



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA EL ANÁLISIS  
DE CLORURO DE BENZALCONIO POR HPLC EN SOLUCIÓN  
OFTÁLMICA**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

**ULISES SOSA GARZA**



MÉXICO, D.F.

ABRIL DE 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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	Carolina Muñoz Padilla
Vocal	Ricardo Rodríguez Sáenz
Secretario	Daniel García Escandón
1° suplente	Ángel Ávila Villagrán
2° suplente	Abraham Faustino Vega

**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**

---

Ulises Sosa Garza

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi asesor, Daniel García Escandón, por darme la oportunidad de realizar mi proyecto de tesis dentro de las instalaciones de Alcon México, por darme su apoyo, dedicación y confianza en todo momento.

A todos los compañeros de Alcon México, que con su apoyo y enseñanzas hicieron posible este trabajo Luz, Lorena, Eduardo, Claudia y en especial agradezco a Yazmin por dejarme aprender tanto de ella, por su confianza, paciencia y sobre todo por su amistad.

A mi mamá, Carmen Garza, por darme tanto amor y cariño incondicional en todos momentos de mi vida, por la confianza, fé y apoyo que siempre necesite para lograr mis metas y para darle sentido a todo lo que hago. Por enseñarme el camino correcto por más difícil que fuera, sin duda agradezco que me hayas dado la vida y la dicha de estar contigo, por demostrarme los valores que nos hacen grandes, pero sobre todo gracias por ser mi más grande héroe, Te amo mamá.

A mi hermano, Armando, por ser siempre el primero en dar el ejemplo y apoyarme a lo largo de mi vida, por ese amor de hermano que nos une, por tantos consejos que siempre fueron para bien, por esos empujones que siempre necesite para superarme y porque nunca me dejaste solo.

A mi hermano, Adrian, por enseñarme la vida desde otro punto, por tanto amor que me demuestras, la confianza y porras que tanto me ayudaron, y el que siempre pueda contar contigo. A mis hermanos los quiero mucho.

† A mis abuelitos, Manuel y Carmen por dejar siempre su amor, cariño, y sus grandes enseñanzas en lo más profundo de mi corazón.

A mi abuelita Marina que quiero mucho, agradezco que tenga un corazón muy grande para querer y apoyar a toda la familia, por estar siempre al pendiente de mí, y por ser mi segunda mamá.

A Brenda, por decidir estar a mi lado en los momentos buenos y malos, por apoyarme, escucharme, abrazarme, quererme, alentarme, y sobre todo por amarme con todo su corazón. Gracias por ser todos los días mi inspiración y compañera de vida, porque el tiempo que estamos juntos me haces el hombre más feliz. Te amo mi chiquita preciosa y siempre lo voy hacer.

A mis tí@s, Enrique, Paty, Jorge, Alfredo, y Yadira Garza, y a Jorge y Juan Medina por preocuparse y estar al pendiente de mis progresos, por aconsejarme, por darme todo ese cariño y apoyo a lo largo de mi vida,

A mis prim@s Joselyn, Jonathan, Donovan, Yair, Paola y Jorge, por compartir conmigo tanto tiempo, y dejar que sea parte de su vida y sobre todo gracias a Diego por ser un primo con un gran corazón y quererme como un hermano.

A la familia Piña Sánchez, amigos y familiares, Molo, Male, Andrea, Manuel, Azu, Rosa, Rafael, Andi, Guadalupe, Juan, Toño, Jorge, Rolo, Luis, Miguel y Anahí, gracias por aceptarme y tratarme como un miembro de la familia.

A mis amig@s del Basket, Ivan, Ángel Acapulco, Memo, Angelote, Javier, Sandra, Mitzi, Peter, Moy, Cesar, Pablo, Ángel coatza, Jorge lors, Jorjote, Mario, Zenen, Chucho, Diego, y a todos aquellos que no mencioné, pero que estuvieron conmigo, por tanto tiempo que pasamos juntos durante nuestra estancia en la Universidad, por los grandiosos tiempos que disfrutamos y por porque sin ustedes la universidad no sería la mejor experiencia de mi vida.

A mis amig@s del CCH, Franck, Gina, Viri, Edgar, Sergio, Orlando, Daniel, Skoby, Pablo, Andrés, † Conejo, Delia, Angelica, German, Hector, con ustedes puedo contar incondicionalmente y han estado siempre para apoyarme y aconsejarme, porque ustedes le dan un sentido más a mi vida.

A mis amig@s de la Universidad, Brenda, Xanic, Viri, Alex, Carlos, Paco, Yamani, Alfredo, Noemi, Jas, Cecilia, Jaquelin, Hugo, Lencho, Ariel, Ana, Ulises, Miguel, Laura y todos aquellos que sufrieron y disfrutaron de las clases en la Universidad conmigo, por todos esos momentos que hicieron de la Facultad nuestra segunda casa.

A mis amig@s Cynthia, Brenda, Lupita, Blanca, Roberto, Alan, Ana, Mayra, Silver, Gio, y Toño, gracias por escucharme y compartir conmigo todas esas experiencias de vida que nos han pasado, agradezco su valiosa amistad.

Gracias a todos.

ULISES SOSA GARZA

# INDICE GENERAL

<b>CAPITULO I INTRODUCCION</b> .....	9
1.1 OBJETIVOS .....	11
1.2 JUSTIFICACION .....	11
<b>CAPITULO II MARCO TEORICO</b> .....	13
2.1 SOLUCION OFTALMICA.....	13
2.2 MONOGRAFIA DE CLORURO DE BENZALCONIO .....	14
2.2.1 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS.....	14
2.2.2 APLICACIONES.....	15
2.2.3 PRECAUCIONES .....	16
2.3 VALIDACION DE METODOS ANALITICOS .....	16
2.3.1 VALIDACION PROSPECTIVA.....	19
2.3.2 VALIDACION CONCURRENTE.....	19
2.3.3 VALIDACION RETROSPECTIVA .....	19
2.4 CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION .....	20
2.4.1 HISTORIA .....	20
2.4.2 TIPOS DE CROMATOGRAFIA .....	21
2.4.2.1 CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS EN FASE NORMAL .....	21
2.4.2.2 CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS EN FASE INVERSA .....	21
2.4.2.3 CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE INTERCAMBIO IONICO .....	22
2.4.2.4 CROMATOGRAFIA POR FILTRACION EN GEL .....	22
2.4.3 COMPONENTES DEL HPLC .....	23
2.5 PARAMETROS CROMATOGRAFICOS .....	24
2.5.1 FACTOR DE CAPACIDAD ( $k'$ ) .....	24
2.5.2 FACTOR DE COLEO O ASIMETRIA (T) .....	25
2.5.3 FACTOR DE RESPUESTA (FR) .....	25
2.5.4 NUMERO DE PLATOS TEORICOS (N) .....	25
2.5.5 RESOLUCION (R) .....	26

2.5.6 TIEMPO DE RETENCION (tR) .....	27
2.5.7 VOLUMEN MUERTO (Vo) .....	27
2.6 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO .....	28
<b>CAPITULO III DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>30</b>
3.1 PRECISION DEL SISTEMA .....	30
3.2 PRECISION DEL METODO .....	31
3.3 LINEALIDAD DEL SISTEMA .....	32
3.4 LINEALIDAD DEL METODO .....	33
3.5 PRECISION INTERMEDIA .....	34
3.6 ESPECIFICIDAD .....	35
3.7 ESTABILIDAD ANALITICA DE LA MUESTRA .....	35
3.8 TOLERANCIA .....	36
3.9 ROBUSTEZ .....	36
<b>CAPITULO IV RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
4.1 ESPECIFICIDAD .....	38
4.2 PRECISION DEL SISTEMA .....	45
4.3 PRECISION DEL METODO .....	46
4.4 LINEALIDAD DEL SISTEMA .....	47
4.5 LINEALIDAD DEL METODO .....	48
4.6 PRECISION INTERMEDIA .....	49
4.7 ESTABILIDAD ANALITICA DE LA MUESTRA .....	49
4.8 ROBUSTEZ .....	50
3.9 TOLERANCIA .....	52
<b>CAPITULO V DISCUSION DE RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
5.1 PRUEBAS DE DETECCION .....	53
5.2 ESPECIFICIDAD .....	53
5.3 PRECISION Y ADECUABILIDAD DEL SISTEMA .....	54
5.4 LINEALIDAD DEL SISTEMA .....	54
5.5 PRECISION DEL METODO POR REPETIBILIDAD .....	54
5.6 LINEALIDAD DEL METODO .....	55
5.7 PRECISION INTERMEDIA .....	55



5.8 ESTABILIDAD ANALITICA DE LA MUESTRA .....	55
5.9 ROBUSTEZ .....	56
5.10 TOLERANCIA .....	56
<b>CAPITULO VI CONCLUSIONES .....</b>	<b>57</b>
<b>CAPITULO VII BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>59</b>
<b>CAPITULO VIII ANEXOS.....</b>	<b>61</b>
8.1 ALGORITMO PARA LA CUANTIFICACION DE CLORURO DE BENZALCONIO .....	61
8.2 AREAS OBTENIDAS DURANTE EL ANALISIS .....	62
8.2.1 PRECISION DEL SISTEMA .....	62
8.2.2 PRECISION DEL METODO .....	62
8.2.3 LINEALIDAD DEL SISTEMA .....	63
8.2.4 LINEALIDAD DEL METODO .....	63
8.2.5 PRECISION INTERMEDIA .....	64
8.2.6 ESPECIFICIDAD .....	65
8.2.7 ESTABILIDAD ANALITICA DE LA MUESTRA .....	67
8.2.8 ROBUSTEZ .....	69
8.2.9 TOLERANCIA .....	73

## CAPITULO I INTRODUCCIÓN

Hoy en día los laboratorios deben demostrar que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables y adecuados para su finalidad y propósito perseguido, ya que muchas de las decisiones que se toman están basadas en la información que estos datos proporcionan. La validación de las metodologías, junto a otras actividades englobadas en el control del aseguramiento de la calidad, permite demostrar a los laboratorios que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables

Es en los años setenta cuando la FDA establece el paradigma “proceso no validado es un proceso de alto riesgo, ya que en cualquier momento generará medicamentos fuera de especificaciones” y por consecuencia no cumplirán su función y pondrán en riesgo al paciente.<sup>2</sup>

Validación es “Contar con evidencia documental, que provee de un alto grado de seguridad de que un proceso específico, produce consistentemente un producto de acuerdo a especificaciones predeterminadas y atributos de calidad”<sup>2</sup>

La validación de métodos analíticos es un sistema involucrado en los procesos de fabricación en el área de calidad de la empresa y bajo la filosofía de la Validación, las Autoridades Regulatorias verifican que las empresas sustenten estos sistemas con actividades documentadas, como se indica en la NOM-059 SSA1. La validación proporciona, a quien aplica la metodología, una seguridad de la confiabilidad de dichos métodos y puede tomar la decisión final con certeza.<sup>1</sup>

Para la realización de una validación se debe contar con: <sup>13</sup>

- Un método de análisis apropiado, en el cual se establecen todas las condiciones de análisis por ejemplo: pH, velocidad de flujo, volumen de inyección, sustancia de referencia, etc.
- Un protocolo de validación en donde se resumen procedimientos y criterios para los trabajos de laboratorio. Estos criterios y procedimientos serán uniformes con respecto a los empleados en las demás validaciones de métodos dentro de la organización, y éstos a su vez de acuerdo a los parámetros establecidos por organizaciones como Secretaría de Salud de México o la FDA en EUA.
- Al finalizar la validación deberá elaborarse un informe de validación, con información útil y clara, para los usuarios y autoridades. Dejando por escrito todo lo referente a la validación.

## 1.1 OBJETIVOS

- Validar el Método Analítico para cuantificar Cloruro de Benzalconio en solución oftálmica con concentración de 0.01% por cromatografía de líquidos de alta resolución.
- Confirmar que el sistema es lineal y preciso, que el método es preciso, lineal, reproducible, específico, robusto y tolerante de acuerdo a los lineamientos básicos establecidos en la “Guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de QFB’s”<sup>1</sup>.

Se pretende establecer que la capacidad del método mencionado, cumpla los requisitos para ser utilizado como método de rutina en el laboratorio de Control Físicoquímico y como método de especificación de Alcon México

## 1.2 JUSTIFICACIÓN <sup>1,6,18</sup>

De acuerdo al Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) los problemas visuales son la segunda causa en México de discapacidad, estos problemas visuales se deben entre otras causas a las: hereditarias, sociales y ambientales.

Dentro de esta problemática de salud visual, se destaca que los problemas más recurrentes que aquejan a la población en México son: miopía, astigmatismo e hipermetropía, mismos trastornos que pueden ser corregidos con cirugía.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Organismo Internacional de Prevención de la Ceguera cerca de 200 millones de personas en el mundo sufren este tipo de padecimientos, de los cuales el 80% es curable a través de una cirugía.

El cloruro de benzalconio se encuentra como preservante en diversos medicamentos oftálmicos, incluyendo anestésicos, Los cuales están indicados en todo procedimiento oftálmico que requiera de anestesia tópica, incluyendo tonometría, extracción de cuerpos extraños, retiro de suturas, auxiliar en el diagnóstico de lesiones oculares por traumatismos y previo a eventos quirúrgicos.

Sin embargo el cloruro de benzalconio a concentraciones mayores a 0.3% causa diversos efectos secundarios tóxicos para la salud del paciente, por tal motivo se debe emplear un método analítico para cuantificar la concentración de dicho compuesto.

Un método analítico mide un componente específico (analito) en una muestra y como todo proceso de medición, este debe ser confiable para ser utilizado con un propósito definido. La validación de métodos analíticos es un proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada, es decir cumple con el propósito.

El presente trabajo se realizó con el fin de demostrar la capacidad del método analítico empleado para la cuantificación de Cloruro de Benzalconio por HPLC en una solución oftálmica.

## **CAPITULO II MARCO TEÓRICO**

### **2.1 SOLUCIÓN OFTÁLMICA<sup>5</sup>.**

Éste es, sin duda el método más común para administrar un fármaco en el ojo. Por definición, todos los componentes están completamente en solución, la uniformidad no es un problema y la interferencia física con la visión es escasa. La desventaja principal de las soluciones es el tiempo de contacto relativamente breve entre la medicación y las superficies absorbentes. El tiempo de contacto puede estar aumentado en cierta medida con la inclusión de un agente que aumente viscosidad.

Las formulaciones oftálmicas contienen generalmente uno o más compuestos activos junto con excipientes tales como tensoactivos, agentes acomplejantes, estabilizadores, agentes quelantes, agentes de viscosidad y antioxidantes. Las formulaciones oftálmicas que están destinadas para uso multidosis requieren un preservante.

El cloruro de benzalconio es un conservante ampliamente usado en las soluciones oftálmicas. Sin embargo, el cloruro de benzalconio y otros compuestos de amonio cuaternario se consideran generalmente incompatibles con las composiciones oftálmicas de fármacos con grupos ácidos, tales como fármacos antiinflamatorios no esteroides. Estos preservantes pierden su capacidad para funcionar cuando forman complejos con compuestos de fármacos cargados.

## 2.2 MONOGRAFÍA DE CLORURO DE BENZALCONIO<sup>5</sup>.

Nombre Químico

- Cloruro de alquildimetil(fenilmetil)-amonio.

Fórmula Condensada:  $[C_6H_5CH_2N(CH_3)_2R]Cl$

Donde R representa una mezcla de alquilos, incluyendo todos o alguno de los grupos empezando con n-C<sub>8</sub>H<sub>17</sub> y extendiéndose a través de homólogos mayores, con n-C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>, n-C<sub>14</sub>H<sub>33</sub> comprendiendo la porción mayor.

Estructura<sup>6</sup>:

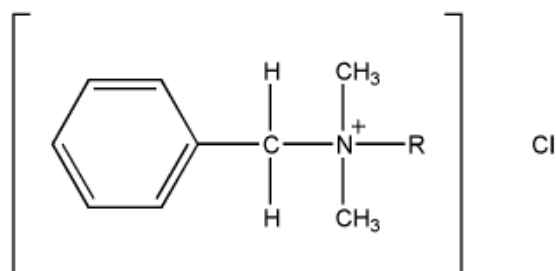


Figura 1 Estructura química de Cloruro de Benzalconio

### 2.2.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS<sup>5,6</sup>

- El peso molecular promedio del cloruro de benzalconio es 360 mg/mol.
- pH: 5 – 8 en una solución acuosa al 10% P/V
- Densidad: ~0.98 g/cm<sup>3</sup> a 20 °C.
- Punto de Fusión: ~40 °C

Descripción: Consiste en un gel espeso o en piezas gelatinosas blancas o de color blanco amarillento; tiene olor aromático y un sabor muy amargo; las soluciones son alcalinas frente al tornasol y forman mucha espuma cuando se agitan, tienen una baja tensión superficial y poseen propiedades detergentes y emulsificantes.

Solubilidad: Es muy soluble en agua y alcohol; 1g de la forma anhidra se disuelve en aproximadamente 6 ml de benceno y en unos 100 mL de éter.

Incompatibilidades: El cloruro de benzalconio es incompatible con aluminio, surfactantes aniónicos, citratos, algodón, fluoresceína, peróxido de hidrógeno, hipromelosa, yoduros, caolín, lanolina, nitratos, tensoactivos no aniónicos en altas concentraciones, permanganatos, proteínas, salicilatos, sales de plata, jabones, sulfonamidas, tartratos, óxido de zinc, sulfato de zinc, algunas mezclas de gomas y algunas mezclas de plásticos

### **2.2.2 APLICACIONES<sup>5,6</sup>**

El Cloruro de benzalconio es bacteriostático en bajas concentraciones y bactericida en concentraciones elevadas. Las bacterias Gram positivas son más sensibles que las Gram negativas. Es inefectivo contra algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Trichophyton interdigitale*, y *T. rubrum*.

El Cloruro de benzalconio es un compuesto de amonio cuaternario usado en formulaciones farmacéuticas como preservante antimicrobiano.

En preparaciones oftálmicas el cloruro de benzalconio es uno de los preservantes más usados, a una concentración de 0.01 – 0.02 % p/v.

A menudo se usa en combinación con otros preservantes o excipientes, principalmente con edetato disódico al 0.01 %P/V para aumentar su capacidad antimicrobiana contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

En formulaciones nasales y óticas se usa una concentración de 0.002–0.02 % p/v. El cloruro de benzalconio al 0.01 % p/v también se usa como preservante en productos parenterales de pequeño volumen.



### **2.2.3 PRECAUCIONES** <sup>5,6</sup>

El cloruro de benzalconio usualmente no es irritante y es bien tolerado en las diluciones normalmente empleadas en la piel y en membranas mucosas. Sin embargo, ha sido asociado con efectos adversos cuando es usado en algunas formulaciones farmacéuticas. Puede producirse ototoxicidad cuando es aplicado en el oído y en contacto prolongado con la piel puede causar ocasionalmente irritación e hipersensibilidad. También se sabe que puede causar bronco constricción en pacientes asmáticos cuando se usa en soluciones de nebulizadores. Cloruro de benzalconio no es adecuado para su uso como preservante en soluciones usadas para guardar o limpiar lentes de contacto blandos, ya que se puede unir a los lentes y producir toxicidad ocular más tarde cuando los lentes son usados.

El contacto de una solución más concentrada que 0.03 % p/v con el ojo requiere atención médica inmediata. Tras el contacto con soluciones concentradas (>0.1 % p/v) puede producirse irritación de la garganta, esófago, estómago e intestino. La dosis fatal oral en humanos es estimada en 1-3 g. Efectos adversos luego de su ingestión oral incluyen vómitos, colapso y coma. Las dosis tóxicas conducen a la parálisis de los músculos respiratorios, disnea y cianosis. Soluciones concentradas de cloruro de benzalconio accidentalmente derramadas en la piel pueden producir lesiones corrosivas con necrosis profunda y cicatrices, por lo que se debe lavar inmediatamente con agua y con jabón posteriormente. Para su manejo deben utilizarse guantes, protección para los ojos y ropa adecuada.

### **2.3 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS**

Según la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006, los métodos analíticos deben ser validados, de igual manera se debe de contar con métodos de análisis validados para producto a granel, producto terminado y materia prima en caso de no aparecer en cualquier farmacopea internacional ni en la FEUM.

La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.

Los parámetros de desempeño a estudiar para una validación en función de la aplicación analítica de un método se describen en la siguiente tabla.<sup>1</sup>

Tabla 1 Parámetros de desempeño que se deben evaluar.

PARAMETRO DE DESEMPEÑO	ENSAYO (CONTENIDO/ POTENCIA)	PRUEBAS DE IMPUREZA		IDENTIFICACION
		CONTENIDO/ VALORACION	LIMITE	
PRECISIÓN/ ADECUABILIDAD DEL SISTEMA	SI	SI	SI	*
LINEALIDAD DEL SISTEMA	SI	SI	NO	NO
ESPECIFICIDAD <sup>1</sup>	SI <sup>3</sup>	SI	SI	SI
EXACTITUD Y REPETIBILIDAD	SI	SI	NO	NO
LINEALIDAD DEL MÉTODO	SI	SI	NO	NO
PRECISIÓN DEL MÉTODO O PRECISIÓN INTERMEDIA <sup>2</sup>	SI	SI	NO	NO
ESTABILIDAD ANALITICA <sup>2</sup> DE LA MUESTRA	*	*	NO	NO
LIMITE DE DETECCIÓN	NO	NO	SI	NO
LIMITE DE CUANTIFICACIÓN	NO	SI	NO	NO
ROBUSTEZ	*	*	*	NO
TOLERANCIA	*	*	*	NO

\*Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método

1. La falta de especificidad de un método analítico, puede ser compensada por otra alternativa analítica de soporte, como por ejemplo cromatografía de capa fina.
2. También es definido como un estudio de tolerancia.
3. Un método que es exacto y lineal, por definición es específico al placebo analítico o a los otros componentes de la muestra.

Adecuabilidad del sistema<sup>1</sup>. Verificación de que el sistema (instrumento, analista, equipo, sustancia de referencia, entre otros) opera con base a los criterios preestablecidos, que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico.

Especificidad<sup>1</sup>. Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra.

Estabilidad analítica de la muestra<sup>1</sup>. Propiedad de la muestra, preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

Linealidad<sup>1</sup>. Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado.

Precisión<sup>1</sup>. Grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia.

Precisión Intermedia<sup>1</sup>. 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.

Repetibilidad<sup>1</sup>. Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método.

Robustez<sup>1</sup>. Capacidad del Método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método.

Tolerancia<sup>1</sup>. Reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos, por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación como pueden ser: equipos columnas.

Dependiendo los requerimientos los tipos de validación pueden ser divididos en tres tipos principales que son<sup>13</sup>:

Validación Prospectiva

Validación Concurrente

Validación Retrospectiva

### **2.3.1 VALIDACIÓN PROSPECTIVA<sup>16</sup>.**

La validación prospectiva debe llevarse a cabo antes de la distribución comercial de un principio activo producida por un proceso nuevo o sustancialmente modificado.

Los métodos validados de análisis capaces de cuantificar los atributos de calidad del principio activo deben ser utilizados durante la validación del proceso. Los datos obtenidos deberían ser evaluados e incluidos en un informe de validación, aprobados por las mismas unidades de organización que aprobó el protocolo.

### **2.3.2 VALIDACIÓN CONCURRENTE<sup>17</sup>.**

Establece la evidencia documentada de que el proceso hace lo que se propuso hacer, basada en la información generada durante el desarrollo del proceso.

Este tipo de validación es empleada en casos de fabricación esporádica, de fabricación de productos de alto riesgo o en maquilas.

### **2.3.3 VALIDACIÓN RETROSPECTIVA<sup>15</sup>.**

La validación retrospectiva puede llevarse a cabo un proceso bien establecido que ha sido utilizada sin cambios significativos (por ejemplo, cambios en materias primas, equipos, sistemas, instalaciones o en el proceso de producción) que afectan la calidad de los atributos críticos del principio activo. Este enfoque de validación que se debe utilizar sólo cuando hay suficientes antecedentes sobre el pasado de los lotes para demostrar que el proceso produce constantemente productos aceptables, y que los atributos críticos de calidad y parámetros críticos del proceso se han identificado y documentado; las especificaciones adecuadas durante el proceso y los controles se han establecido y documentado.

El protocolo de validación debe incluir los criterios de selección de lote y los datos analíticos que se evaluarán para determinar la consistencia del proceso.

Los datos obtenidos deben ser evaluados por el personal apropiado, y se debe hacer un informe de validación final que resuma los resultados y conclusiones. Este informe debe ser revisado y aprobado por las unidades de organización que aprobó el protocolo original.

La validación retrospectiva podría emplearse también para proporcionar datos adicionales para complementar la validación prospectiva y, o bien aumentar la confianza en un proceso de producción.

## 2.4 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

### 2.4.1 HISTORIA<sup>14</sup>

Cromatografía de líquidos se definió a principios de 1900 por la obra del botánico ruso, Mikhail S. Tswett. Sus estudios se centraron en la separación de los compuestos (pigmentos) de las hojas, extraídos de las plantas utilizando un disolvente en una columna rellena con partículas.

Relató que se repartieron, las bandas de diferentes colores para los diferentes compuestos que figuraban inicialmente en la muestra. Él había creado una separación analítica de estos compuestos sobre la base de la fuerza de atracción química diferente para cada compuesto de las partículas. Los compuestos que fueron más fuertemente atraídos por las partículas eran más lentos, mientras que otros compuestos más fuertemente atraídos por el disolvente se movía más rápido. Esto hace que cada compuesto se mueva a una velocidad diferente, creando así una separación de los compuestos.

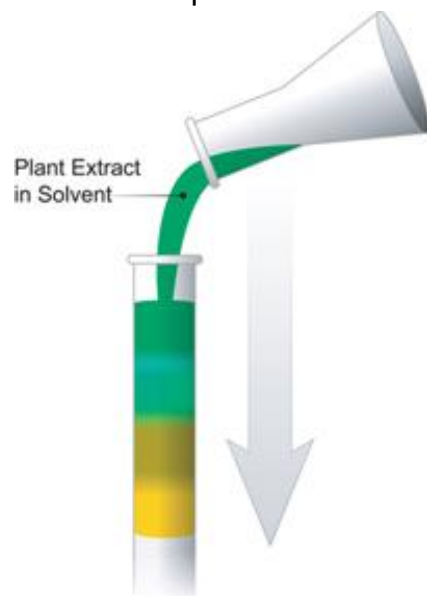


Figura 2. Experimento de Tswetts (© 2010 Waters. All rights reserved)

Para las partículas <10 micras estamos obligados a mejorar el poder de separación. Sin embargo, las partículas más pequeñas tienen una mayor resistencia al flujo, las presiones tan altas son necesarias para crear el ritmo

deseado de flujo de disolvente. Bombas y columnas diseñadas para soportar alta presión son necesarias. Cuando se tiene una presión moderada-alta se utiliza para el flujo de disolvente una columna cromatográfica, la técnica se denomina HPLC.

Las siglas HPLC, acuñado por el difunto profesor Csaba Horváth por su papel Pittcon 1970, originalmente se indica el hecho de que la presión alta se utilizó para generar el caudal necesario para cromatografía líquida en columnas de relleno. Al principio, las bombas sólo tenían una capacidad de presión de 500 psi. Esto fue llamado cromatografía líquida de alta presión, o HPLC. La década de 1970 vio un enorme salto en la tecnología. Estos nuevos instrumentos de HPLC podrían desarrollar hasta 6.000 psi de presión, y se incorporan inyectores mejorados, detectores y columnas. HPLC realmente comenzó a afianzarse a mediados y finales de la década de 1970. Las siglas HPLC siguieron siendo las mismas, pero el nombre fue cambiado a cromatografía de líquidos de alta resolución.

## **2.4.2 TIPOS DE CROMATOGRAFÍA<sup>7</sup>**

Los distintos tipos de cromatografía de líquidos también se clasifican según el tipo general de interacción que se produce entre la fase estacionaria y los solutos en el eluyente. Se clasifican como cromatografía en fase normal, fase inversa, de intercambio iónico y de filtración en gel o exclusión.

### **2.4.2.1 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS EN FASE NORMAL<sup>7</sup>.**

La fase sólida es más polar que la fase móvil. Las fases estacionarias suelen ser polímeros inorgánicos que tienen gran número de poros de tamaño molecular de modo que sus áreas superficiales son grandes. Los dos materiales más comunes son el óxido de silicio hidratado o polímeros de óxido de aluminio hidratado.

La polaridad del disolvente es el principal factor que determina los volúmenes de elución. Cuando los disolventes son más polares, los solutos se desplazan con mayor rapidez y se eluyen más pronto.

### **2.4.2.2 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS EN FASE INVERSA<sup>7</sup>.**

La fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. Se emplean dos tipos fundamentales de fases estacionarias y las más comunes son grupos no polares enlazados con la sílica. Entre ellos los que se emplean más a menudo son los grupos orgánicos  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{C}_8\text{H}_{17}$ ,  $-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ . De este modo, los solutos se reparten entre el recubrimiento superficial y la fase móvil a semejanza de una extracción líquido-líquido.

Los disolventes menos polares son eluyentes más poderosos en las separaciones, en general, el poder de elución de fase inversa es opuesto al orden para la elución en fase normal.

#### **2.4.2.3 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE INTERCAMBIO IÓNICO<sup>7</sup>**

En solución, una de las causas por las que dos iones se enlazan es la atracción de cargas contrarias. Del mismo modo, si se anclan grupos con cargas positivas a una fase estacionaria, atraerán iones de carga opuesta. Estas interacciones emplean para separar las especies que se eluyen según sus diferencias de carga promedio.

Los materiales con fases estacionarias que tienen cargas enlazadas se llaman de intercambio iónico. Las fases estacionarias formadas por polímeros entrecruzados con cargas negativas fijas se intercambian con iones positivos y se llaman resinas de intercambio catiónico y los polímeros con cargas positivas enlazadas covalentemente sobre ellos intercambian iones negativos y se llaman resinas de intercambio aniónico.

Debido a la dependencia crucial del pH, la fase móvil casi siempre se amortigua a un pH fijo y escogido cuidadosamente.

#### **2.4.2.4 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS POR FILTRACIÓN EN GEL<sup>7</sup>**

La separación se basa en el tamaño de las moléculas. La fase estacionaria que se emplea es un sólido con poros de corte transversal controlado (con todo el cuidado y precisión posibles). La permeación se produce a través de los poros de las partículas empacadas en las columnas. La separación se produce porque sólo las partículas más pequeñas penetran a los poros y son removidas de la fase móvil que fluye. De este modo las moléculas mayores se eluyen en primer lugar, seguidas por las más pequeñas.

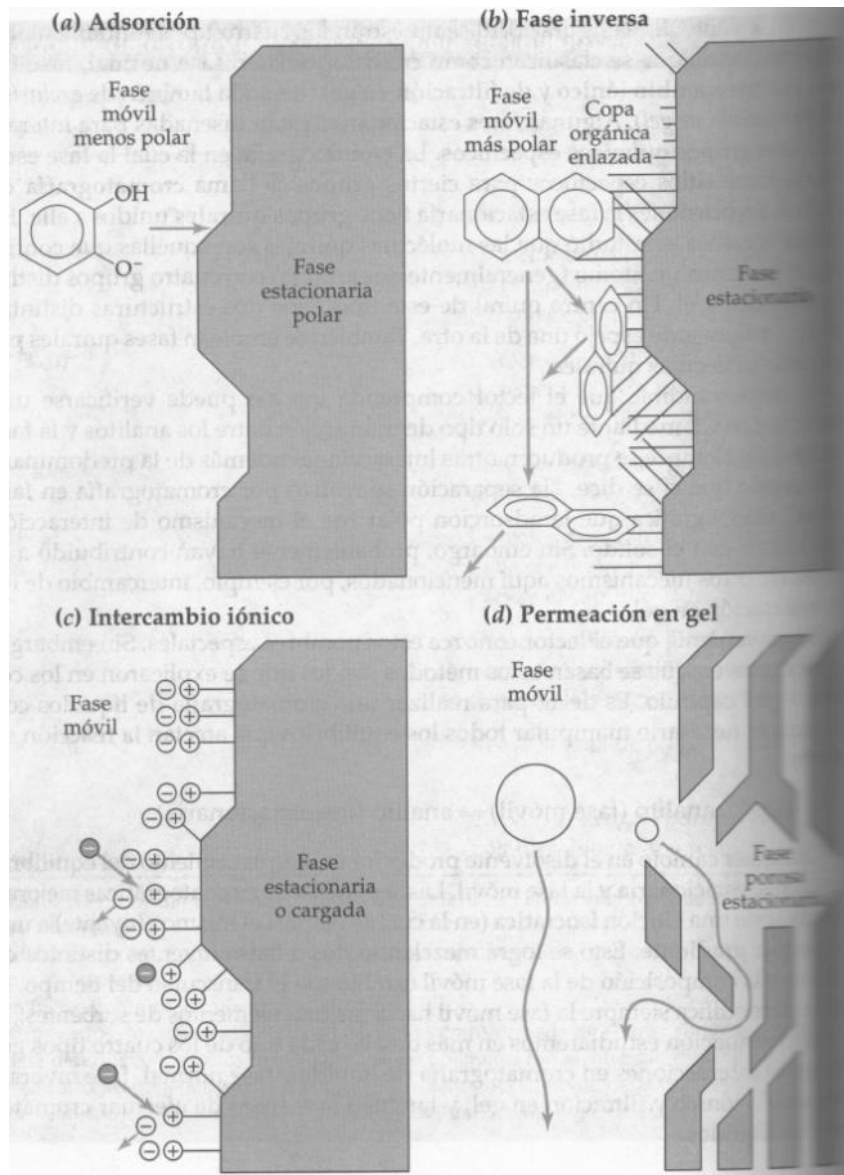


Figura 3. Tipos de cromatografía de líquidos (Rubinson F.J, Rubinson K. A, 2000)

### 2.4.3 COMPONENTES DEL HPLC<sup>14</sup>

Un depósito contiene el disolvente llamado la fase móvil. Una bomba de alta presión es el sistema de distribución del disolvente, por lo general mililitros por minuto. Un inyector de muestras automático, que es capaz de inyectar la muestra en el flujo continuo de fase móvil que lleva la muestra en la columna de HPLC. La columna contiene el material de embalaje de cromatografía necesario para efectuar la separación. Este material de embalaje se llama fase estacionaria, ya que se mantiene en su lugar por el hardware de la columna. Un detector que se necesita para ver a los grupos compuestos separados, ya que eluyen de la



columna. Las salidas de fase móvil y el detector se pueden enviar a los residuos, o se recogerá, según se desee.

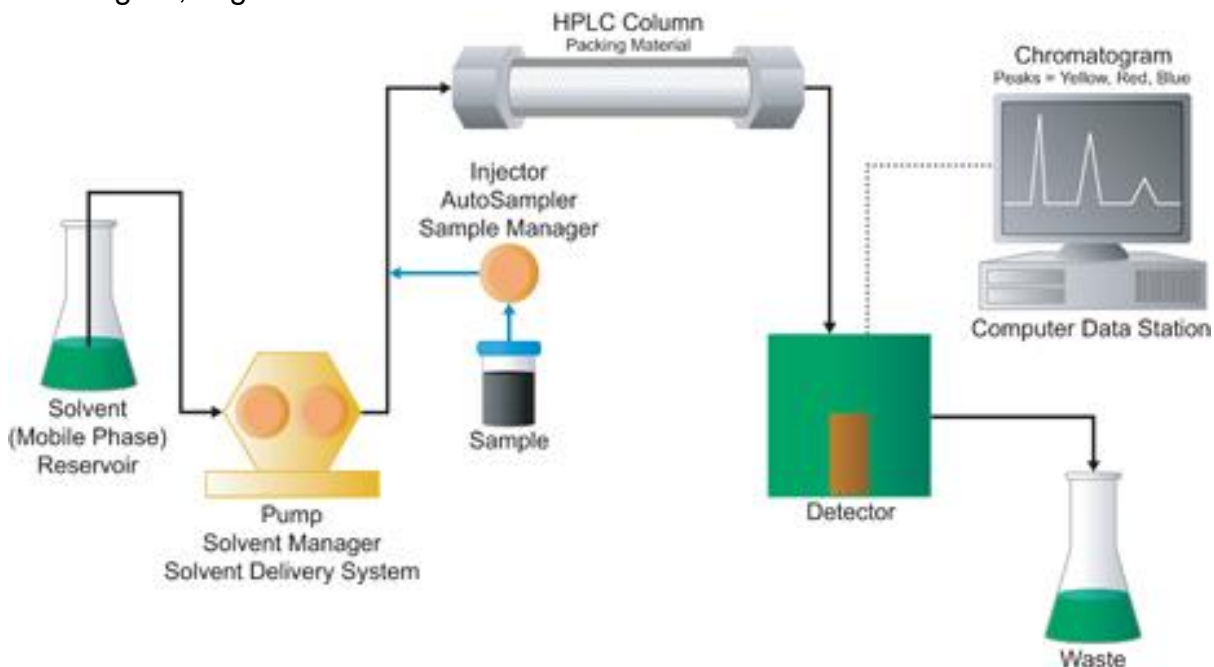


Figura 4. Componentes del HPLC (© 2010 Waters. All rights reserved)

## 2.5 PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS<sup>8,9,10,11</sup>

Los parámetros cromatográficos que se evalúan son los que a continuación se describen.

**2.5.1 FACTOR DE CAPACIDAD (k')**: El factor de capacidad (k') es una medición del tiempo de retención de una muestra, relativo al volumen muerto de la columna. El factor de capacidad que mide la distribución de la muestra entre la fase estacionaria y la fase móvil. Los valores de k' menores a uno indican que la muestra casi no es retenida por la fase estacionaria en la columna y da como resultado separaciones muy pobres.

$$k' = \frac{Rt}{V_o} - 1.0$$

Donde:

k' = Factor de capacidad

Rt = Tiempo de retención, medido desde el punto de inyección al pico máximo.

Vo = Tiempo de retención, medido desde el punto de inyección al volumen muerto del frente del solvente.

**2.5.2 FACTOR DE COLEO O ASIMETRÍA (T):** una medida de la simetría del pico, es uno (1) para los picos perfectamente simétricos y su valor aumenta a medida que la simetría es más pronunciada. En algunos casos pueden observarse valores menores de la unidad. Como consecuencia de la simetría del pico, la integración y la precisión son menos confiables.

$$T = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

Donde:

$W_{0.05}$  = Ancho del pico al 5% de la altura.

$f$  = Distancia entre el máximo del pico y el borde inicial del pico, al 5% de la altura del pico desde la línea base.

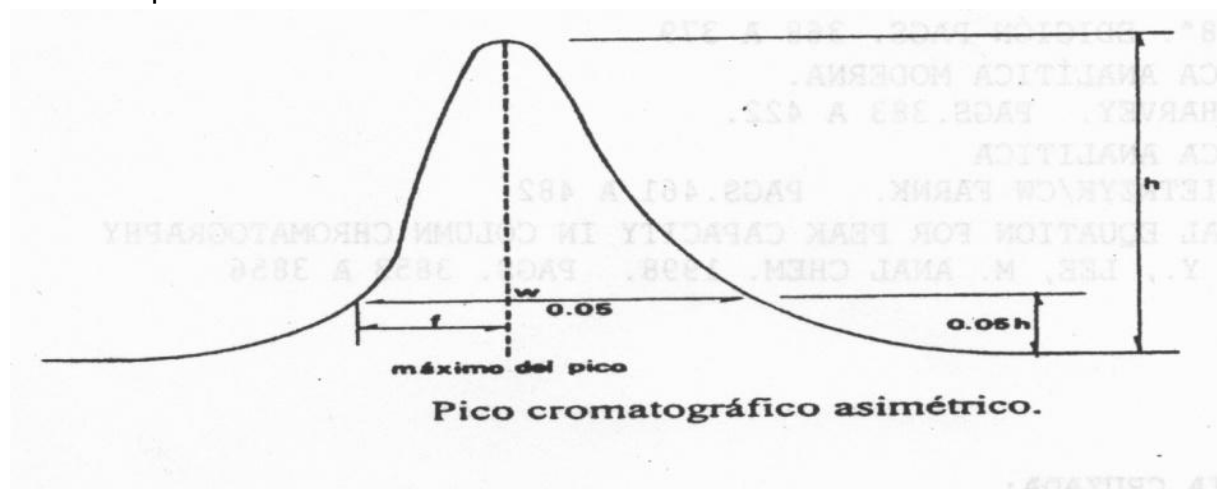


Figura 5. Factor de coleo (USP 33)

**2.5.3 FACTOR DE RESPUESTA (FR):** El cociente de dividir concentración de estándar (mg/ml) entre respuesta del estándar. (abs ó área de estándar según sea el caso).

$$FR = \frac{C \text{ de ST}}{Resp \text{ de ST}}$$

Donde:

FR = Factor de respuesta.

Conc de ST = Concentración del ST en mg/ml.

Resp de ST = Absorbancia ó área de estándar según sea el caso.

**2.5.4 NÚMERO DE PLATOS TEÓRICOS (N):** Medida de la eficiencia de la columna. El valor de (N) depende de la sustancia que se realiza y las condiciones de operación como la velocidad de flujo y el largo de la columna.

$$N = 16 \left( \frac{tR}{W} \right)^2 = 5.54 \left( \frac{tR}{W^{1/2}H} \right)$$

Donde:

tR = Tiempo de retención de la sustancia.

W = Ancho del pico medido por extrapolación de los lados relativamente rectos en la línea base.

W<sup>1/2</sup>H = Ancho del pico a la mitad de la altura.

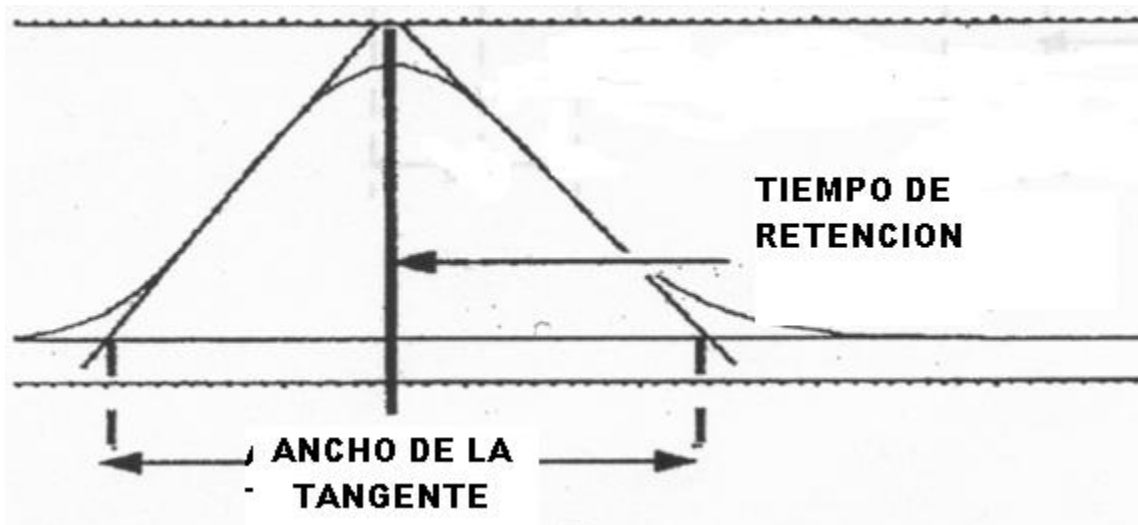


Figura 6. Platos teóricos (USP 33)

**2.5.5 RESOLUCIÓN (R):** También es función de la eficiencia de la columna (N) y se especifica para asegurar que los compuestos que eluyen muy cercanos se resuelvan entre sí, para establecer el poder de resolución general del sistema y para asegurar que los estándares internos se resuelvan de la muestra. La eficiencia de la columna puede especificarse también como un requisito de la confiabilidad del sistema, especialmente si hay un solo pico de interés en el cromatograma, sin embargo, es un medio menos confiable para asegurar la resolución de la medición directa. La eficiencia de la columna es una medida de la agudeza de los picos, que es importante para detectar componentes en trazas.

$$R = \frac{C(Rt_2 - Rt_1)}{(W_2 + W_1)}$$

Donde:

R = Resolución.

Rt = Tiempo de retención.

W<sub>1</sub>+W<sub>2</sub> = Suma de ancho de pico de tangentes al 50 %.

C = Constante de 2.

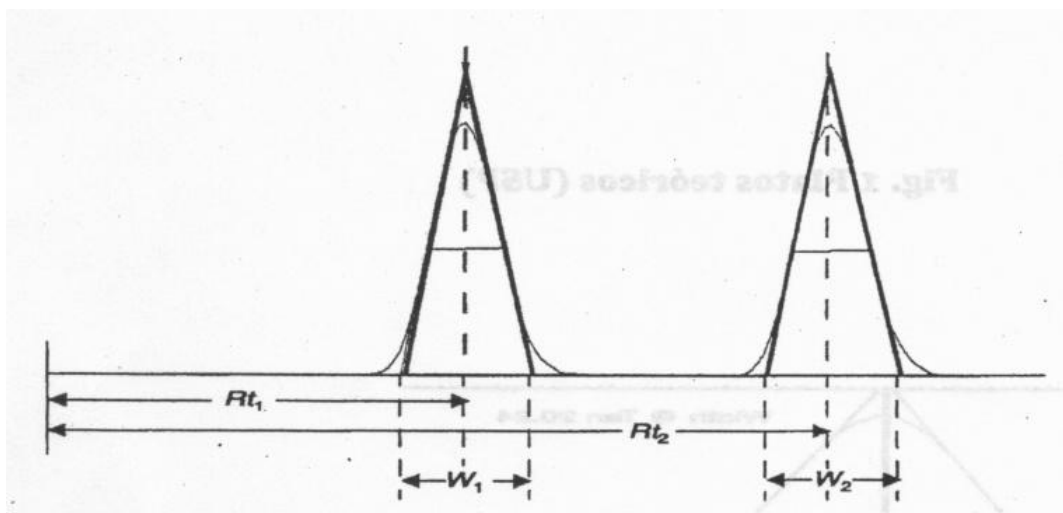


Figura 7. Resolución (USP 33)

**2.5.6 TIEMPO DE RETENCIÓN (tR):** El tiempo (en minutos) que una muestra requiere para eluir. Este es medido desde el momento de la inyección hasta el máximo del pico. Es característico para cada muestra, según el solvente utilizado y el empaque de la columna, a una temperatura dada. Se utiliza como ayuda para la identificación de los componentes. Sin embargo no siempre es adecuado el tR para la identificación, ya que este se ve afectado por muchos factores como la velocidad de flujo, la temperatura de la columna, el tamaño de la muestra y el tiempo de uso de la columna, además, puede haber varios compuestos que tengan el mismo tR.

**2.5.7 VOLUMEN MUERTO (Vo):** Volumen de fase móvil necesario para desplazar un soluto no retenido desde el inyector al detector.

$$v_0 = 0.6 \times (DI/2)^2 \times \pi \times L/F$$

Donde:

$v_0$  = Volumen muerto.

0.6 = Factor de constante.

DI = Diámetro interno de columna en cm.

$\pi$  = Pi (3.1416)

L = Longitud de columna en cm.

F = Flujo de Fase Móvil en ml/min.

## 2.6 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

### Objetivo

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

### Soluciones

Buffer de fosfato: Pipetear 3.0 ml de ácido fosfórico concentrado en 1000 ml de agua. Ajuste el pH a 3.0 con hidróxido de sodio al 50%.

Fase móvil: Buffer de Fosfato : Acetonitrilo (60:40). Filtrar a través de un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  antes de utilizarla.

Preparación de la Solución Stock del Estándar de BAC (1.0 mg/ml)

A partir de la solución al 10% del estándar de referencia de BAC, pipetear 2.5 ml /100mg/ml) en una matraz volumétrico de 250.0 ml y diluya al volúmen con agua purificada. Adicionar el agua lentamente para evitar la formación de espuma y que se pueda hacer una dilución exacta, mezclar bien.

Preparación del estándar de trabajo de BAC

Diluir la solución stock del estándar de BAC (1.0 mg/ml) con fase móvil para tener una concentración final de 0.02 mg/ml. Por ejemplo, diluir 5.0 ml a 50 ml o diluir 2.5 ml a 25.0 ml y después hacer una segunda dilución de 1.0 ml a 5.0 ml.

Preparación del producto

La concentración final de BAC es aproximadamente 0.02 mg/ml. Para productos con una concentración teórica de BAC de 0.1 mg/ml (0.01% p/v), pipetear 1.0 ml del producto y diluir a 5.0 ml con fase móvil.

## Equipo

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

Columna para HPLC Ciano, 5 $\mu$ m, 4.6 mm x 15 cm o equivalente.

## Sistema cromatográfico

Parámetros sugeridos de operación

Velocidad de Flujo: 1.0 ml/min

Longitud de onda del detector: 214 nm

Volumen de inyección: 30  $\mu$ l

## Adecuabilidad del sistema

% RSD para 5 inyecciones  $\leq 2.0\%$

Resolución (R) entre C<sub>12</sub> y C<sub>14</sub>  $\geq 2.0$

Factor de coelección (T), C<sub>12</sub>  $\leq 2.0$

Platos por columna (N), C<sub>12</sub>  $\geq 1500$

## CAPITULO III DISEÑO EXPERIMENTAL

### 3.1 PRECISIÓN DEL SISTEMA

Se 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.

#### PROCEDIMIENTO

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 purificada. 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.

#### REPORTE DE DATOS

Tabular los resultados y calcular los siguientes datos estadísticos:

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

### 3.2 PRECISIÓN DEL METODO

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, como se indica en el método analítico

#### PROCEDIMIENTO

Preparar el placebo de cada producto a utilizar. Tomar la alícuota o el peso necesario y depositarlo en un matraz volumétrico de 10 mL, según esté indicado en el método ME.C02.2ATP.0976 última revisión Anexo 1.

Añadir al matraz volumétrico de 10 mL una alícuota de 2.0 mL de la solución B (Conc. 0.1 mg/mL), para tener una conc. Final de 0.02 mg/mL en placebo cargado.

#### REPORTE DE DATOS

Tabular los resultados y calcular los siguientes datos estadísticos:

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

En la determinación de Precisión reportar:

- Factor de coleccionamiento (T)
- Número de platos teóricos (N)
- Resolución (R)
- % Recobro
- Intervalo de confianza de la media poblacional (IC( $\mu$ )).



### 3.3 LINEALIDAD DEL SISTEMA

#### PROCEDIMIENTO.

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. 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 2

Tabla 2 Curva para la linealidad del sistema.

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

#### REPORTE DE DATOS.

Tabular los resultados y calcular los siguientes datos estadísticos:

- Pendiente ( $b_1$ )
- Intercepto en Y u ordenada al origen ( $b_0$ ).

- Relación respuesta vs concentración para cada punto.
  - CV de la relación resp/conc.
  - Intervalo de confianza para la pendiente  $IC(\beta_1)$ .
  - Coeficiente de determinación " $r^2$ " y Coeficiente de correlación " $r$ ".
- Todos ellos para cada curva.

### 3.4 LINEALIDAD DEL METODO

#### PROCEDIMIENTO

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 90 a 120%, analizar por triplicado cada punto de la curva contra estándar de concentración conocida.

Añadir al matraz volumétrico de 10 mL la alícuota establecida en la tabla No. II para tener las concentraciones establecidas de Cloruro de Benzalconio.

Pesar 100 mg de solución de Cloruro de Benzalconio 50% (materia prima) y diluir en un matraz de 100 ml con agua. Llevar al aforo con agua. Se tiene una concentración final aproximada de 0.5 mg/ml (Solución C).

De la solución C transferir una alícuota de 5 ml a un matraz de 25 ml. Llevar al aforo con agua. Se tiene una concentración final aproximada de 0.20 mg/ml (Solución D).

De la solución C transferir una alícuota de 4 ml a un matraz de 25 ml. Llevar al aforo con agua. Se tiene una concentración final aproximada de 0.16 mg/ml (Solución E).

De la solución C transferir una alícuota de 6 ml a un matraz de 25 ml. Llevar al aforo con agua. Se tiene una concentración final aproximada de 0.24 mg/ml (Solución F).

Tabla 3 Curva para linealidad del método.

Conc. de la curva %	Alícuota	Solución	Volumen final aforo con fase móvil	Conc. Teórica final mg/ml
80	2 mL	D	10.0 mL	0.016
100	2 mL	E	10.0 mL	0.020
120	2 mL	F	10.0 mL	0.024

#### REPORTE DE DATOS

- Calcular la relación cantidad adicionada contra la cantidad recuperada.
- Calcular la pendiente ( $b_1$ )
- Calcular la ordenada al origen o intercepto en y ( $b_0$ ).
- Calcular el coeficiente de determinación ( $r^2$ )
- Calcular la desviación estándar relativa de la regresión ( $CV_{y/x}$ ).
- Calcular el intervalo de confianza para la pendiente IC ( $\beta_1$ ).
- Calcular el intervalo de confianza para la ordenada al origen IC ( $\beta_0$ ).
- % Recobro (Media, Desviación estándar y %CV)
- IC ( $\mu$ ) media poblacional del recobro

### 3.5 PRECISIÓN INTERMEDIA

#### PROCEDIMIENTO.

Determinar el % de activo en muestras de placebo cargado o producto al 100% de activo por triplicado, por 2 diferentes analistas en 2 diferentes días, usando el mismo estándar de referencia y equipo. Seguir la técnica de preparación según sea el producto.

#### REPORTE DE DATOS

- Calcular la media, la desviación estándar y el %CV de cada grupo de datos y total.
- Tabla de análisis de Varianza analista / día.

### **3.6 ESPECIFICIDAD**

#### PROCEDIMIENTO

Debido que no se cuenta con estándares de productos de degradación del Cloruro de Benzalconio se analizan los cromagramas de placebo cargado, placebo degradado cargado y el activo previamente degradado por las cuatro vías (medio ácido, medio básico, oxidación y temperatura) con respecto al estándar de activo intacto.

Al analizar las muestras degradadas en el sistema cromatográfico, se inyectarán muestras de placebo, placebo cargado, activo sin degradar y finalmente fase móvil, con el fin de observar en los cromatogramas los posibles picos de degradación del activo.

#### REPORTE DE DATOS

- Calcular el % Recobro para los placebos cargados, los placebos degradados cargados y los activos degradados.
- Calcular el %CV de los placebos cargados, placebos degradados cargados

### **3.7 ESTABILIDAD ANALITICA DE LA MUESTRA**

#### PROCEDIMIENTO

Preparar tres muestras de placebo cargado o producto, vaciar en tres viales cada una para analizar contra un estándar recientemente preparado en lapsos de inicial, 12, 24 y 48 hrs. en las condiciones cromatográficas normales.

Nota: En el caso de que alguna condición no cumpliera especificaciones, se procederá a determinar el tiempo en el que la muestra sea estable.

## REPORTE DE DATOS

- Media aritmética del análisis inicial
- Media aritmética de cada condición
- Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto al análisis inicial.

### **3.8 TOLERANCIA**

#### PROCEDIMIENTO

Analizar una muestra por triplicado contra un estándar en 2 diferentes equipos y 2 diferentes columnas por un solo analista en un mismo día.

#### REPORTE DE DATOS.

- Media X
- Desviación estándar
- Coeficiente de variación  $\%CV$  ó  $\%RSD \leq 2.0\%$
- N= Numero de datos totales para comparar

### **3.9 ROBUSTEZ**

#### PROCEDIMIENTO

Analizar una muestra de producto o placebo cargado por triplicado contra un estándar, modificando los parámetros cromatográficos del método indicados en la Tabla 4.

Tabla 4 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 µcl	20 µcl	25 µcl
Columna	Beckman Ultrasphere Cyano de 4.6 mm x 150 mm, 5 micras	Thermohypersil CN 15 cm X 4.6 mm	Spherisorb CN 15 cm X 4.6 mm

Nota: Si un parámetro no cumple con los requerimientos se buscarán las condiciones adecuadas a las cuales se mantenga la robustez del método.

#### REPORTE DE DATOS

- Calcular los parámetros cromatográficos de adecuabilidad del sistema para cada condición.
- Reportar el contenido para las muestras de la condición normal de operación y las muestras de las condiciones alternas.
- Diferencia media absoluta entre la condición normal y la condición alterada, no mayor a 2.0% expresada en %

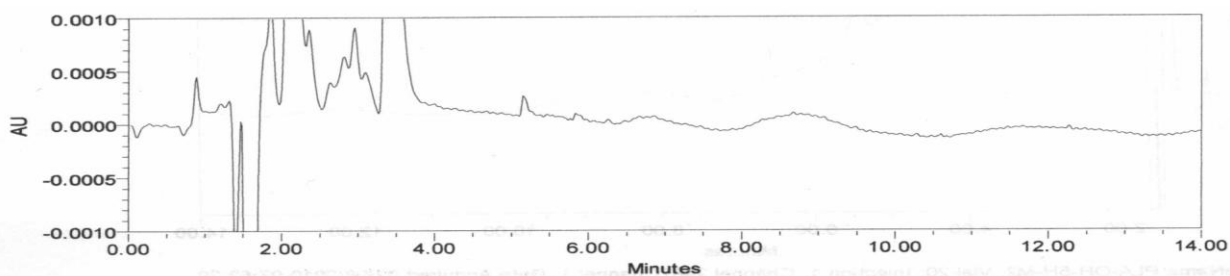
## CAPITULO IV RESULTADOS

### 4.1 ESPECIFICIDAD

Condiciones de análisis iniciales. Proporción de fase Buffer de fosfatos pH 3: acetonitrilo (40:60), velocidad de flujo: 1.0 ml/ min, volumen de inyección 30  $\mu$ l, temperatura ambiente y Columna Ciano de 4.6 mm de DI X 150mm de longitud.

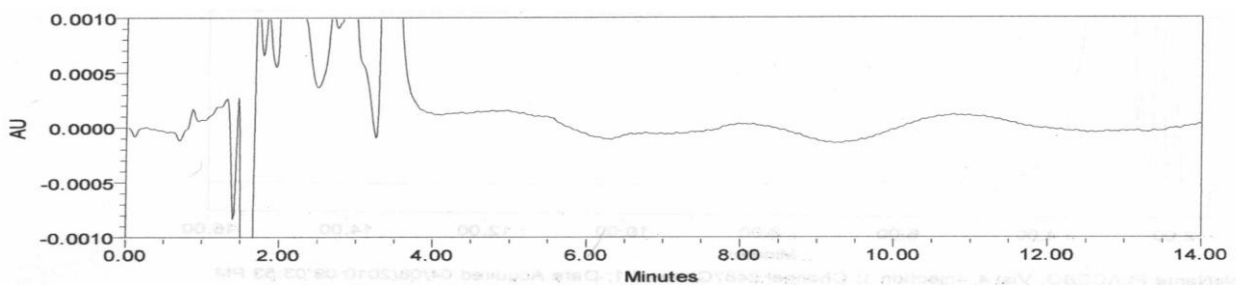
Con el fin de obtener el comportamiento del principio activo en estudio bajo condiciones extremas, se analizó por triplicado placebo, placebo cargado, activo y fase móvil por cuatro vías de degradación: vía ácida (HCl 38% y 80 °C), vía básica (NaOH 38% y 80 °C), vía oxidación (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 80 °C) y vía calor (80 °C), al final de las condiciones de degradación se compararon contra las muestras intactas para identificar los posibles productos de degradación.

Figura 8 Blanco inicial



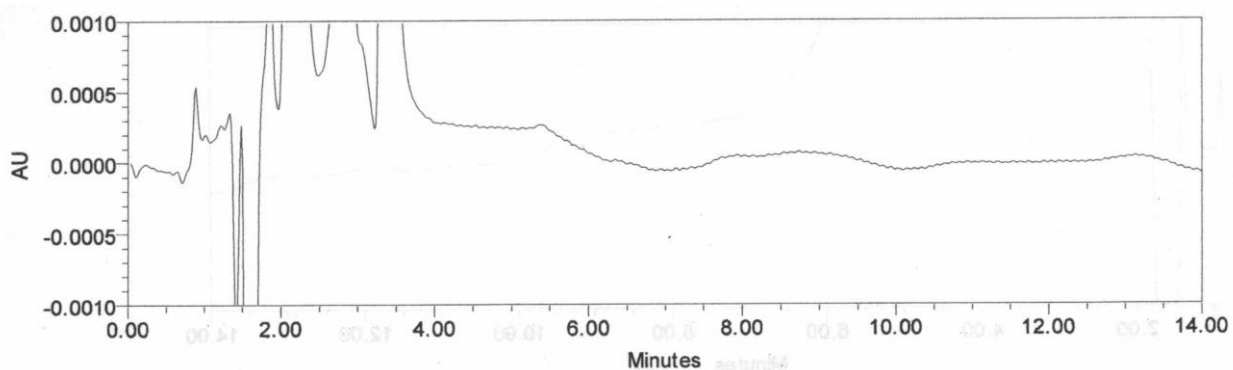
Cromatograma del blanco en las condiciones iniciales de cada experimento

Figura 9 Blanco vía ácida



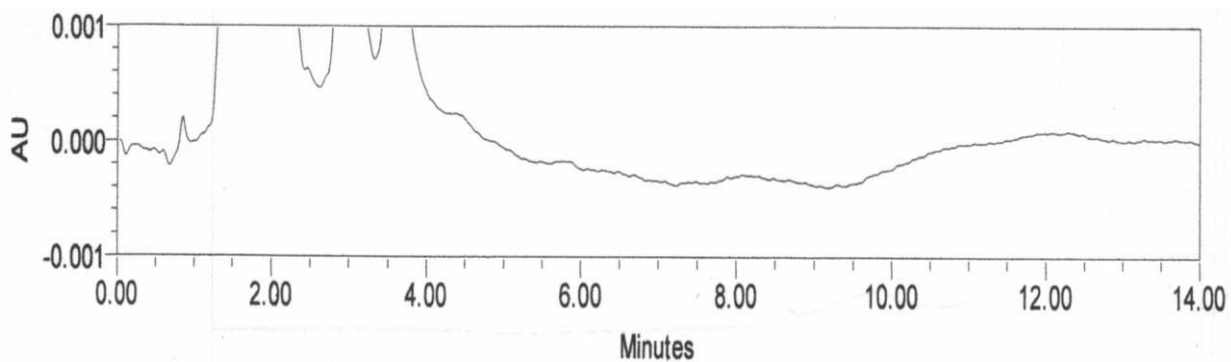
Cromatograma del blanco después de 5 horas de reacción con HCl 38% y 80 °C

Figura 10 Blanco vía básica



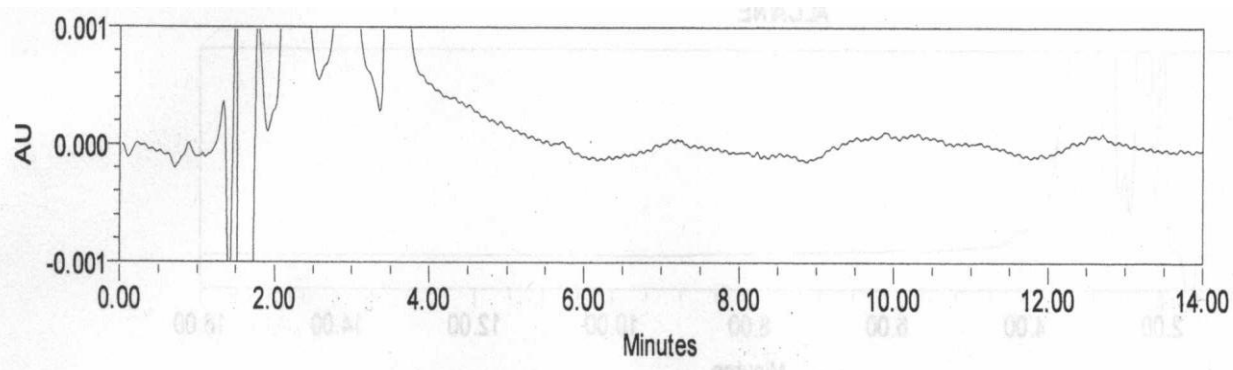
Cromatograma del blanco después de 5 horas de reacción con NaOH 38% y 80 °C

Figura 11 Blanco vía oxidación



Cromatograma del blanco después de 2 horas de reacción con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 80 °C

Figura 12 Blanco vía calor

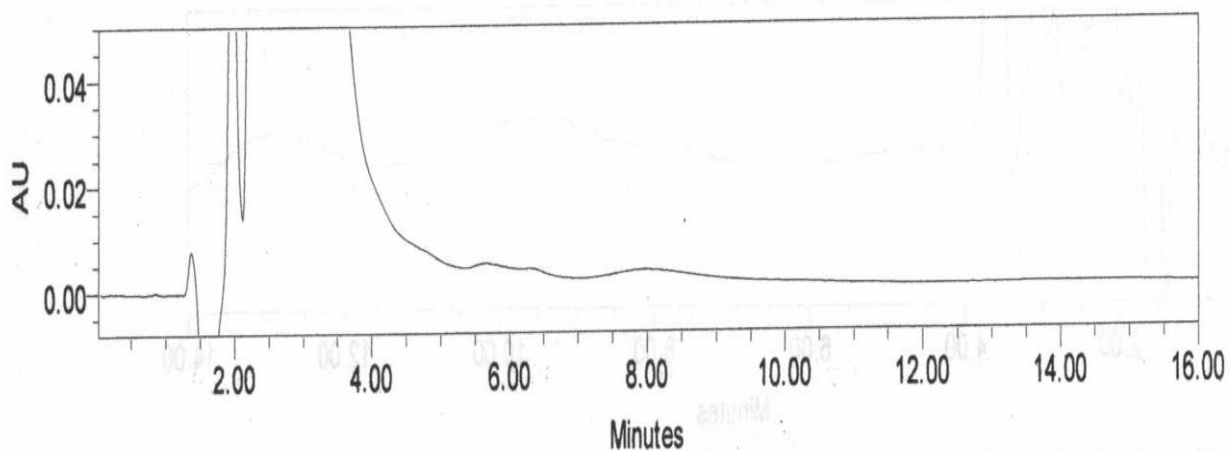


Cromatograma del blanco después de 15 horas de reacción a 80 °C

En los cromatogramas del blanco podemos observar que no aparecen picos que puedan interferir con la cuantificación de la sustancia de interés.

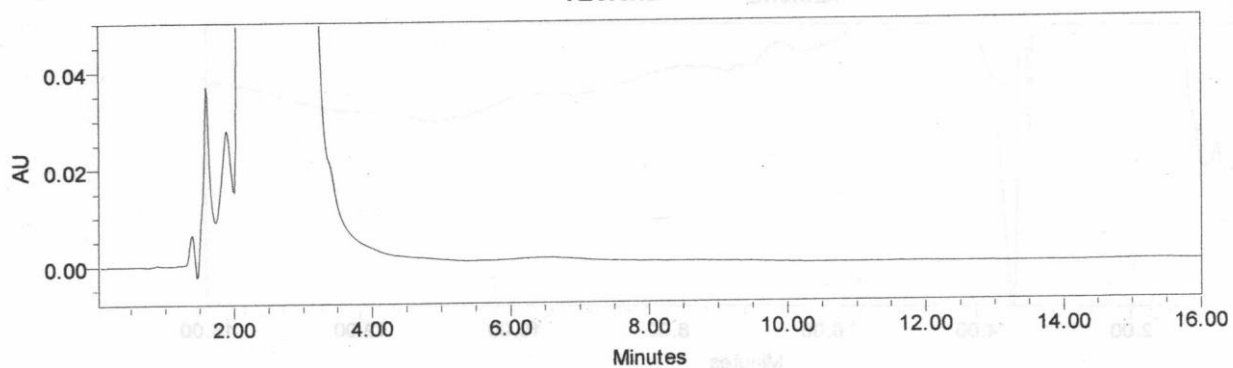


Figura 13 Placebo inicial



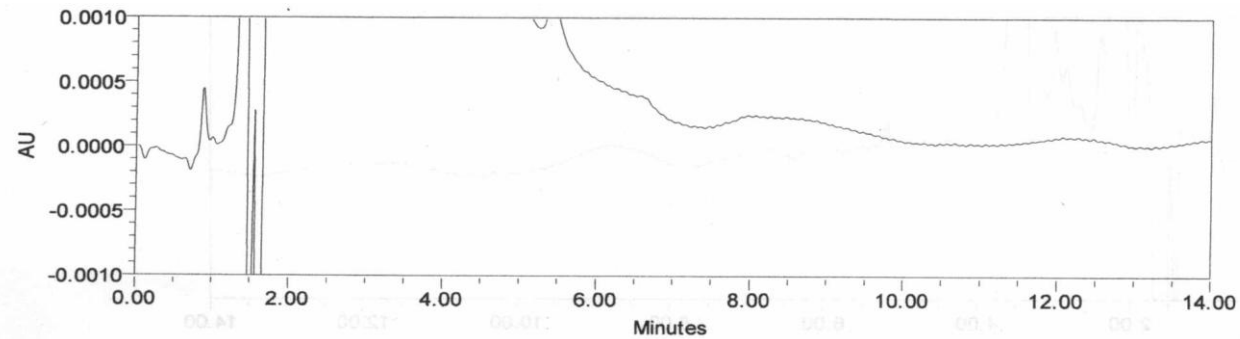
Cromatograma del placebo en las condiciones iniciales de cada experimento

Figura 14 Placebo vía ácida



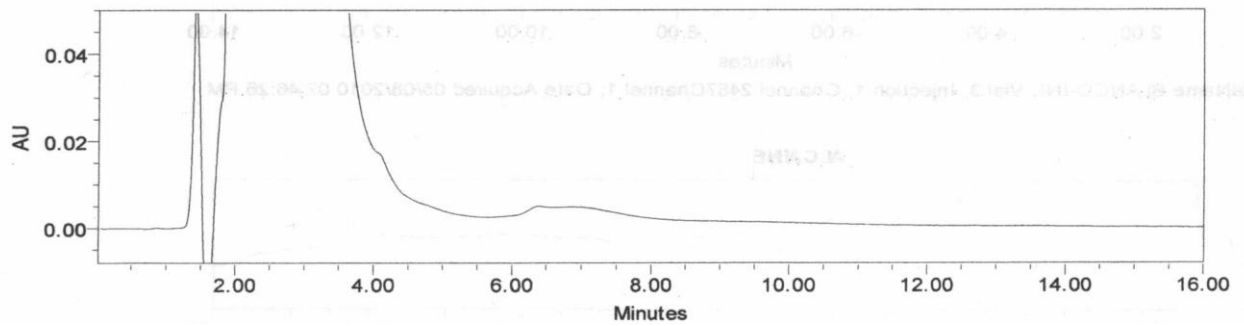
Cromatograma del placebo después de 5 horas de reacción con HCl 38% y 80 °C

Figura 15 Placebo vía básica



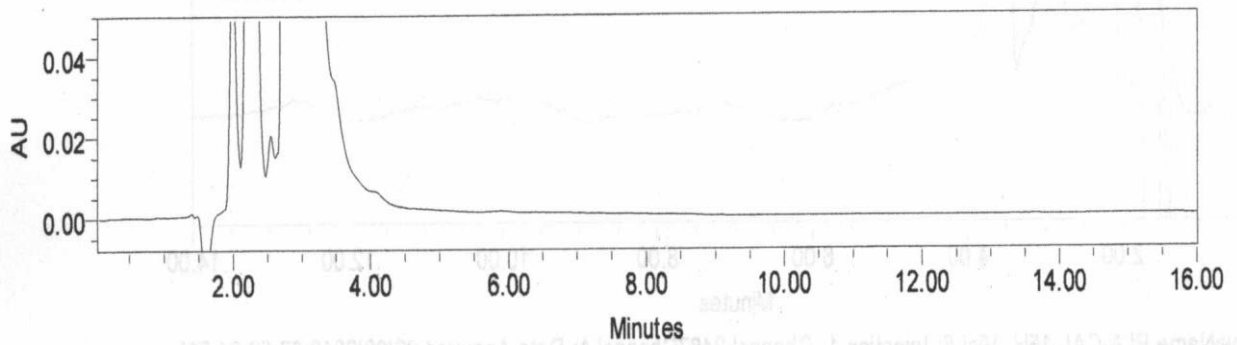
Cromatograma del placebo después de 5 horas de reacción con NaOH 38% y 80°C

Figura 16 Placebo vía oxidación



Cromatograma del placebo después de 2 horas de reacción con  $H_2O_2$  y  $80\text{ }^\circ\text{C}$

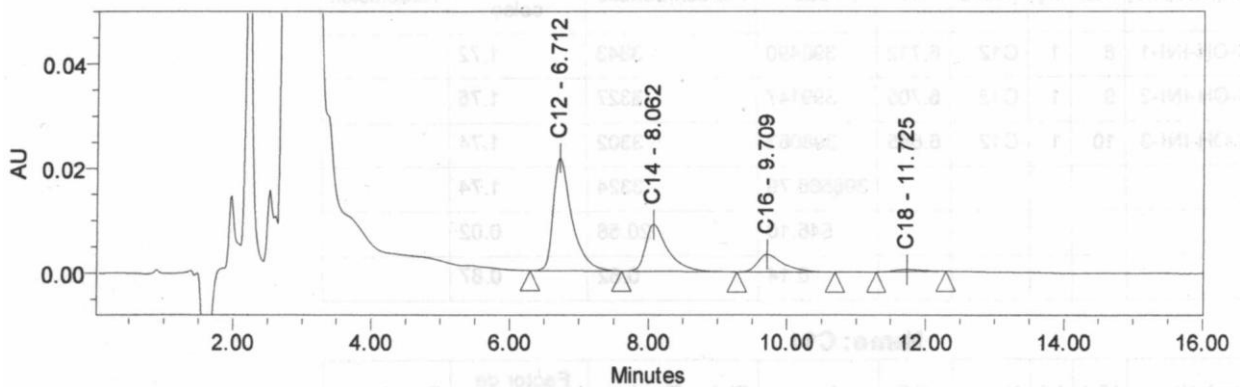
Figura 17 Placebo vía calor



Cromatograma del placebo después de 15 horas de reacción a  $80\text{ }^\circ\text{C}$

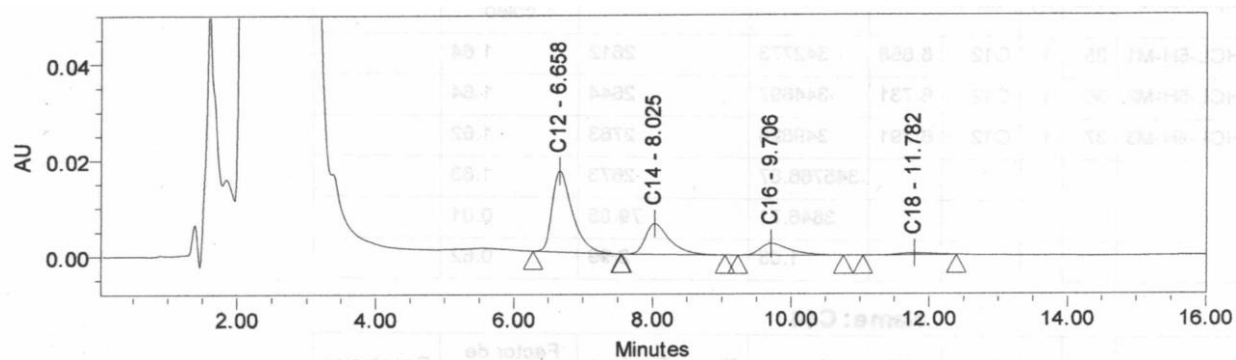
En los cromatogramas del placebo podemos observar que no aparecen picos que puedan interferir con la cuantificación de la sustancia de interés.

Figura 18 Placebo cargado inicial



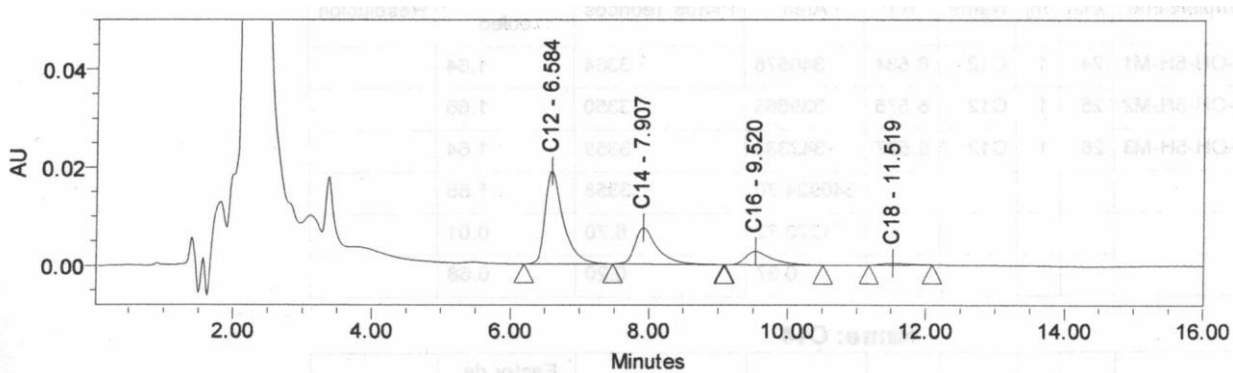
Cromatograma del placebo cargado en las condiciones iniciales de cada experimento

Figura 19 Placebo cargado vía ácida



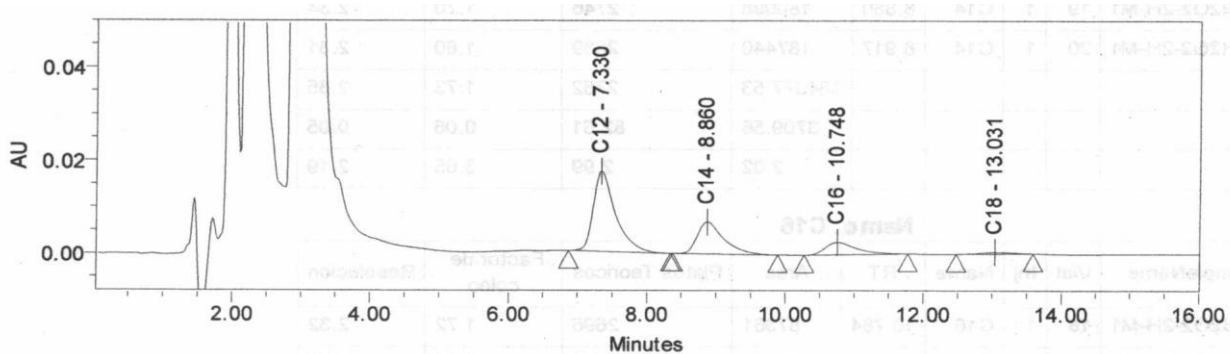
Cromatograma del placebo cargado después de 5 horas de reacción con HCl 38% y 80 °C

Figura 20 Placebo cargado vía básica



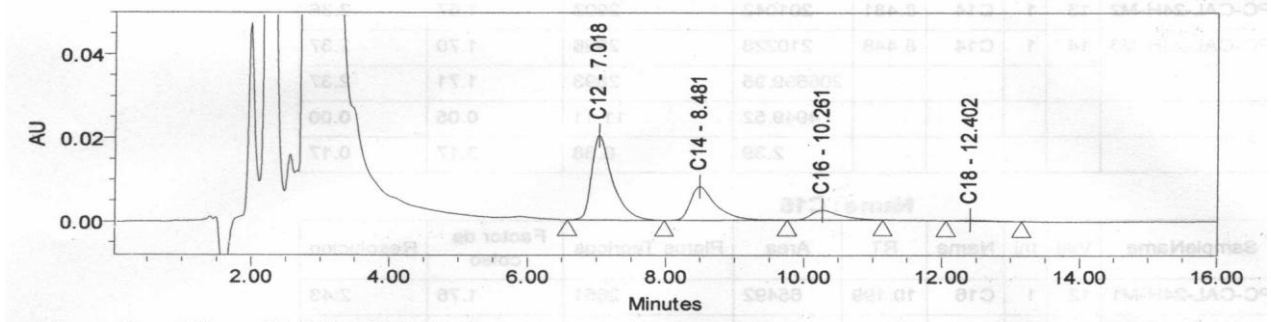
Cromatograma del placebo cargado después de 5 horas de reacción con NaOH 38% y 80 °C

Figura 21 Placebo cargado vía oxidación



Cromatograma del placebo cargado después de 2 horas de reacción con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 80 °C

Figura 22 Placebo vía calor



Cromatograma del placebo cargado después de 15 horas de reacción a 80 °C

En los cromatogramas del placebo cargado podemos observar que no aparecen picos que puedan interferir con la cuantificación de la sustancia de interés. Cabe mencionar que la degradación se presenta tanto en estándares como en muestras, reflejando un valor menor en el recobro.

Tabla 5 % de recobros de estándar para calcular la especificidad\*

Condición	Base	CV	Degradación	CV	% Degradado
<b>NaOH / calor 5 hrs</b> Resultado	94.01 %	0.70	69.50 %	1.40	24.51 %
<b>HCl / calor 5 hrs</b> Resultado	94.96 %	0.89	85.55 %	1.80	9.41 %
<b>Calor 8 hrs</b> Resultado	93.38 %	1.95	82.20 %	0.75	11.18 %
<b>Peroxido / calor 2hrs</b> Resultado	92.53 %	0.60	61.21 %	0.10	31.32 %

Tabla 6 % de recobros de placebo cargado para calcular la especificidad\*

Condición	Base	CV	Degradación	CV	% Degradado
<b>NaOH / calor 5 hrs</b> Resultado	95.73 %	0.79	79.01 %	1.22	16.72 %
<b>HCl / calor 5 hrs</b> Resultado	97.33 %	0.78	79.66 %	1.43	17.67 %
<b>Calor 8 hrs</b> Resultado	100.19 %	0.60	93.47 %	1.06	6.71 %
<b>Peroxido / calor 2hrs</b> Resultado	99.15 %	0.22	85.72 %	0.55	13.44 %

\*El % de recobro y el CV fueron calculados con los datos de las áreas (tabla 25-32 del anexo).

**CRITERIOS DE ACEPTACIÓN:**

%CV  $\leq$  2% placebos cargados y placebos degradados cargados

**CUMPLE**

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

**CUMPLE**

## 4.2 PRECISIÓN DEL SISTEMA

Tabla 7 Suma de las áreas de los homólogos C<sub>12</sub> y C<sub>14</sub> para calcular la precisión del sistema\*

	<b>CONC STD mg/ ml</b>	<b>FR SISTEMA CONC STD / AREA</b>
STD 1	0.02112	8.046E-11
STD 2	0.02112	8.302E-11
STD 3	0.02112	8.119E-11
STD 4	0.0211	8.062E-11
STD 5	0.02112	7.988E-11
STD 6	0.02112	8.101E-11
	<b>MEDIA =</b>	<b>8.103E-11</b>
	<b>RSD ó CV =</b>	<b>1.33%</b>

\*Las áreas totales fueron calculadas con las áreas de la tabla 17 del anexo

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN:

CV o %RSD ≤ al 1.5%

**CUMPLE**

### 4.3 PRECISIÓN DEL MÉTODO

Tabla 8 Suma de las áreas de los homólogos C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub>, y C<sub>18</sub>, y % de recobros para calcular la precisión del método \*

	PORCIENTO RECOBRO (normalizado al 100%)
Muestra 1	101.45%
Muestra 2	101.20%
Muestra 3	101.35%
Muestra 4	101.98%
Muestra 5	101.36%
Muestra 6	101.66%
	MEDIA = 101.50%
	Recobro = 1.498%
	RSD ó CV = 0.28%

\*Las áreas totales fueron calculadas con las áreas de la tabla 18 del anexo

#### CRITERIOS DE ACEPTACIÓN:

CV o %RSD  $\leq$  2.0%: 0.28% **CUMPLE**

Recobro  $\leq$  2%: 1.498% **CUMPLE**

IC( $\mu$ ) debe incluir al 100% o que el promedio aritmético se encuentre dentro del rango de 98-102% : 101.22 a 101.78 **CUMPLE**

#### 4.4 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Tabla 9 Suma de las áreas de los homólogos C<sub>12</sub> y C<sub>14</sub> para calcular la linealidad del sistema\*

	CONC.	RESPUESTA		RESP/CONC
		VALOR	MEDIA	
STD 1	63.360%	149357888 150404016 149909100	149890335	2365693
STD 2	84.480%	200382960 200545028 198966324	199964771	2367007
STD 3	105.600%	250469036 248934176 252102356	250501856	2372177
STD 4	126.720%	300671320 300466256 299202192	300113256	2368318
STD 5	147.840%	346541264 346809812 344551872	345967649	2340149

\*Las áreas totales fueron calculadas con las áreas de la tabla 19 del anexo

#### CRITERIOS DE ACEPTACIÓN:

$r \geq 0.9925$  ó  $r^2 \geq 0.985$ :  $r = 0.999975$  ;  $r^2 = 0.999950$

**CUMPLE**

IC( $\beta_1$ ) no debe incluir el cero: 2367491 a 2347501

**CUMPLE**

IC( $\beta_0$ ) debe incluir al cero: 2235829 a -1563826

**CUMPLE**

% Error de intercepto en Y en el punto medio  $\leq 5\%$ : 0.14%

**CUMPLE**

%CV  $\leq 2\%$  relación resp/conc. (sistema tolerante y preciso): 0.59%

**CUMPLE**



#### 4.5 LINEALIDAD DEL METODO

Tabla 10 Suma de las áreas de los homólogos C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub>, y C<sub>18</sub>, y % de recobros para calcular la linealidad del método\*

	Áreas	mg Adicionados	mg Recuperados	% Recobro
80%	198409900	0.01676	0.01693	101.04
	197784128	0.01676	0.01688	100.72
	199140600	0.01676	0.01699	101.41
100%	249297512	0.02095	0.02128	101.56
	248732332	0.02095	0.02123	101.33
	248081320	0.02095	0.02117	101.07
120%	295089860	0.02514	0.02518	100.18
	294487508	0.02514	0.02513	99.98
	291441068	0.02514	0.02487	98.94

\*Las áreas totales fueron calculadas con las áreas de la tabla 20 del anexo

#### CRITERIOS DE ACEPTACIÓN:

$r^2 \geq 0.985$ : 0.9983	<b>CUMPLE</b>
IC( $\beta_1$ ) debe incluir al uno: 0.94 a 1.00	<b>CUMPLE</b>
IC( $\beta_0$ ) debe incluir al cero: 0.000 a 0.001	<b>CUMPLE</b>
CV $\leq$ 2% relación mg recuperados entre mg adicionados: 0.84 %	<b>CUMPLE</b>
IC( $\mu$ ) debe incluir al 100% o que el promedio aritmético se encuentre dentro del rango de 98 – 102%: 99.77.07 a 101.7760	<b>CUMPLE</b>
%CV y/x de la regresión lineal $\leq$ 2%: 0.54%	<b>CUMPLE</b>

#### 4.6 PRECISIÓN INTERMEDIA

Tabla 11 % de recobros para calcular la precisión intermedia\*

		ANALISTA	
		1	2
D I A	1	94.21	97.74
		94.65	97.00
		95.87	98.09
	2	95.27	97.86
		96.78	96.81
		97.78	98.07

\*El % de recobro fue calculado con los datos de las áreas (tabla 21-24 del anexo)

MEDIA	96.68
CV	1.42

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN:

CV  $\leq$  2% relación mg recuperados entre mg adicionados.

**CUMPLE**

#### 4.7 ESTABILIDAD ANALITICA DE LA MUESTRA.

Tabla 12 % de recobros para calcular la estabilidad de la muestra a 24 y 48 horas a temperatura ambiente y refrigeración\*

Inicial	24 hrs		48 hrs	
	T.A %	Refrigeración %	T.A %	Refrigeración %
96.17 %	96.58	96.20	97.88	95.85
	Diferencia %		Diferencia %	
	T.A %	Refrigeración %	T.A %	Refrigeración %
	-0.41	-0.03	-1.71	0.31

\*El % de recobro fue calculado con los datos de las áreas (tabla 33-37 del anexo)

## CRITERIOS 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%. **CUMPLE**

### 4.8 ROBUSTEZ

Tabla 13 % de recobros para calcular la robustez cambiando los parámetros\*

Condición	Base	Alterada	Diferencia
<b>% Fase Buffer/ACN</b>	(40:60)	(35:65)	
Resultado	94.62 %	92.733 % =	1.89 %
<b>Buffer/ACN</b>	(40:60)	(45:55)	
Resultado	94.62 %	89.22 % =	5.40 %
<b>pH Fase</b>	( pH 3.0)	( pH 2.5)	
Resultado	98.17 %	97.37 % =	0.80 %
<b>pH Fase</b>	( pH 3.0)	( pH 3.5)	
Resultado	98.171 %	99.14 % =	-0.97 %
<b>Volumen de inyección</b>	(30 mL)	(20 mL)	
Resultado	94.619 %	94.405 % =	0.21 %
<b>Volumen de inyección</b>	(30 mL)	(50 mL)	
Resultado	94.619 % -	92.862 % =	1.76 %
<b>Flujo mL/min</b>	(1 mL/min)	(0.8 mL/min)	
Resultado	94.62 %	94.648 % =	-0.03 %
<b>Flujo mL/min</b>	(1 mL/min)	(1.2 mL/min)	
Resultado	94.62 %	92.049 % =	2.57 %
<b>Marca de Columna</b>	Beckman CN	Thermo CN	
Resultado	97.19 %	97.39 % =	-0.20 %

\*El % de recobro fue calculado con los datos de las áreas (tabla 38-50 del anexo)

## CRITERIOS DE ACEPTACIÓN:

La diferencia debe ser menor de 2% para considerar que no hay efecto significativo sobre la valoración del activo. **CUMPLE**

Tabla 14 Parámetros de adecuabilidad para la prueba de robustez

Condición	Platos teóricos	Coleo C12	Resolución C12 y C14
%Fase			
Condición base	4059	1.73	3.02
35:65 ( Buffer/ ACN)	4547	1.65	2.35
45:55 (Buffer / ACN)	3891	1.76	3.93
pH Fase			
Condición base	3014	1.59	3.24
pH 2.5	3778	1.69	3.14
pH 3.5	3019	1.64	2.94
Volumen de inyección			
Condición base	4059	1.73	3.02
20mcL	4558	1.67	3.16
50mcL	4474	1.69	3.15
Flujo			
Condición base	4059	1.73	3.02
0.8 mL/min	3912	1.73	2.96
1.2 ml/min	4319	1.74	3.15
Marca Columna			
Beckman	2382	2	2.18
Thermo CN	12115	1.1	1.39

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN:

Platos teóricos por columna para C12	$\geq 1500$
Factor de coleo para C12	$\leq 2.0$
Resolución entre C12 y C14	$\geq 2.0$
% RSD	$\leq 2.0\%$

## 4.9 TOLERANCIA

Tabla 15 % de recobros para calcular la tolerancia

Condición	Base	Alterada			Diferencia
<b>Equipo HPLC</b>	F.048		F.009		
Resultado	98.17 %	-	99.12 %	=	-0.94 %
<b>Cambio de Columna Beckman</b>	Serie 8UEC125		Serie 7UEC125		
Resultado	98.17 %	-	98.25 %	=	-0.08 %

\*El % de recobro fue calculado con los datos de las áreas (tabla 51-53 del anexo)

### CRITERIOS DE ACEPTACIÓN:

La diferencia debe ser menor de 2% para considerar que no hay efecto significativo sobre la valoración del activo. **CUMPLE**

Tabla 16 Parámetros de adecuabilidad para la prueba de tolerancia

Condición	Platos teóricos	Coleo C12	Resolución C12 y C14
<b>Equipo HPLC</b>			
F.048	2939	1.66	2.74
F.009	4268	1.69	3.05
<b>Cambio de Columna Beckman</b>			
Serie 8UEC125	2939	1.66	2.74
Serie 7UEC125	6297	1.95	3.88

### CRITERIOS DE ACEPTACIÓN:

Platos teóricos por columna para C12  $\geq 1500$

Factor de coleo para C12  $\leq 2.0$

Resolución entre C12 y C14  $\geq 2.0$

%RSD  $\leq 2.0\%$

## **CAPITULO V DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

Los cálculos para la obtención de todos los parámetros de desempeño de ésta validación, se realizaron para Cloruro de Benzalconio.

### **5.1 PRUEBAS DE DETECCIÓN:**

Se realizan pruebas con diferentes condiciones de análisis: proporción de fase, velocidad de flujo, columna. Partiendo de éstas pruebas, se establecen las condiciones idóneas: Proporción de fase Buffer pH 3: Acetonitrilo (40:60), Velocidad de flujo: 1.0 ml/ min. Columna Ciano de 4.6 mm de diámetro X 150 mm de longitud. Bajo éstas condiciones se cumplen los parámetros de adecuabilidad requeridos, además de obtener una buena respuesta en la señal del analito.

### **5.2 ESPECIFICIDAD:**

Se realizan inyecciones de: fase móvil, solución estándar de cloruro de benzalconio, Placebo, placebo cargado; ninguna solución mencionada anteriormente presenta alguna señal ó pico de interferencia con el pico de interés, durante los veinte minutos de la corrida. Tanto el estándar como la muestra, en éste caso, placebo solo y placebo cargado, se someten a degradación ácida (ácido clorhídrico 38%), degradación básica (hidróxido de amonio 38%), degradación por oxidación (peróxido de hidrógeno al 30%), y degradación por temperatura (aproximadamente 80 C/15 horas). Se observa en la señal que, en algunos casos se modifica ó aumenta el área. Se someten a análisis cuantitativo tanto muestras como estándares y se observa en los resultados que el mayor nivel de degradación en las primeras horas de reacción se da en la degradación por oxidación y posteriormente, con 5 horas de reacción además de la adición de temperatura, el mayor nivel de degradación se da en la degradación básica. La degradación se presenta tanto en estándares como en muestras, reflejando un valor menor en el recobro. En ningún

caso se observa ninguna señal que cause interferencia con el pico de interés, por lo que se concluye que el método es específico.

### **5.3 PRECISIÓN Y ADECUABILIDAD DEL SISTEMA:**

Bajo las condiciones de análisis establecidas, se cumplen los parámetros de adecuabilidad: Platos teóricos por columna para  $C_{12} \geq 1500$ , Factor de coleo  $\leq 2.0$ , Resolución entre  $C_{12}$  y  $C_{14} \geq 2.0$ . Se utiliza columna Ciano 4.6 DI X 150 mm. Se obtiene reproducibilidad,  $CV = 1.33\%$ . El Sistema es preciso.

### **5.4 LINEALIDAD DEL SISTEMA:**

Se someten las concentraciones necesarias para una curva que contempla, del 60 al 140% de cloruro de benzalconio, teniendo como concentraciones reales en la curva 63.36%, 84.48%, 105.6%, 126.72% y 147.84%. *Se obtienen los resultados: Intervalo de la pendiente IC ( $\beta_1$ ) = 2367491 a 2347501 no contiene al cero. Intervalo del Intercepto IC ( $\beta_0$ ) = 2235829 a -1563826 contiene al cero. Coeficiente de determinación ( $r^2$ ) = 0.999950. Coeficiente de correlación ( $r$ ) = 1.00; todos los parámetros están dentro de los criterios de aceptación. El sistema cumple con los parámetros de adecuabilidad. El sistema es lineal en el rango de concentraciones analizadas.*

### **5.5 PRECISIÓN DEL MÉTODO POR REPETIBILIDAD:**

Se realiza la prueba con placebo cargado con el mismo estándar secundario de cloruro de benzalconio. Los Factores de Respuesta de las soluciones estándar, arrojan un  $CV = 0.38\%$ . El sistema cumple con los parámetros de adecuabilidad. Se observa buena repetibilidad en la respuesta del placebo cargado, se obtiene un  $CV = 0.28\%$  y el promedio del porcentaje se incluye en el intervalo ( $X$ ) = 101.50%. El sistema cumple con los parámetros de adecuabilidad. El método es preciso por repetibilidad.

## **5.6 LINEALIDAD DEL METODO:**

Se determina la Linealidad del Método a partir de placebos cargados a tres diferentes niveles de concentración, 80, 100, 120 %. Se obtienen los siguientes resultados: Coeficiente de determinación ( $r^2$ ) = 0.9983. Intervalo de confianza del intercepto IC ( $\beta_0$ ) = 0.000 a 0.001 (debe contener al cero). Como el intervalo de confianza de la pendiente IC ( $\beta_1$ ) = 0.94 a 1.00. El CV de la regresión es de 0.84%, y el % de recobro de todos los puntos está en el rango de 98% a 102%. El sistema cumple con los parámetros de adecuabilidad. El método es lineal en el rango de concentraciones analizadas.

## **5.7 PRECISIÓN INTERMEDIA:**

Se realiza ésta prueba con producto terminado para los dos analistas, tomando alícuotas individuales. El día 1, el analista 1 obtiene en la respuesta de los estándares CV = 0.31% y en el recobro de las muestras, un promedio de 94.91% con CV = 0.90%. El analista 2, obtiene en la respuesta de los estándares CV = 0.24% y en el recobro de las muestras, un promedio de 97.61% con CV = 0.57%. El día 2, el analista 1 obtiene en la respuesta de los estándares CV = 0.33% y en el recobro de las muestras, un promedio de 96.61% con CV = 1.31%. El analista 2, obtiene en la respuesta de los estándares CV = 0.2% y en el recobro de las muestras, un promedio de 97.58% con CV = 0.69%. Se obtiene un recobro promedio general de todos los datos de 97.10% con un CV = 1.08%. En todos los casos, el sistema cumple con los parámetros de adecuabilidad.

## **5.8 ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA:**

Se analizan muestras a tiempos de 24, 48, horas a temperatura ambiente y en refrigeración. Se observa que en ningún caso la diferencia es mayor de 2% cuando el límite es 2%; por lo tanto se considera que no hay efecto significativo en la valoración del activo, aún después de 48 horas de preparadas las muestras. Se



concluye que tanto los estándares como las muestras son estables hasta 48 horas a Temperatura ambiente y refrigeración.

### **5.9 ROBUSTEZ:**

Los cambios para la prueba de robustez del método, se hicieron sobre los puntos: pH del Buffer de fosfatos, proporción de la fase móvil, velocidad de flujo, volumen de inyección y marca de columna.

En todos los casos, se cumplen los parámetros de adecuabilidad, excepto en el cambio de columna WATERS el valor de resolución = 1.35, cuando el valor mínimo es 2.0. En todos los casos, la diferencia no es mayor al 2%, excepto para el cambio de columna Waters, el cambio de velocidad de flujo (1.2 mL/min) y el cambio de la proporción de fase buffer: ACN (45:55), se considera que con los cambios no hay efecto significativo en la valoración del activo, por lo tanto, el método se considera robusto respecto a éstos cambios; para los casos de cambio de columna Waters, el cambio de velocidad de flujo (1.2 mL/min) y el cambio de la proporción de fase buffer: ACN (45:55), de aplicarlos en caso necesario, revisar y valorar los parámetros de adecuabilidad.

### **5.10 TOLERANCIA:**

Se evalúa el comportamiento y error de un solo analista, 2 columnas diferentes y 2 equipos diferentes, obteniendo una diferencia menor a 2% en ambos casos, por lo que, se considera que con los cambios no hay efecto significativo en la valoración del activo, por lo tanto, el método es tolerante respecto a los cambios de equipo y columna.

## CAPITULO VI CONCLUSIONES

Se realizó la validación del Método Analítico para cuantificar Cloruro de Benzalconio en solución oftálmica con concentración de 0.01% por cromatografía de líquidos de alta resolución., para lo cual se utilizó: Proporción de fase Buffer de fosfatos pH 3: Acetonitrilo (40:60), Velocidad de flujo: 1.0 ml/ min. Columna Ciano de 4.6 mm de diámetro X 150 mm de longitud y una longitud de onda de detección de 214 nm.

Las pruebas que se realizaron fueron:

Precisión del sistema

Linealidad del Sistema

Precisión del método

Linealidad del método

Precisión intermedia

Especificidad

Estabilidad de la muestra

Robustez

Tolerancia

Al finalizar esta validación podemos concluir que:

- I. El sistema para la valoración de Cloruro de Benzalconio es preciso y lineal.
- II. El método analítico es preciso, ya que presenta un CV menor a 2% estipulado en la guía de validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de QFB's y la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006.
- III. El método analítico es lineal en un intervalo de concentración de 80 a 120 % de la concentración de activo teórica.
- IV. El método analítico es reproducible, ya que presenta un CV menor a 2% entre los dos analistas.
- V. El método analítico es específico, ya que detecta al Cloruro de Benzalconio y no a los excipientes de la formulación de las soluciones y no existe interferencia alguna con los picos de interés.
- VI. Las muestras analíticas son estables por lo menos 48 horas tanto en condiciones de temperatura ambiente como en condiciones de refrigeración, sin embargo, se recomienda guardar en condiciones de refrigeración ya que la diferencia absoluta fue más baja.
- VII. El método analítico es robusto, excepto en los casos de cambio de columna, velocidad de flujo y de cambio de la proporción de fase buffer: ACN, de aplicarlos en caso necesario, revisar y valorar los parámetros de adecuabilidad.
- VIII. El método analítico es tolerante al cambio de columna de la misma marca y mismas características, así como al cambio de equipo para su valoración.

El Método Analítico para cuantificar Cloruro de Benzalconio en solución oftálmica con concentración de 0.01% por cromatografía de líquidos de alta resolución, es adecuado para ser utilizado como método de rutina en el laboratorio de Control Físicoquímico de Alcon México

## CAPITULO VII BIBLIOGRAFÍA

1. Guía de validación de Métodos Analíticos, Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C., México, (2002).
2. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006. Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.
3. Norma Oficial Mexicana NOM-164-SSA1-1998, Buenas prácticas de fabricación para fármacos.
4. Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de medicamentos.
5. Remington. "Farmacía" Medica Panamericana, 19ª edición, Buenos Aires, (1998), pág: 1922-1923.
6. Rowe C. R, Sheskey J. P. "Handbook of pharmaceutical excipients." Pharmaceutical Press, fifth edition, Great Britain, (2006), pág: 61-63.
7. Rubinson F.J, Rubinson K. A, "Química analítica contemporánea." Pearson Educación, primera edición, México (2000), pág: 423-439.
8. Settle F. "Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry" Prentice-Hall hispanoamericana, primera edición, México, (1997), pág: 154-161.
9. USP 33 edición Español, pág: 272-276.
10. FEUM. novena edición, pág: 368-379.

11. Adecuabilidad del sistema, procedimiento normalizado, Alcon México.
12. FWMDOC-05463. ANALYSIS OF BAC BY HPLC. CURRENT, 27.0. 25-Feb-2010
13. Guideline on general principles of process validation  
<http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/pv.htm>
14. [http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=es\\_MX&cid=10048919](http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=es_MX&cid=10048919)
15. [http://www.betterchem.com/21cfr211/retrospective\\_validation.htm](http://www.betterchem.com/21cfr211/retrospective_validation.htm)
16. [http://www.betterchem.com/21cfr211/prospective\\_validation.htm](http://www.betterchem.com/21cfr211/prospective_validation.htm)
17. [http://www.betterchem.com/21cfr211/concurrent\\_validation.htm](http://www.betterchem.com/21cfr211/concurrent_validation.htm)
18. <http://www.lasalud.com.mx/2008/02/19/Oftalmologia/Problemas.visuales.C/2706.html> - 05/03/11

## CAPITULO VIII ANEXOS

### 8.1 ALGORITMO PARA LA CUANTIFICACION DE CLORURO DE BENZALCONIO.

$$\left( \left( \frac{\text{AREA TOTAL MUESTRA}}{\text{AREA PROMEDIO ESTANDAR}} \right) \left( \frac{\text{CONCENTRACION DE ESTANDAR}}{\text{CONCENTRACION DE MUESTRA}} \right) \right) \times 100$$

*= % DE RECOBRO DE CLORURO DE BENZALCONIO*

El área total del estándar y la muestra se calcula de la siguiente manera.

$$\text{AREA TOTAL} = (\text{AREA C12} \times \text{PM DE C12}) + (\text{AREA C14} \times \text{PM DE C14}) \\ + (\text{AREA C16} \times \text{PM DE C16}) + (\text{AREA C18} \times \text{PM DE C18})$$

Donde.

PM C12 = 340

PM C14 = 368

PM C16 = 396

PM C18 = 424

## 8.2 AREAS OBTENIDAS DURANTE EL ANALISIS

### 8.2.1 PRECISIÓN DEL SISTEMA

Tabla 17 Áreas de los homólogos para precisión del sistema

AREA TOTAL DE STD					
	Área C <sub>12</sub>	Área C <sub>14</sub>	Área Total	FR STD	
Std 1	494262	256635	262490760	8.046E-11	mg/ml
Std 2	488200	240265	254405520	8.302E-11	mg/ml
Std 3	490168	253977	260120656	8.119E-11	mg/ml
Std 4	494979	254599	261985292	8.062E-11	mg/ml
Std 5	497528	258819	264404912	7.988E-11	mg/ml
Std 6	490414	255344	260707352	8.101E-11	mg/ml

### 8.2.2 PRECISIÓN DEL MÉTODO

Tabla 18 Áreas de los homólogos para la precisión del método

AREA TOTAL DE MTA	alícuota	AREA C <sub>12</sub>	AREA C <sub>14</sub>	AREA C <sub>16</sub>	AREA C <sub>18</sub>	AREA TOTAL DE MTA
100%-1	2	388896	208143	107475	16074	258196740
100%-2	2	389947	206569	106776	15719	257547524
100%-3	2	389597	207592	107524	15332	257937108
100%-4	2	391666	210018	107541	15340	259543460
100%-5	2	391671	208548	105160	15111	257964228
100%-6	2	390202	208059	108115	15735	258719572

### 8.2.3 LINEALIDAD DEL SISTEMA

**Tabla 19 Áreas de los homólogos para la linealidad del sistema**

#	Sample Name	C <sub>12</sub>	C <sub>14</sub>	Area Total
1	std 60% BAC	279656	147486	149357888
2	std 60% BAC	280724	149342	150404016
3	std 60% BAC	278659	149905	149909100
4	std 80% BAC	375440	197645	200382960
5	std 80% BAC	374541	198916	200545028
6	std 80% BAC	368337	200358	198966324
7	std 100% BAC	464779	251207	250469036
8	std 100% BAC	467300	244707	248934176
9	std 100% BAC	468165	252517	252102356
10	std 120% BAC	554686	304560	300671320
11	std 120% BAC	563232	296107	300466256
12	std 120% BAC	564480	291519	299202192
13	std 140% BAC	649596	341518	346541264
14	std 140% BAC	647549	344139	346809812
15	std 140% BAC	644036	341249	344551872

### 8.2.4 LINEALIDAD DEL MÉTODO

**Tabla 20 Áreas de los homólogos para la linealidad del método**

#	SampleName	C <sub>12</sub>	C <sub>14</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>18</sub>	Area Total
4	PC 80	309022	163433	73947	9236	198409900
5	PC 80	307919	161664	74841	9345	197784128
6	PC 80	311134	162512	74884	9190	199140600
7	PC 100	383448	200313	99392	13799	249297512
8	PC 100	386358	200524	96115	13010	248732332
9	PC 100	382943	200447	97389	13090	248081320
10	PC 120	455103	237110	114980	17845	295089860
11	PC 120	453145	236269	116216	17570	294487508
12	PC 120	450712	233341	113365	17540	291441068



## 8.2.5 PRECISIÓN INTERMEDIA

**Tabla 21 Áreas de los homólogos para analista 1 día 1**

	<b>Cmta mg/mL</b>	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
MTA 1	0.0200	348303	188806	83890	17237	228432556
MTA 2	0.0200	351371	188846	84159	15988	229067344
MTA 3	0.0200	352585	191081	87638	17552	232343404

**Tabla 22 Áreas de los homólogos para analista 1 día 2**

	<b>Cmta mg/mL</b>	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
MTA 1	0.0200	360333	191288	83691	16640	233104200
MTA 2	0.0200	361527	195666	87373	17164	236801512
MTA 3	0.0200	362327	196200	90811	18617	239247544

**Tabla 23 Áreas de los homólogos para analista 2 día 1**

	<b>Cmta mg/mL</b>	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
MTA 1	0.0200	355826	194420	89630	17701	235526104
MTA 2	0.0200	359216	191630	85360	16591	233490424
MTA 3	0.0200	357266	195758	89707	17889	236618292

**Tabla 24 Áreas de los homólogos para analista 2 día 2**

	<b>Cmta mg/mL</b>	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
MTA 1	0.0200	365778	199030	90941	17787	241161884
MTA 2	0.0200	363404	197830	99149	17255	242937924
MTA 3	0.0200	369675	199427	88984	17371	241681604

## 8.2.6 ESPECIFICIDAD

**Tabla 25 Áreas de los homólogos por vía básica condición inicial**

	AREA C <sub>12</sub>	AREA C <sub>14</sub>	AREA C <sub>16</sub>	AREA C <sub>18</sub>	AREA TOTAL DE MTA
NaOH-M1	398490	200307	86325	11021	248057180
NaOH-M2	399147	197720	95764	13037	251921172
NaOH-M3	398063	199000	87611	14193	249285208

**Tabla 26 Áreas de los homólogos por vía básica condición final**

	AREA C <sub>12</sub>	AREA C <sub>14</sub>	AREA C <sub>16</sub>	AREA C <sub>18</sub>	AREA TOTAL DE MTA
NaOH-M1	340576	165301	71248	9476	208858640
NaOH-M2	339865	159835	66514	7371	203838228
NaOH-M3	342333	157239	71924	7735	206018716

**Tabla 27 Áreas de los homólogos por vía ácida condición inicial**

	AREA C <sub>12</sub>	AREA C <sub>14</sub>	AREA C <sub>16</sub>	AREA C <sub>18</sub>	AREA TOTAL DE MTA
HCL-M1	403949	210381	95881	10321	257107848
HCL-M2	394040	209378	100392	14304	256844832
HCL-M3	398715	213942	104680	11054	260433932

**Tabla 28 Áreas de los homólogos por vía ácida condición final**

	AREA C <sub>12</sub>	AREA C <sub>14</sub>	AREA C <sub>16</sub>	AREA C <sub>18</sub>	AREA TOTAL DE MTA
HCL-M1	343204	156053	71616	10299	206843576
HCL-M2	344543	159071	78649	8470	210419032
HCL-M3	349828	164347	76038	7698	212796216

**Tabla 29 Áreas de los homólogos por vía de oxidación condición inicial**

	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -M1	429496	210958	89936	8806	263009584
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -M2	427645	211718	89003	8951	262351936
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -M3	430080	211395	89854	9236	263518808

**Tabla 30 Áreas de los homólogos por vía de oxidación condición final**

	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -M1	363935	184694	86909	7029	229101552
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -M2	370985	180098	78346	7512	226621068
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -M3	369538	185274	78925	7278	228163924

**Tabla 31 Áreas de los homólogos por vía de calor condición inicial**

	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
CALOR-M1	434064	210163	89936	8806	264270144
CALOR-M2	432187	219899	90128	9086	267409564
CALOR-M3	434685	210821	90019	12307	266240720

**Tabla 32 Áreas de los homólogos por vía de calor condición final**

	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
CALOR-M1	416602	208830	65492	7130	247452072
CALOR-M2	414702	201042	65199	7252	243875788
CALOR-M3	414513	210228	69423	7546	248989336

## 8.2.7 ESTABILIDAD ANALITICA DE LA MUESTRA

**Tabla 33 Áreas de los homólogos para la estabilidad de la muestra condición inicial**

	<b>Cmta mg/mL</b>	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
MTA 1	0.0200	356683	194964	87009	17135	234739776
MTA 2	0.0200	364662	195706	86275	16094	236993644
MTA 3	0.0200	359881	196609	88856	17309	237237644

**Tabla 34 Áreas de los homólogos para la estabilidad de la muestra condición 24 horas a temperatura ambiente**

	<b>Cmta mg/mL</b>	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
MTA 1	0.0200	358905	195294	90188	17281	236937484
MTA 2	0.0200	359585	192876	85275	15535	233593008
MTA 3	0.0200	357111	193266	88241	17169	234762720

**Tabla 35 Áreas de los homólogos para la estabilidad de la muestra condición 48 horas a temperatura ambiente**

	<b>Cmta mg/mL</b>	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
MTA 1	0.0200	367705	199027	91716	17732	242099540
MTA 2	0.0200	364920	196911	86213	17134	237941212
MTA 3	0.0200	360156	196534	89736	18215	238036168

**Tabla 36 Áreas de los homólogos para la estabilidad de la muestra condición  
24 horas en refrigeración**

	<b>Cmta mg/mL</b>	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
MTA 1	0.0200	358176	192704	87809	17333	234816468
MTA 2	0.0200	357793	190129	84486	17025	232292148
MTA 3	0.0200	356944	194618	87858	17276	235097176

**Tabla 37 Áreas de los homólogos para la estabilidad de la muestra condición  
48 horas en refrigeración**

	<b>Cmta mg/mL</b>	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
MTA 1	0.0200	355742	193865	88184	16841	234356048
MTA 2	0.0200	361816	193269	84815	17934	235331188
MTA 3	0.0200	355452	194028	87567	17292	234264324

## 8.2.8 ROBUSTEZ

**Tabla 38 Áreas de los homólogos para robustez condición inicial**

	<b>Cmta mg/mL</b>	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
MTA 1	0.0200	364792	191121	93561	12119	236550420
MTA 2	0.0200	366250	193098	92423	13007	237699540
MTA 3	0.0200	369759	194090	87992	13778	237829884

**Tabla 39 Áreas de los homólogos para robustez condición volumen de  
inyección 20 microlitros**

	<b>Cmta mg/mL</b>	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
MTA 1	0.0200	238394	124861	59985	8935	154545308
MTA 2	0.0200	237881	123949	59505	9037	153888440
MTA 3	0.0200	239449	127604	63599	9605	157628656

**Tabla 40 Áreas de los homólogos para robustez condición volumen de  
inyección 25 microlitros**

	<b>Cmta mg/mL</b>	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
MTA 1	0.0200	299281	157115	67521	9559	190365192
MTA 2	0.0200	301366	156999	70208	9658	192137432
MTA 3	0.0200	303620	160041	71929	10867	195217380

**Tabla 41 Áreas de los homólogos para robustez condición velocidad de flujo  
0.8 mL/min**

	<b>Cmta mg/mL</b>	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
MTA 1	0.0200	452400	235351	113482	16663	292429152
MTA 2	0.0200	453290	236545	116700	17206	294675704
MTA 3	0.0200	458057	240061	120185	19059	299756104

**Tabla 42 Áreas de los homólogos para robustez condición velocidad de flujo  
1.2 mL/min**

	<b>Cmta mg/mL</b>	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
MTA 1	0.0200	300778	157417	74581	10500	194180052
MTA 2	0.0200	302494	158305	75570	10740	195583680
MTA 3	0.0200	307334	162164	78865	11634	200333268

**Tabla 43 Áreas de los homólogos para robustez condición fase móvil buffer :  
Acetonitrilo (35:65)**

	<b>Cmta mg/mL</b>	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
MTA 1	0.0200	354666	188480	84169	12583	228613196
MTA 2	0.0200	354943	188891	84735	12634	229104384
MTA 3	0.0200	363230	193223	89975	13803	236086836

**Tabla 44 Áreas de los homólogos para robustez condición fase móvil buffer:  
Acetonitrilo (45:55)**

	<b>Cmta mg/mL</b>	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
MTA 1	0.0200	356502	175380	76320	13565	221724800
MTA 2	0.0200	361928	176391	77062	8662	222156648
MTA 3	0.0200	366803	180542	83352	8760	227874108

**Tabla 45 Áreas de los homólogos para robustez condición inicial**

	<b>Cmta mg/mL</b>	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
MTA 1	0.0200	351793	186549	90471	15626	230711592
MTA 2	0.0200	355078	183047	88404	16604	230135896
MTA 3	0.0200	351299	182207	87136	17024	228217868

**Tabla 46 Áreas de los homólogos para robustez condición buffer pH 3.5**

	<b>Cmta mg/mL</b>	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
MTA 1	0.0200	354177	196893	84006	14595	232331460
MTA 2	0.0200	353791	187653	90463	14940	231503152
MTA 3	0.0200	348590	197579	83257	14973	230547996

**Tabla 47 Áreas de los homólogos para robustez condición buffer pH 2.5**

	<b>Cmta mg/mL</b>	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
MTA 1	0.0200	349837	190515	86198	16244	230075964
MTA 2	0.0200	348261	184484	83294	17430	226673596
MTA 3	0.0200	350057	184308	82158	16302	226291340



**Tabla 48 Áreas de los homólogos para robustez condición inicial**

	<b>Cmta mg/mL</b>	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
MTA 1	0.0200	358410	186360	83544	13814	229380440
MTA 2	0.0200	358355	184027	85889	20207	232142448
MTA 3	0.0200	363150	186150	78117	17469	230315388

**Tabla 49 Áreas de los homólogos para robustez condición columna**

**Thermohypersil**

	<b>Cmta mg/mL</b>	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
MTA 1	0.0200	352816	178374	83062	14041	224445008
MTA 2	0.0200	358973	188626	84010	15604	231349244
MTA 3	0.0200	356749	177280	86315	14680	226938760

**Tabla 50 Áreas de los homólogos para robustez condición columna Waters**

**Spherisorb**

	<b>Cmta mg/mL</b>	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
MTA 1	0.0200	311810	138998	60145	8249	184481660
MTA 2	0.0200	311098	137474	59950	4341	181944536
MTA 3	0.0200	311652	136283	58442	8006	182651400

## 8.2.9 TOLERANCIA

**Tabla 51 Áreas de los homólogos para tolerancia con la columna Beckman  
Ultrasphere Cyano 8UEC125 con el equipo #48**

	<b>Cmta mg/mL</b>	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
MTA 1	0.0200	351793	186549	90471	15626	230711592
MTA 2	0.0200	355078	183047	88404	16604	230135896
MTA 3	0.0200	351299	182207	87136	17024	228217868

**Tabla 52 Áreas de los homólogos para tolerancia con la columna Beckman  
Ultrasphere Cyano 8UEC125 con el equipo #09**

	<b>Cmta mg/mL</b>	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
MTA 1	0.0200	377002	190520	89626	17080	241025856
MTA 2	0.0200	372983	189691	90781	17143	239838416
MTA 3	0.0200	378519	194333	95226	23220	247765780

**Tabla 53 Áreas de los homólogos para tolerancia con la columna Beckman  
Ultrasphere Cyano 7UEC125 con el equipo #48**

	<b>Cmta mg/mL</b>	<b>AREA C<sub>12</sub></b>	<b>AREA C<sub>14</sub></b>	<b>AREA C<sub>16</sub></b>	<b>AREA C<sub>18</sub></b>	<b>AREA TOTAL DE MTA</b>
MTA 1	0.0200	360434	195806	87935	12876	234885852
MTA 2	0.0200	357878	189726	81752	10398	228280232
MTA 3	0.0200	362986	194099	82438	13008	233004512