAC | 484971 | 256777 | 259384076 |
| STD 1 BAC | 484789 | 256311 | 259150708 |
| STD 1 BAC | 485482 | 256831 | 259577688 |
| STD 1 BAC | 488830 | 256666 | 260655288 |
| | | Media | 259805759 |
| | | Desviación Estándar | 585761.7 |
| | | % RSD | 0.23 |

Tabla XXII. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar la linealidad del método.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | C ₁₆ | C ₁₈ | Área Total |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|
| Placebo Cargado 80 | 289004 | 154261 | 83283 | 13232 | 193619844 |
| Placebo Cargado 80 | 284048 | 152770 | 82613 | 12957 | 191004196 |
| Placebo Cargado 80 | 286828 | 153677 | 83021 | 13090 | 192501132 |
| Placebo Cargado 100 | 378964 | 202613 | 107139 | 14770 | 252098868 |
| Placebo Cargado 100 | 380170 | 204489 | 109895 | 17074 | 255267548 |
| Placebo Cargado 100 | 379918 | 204072 | 109712 | 16895 | 254880048 |
| Placebo Cargado 120 | 478437 | 256409 | 138522 | 19757 | 320258772 |
| Placebo Cargado 120 | 478930 | 257127 | 138783 | 20986 | 321315068 |
| Placebo Cargado 120 | 481717 | 259035 | 137579 | 17549 | 321030720 |

9.2.5. Precisión Intermedia

Día 1 Analista 1

Tabla XXIII. Área del estándar obtenido para la precisión intermedia.

| Nombre de la muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------------|-----------------|-----------------|------------|
| STD 1 Ana1 BAC | 491281 | 257867 | 261930596 |
| STD 1 Ana1 BAC | 494268 | 254370 | 261659280 |
| STD 1 Ana1 BAC | 495496 | 258761 | 263692688 |
| STD 1 Ana1 BAC | 493240 | 261503 | 263934704 |
| STD 1 Ana1 BAC | 493973 | 261875 | 264320820 |
| STD 1 Ana1 BAC | 500138 | 258843 | 265301144 |
| Media | 494733 | 258870 | 263473205 |
| Desviación Estándar | 2991.2 | 2728.8 | 1413572.3 |
| % RSD | 0.60 | 1.05 | 0.54 |

Tabla XXIV. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar precisión intermedia.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | C ₁₆ | C ₁₈ | Área Total |
|----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|
| PT 28KR BAC 1 Ana 1 | 390410 | 216157 | 111671 | 23484 | 266464108 |
| PT 28KR BAC 2 Ana 1 | 393485 | 217663 | 111643 | 24353 | 268421184 |
| PT 28KR BAC 3 Ana 1 | 395166 | 215203 | 114075 | 22673 | 268338196 |
| Media | | | | | 267741163 |
| Desviación Estándar | | | | | 1106739.9 |
| % RSD | | | | | 0.41 |

Día 1 Analista 2

Tabla XXV. Área del estándar obtenido para la precisión intermedia.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------------|-----------------|-----------------|------------|
| STD 1 Ana2 BAC | 487867 | 253781 | 259266188 |
| STD 1 Ana2 BAC | 487913 | 247118 | 256829844 |
| STD 1 Ana2 BAC | 490675 | 257600 | 261626300 |
| STD 1 Ana2 BAC | 494757 | 257519 | 262984372 |
| STD 1 Ana2 BAC | 495131 | 259304 | 263768412 |
| STD 1 Ana2 BAC | 490785 | 258779 | 262097572 |
| Media | 491188 | 255684 | 261095448 |
| Desviación Estándar | 3177.0 | 4619.9 | 2589996.0 |
| % RSD | 0.65 | 1.81 | 0.99 |

Tabla XXVI. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar precisión intermedia

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | C ₁₆ | C ₁₈ | Área Total |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------------|------------|
| PT 28KR BAC 1 Ana 2 | 387505 | 210104 | 112595 | 21324 | 262698968 |
| PT 28KR BAC 2 Ana 2 | 385022 | 210182 | 112060 | 21297 | 261660144 |
| PT 28KR BAC 3 Ana 2 | 386935 | 213614 | 113040 | 22373 | 264417844 |
| | | | | Media | 262925652 |
| | | | | Desviación Estándar | 1392755.0 |
| | | | | % RSD | 0.53 |

Día 2 Analista 1

Tabla XXVII. Área del estándar obtenido para la precisión intermedia.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------------|-----------------|-----------------|------------|
| STD 1 Ana1 BAC | 482509 | 257498 | 258812324 |
| STD 1 Ana1 BAC | 483747 | 256076 | 258709948 |
| STD 1 Ana1 BAC | 483809 | 253749 | 257874692 |
| STD 1 Ana1 BAC | 485945 | 258177 | 260230436 |
| STD 1 Ana1 BAC | 488143 | 257432 | 260703596 |
| STD 1 Ana1 BAC | 492452 | 255317 | 261390336 |
| Media | 486101 | 256375 | 259620222 |
| Desviación Estándar | 3694.0 | 1657.1 | 1357021.5 |
| % RSD | 0.76 | 0.65 | 0.52 |

Tabla XXVII. Área del estándar obtenido para la precisión intermedia.

| Nombre de la Muestra | C12 | C14 | C16 | C18 | Área Total |
|----------------------|--------|--------|--------|----------------------------|------------|
| PT 28KR BAC 1 Ana 1 | 392442 | 217511 | 112044 | 22593 | 267423184 |
| PT 28KR BAC 2 Ana 1 | 389648 | 215536 | 110074 | 22374 | 264873448 |
| PT 28KR BAC 3 Ana 1 | 390411 | 217903 | 109158 | 26283 | 267298604 |
| | | | | Media | 266531745 |
| | | | | Desviación Estándar | 1437477.9 |
| | | | | % RSD | 0.54 |

Día 2 Analista 2

Tabla XXVIII. Área del estándar obtenido para la precisión intermedia.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------------|-----------------|-----------------|------------|
| STD 1 Ana2 BAC | 480762 | 254710 | 257192360 |
| STD 1 Ana2 BAC | 479191 | 254379 | 256536412 |
| STD 1 Ana2 BAC | 479503 | 253323 | 256253884 |
| STD 1 Ana2 BAC | 488638 | 260461 | 261986568 |
| STD 1 Ana2 BAC | 491427 | 259550 | 262599580 |
| STD1 Ana2 BAC | 487829 | 258567 | 261014516 |
| Media | 484558 | 256832 | 259263887 |
| Desviación Estándar | 5353.4 | 3046.3 | 2911872.4 |
| % RSD | 1.10 | 1.19 | 1.12 |

Tabla XXX. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar precisión intermedia.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | C ₁₆ | C ₁₈ | Área Total |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------------|------------|
| PT 28KR BAC 1 Ana 2 | 390825 | 212924 | 111430 | 20798 | 264181164 |
| PT 28KR BAC 2 Ana 2 | 390203 | 215972 | 112389 | 23448 | 266594712 |
| PT 28KR BAC 3 Ana 2 | 392980 | 219854 | 111167 | 23397 | 268461932 |
| | | | | Media | 266412603 |
| | | | | Desviación Estándar | 2146186.5 |
| | | | | % RSD | 0.81 |

9.2.6. Robustez
 Proporción de Fase

Tabla XXXI. Área del estándar obtenido para robustez proporción de fase condición inicial.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------|-----------------|----------------------------|------------|
| STD 1 BAC | 485462 | 256878 | 259588184 |
| STD 1 BAC | 485196 | 257707 | 259802816 |
| STD 1 BAC | 486546 | 256506 | 259819848 |
| STD 1 BAC | 488770 | 258872 | 261446696 |
| STD 1 BAC | 487909 | 258736 | 261103908 |
| STD 1 BAC | 488756 | 258654 | 261361712 |
| | | Media | 260520527 |
| | | Desviación Estándar | 869602 |
| | | % RSD | 0.30 |

Tabla XXXII. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar robustez proporción de fase.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | C ₁₆ | C ₁₈ | Área Total |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|
| PT M-1 BAC | 385235 | 216990 | 114358 | 24944 | 266694244 |
| PT M-2 BAC | 383632 | 214801 | 112749 | 23999 | 264305828 |
| PT M-3 BAC | 382867 | 214734 | 112509 | 24292 | 264050264 |

Tabla XXXIII. Área del estándar obtenido para robustez proporción de fase 45:55.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------|-----------------|----------------------------|------------|
| STD 1 BAC | 485906 | 256956 | 259767848 |
| STD 1 BAC | 485751 | 256266 | 259461228 |
| STD 1 BAC | 483487 | 255586 | 258441228 |
| STD 2 BAC | 483870 | 258898 | 259790264 |
| STD 2 BAC | 485807 | 258691 | 260353628 |
| STD 2 BAC | 483535 | 258801 | 260446808 |
| | | Media | 259710167 |
| | | Desviación Estándar | 726444 |
| | | % RSD | 0.28 |

Tabla XXXIV. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar robustez proporción de fase 45:55.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | C ₁₆ | C ₁₈ | Área Total |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|
| PT M-1 BAC | 363971 | 209915 | 102579 | 19615 | 249936904 |
| PT M-2 BAC | 352799 | 210158 | 106352 | 20068 | 247914028 |
| PT M-3 BAC | 362930 | 210223 | 105612 | 20685 | 251351056 |

Tabla XXXV. Área del estándar obtenido para robustez proporción de fase 35:65.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------|-----------------|----------------------------|------------|
| STD 1 BAC | 485736 | 256017 | 259364496 |
| STD 1 BAC | 484941 | 255671 | 258966868 |
| STD 1 BAC | 487414 | 257062 | 260319576 |
| STD 1 BAC | 487910 | 258696 | 261089528 |
| STD 1 BAC | 488674 | 258492 | 261274216 |
| STD 2 BAC | 488577 | 259390 | 261571700 |
| | | Media | 260431064 |
| | | Desviación Estándar | 1071391 |
| | | % RSD | 0.41 |

Tabla XXXVI. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar robustez proporción de fase 35:65.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | C ₁₆ | C ₁₈ | Área Total |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|
| PT M-1 BAC | 388200 | 217462 | 115747 | 24927 | 268418876 |
| PT M-2 BAC | 384830 | 215719 | 115749 | 24965 | 266648556 |
| PT M-3 BAC | 386119 | 215486 | 114828 | 25154 | 266716492 |

Volumen de Inyección

Tabla XXXVII. Área del estándar obtenido para robustez volumen de inyección condición inicial.

| Nombre de la muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------|-----------------|----------------------------|------------|
| STD 1 BAC | 498908 | 262235 | 266131200 |
| STD 1 BAC | 499895 | 263049 | 266766332 |
| STD 1 BAC | 500184 | 263488 | 267026144 |
| STD 1 BAC | 500316 | 262990 | 266887760 |
| STD 1 BAC | 499453 | 262224 | 266312452 |
| STD 2 BAC | 499151 | 263213 | 266573724 |
| | | Media | 266616269 |
| | | Desviación Estándar | 344567 |
| | | % RSD | 0.10 |

Tabla XXXVIII. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar robustez volumen de inyección condición inicial.

| Nombre de la Muestra | C12 | C14 | C16 | C18 | Área Total |
|----------------------|--------|--------|--------|-------|------------|
| PT M-1 BAC | 392970 | 217534 | 116191 | 24356 | 270000892 |
| PT M-2 BAC | 394904 | 219674 | 116131 | 24430 | 271453588 |
| PT M-3 BAC | 396237 | 218632 | 116502 | 24428 | 271669420 |

Volumen de inyección 20µL

Tabla XXXIX. Área del estándar obtenido para robustez volumen de inyección 20µL.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------|-----------------|----------------------------|------------|
| STD 1 BAC | 329957 | 170413 | 174897364 |
| STD 1 BAC | 329596 | 170311 | 174737088 |
| STD 1 BAC | 329362 | 171340 | 175036200 |
| STD 1 BAC | 329577 | 170930 | 174958420 |
| STD 1 BAC | 329211 | 171032 | 174871516 |
| STD 1 BAC | 328947 | 171065 | 174793900 |
| | | Media | 174882415 |
| | | Desviación Estándar | 108373 |
| | | % RSD | 0.06 |

Tabla XL. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar robustez volumen de inyección 20µL.

| Nombre de la Muestra | C12 | C14 | C16 | C18 | Área Total |
|----------------------|--------|--------|-------|-------|------------|
| PT M-1 BAC | 259594 | 142877 | 75609 | 14516 | 176936644 |
| PT M-2 BAC | 259679 | 143027 | 74865 | 14956 | 176912680 |
| PT M-3 BAC | 258717 | 142096 | 74557 | 14328 | 175854752 |

Volumen de Inyección 50 μ L

Tabla XLI. Área del estándar obtenido para robustez volumen de inyección 50 μ L.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------------|-----------------|-----------------|------------|
| STD 1 BAC | 831515 | 438703 | 444157804 |
| STD 1 BAC | 837658 | 432027 | 443789656 |
| STD 1 BAC | 831653 | 433053 | 442125524 |
| STD 1 BAC | 837577 | 438683 | 446211524 |
| STD 1 BAC | 837243 | 438894 | 446175612 |
| STD 2 BAC | 827500 | 429447 | 439386496 |
| Media | | | 443641103 |
| Desviación Estándar | | | 2596864 |
| % RSD | | | 0.59 |

Tabla XLII. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar robustez volumen de inyección 50 μ L.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | C ₁₆ | C ₁₈ | Área Total |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|
| PT M-1 BAC | 656941 | 362737 | 193380 | 40863 | 450751548 |
| PT M-2 BAC | 659172 | 365303 | 194520 | 40877 | 452911752 |
| PT M-3 BAC | 656341 | 363686 | 192933 | 40795 | 450690936 |

Velocidad de Flujo

Tabla XLIII. Área del estándar obtenido para robustez velocidad de flujo condición inicial.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------------|-----------------|-----------------|------------|
| STD 1 BAC | 498908 | 262235 | 266131200 |
| STD 1 BAC | 499895 | 263049 | 266766332 |
| STD 1 BAC | 500184 | 263488 | 267026144 |
| STD 1 BAC | 500316 | 262990 | 266887760 |
| STD 1 BAC | 499453 | 262224 | 266312452 |
| STD 2 BAC | 499151 | 263213 | 266573724 |
| Promedio | | | 266616269 |
| Desviación Estándar | | | 344567 |
| % RSD | | | 0.10 |

Tabla XLIV. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar robustez velocidad de flujo condición inicial.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | C ₁₆ | C ₁₈ | Área Total |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|
| PT M-1 BAC | 392970 | 217534 | 116191 | 24356 | 270000892 |
| PT M-2 BAC | 394904 | 219674 | 116131 | 24430 | 271453588 |
| PT M-3 BAC | 396237 | 218632 | 116502 | 24428 | 271669420 |

Velocidad de Flujo 0.8mL/min

Tabla XLV. Área del estándar obtenido para robustez velocidad de flujo 0.8mL/min.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------|-----------------|----------------------------|------------|
| STD 1 BAC | 621487 | 325365 | 331039900 |
| STD 1 BAC | 622096 | 326946 | 331828768 |
| STD 1 BAC | 621803 | 327825 | 332052620 |
| STD 1 BAC | 617441 | 328298 | 330743604 |
| STD 1 BAC | 621737 | 326110 | 331399060 |
| STD 2 BAC | 619676 | 326986 | 331020688 |
| | | Media | 331347440 |
| | | Desviación Estándar | 509428 |
| | | % RSD | 0.15 |

Tabla XLVI. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar robustez velocidad de flujo 0.8mL/min. Velocidad de Flujo 1.2mL/min

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | C ₁₆ | C ₁₈ | Área Total |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|
| PT M-1 BAC | 489264 | 269222 | 143564 | 30403 | 335165672 |
| PT M-2 BAC | 495175 | 274063 | 146174 | 31247 | 340348316 |
| PT M-3 BAC | 493204 | 271380 | 145455 | 30933 | 338272972 |

Tabla XLVII. Área del estándar obtenido para robustez velocidad de flujo 1.2mL/min

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------|-----------------|----------------------------|------------|
| STD 1 BAC | 417886 | 219836 | 222980888 |
| STD 1 BAC | 418213 | 220577 | 223364756 |
| STD 1 BAC | 417790 | 219869 | 222960392 |
| STD 1 BAC | 415263 | 219812 | 222080236 |
| STD 1 BAC | 415991 | 218891 | 221988828 |
| STD 2 BAC | 414913 | 220555 | 222234660 |
| | | Media | 222601627 |
| | | Desviación Estándar | 572181 |
| | | % RSD | 0.26 |

Tabla XLVIII. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar robustez velocidad de flujo 1.2mL/min.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | C ₁₆ | C ₁₈ | Área Total |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|
| PT M-1 BAC | 332952 | 183470 | 97807 | 21566 | 228596196 |
| PT M-2 BAC | 329556 | 182257 | 97451 | 21113 | 226662124 |
| PT M-3 BAC | 329591 | 181758 | 96949 | 21312 | 226375976 |

Cambio de pH a 2.5

Tabla XLIX. Área del estándar obtenido para robustez cambio de pH condición inicial.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------|-----------------|----------------------------|------------|
| STD 1 BAC | 485462 | 256878 | 259588184 |
| STD 1 BAC | 485196 | 257707 | 259802816 |
| STD 1 BAC | 486546 | 256506 | 259819848 |
| STD 1 BAC | 488770 | 258872 | 261446696 |
| STD 1 BAC | 487909 | 258736 | 261103908 |
| STD 1 BAC | 488756 | 258654 | 261361712 |
| | | Media | 260520527 |
| | | Desviación Estándar | 869602 |
| | | % RSD | 0.30 |

Tabla L. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar robustez cambio de pH condición inicial.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | C ₁₆ | C ₁₈ | Área Total |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|
| PT M-1 BAC | 385235 | 216990 | 114358 | 24944 | 266694244 |
| PT M-2 BAC | 383632 | 214801 | 112749 | 23999 | 264305828 |
| PT M-3 BAC | 382867 | 214734 | 112509 | 24292 | 264050264 |

Tabla LI. Área del estándar obtenido para robustez a cambio de pH 2.5.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------|-----------------|----------------------------|------------|
| STD 1 BAC | 485956 | 256155 | 259490080 |
| STD 1 BAC | 487755 | 257356 | 260543708 |
| STD 1 BAC | 485396 | 256538 | 259440624 |
| STD 1 BAC | 488669 | 259153 | 261515764 |
| STD 1 BAC | 488696 | 258841 | 261410128 |
| STD 2 BAC | 488933 | 258801 | 261475988 |
| | | Media | 260646049 |
| | | Desviación Estándar | 982732 |
| | | % RSD | 0.40 |

Tabla LII. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar robustez a cambio de pH 2.5.

Cambio de pH a 3.5

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | C ₁₆ | C ₁₈ | Área Total |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|
| PT M-1 BAC | 387378 | 216877 | 113605 | 24273 | 266798588 |
| PT M-2 BAC | 386476 | 216252 | 113259 | 24497 | 266219868 |
| PT M-3 BAC | 385026 | 214892 | 112508 | 23867 | 264661872 |

Tabla LIII. Área del estándar obtenido para cambio de pH condición inicial.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------------|-----------------|-----------------|------------|
| STD 1 BAC | 478945 | 253104 | 255983572 |
| STD 1 BAC | 478649 | 253289 | 255951012 |
| STD 1 BAC | 479460 | 252988 | 256115984 |
| STD 1 BAC | 476830 | 252565 | 255066120 |
| STD 1 BAC | 478912 | 253188 | 256003264 |
| STD 2 BAC | 478276 | 252711 | 255611488 |
| Media | | | 255788573 |
| Desviación Estándar | | | 392683 |
| % RSD | | | 0.20 |

Tabla LIV. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar robustez cambio de pH condición inicial.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | C ₁₆ | C ₁₈ | Área Total |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|
| PT M-1 BAC | 382237 | 213872 | 112250 | 24238 | 263393388 |
| PT M-2 BAC | 384876 | 215481 | 113160 | 24141 | 265201992 |
| PT M-3 BAC | 384973 | 215010 | 112867 | 24191 | 264966816 |

Tabla LV. Área del estándar obtenido para robustez cambio de pH 3.5.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------------|-----------------|-----------------|------------|
| STD 1 BAC | 480557 | 254857 | 257176756 |
| STD 1 BAC | 479650 | 253870 | 256505160 |
| STD 1 BAC | 479696 | 255020 | 256944000 |
| STD 1 BAC | 479575 | 254480 | 256704140 |
| STD 1 BAC | 477044 | 252912 | 255266576 |
| STD 2 BAC | 476990 | 252911 | 255247848 |
| Media | | | 256307413 |
| Desviación Estándar | | | 844218 |
| % RSD | | | 0.33 |

Tabla LVI. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar robustez cambio de pH 3.5.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | C ₁₆ | C ₁₈ | Área Total |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|
| PT M-1 BAC | 382237 | 213872 | 112250 | 24238 | 263393388 |
| PT M-2 BAC | 384876 | 215481 | 113160 | 24141 | 265201992 |
| PT M-3 BAC | 384973 | 215010 | 112867 | 24191 | 264966816 |

9.2.7. Tolerancia

Condición inicial

Tabla LVII. Área del estándar obtenido para tolerancia.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------------|-----------------|-----------------|------------|
| STD 1 BAC | 476821 | 250691 | 254373428 |
| STD 1 BAC | 476399 | 250193 | 254046684 |
| STD 1 BAC | 475617 | 251253 | 254170884 |
| STD 1 BAC | 475317 | 243394 | 251176772 |
| STD 1 BAC | 477085 | 244637 | 252235316 |
| STD 2 BAC | 475892 | 245539 | 252161632 |
| Media | | | 253027453 |
| Desviación Estándar | | | 1338661 |
| % RSD | | | 0.53 |

Tabla LVIII. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar tolerancia.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | C ₁₆ | C ₁₈ | Área Total |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|
| PT M-1 BAC | 379345 | 205133 | 114289 | 24254 | 260008384 |
| PT M-2 BAC | 383134 | 210439 | 114644 | 23847 | 263217264 |
| PT M-3 BAC | 382484 | 206897 | 114262 | 24591 | 261856992 |

Condición 55ACN_45Buffer Marca Ultrasphere Luna

Tabla LIX. Área del estándar obtenido para tolerancia columna Luna.

| Nombre de la muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------------|-----------------|-----------------|------------|
| STD 1 BAC | 477830 | 250335 | 254585480 |
| STD 1 BAC | 478378 | 250084 | 254679432 |
| STD 1 BAC | 479581 | 249905 | 255022580 |
| STD 1 BAC | 483086 | 253172 | 257416536 |
| STD 1 BAC | 481222 | 254229 | 257171752 |
| STD 2 BAC | 482926 | 252565 | 257138760 |
| Media | | | 256002423 |
| Desviación Estándar | | | 1369411 |
| % RSD | | | 0.53 |

Tabla LX. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar tolerancia columna Luna.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | C ₁₆ | C ₁₈ | Área Total |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|
| PT M-1 BAC | 379156 | 212620 | 106061 | 21046 | 258080860 |
| PT M-2 BAC | 381192 | 214197 | 110574 | 20763 | 261020592 |
| PT M-3 BAC | 383516 | 212816 | 109194 | 21426 | 261037176 |

9.2.8. Estabilidad de la muestra

Condición inicial

Tabla LXI. Área del estándar obtenido para estabilidad de la muestra.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------------|-----------------|-----------------|------------|
| STD 1 BAC | 499895 | 263552 | 266951436 |
| STD 1 BAC | 501770 | 263049 | 267403832 |
| STD 1 BAC | 500184 | 262990 | 266842880 |
| STD 1 BAC | 498161 | 262584 | 266005652 |
| STD 1 BAC | 500153 | 263213 | 266914404 |
| STD 1 BAC | 499151 | 263607 | 266718716 |
| Media | | | 266806153 |
| Desviación Estándar | | | 456035 |
| % RSD | | | 0.20 |

Tabla LXII. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar estabilidad de la muestra.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | C ₁₆ | C ₁₈ | Área Total |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|
| PT M-1 BAC | 388370 | 212744 | 113449 | 23880 | 265386516 |
| PT M-2 BAC | 392015 | 216547 | 117294 | 25441 | 270209804 |
| PT M-3 BAC | 389526 | 214396 | 114773 | 23964 | 266947412 |

Estabilidad 24 horas temperatura ambiente

Tabla LXIII. Área del estándar obtenido para estabilidad de la muestra a temperatura ambiente 24 horas.

| Nombre de la Muestra | C12 | C14 | Área Total |
|----------------------|--------|----------------------------|------------|
| STD 1 BAC | 499223 | 262230 | 266236460 |
| STD 1 BAC | 494010 | 259387 | 263417816 |
| STD 1 BAC | 497899 | 261735 | 265604140 |
| STD 1 BAC | 498449 | 261979 | 265880932 |
| STD 1 BAC | 498971 | 262842 | 266375996 |
| STD 2 BAC | 499964 | 261938 | 266380944 |
| | | Media | 265649381 |
| | | Desviación Estándar | 1135197 |
| | | % RSD | 0.43 |

Tabla LXIV. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar estabilidad de la muestra a temperatura ambiente 24 horas.

| Nombre de la Muestra | C12 | C14 | C16 | C18 | Área Total |
|----------------------|--------|--------|--------|-------|------------|
| PT M-1 BAC | 387288 | 212327 | 112815 | 23205 | 264327916 |
| PT M-2 BAC | 389302 | 214973 | 116287 | 24413 | 267873508 |
| PT M-3 BAC | 388383 | 213724 | 113722 | 23517 | 265705772 |

Estabilidad de la muestra 24 horas refrigeración

Tabla LXV. Área del estándar obtenido para estabilidad de la muestra en refrigeración 24 horas.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------------|-----------------|-----------------|------------|
| STD 1 BAC | 499223 | 262230 | 266236460 |
| STD 1 BAC | 494010 | 259387 | 263417816 |
| STD 1 BAC | 497899 | 261735 | 265604140 |
| STD 1 BAC | 498449 | 261979 | 265880932 |
| STD 1 BAC | 498971 | 262842 | 266375996 |
| STD 2 BAC | 499964 | 261938 | 266380944 |
| Media | | | 265649381 |
| Desviación Estándar | | | 1135197 |
| % RSD | | | 0.43 |

Tabla LXVI. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar estabilidad de la muestra en refrigeración 24 horas.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | C ₁₆ | C ₁₈ | Área Total |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|
| PT M-1 BAC | 388189 | 213506 | 113358 | 23406 | 265368380 |
| PT M-2 BAC | 386621 | 212987 | 116863 | 23796 | 266197608 |
| PT M-3 BAC | 385359 | 212085 | 112686 | 23073 | 263475948 |

Estabilidad de la muestra temperatura ambiente 48 horas

Tabla LXVII. Área del estándar obtenido para estabilidad de la muestra a temperatura ambiente 48 horas.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------------|-----------------|-----------------|------------|
| STD 1 BAC | 492279 | 262474 | 263965292 |
| STD 1 BAC | 499156 | 258721 | 264922368 |
| STD 1 BAC | 495229 | 259109 | 263729972 |
| STD 1 BAC | 498771 | 262496 | 266180668 |
| STD 1 BAC | 499112 | 262394 | 266259072 |
| STD 1 BAC | 499003 | 262397 | 266223116 |
| Media | | | 265213415 |
| Desviación Estándar | | | 1174018 |
| % RSD | | | 0.44 |

Tabla LXVIII. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar estabilidad de la muestra a temperatura ambiente 48 horas.

| Nombre de la Muestra | C12 | C14 | C16 | C18 | Área Total |
|----------------------|--------|--------|--------|-------|------------|
| PT M-1 BAC | 385499 | 212588 | 114603 | 23789 | 264771368 |
| PT M-2 BAC | 386804 | 213564 | 116690 | 25636 | 267183816 |
| PT M-3 BAC | 386393 | 211610 | 112509 | 24121 | 264026968 |

Estabilidad de la muestra refrigeración 48 horas

Tabla LXIX. Área del estándar obtenido para estabilidad de la muestra en refrigeración 48 horas.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------|-----------------|----------------------------|------------|
| STD 1 BAC | 497722 | 258721 | 264434808 |
| STD 1 BAC | 492279 | 261549 | 263624892 |
| STD 1 BAC | 499258 | 262201 | 266237688 |
| STD 1 BAC | 495229 | 259109 | 263729972 |
| STD 1 BAC | 499003 | 263207 | 266521196 |
| STD 1 BAC | 498558 | 262394 | 266070712 |
| | | Media | 265103211 |
| | | Desviación Estándar | 1323008 |
| | | % RSD | 0.50 |

Tabla LXX. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar estabilidad de la muestra en refrigeración 48 horas.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | C ₁₆ | C ₁₈ | Área Total |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|
| PT M-1 BAC | 383849 | 211207 | 111980 | 24119 | 262803372 |
| PT M-2 BAC | 385408 | 212660 | 115889 | 24766 | 265690428 |
| PT M-3 BAC | 387032 | 212231 | 113771 | 24008 | 264924596 |

9.2.9. Especificidad

Condición inicial para posterior degradación con NaOH y HCl

Tabla LXXI. Área del estándar obtenido para especificidad condición inicial.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------------|-----------------|-----------------|------------|
| STD 1 BAC | 485571 | 254893 | 258894764 |
| STD 1 BAC | 486943 | 255326 | 259520588 |
| STD 1 BAC | 485249 | 254701 | 258714628 |
| STD 2 BAC | 484466 | 255126 | 258604808 |
| STD 2 BAC | 485262 | 254731 | 258730088 |
| STD 2 BAC | 485594 | 254720 | 258838920 |
| Media | | | 258883966 |
| Desviación Estándar | | | 327938 |
| % RSD | | | 0.10 |

Tabla LXXII. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar especificidad del método condición inicial.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | C ₁₆ | C ₁₈ | Área Total |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|
| PT M-1 BAC | 393940 | 207888 | 109985 | 15864 | 260722780 |
| PT M-2 BAC | 399459 | 210714 | 110968 | 16124 | 264138716 |
| PT M-3 BAC | 398010 | 210720 | 111867 | 15909 | 263913108 |

Degradación con NaOH 5h/80°C

Tabla LXXIII. Área del estándar obtenido para especificidad degradación con NaOH.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------------|-----------------|-----------------|------------|
| STD 1 BAC | 485784 | 254100 | 258675360 |
| STD 1 BAC | 484906 | 254392 | 258484296 |
| STD 1 BAC | 484559 | 254136 | 258272108 |
| STD 1 BAC | 485780 | 254130 | 258685040 |
| STD 1 BAC | 483775 | 254069 | 257980892 |
| STD 2 BAC | 484312 | 253598 | 257990144 |
| Media | | | 258347973 |
| Desviación Estándar | | | 318724 |
| % RSD | | | 0.12 |

Tabla LXXIV. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar especificidad del método degradación con NaOH.

| Nombre de la Muestra | C12 | C14 | C16 | C18 | Área Total |
|----------------------|--------|--------|--------|-------|------------|
| PT M-1 BAC | 388954 | 204845 | 107367 | 15063 | 256531364 |
| PT M-2 BAC | 389706 | 205856 | 108708 | 15144 | 257724472 |
| PT M-3 BAC | 388494 | 205122 | 108098 | 15231 | 256837608 |

Degradación con HCl 5h/80°C

Tabla LXXV. Área del estándar obtenido para especificidad degradación con HCl.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------|-----------------|----------------------------|------------|
| STD 1 BAC | 486943 | 255326 | 259520588 |
| STD 1 BAC | 484466 | 255126 | 258604808 |
| STD 1 BAC | 485262 | 254720 | 258726040 |
| STD 1 BAC | 485571 | 254893 | 258894764 |
| STD 1 BAC | 485249 | 254701 | 258714628 |
| STD 2 BAC | 485594 | 254731 | 258842968 |
| | | Media | 258883966 |
| | | Desviación Estándar | 328216 |
| | | % RSD | 0.13 |

Tabla LXXVI. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar especificidad del método degradación con HCl.

| Nombre de la Muestra | C12 | C14 | C16 | C18 | Área Total |
|----------------------|--------|--------|--------|-------|------------|
| PT M-1 BAC | 391980 | 208366 | 109329 | 15744 | 259921628 |
| PT M-2 BAC | 375660 | 201010 | 107827 | 16856 | 251542516 |
| PT M-3 BAC | 392463 | 207978 | 110146 | 15349 | 260099116 |

Degradación Calor/Peróxido

Tabla LXXVII. Área del estándar obtenido para especificidad condición inicial.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------|-----------------|----------------------------|------------|
| STD 1 BAC | 496199 | 262731 | 265392668 |
| STD 1 BAC | 494039 | 261955 | 264372700 |
| STD 1 BAC | 490448 | 259996 | 262430848 |
| STD 2 BAC | 493085 | 261508 | 263883844 |
| STD 2 BAC | 494543 | 261952 | 264542956 |
| STD 2 BAC | 492544 | 260546 | 263345888 |
| | | Media | 263994817 |
| | | Desviación Estándar | 1027294 |
| | | % RSD | 0.40 |

Tabla LXXVIII. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar especificidad del método condición inicial.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | C ₁₆ | C ₁₈ | Área Total |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|
| PT M-1 BAC | 395965 | 212085 | 112651 | 17450 | 264683976 |
| PT M-2 BAC | 390952 | 208563 | 111369 | 17035 | 260999828 |
| PT M-3 BAC | 390685 | 209307 | 112096 | 16948 | 261433844 |

Degradación calor 8 horas

Tabla LXXIX. Área del estándar obtenido para especificidad degradación con calor.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | Área Total |
|----------------------|-----------------|----------------------------|------------|
| STD 1 BAC | 487934 | 260469 | 261750152 |
| STD 1 BAC | 492329 | 258151 | 262391428 |
| STD 1 BAC | 487614 | 257223 | 260446824 |
| STD 1 BAC | 487373 | 257623 | 260512084 |
| STD 1 BAC | 488044 | 258608 | 261102704 |
| STD 1 BAC | 488284 | 257986 | 260955408 |
| | | Media | 261193100 |
| | | Desviación Estándar | 752553 |
| | | % RSD | 0.29 |

Tabla LXXX. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar especificidad del método degradación con calor.

| Nombre de la Muestra | C ₁₂ | C ₁₄ | C ₁₆ | C ₁₈ | Área Total |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|
| PT M-1 BAC | 401459 | 212969 | 112157 | 15624 | 265907400 |
| PT M-2 BAC | 401430 | 210570 | 109991 | 14449 | 263658772 |
| PT M-3 BAC | 400998 | 212279 | 106739 | 14710 | 262963676 |

Degradación peróxido

Tabla LXXXI. Área del estándar obtenido para especificidad degradación con peróxido.

| Nombre de la Muestra | C12 | C14 | Área Total |
|----------------------|--------|----------------------------|------------|
| STD 1 BAC | 506762 | 261077 | 268375416 |
| STD 1 BAC | 494725 | 268064 | 266854052 |
| STD 1 BAC | 504513 | 267235 | 269876900 |
| STD 1 BAC | 493607 | 260399 | 263653212 |
| STD 1 BAC | 509901 | 260567 | 269254996 |
| STD 2 BAC | 492803 | 268582 | 266391196 |
| | | Media | 267400962 |
| | | Desviación Estándar | 2275154 |
| | | % RSD | 0.85 |

Tabla LXXXII. Áreas de los homólogos de BAC obtenidas para determinar especificidad del método degradación con peróxido

| Nombre de la Muestra | C12 | C14 | C16 | C18 | Área Total |
|----------------------|--------|--------|-------|------|------------|
| PT M-1 BAC | 313202 | 163857 | 66499 | 6673 | 195951012 |
| PT M-2 BAC | 319022 | 156088 | 74409 | 7902 | 198724276 |
| PT M-3 BAC | 316795 | 154746 | 72334 | 7693 | 196562924 |