



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

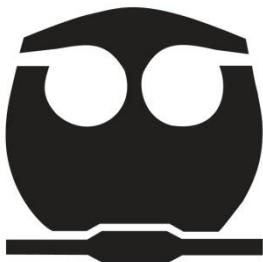
**VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS PARA CUANTIFICAR EL
CONSERVADOR CLORURO DE BENZALCONIO POR HPLC EN EL
PREPARADO FARMACÉUTICO TOBRAMICINA SOLUCIÓN
OFTÁLMICA.**

TESIS

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

PRESENTA

BEATRIZ ISELA APASEO TENORIO



MÉXICO, D.F.

MARZO 2012



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: María del Socorro Alpízar Ramos

Vocal: Juan Manuel Rodríguez

Secretario: Daniel García Escandón

1er suplente: Ángel Ávila Villagrán

2do suplente: Abraham Faustino Vega

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Control Físicoquímico

Departamento de Control de Calidad

Alcon Laboratorios S.A. de C.V.

Asesor del tema

Q.B.P. Daniel García Escandón

Supervisor Técnico

Q.F.B. María de la Luz Espinoza Colín

Sustentante

Beatriz Isela Apaseo Tenorio

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por el regalo de la vida y todo lo que con ella me ha dado.

*Gracias a mis padres, Jesús y Rosa,
por su amor y apoyo incondicional.*

*Gracias a mis hermanos, familia
y amigos por su apoyo.*

*Gracias a mis amigos de la universidad
por su compañía, comprensión, ayuda y amistad.*

*Gracias al Pbro. Armando Noguez
por su cariño y guiarme desde niña.*

*Gracias al Pbro. Oscar Brand por escuchar,
impulsarme a terminar este trabajo,
mirar hacia delante y sobretodo por su amistad.*

*Gracias a Alcon Laboratorios
por permitirme realizar este trabajo.*

*Gracias a la UNAM y a la Facultad de Química
por la oportunidad que da a los jóvenes de crecer en la vida.*

*Gracias por todas aquellas personas que Dios ha puesto en mi camino
para poder llegar a este momento.*

Con cariño:

Beatriz Isela

ÍNDICE

CAPÍTULO I: PRESENTACIÓN	06
1.1 Resumen.....	06
1.2 Objetivos.....	06
1.3 Justificación.....	07
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	09
2.1 Validación.....	09
2.1.1 Tipos de Validación.....	10
2.2 Métodos Analíticos.....	12
2.2.1 Clasificación de Métodos Analíticos.....	13
2.3 Validación de Métodos Analíticos.....	14
2.4 Parámetros de Desempeño.....	15
2.5 Sustancias de Referencia.....	18
2.6 Documentación.....	18
2.7 Cromatografía Analítica.....	19
2.7.1 Origen de la Cromatografía.....	20
2.7.2 Usos de la Cromatografía.....	22
2.7.3 Clasificación de las técnicas Cromatografías.....	22
2.8 Elución Cromatográfica.....	24
2.9 El Cromatograma.....	25
2.10 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC).....	26
2.10.1 Instrumentación.....	26
2.10.2 Parámetros Cromatográficos.....	29
2.11 Preparados Farmacéuticos.....	32
2.11.1 Solución Oftálmica.....	34
2.12 Tobramicina.....	36
2.13 Cloruro de Benzalconio.....	38
2.13.1 Monografía Cloruro de Benzalconio.....	38
CAPÍTULO III: DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS	43
3.1 Introducción.....	43
3.2 Algoritmo para la cuantificación total de Cloruro de Benzalconio.....	43
3.3 Condiciones del Método.....	43
3.4 Soluciones y reactivos.....	44
3.5 Parámetros cromatográficos del sistema.....	44
3.6 Preparación de la muestra.....	45
CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA EXPERIMENTAL DE LA VALIDACIÓN	46
4.1 Parámetros de desempeño de la validación.....	46
4.2 Metodología y Criterios de Aceptación.....	46
4.2.1 Precisión del Sistema.....	46
4.2.1.1 Adecuabilidad del Sistema.....	47

4.2.2 Linealidad del Sistema.....	47
4.2.3 Especificidad.....	49
4.2.4 Exactitud y Repetibilidad del Método.....	50
4.2.5 Linealidad del Método.....	52
4.2.6 Precisión Intermedia.....	54
4.2.7 Estabilidad Analítica de la Muestra.....	54
4.2.8 Robustez.....	55
4.2.9 Tolerancia.....	57
4.3 Resumen de parámetros de desempeño.....	58
 CAPÍTULO V: RESULTADOS	 59
5.1 Precisión del Sistema.....	59
5.1.1 Adecuabilidad del Sistema.....	60
5.2 Linealidad del Sistema.....	61
5.3 Especificidad.....	62
5.4 Exactitud y Repetibilidad del Método.....	67
5.5 Linealidad del Método.....	68
5.6 Precisión Intermedia.....	69
5.7 Estabilidad Analítica de la Muestra.....	70
5.8 Robustez.....	70
5.9 Tolerancia.....	72
 CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN DE RESULTADOS	 73
6.1 Precisión del Sistema.....	73
6.1.1 Adecuabilidad del Sistema.....	73
6.2 Linealidad del Sistema.....	73
6.3 Especificidad.....	74
6.4 Exactitud y Repetibilidad del Método.....	74
6.5 Linealidad del Método.....	75
6.6 Precisión Intermedia.....	75
6.7 Estabilidad Analítica de la Muestra.....	76
6.8 Robustez.....	77
6.9 Tolerancia.....	78
 CAPITULO VII: CONCLUSIONES	 79
 CAPITULO VIII: REFERENCIAS	 80
 CAPITULO IX: ANEXOS	 81
Definiciones.....	81
Símbolos y Abreviaturas.....	85
Áreas obtenidas durante el análisis.....	87

CAPÍTULO I: PRESENTACIÓN

1.1 Resumen

Se realizó la validación del método de análisis para cuantificar cloruro de benzalconio al 0.01% en tobramicina solución oftálmica, por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), para confirmar que el sistema es lineal y preciso y 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 Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. ” y de los lineamientos internos establecidos por Alcon Laboratorios S.A. de C.V.

En función de la aplicación analítica del método, los parámetros de desempeño evaluados en esta validación fueron: precisión y linealidad del sistema, linealidad, exactitud y precisión del método, especificidad, estabilidad analítica de la muestra, robustez y tolerancia.

De acuerdo a la validación realizada, se concluyó que el método analítico para la cuantificación del conservador cloruro de benzalconio en el preparado farmacéutico tobramicina solución oftálmica cumple con los criterios de aceptación establecidos, por lo que el método es adecuado para el propósito para el cual fue diseñado.

1.2 Objetivos

Objetivo general:

- o Validar el Método Analítico para cuantificar cloruro de benzalconio tobramicina solución oftálmica a la concentración de 0.01% por cromatografía de líquidos de alta resolución.

Objetivo particular:

- o 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 Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C.” y del protocolo de validación establecido por Alcon Laboratorios S.A. de C.V.

1.3 Justificación

En muchas situaciones, cuando se tiene el interés de medir un componente en una muestra, es necesario contar con una metodología de medición (método analítico). Por ello, las compañías farmacéuticas requieren de este tipo de metodologías analíticas, pudiendo utilizar metodologías farmacopeicas o bien, dedicar tiempo para su desarrollo, partiendo del hecho de que deben cumplir el atributo de ser confiable. Como en muchas de las actividades de la industria farmacéutica se hace uso del método científico para alcanzar este atributo, es necesario llevar a cabo en la mayoría de las ocasiones estudios experimentales que permitan demostrar la confiabilidad de lo que se está midiendo. Un proceso que permite cumplir con este fin, es la validación.

Como es bien sabido, todo producto farmacéutico debe reunir atributos de identidad, pureza, concentración, potencia, inocuidad y disponibilidad para cumplir con los aspectos normativos oficiales e internos y no menos importantes, los éticos, por ello si un método analítico, que finalmente es el medidor de las características críticas de calidad del producto, no es confiable, se corre el grave riesgo de afectar al usuario final que es un paciente.

Desde este enfoque, la validación es un elemento indispensable en los procesos de fabricación en el área de calidad de la compañía y bajo la filosofía de la Validación, las Autoridades Regulatorias verifican que las compañías sustenten estos sistemas con actividades documentadas, como se indica en la NOM-059 SSA1 y en otros lineamientos regulatorios internacionales.

El objetivo final de un dictamen de calidad, es la liberación o no de un producto sobre la base de las especificaciones previamente establecidas. Esta decisión es tomada generalmente por el profesional farmacéutico, en gran medida esta dada por los resultados obtenidos al aplicar uno o diversos métodos analíticos; si éstos no son farmacopeicos y no están validados, su decisión corre el riesgo de

ser errónea y afectar al usuario del producto y por ende, a la misma compañía. La validación le proporciona a quien aplica la metodología, una seguridad de la confiabilidad de dichos métodos y puede tomar la decisión final con certeza.

Por lo anterior, 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, en donde el químico se da cuenta si el estudio, el cual esta siendo evaluado sistemáticamente, cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado.

Además, que de acuerdo a las Buenas Prácticas de Fabricación y de Laboratorio, es necesario que todos los métodos analíticos estén validados.

CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Validación.²

Durante los últimos años, se ha escuchado hablar del concepto de validación. En diversos países, este concepto tiene poco tiempo de ser exigido, pero se ha estado conciente de su necesidad, resultados y beneficios a lo largo del tiempo.

Esto se puede observar en las nuevas actualizaciones de las regulaciones enfocadas al área farmacéutica. Todas incluyen de alguna u otra forma el requisito de la validación.

La validación se define como:

“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”.

La validación toma mayor intensidad cuando la FDA (Food and Drug Administration) establece que “un proceso no validado es un proceso de alto riesgo, ya que en cualquier momento generara procesos fuera de especificación” y por consecuencia no cumplirá su función y pondrá en riesgo al paciente.

En México, se cuenta con NOM-059-SSA1-2006, “Buenas Prácticas de Fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos”, en la cual se establece a la validación como un requerimiento de esta norma que los fabricantes de medicamentos determinen que actividades de validación son necesarias para demostrar el control de los aspectos críticos de sus operaciones, siendo la validación de métodos analíticos uno de estas actividades a validar. Recordando además, que del cumplimiento de las Buenas Practicas de Fabricación (BPF) depende la vida de los pacientes.

2.1.1 Tipos de validación. ²

Durante muchos años se ha hablado tradicionalmente de tres tipos de validación. En forma global y considerando antecedentes y nuevas perspectivas se puede hablar de cinco tipos de validación:

Las tradicionales:

- o Validación prospectiva.
- o Validación retrospectiva.
- o Validación concurrente.

Las de aplicación actual:

- o Validación esbelta
- o Validación en tiempo real, mejor conocida como *“Verificación continua de la calidad”*.

2.1.1.1 Validación prospectiva. ²

Se define como: *“El estudio que se lleva a cabo para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que esta previsto basado en resultados obtenidos antes de que el producto involucrado salga al mercado”*.

Este tipo de validación es la de mejor aplicación en la actualidad si se trabaja bajo el concepto tradicional, ya que permite que la empresa disminuya su nivel de riesgos antes de liberar un producto, trayendo como consecuencia un mayor entendimiento de procesos, menor numero de no conformidades internas y de quejas principalmente.

Su aplicación solo es valida para procesos nuevos. Es la más adecuada por su enfoque preventivo. De hecho, la naturaleza de la definición de la validación es bajo un ambiente prospectivo, que implícitamente incluye la prevención.

2.1.1.2 Validación retrospectiva. ²

Se define como: *“El estudio que se lleva a cabo para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que esta previsto basado en resultados obtenidos con la información histórica del producto involucrado en el proceso en cuestión”.*

Este tipo de validación solo aplica para procesos que ya llevan realizándose durante cierto tiempo. El principal problema es considerar cual es el tiempo ideal en el cual una empresa cuenta con información suficiente para históricamente fundamentar la validación de los proceso.

2.1.1.3 Validación concurrente. ²

Se define como: *“El estudio que se lleva a cabo para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que esta previsto basado en resultados obtenidos paralelamente durante el desarrollo del proceso del producto en cuestión”.*

Esto puede aplicarse bajo dos enfoques:

- o Productos nuevos: Se libera un producto al mercado sin tener la validación completa. Se tienen estudios a nivel desarrollo y estudios parciales de validación, pero en los primeros lotes que se distribuyen se obtiene la información complementaria de este estudio.
- o Productos antiguos: Se tiene productos con los cuales se ha trabajado mucho tiempo. Se continúa con la producción normal y a partir de la fecha planeada se consideran ciertos lotes como parte del estudio de validación.

La validación concurrente y la prospectiva son las más aceptadas por la entidad sanitaria.

2.1.1.4 Validación esbelta. ²

Se define como: *“El estudio que se lleva a cabo para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que esta previsto basado en resultados que consideran en su estudio la identificación de atributos críticos de calidad”*.

Este concepto surge de la industria, con el objetivo de cumplir sin tener que salirse de los límites. Con las nuevas corrientes que enfatizan la calidad por diseño y la importancia del desarrollo farmacéutico, las empresas han vuelto sus ojos al origen del producto y a la identificación de aquellos factores que realmente afectan la calidad del mismo, denominándolos *atributos críticos de calidad*. Estos últimos sirven de base para el desarrollo de la validación, puesto que esta última se tiene que centrar en el control de dichos atributos para garantizar el cumplimiento de las especificaciones.

2.1.1.4 Validación en tiempo real o verificación continua de calidad. ²

Se define como: *“El estudio que se lleva a cabo para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que esta previsto basado en resultados obtenidos lote a lote”*.

Este concepto es de aplicación reciente y refleja hacia donde se tendrá que migrar tarde o temprano.

2.2 Método Analítico. ^{1,2}

Un método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de una muestra.

Un analito se define como un componente específico en una muestra a medir en un análisis; por lo que un método analítico mide un componente específico

(analito) en una muestra y como todo proceso de medición, éste debe de ser confiable para ser utilizado con un propósito definido.

2.2.1 Clasificación de Métodos Analíticos. ¹

Los métodos analíticos se clasifican bajo los siguientes criterios:

- o En función de su estado regulatorio en:
 - Métodos farmacopeicos: todos aquellos métodos que aparecen en cualquier farmacopea (FEUM, USP, BP, etc.).
 - Métodos no farmacopeicos: aquellos métodos no compendiados en una farmacopea.

- o En función de su aplicación (NOM-059-SSA1 y NOM-073-SSA1) en :
 - Métodos para producto a granel.
 - Métodos para producto terminado.
 - Métodos para materia prima.
 - Métodos indicadores de estabilidad.

- o En función de la naturaleza de la respuesta analítica :
 - Métodos fisicoquímicos: cuando la respuesta es de carácter físico (absorción de luz, emisión de luz, voltaje, etc.) o químico (consumo de iones -OH , consumo de un acomplejante, etc.).
 - Métodos biológicos: cuando la respuesta es de carácter biológico (crecimiento de microorganismos, protección, muerte, etc.).

- o En función de su propósito analítico en:
 - Métodos para cuantificar el analito (contenido o potencia).
 - Métodos para establecer la presencia del analito a un límite.
 - Métodos para identificar al analito.

- o En función de la naturaleza del sistema de medición en:
 - Métodos en los cuales el instrumento de medición de la respuesta analítica, permite medir una señal de ruido (cromatógrafo de líquidos, cromatógrafo de gases, espectrofotómetros, etc.).
 - Métodos en los cuales el instrumento de medición no permite medir una señal de ruido (buretas, medidor de halos, potenciómetros, etc.).

2.3 Validación de Métodos Analíticos. ^{1, 2, 3 y 4.}

La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio y de la documentación correspondiente, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada; es decir cumple con un propósito.

Los métodos analíticos y su validación son un sistema crítico en el Aseguramiento de la Calidad en una empresa farmacéutica, ya que impacta de manera directa en la calidad del producto. Además de que estos deben ser validados de acuerdo con lo establecido en la Regulación Sanitaria correspondiente.

Serán validados al menos los métodos analíticos usados para:

- o Evaluación de insumos relacionados con el producto.
- o Evaluación del producto en sus diferentes etapas.
- o Pruebas de estabilidad.
- o Evaluación de limpieza y sanitización.

Además, cada método analítico contará con su protocolo de validación, reporte de validación correspondiente y cualquier cambio en el método validado contará con un control de cambios aprobado.

La validación de métodos analíticos es un sistema crítico en el Aseguramiento de la Calidad en una empresa farmacéutica, ya que impacta de manera directa en la calidad del producto. De manera moral y ética el profesional farmacéutico es el responsable de los procesos y por lo tanto de la calidad de estos. Mientras que, de manera económica, la validación impacta en las empresas por alcanzar una productividad elevada a costos menores, al utilizar métodos de prueba de menor costo, mantenimiento de análisis o tiempo de análisis entre otros. Finalmente, los métodos analíticos, deben ser validados de acuerdo con lo establecido en la Regulación Sanitaria correspondiente.

El presente trabajo esta basado en las siguientes referencias regulatorias:

- o Reglamento de Insumos para la salud: que establece que los establecimientos que se destinen a la fabricación de insumos, llevaran control analítico de estos. Dicho control deberá incluir la validación de las técnicas empleadas.
- o Norma Oficial Mexicana NOM-059-2006. Buenas Practicas de Fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados la fabricación de medicamentos.
- o Norma Oficial Mexicana NOM-0164-1998. Buenas prácticas de fabricación de fármacos.
- o Norma Oficial Mexicana NOM-073-2005. Estabilidad de medicamentos.

Las regulaciones anteriores, determinan la obligación de validar métodos analíticos. Estas regulaciones podrían ser modificadas por lo que es importante estar actualizados.

2.4 Parámetros de desempeño a evaluar.¹

En función de la aplicación analítica de un método, la siguiente tabla indica los parámetros de desempeño a estudiar en la validación de estos.

Tabla 2.1. Parámetros de desempeño.

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 ¹	SI ³	SI	SI	SI
EXACTITUD Y REPETIBILIDAD	SI	SI	NO	NO
LINEALIDAD DEL MÉTODO	SI	SI	NO	NO
PRECISIÓN DEL MÉTODO O PRECISIÓN INTERMEDIA ²	SI	SI	NO	NO
ESTABILIDAD ANALÍTICA ² 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.

Donde las siguientes determinaciones se refieren a:

- *Precisión del sistema:* Grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra referencia.
- *Adecuabilidad del sistema:* 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.

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

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

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

- *Linealidad del método:* Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito en la muestra o producto, dentro de un intervalo determinado.

- *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.

- *Estabilidad analítica de la muestra:* 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.

- *Robustez*: Capacidad del Método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método.
- *Tolerancia*: Reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos, por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación como pueden ser: equipos y/o columnas.

2.5 Sustancias de Referencia.¹

Las sustancias de referencia o estándares son importantes en la validación de métodos analíticos, ya que constituyen un componente propio del método y una herramienta en la evaluación de los parámetros de desempeño, lo que permite establecer la confiabilidad el sistema.

Para la selección y adquisición de las sustancias de referencia se debe de contar con procedimientos acordes para su manejo y aplicación correctos dentro del laboratorio que lleva a cabo las actividades de validación de métodos. Así mismo se debe de contar con registros de uso y una documentación que avale y una buena práctica en el manejo de dichas sustancias.

2.6 Documentación.^{1,4}

Las actividades de la validación de un método analítico, deben ser sustentadas por los siguientes documentos ya que es crítico documentar los registros analíticos:

a) Protocolo de validación. El contenido sugerido que debe tener es:

1. Título.
2. Propósito u objetivo.
3. Responsabilidades.

4. Plan de prueba. En este, se deben de describir los parámetros de desempeño que permitan verificar la aplicación analítica deseada.
5. Criterios de aceptación de cada parámetro.
6. Formato de registro de resultados.

b) Reporte. Cuyo contenido mínimo debe de ser:

1. Título.
2. Resultados.
3. Análisis de Resultados.
4. Confrontación contra los criterios de aceptación.
5. Conclusión.

2.7 Cromatografía Analítica. ^{5,6}

La cromatografía es un procedimiento de separación de los constituyentes de una mezcla. Se ha convertido en un método analítico de primer orden para identificar y cuantificar los compuestos de una fase líquida o gaseosa homogénea. El principio básico se fundamenta en los equilibrios de concentración de los compuestos presentes entre dos fases no miscibles de la que una, llamada fase estacionaria, esta inmovilizada en una columna o fijada sobre un soporte y la otra, llamada móvil, se desplaza al contacto de la primera. La elución a velocidades diferentes de los compuestos presentes por la fase móvil conduce a la separación. De todos los métodos analíticos e instrumentales la cromatografía es la que tiene el mayor campo de aplicabilidad en la industria farmacéutica.

En general el proceso de análisis por cromatografía analítica puede describirse de la siguiente manera:

- o Se inmoviliza en una columna un sólido finamente dividido llamado fase estacionaria.

- o Se coloca en la parte superior de la columna un pequeño volumen de muestra que hay que separar.
- o Se forza a la mezcla disuelta, a través de la fase móvil, a atravesar la columna para arrastrar los diversos constituyentes.
- o Adsorción sobre la fase estacionaria de la sustancia o sustancias a separar.
- o Separación de las sustancias adsorbidas por un flujo continuo de la fase móvil.
- o Si los compuestos de la muestra migran a diferentes velocidades, podrán separarse.
- o Recuperación progresiva de las sustancias separadas, si es el caso.
- o Análisis cualitativo y/o cuantitativo de las sustancias separadas y recuperadas.

2.7.1 Origen de la Cromatografía. ^{5, 6}

Al ruso Mikhail Semenovi Tswett se le atribuye la ideación de esta técnica de separación. Empleó la cromatografía alrededor de los años 1903-1906 para separar una mezcla de pigmentos vegetales (clorofila, xantofila, etc.), haciendo pasar estos a través de una columna de vidrio rellena de un sólido adsorbente (carbonato de calcio). Ya que los compuestos separados aparecían en bandas de distintos colores en la columna, llamó a la técnica cromatografía, pensando en *chroma* que significa color y *graphos* escritura, mientras que a la columna la llamó *cromatograma*.

Zecgmeister, enunció la primera definición técnica detallada en 1936 como “un proceso que permitía resolver una mezcla de solutos por su fijación selectiva y

liberación sobre la superficie sólida de un soporte, con la ayuda de un flujo continuo en una dirección dada”.

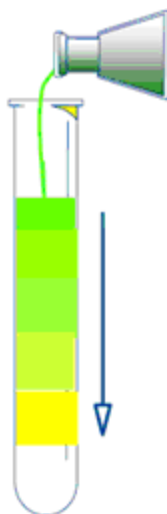


Fig. 2.1: Técnica de Tsweet.

La definición oficial, fue emitida por el Comité Especial de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (*IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry*) como: “un método usado primariamente para separar los componentes de una muestra, en el que dichos componentes se distribuyen en dos fases, una estacionaria, mientras que la otra se mueve. La fase estacionaria puede ser sólida o líquida soportada sobre un sólido, o un gel. La fase estacionaria puede presentarse en una columna o en lecho o film. La fase móvil puede ser gaseosa o líquida.

2.7.1.2 Fundamento de la separación cromatográfica. ⁵

Básicamente la separación cromatográfica se resume en cuatro reglas simples y concretas:

- o Fase móvil y fase estacionaria han de ser de polaridad opuesta.
- o Todos los solutos serán totalmente solubles en la fase móvil (igual polaridad).

- o Todo soluto que entra en la columna ha de salir de ella (propagación).
- o Y como objetivo, los solutos se separan entre sí (migración diferencial).

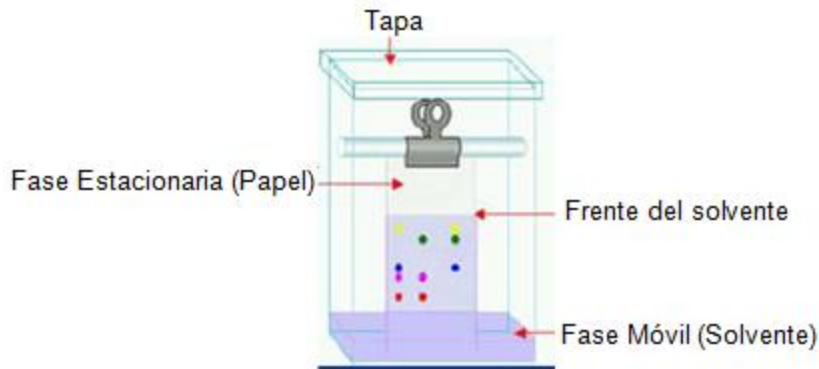


Fig. 2.2: Migración Diferencial en una separación de compuestos por cromatografía en capa fina.

2.7.2 Usos de la Cromatografía. ⁷

La cromatografía es una herramienta poderosa y versátil para separar especies químicas estrechamente relacionadas entre sí. Además, se puede emplear para la identificación cualitativa, a partir de los tiempos de retención característicos para cada compuesto, y la determinación cuantitativa de especies separadas, a partir de las áreas de los picos obtenidos durante la separación cromatográfica y que corresponden al compuesto a cuantificar.

2.7.3 Clasificación de las técnicas cromatográficas. ^{6, 7}

Las técnicas cromatográficas pueden clasificarse según la naturaleza física de las fases, según el procedimiento utilizado o según el fenómeno fisicoquímico originario del coeficiente de distribución K . La clasificación mencionada a continuación da prioridad a la naturaleza de las fases presentes:

2.7.3.1 Cromatografía líquida.^{6,7}

En este tipo de cromatografía la fase móvil es un líquido y engloba la forma más antigua conocida como método preparativo de separación. Esta categoría puede dividirse según el fenómeno aplicado:

- o *Cromatografía líquido-sólido*: la fase estacionaria es un sólido finamente dividido sobre el que las moléculas se adhieren por un doble efecto de adsorción física y química.
- o *Cromatografía iónica*: la fase estacionaria lleva en la superficie sitios iónicos y la fase móvil es una solución buffer acuosa. La fase estacionaria permite el intercambio de estos contra-iones móviles con iones del mismo signo de la muestra.
- o *Cromatografía de exclusión*: la fase estacionaria es un material con poros cuyas dimensiones se eligen en relación con el tamaño de los componentes o especies que hay que separar. De este modo se realiza un tipo de tamiz a escala molecular, de permeabilidad selectiva. Esta técnica está designada por los términos de filtración en gel o permeabilidad en gel, según la naturaleza respectiva acuosa u orgánica de la fase móvil.
- o *Cromatografía líquido-líquido*: la fase estacionaria es un líquido inmovilizado sobre un material inerte y poroso que solo emplea un papel como apoyo.
- o *Cromatografía de afinidad*: para inmovilizar la fase estacionaria (generalmente se trata de un polímero de tipo líquido) se fijan de forma definida las especies que la componen por enlaces covalentes.

2.7.3.2 Cromatografía de gases. ^{6,7}

En la cromatografía de gases la fase móvil es un gas inerte y puede dividirse según el fenómeno aplicado en:

- o *Cromatografía gas-líquido*: la fase móvil es un gas y la fase estacionaria es un líquido inmovilizado por impregnación o por enlace sobre un soporte inerte que puede ser simplemente la pared de la columna.
- o *Cromatografía gas-sólido*: la fase estacionaria es un sólido poroso (grafito o gel de sílice) y la fase móvil es un gas. Este tipo de cromatografía es muy efectiva para análisis de mezclas de gases o de compuestos con bajo punto de ebullición.

2.7.3.3 Cromatografía de fluidos supercríticos. ^{6,7}

La fase móvil es un fluido en estado supercrítico. La fase estacionaria puede ser un líquido o un sólido. En este método se reúnen las ventajas propias de los métodos anteriores.

En la tabla 2.2 se muestra la clasificación de los métodos cromatográficos en columna y el tipo de fenómeno de separación.

2.8 Elución Cromatográfica.⁷

La elución es un proceso en el cual los solutos son arrastrados a través de una fase estacionaria por el movimiento de una fase móvil. La fase móvil que sale de la columna se conoce como eluato.

Un eluyente es un disolvente que se usa para transportar los componentes de una mezcla a través de la fase estacionaria.

Tabla 2.2: Clasificación de los métodos cromatográficos en columna.

Clasificación General	Método Específico	Fase Estacionaria	Tipo de equilibrios.
Cromatografía de gases.	Gas-líquido.	Líquido adsorbido o unido a una superficie sólida.	Reparto entre gas y líquido.
	Gas-sólido.	Sólido.	Adsorción.
Cromatografía de líquidos.	Líquido-líquido o reparto.	Líquido adsorbido o unido a una superficie sólida.	Reparto líquidos inmiscibles.
	Líquido-sólido o adsorción.	Sólido.	Adsorción.
	Intercambio iónico.	Resina de intercambio iónico.	Intercambio iónico.
	Exclusión por tamaño.	Líquido en los intersticios de un sólido polímero.	Reparto o tamizado.
	Afinidad.	Líquido con grupos específicos unido a una superficie sólida.	Reparto entre líquido superficial y líquido móvil.
Cromatografía de fluidos supercríticos.	Fase móvil: Fluido supercrítico.	Espécie orgânica unida a una superficie sólida.	Reparto entre fluido supercrítico y superficie unida.

2.9 El Cromatograma.⁷

Si el detector que responde a la concentración de soluto se coloca en el extremo final de una columna durante la elución y se representa gráficamente su señal en función del tiempo (o del volumen de la fase móvil añadida), se obtiene una serie de picos. Ese diagrama, conocido como *cromatograma*, es útil tanto para el análisis cualitativo como para el análisis cuantitativo. La posición de los picos sobre el eje tiempo (línea base) puede usarse para identificar a los componentes de la muestra; las áreas bajo los picos proporcionan una medida cuantitativa de la cantidad de cada especie, si la separación es incorrecta aparecerán picos solapados.

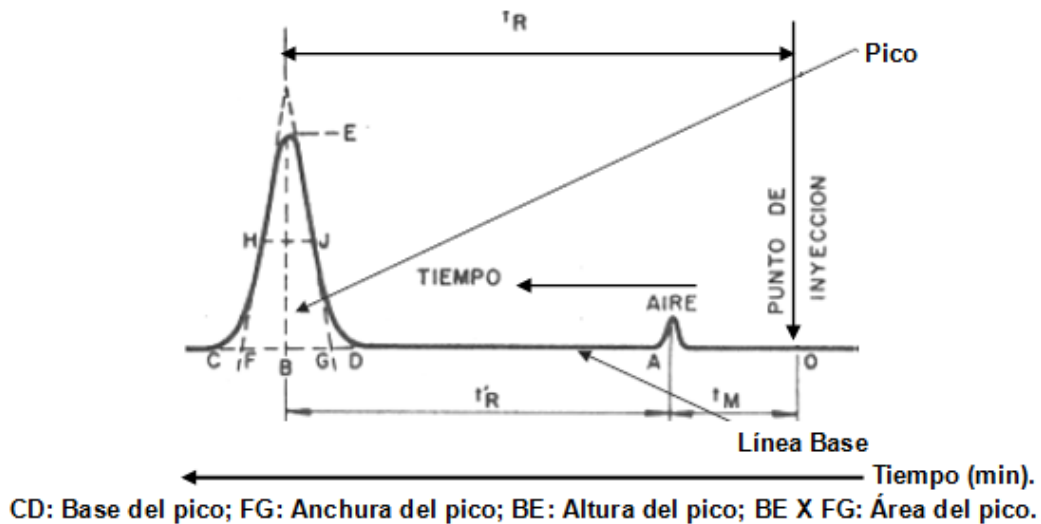


Fig. 2.3 Representación Cromatográfica.

2.10 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC).^{6,7}

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, comúnmente llamada por su abreviatura, HPLC (del inglés *High Performance Liquid Chromatography*), constituye una técnica analítica de uso muy generalizado. Deriva de la evolución de la cromatografía preparativa en columna cuyos resultados, en términos de selectividad y de resolución, han mejorado mucho por la disminución en tamaño y la utilización de fases estacionarias muy elaboradas.

Estas fases, constituidas generalmente por micropartículas esféricas cuyo diámetro está comprendido entre 2 y 5 μ m, producen una pérdida de presión a la fase móvil para obtener un caudal conveniente.

2.10.1. Instrumentación.^{6,7}

Un equipo HPLC se compone de varios módulos con funciones definidas, que están integrados en la misma carcasa o bien se presenta en bloques diferentes unidos entre ellos:

- o *Recipientes de fase móvil y sistemas de tratamiento de disolventes*: los aparatos de HPLC modernos están equipados con uno o más recipientes de vidrio para contener a los disolventes. Frecuentemente incluyen accesorios para eliminar los gases disueltos y partículas en suspensión de los líquidos. De ellos los primeros producen burbujas en la columna y pueden causar

ensanchamiento de la banda; además, tanto las burbujas como las partículas interfieren en el rendimiento de los detectores. Los desgasificadores pueden consistir en un sistema de bomba de vacío, uno de destilación, un dispositivo para calentamiento y agitación o, un sistema de burbujeo (*sparring*).

- o *Sistema de bombeo*: los requisitos de las bombas para HPLC incluyen: capacidad para generar presiones de hasta 6000psi, salida libre de pulsos, velocidades de flujo de 0.1-10 ml/min, reproducibilidad relativa de los flujos de 0.5% o mejor y resistencia a la corrosión por diversos disolventes. Existen tres tipos de bombas: las de tipo de jeringa impulsada por tornillo, las bombas de vaivén u oscilantes y las bombas neumáticas o de presión constante. El tipo de bomba más utilizado es el oscilante, que consiste en una pequeña cámara cilíndrica que se llena y vacía con el movimiento oscilante de un pistón. Tienen gran adaptación a la elución en gradiente y de flujo constante.
- o *Sistema de inyección de muestras*: el sistema de inyección de muestras más usado se basa en un bucle de muestras. Este tipo de dispositivo es parte integral de algunos equipos. Frecuentemente se encuentran bucles intercambiables de una amplia gama de tamaños que varía de 5 a 500 μ L. Muchos instrumentos de HPLC incluyen un muestreador dotado de un inyector automático, que permite la inyección continua de volúmenes variables.
- o *Columnas para HPLC*: las columnas de cromatografía líquida usualmente se elaboran con tubos de acero inoxidable. La mayoría de las columnas tienen una longitud de 10-30cm y diámetro interno de 2-5mm. Los empaquetamientos de las columnas suelen ser de partículas de 3-5 μ m. Las columnas de este tipo proporcionan de 40 000 a 60 000 platos por metro. El empaquetamiento más común en la cromatografía líquida se prepara con partículas de sílice, que se sintetizan por aglomeración de partículas submicrónicas de sílice en condiciones que producen partículas más grandes y de diámetro uniforme. Las partículas resultantes suelen cubrirse con películas orgánicas finas, que se enlazan química o físicamente con la

superficie. Otros materiales de empaquetamiento son las partículas de alúmina, polímeros porosos o resinas de intercambio iónico.

- o *Termostatos para la columna:* en muchas aplicaciones, no es necesario el control estricto de la temperatura de la columna, y las columnas se usan a temperatura ambiente. Sin embargo, es frecuente que obtengan mejores cromatogramas al mantener temperaturas de columna constante. Muchos instrumentos están equipados con calentadores que controlan la temperatura de la columna, de temperatura ambiente hasta 150° C.
- o *Detectores:* los detectores de HPLC deben de tener un volumen muerto bajo para minimizar el ensanchamiento de banda adicional de columna. El detector debe ser pequeño y compatible con el flujo de líquido. No se cuenta con un detector universal altamente sensible para HPLC del tipo de los usados en cromatografía de gases. Así pues, el detector usado depende de la naturaleza de la muestra. A continuación se enumeran algunos de los detectores usados en HPLC:

- | | |
|----------------------------|----------------------------|
| 1. Absorbancia | 7. FTIR |
| 2. Fluorescencia | 8. Dispersión de luz. |
| 3. Electroquímico | 9. Fotoionización |
| 4. Índice de refracción | 10. Selectivo de elementos |
| 5. Conductividad | 11. Actividad óptica |
| 6. Espectrometría de masas | |

Los detectores más usados en cromatografía líquida se basan en la absorción de luz ultravioleta o visible.

La siguiente figura muestra los componentes básicos para un sistema HPLC:

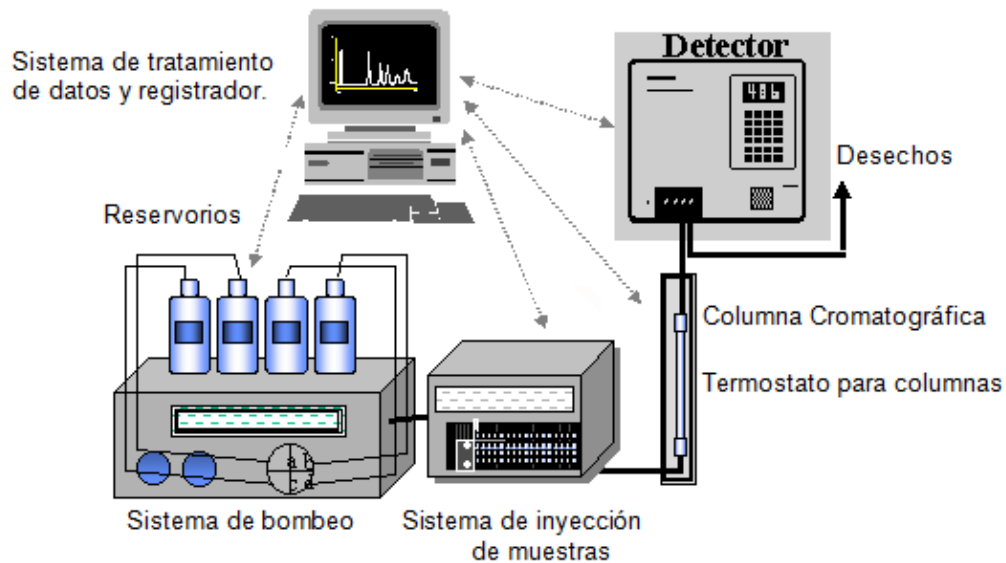


Figura 2.4: Componentes básicos para un sistema HPLC.

Finalmente un equipo HPLC puede ser representado de la siguiente forma:

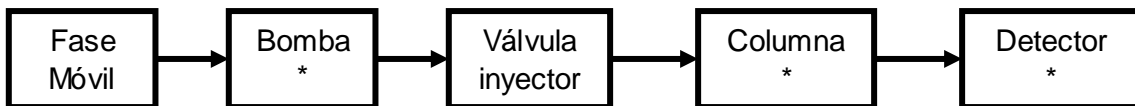


Diagrama 2.5: Esquema de los componentes del equipo HPLC.

2.10.2 Parámetros Cromatográficos. ^{5, 6, 7}

Los parámetros cromatográficos son claves para el diseño de un análisis, pues son herramientas que ayudan a evaluar las condiciones en las que se está llevando a cabo. Cada soluto tendrá asociado un *tiempo de retención* distinto que se puede expresar como el *factor de capacidad*, y la relación de los tiempos de retención o factores de capacidad de los solutos nos indicará si la selectividad del sistema es buena. Al calcular la *resolución* se podrá evaluar si la separación entre los tiempos de retención de los solutos es suficiente o excesiva. El cálculo de los *platos teóricos* nos indicará la eficiencia del sistema.

Una vez evaluados los parámetros cromatográficos, se podrá determinar si el cromatograma obtenido es aceptable, o si es necesario modificar alguna condición para optimizarlo.

A continuación se presentan los parámetros cromatográficos usados en el análisis por HPLC:

o *Tiempo muerto (t_M)*: es el tiempo en que una especie no retenida tarda en pasar a través de una columna cromatográfica. Todos estos componentes de una muestra tardan esta cantidad de tiempo en la fase móvil. Las separaciones se basan en los diferentes tiempos que pasan los componentes en la fase estacionaria (t_s).

o *Tiempo de retención (t_R)*: es el tiempo transcurrido entre la inyección de una muestra y la aparición de un pico de soluto en el detector de una columna cromatográfica o tiempo en el que tarda en salir un soluto de la columna.

$$t_R = t_s + t_M$$

o *Constante de reparto (K)*: mide la distribución del analito entre la fase móvil y la fase estacionaria.

$$K = \frac{C_s}{C_M}$$

C_s : concentración del analito en la fase estacionaria (mol/L)
 C_M : concentración del analito en la fase móvil (mol/L)

o *Factor de capacidad (K')*: Para un soluto A esta relacionada con la velocidad con la cual A migra a través de la columna. Es la cantidad de tiempo que pasa un soluto en la fase estacionaria en relación con el tiempo que pasa en la fase móvil. Describe la velocidad de migración de los analitos en la columna.

$$K = \frac{t_s}{t_M}$$

Ha de estar entre 1 y 5. Si el valor es mayor los tiempos de retención son demasiado largos. Si es menor el tiempo de retención es muy corto y difícil de determinar.

- o *Factor de selectividad (α)*: se establece en función de la constante de reparto de los solutos. Para los solutos A y B se define como la relación de la constante de distribución del soluto más fuertemente retenido (B) con respecto a la constante de distribución para el soluto retenido con menos fuerza (A).

$$\alpha = \frac{K_A}{K_B}$$

El factor de selectividad proporciona una medida de la eficacia con la que la columna puede separar a los analitos.

- o *Resolución (R)*: la resolución de una columna indica cual es la separación entre dos bandas en relación con su anchura. La resolución representa una medida cuantitativa de la capacidad de la columna para separar dos analitos A y B.

$$R = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$

W_A y W_B : anchura de los picos A y B.

Si R es mayor a 1.5 la separación cromatográfica es completa.

- o *Eficiencia*: es un indicador del ensanchamiento de un pico durante su separación, y esta reflejada por el numero de platos teóricos (N) de la columna donde se realiza el proceso cromatográfico.

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

- o *Asimetría o factor de coleo*: es una medida de la simetría del pico. Para los picos perfectamente simétricos le corresponde un valor de 1.0 y su valor aumenta a medida que la simetría es más pronunciada.

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

$W_{0.05}$ = 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.

- o *Volumen muerto (V_0)*: Volumen de fase móvil necesario para desplazar un soluto no retenido desde el inyector al detector.

$$v_0 = 0.6 \times \left(\frac{DI}{2} \right)^2 \times (\pi) \times \left(\frac{L}{F} \right)$$

v_0 = Volumen muerto; 0.6 = Factor de constante; DI = Diámetro interno de columna en cm;
 π = 3.1416; L = Longitud de columna en cm; F = Flujo de Fase Móvil en ml/min.

2.10 Preparados farmacéuticos. ^{8,9}

Se denominan preparados farmacéuticos, formas farmacéuticas o medicamentosas, formas de dosificación, o simplemente preparados a los productos elaborados a partir de fármacos para poder ser administrados en el organismo.

Estos preparados pueden tener uno o varios fármacos y son diseñados por el farmacéutico o la industria farmacéutica. Existen en estado sólido, semisólido, líquido y gaseoso.

La preparación de formas farmacéuticas debe realizarse siguiendo procedimientos de BPF, por personal debidamente capacitado y bajo estricto control, para al final de la fabricación y durante la vida útil de la especialidad o preparado farmacéutico cumpla con las pruebas de identidad, pureza, actividad

o potencia y los requisitos según la forma farmacéutica y la vía de administración.

Para verificar la calidad de los productos, tanto los organismos oficiales como la industria pueden utilizar diversos métodos de análisis si los juzgan más convenientes a sus necesidades, los cuales deben de estar validados.

Las especialidades farmacéuticas o preparados farmacéuticos pueden llevar sustancias adicionales o aditivos, tales como colorantes, saborizantes, conservadores, diluyentes, bases, desintegrantes, reguladores, etc. Para dar mayor estabilidad, elegancia, aceptación, facilitar su preparación o uso, etc. Siempre y cuando estén aprobados por la bibliografía oficial correspondiente.

Los aditivos preparados en cualquier preparado farmacéutico deben de cumplir con los siguientes requisitos: no deben ser dañinos en la cantidad usada, no deben agregar en cantidad mayor a la requerida para dar el efecto deseado, su presencia no debe interferir con la biodisponibilidad, eficacia, efecto terapéutico o seguridad del preparado y no debe de obstaculizar las pruebas y ensayo de análisis.

Además, es indispensable que todos los preparados en su presentación final, medicamentos, estén etiquetados con la siguiente información: nombre del producto, forma farmacéutica, vía de administración, composición (cualitativo y cuantitativa de todos los ingredientes que tengan actividad terapéutica o farmacológica y los conservadores), contenido del envase, lote, fecha de fabricación o de caducidad, nombre y domicilio de fabricante y registro ante Secretaría de Salud, además de cualquier otra leyenda y/o disposición emitida por las autoridades oficiales competentes.

Los preparados farmacéuticos pueden clasificarse de manera general como a continuación muestra el diagrama:

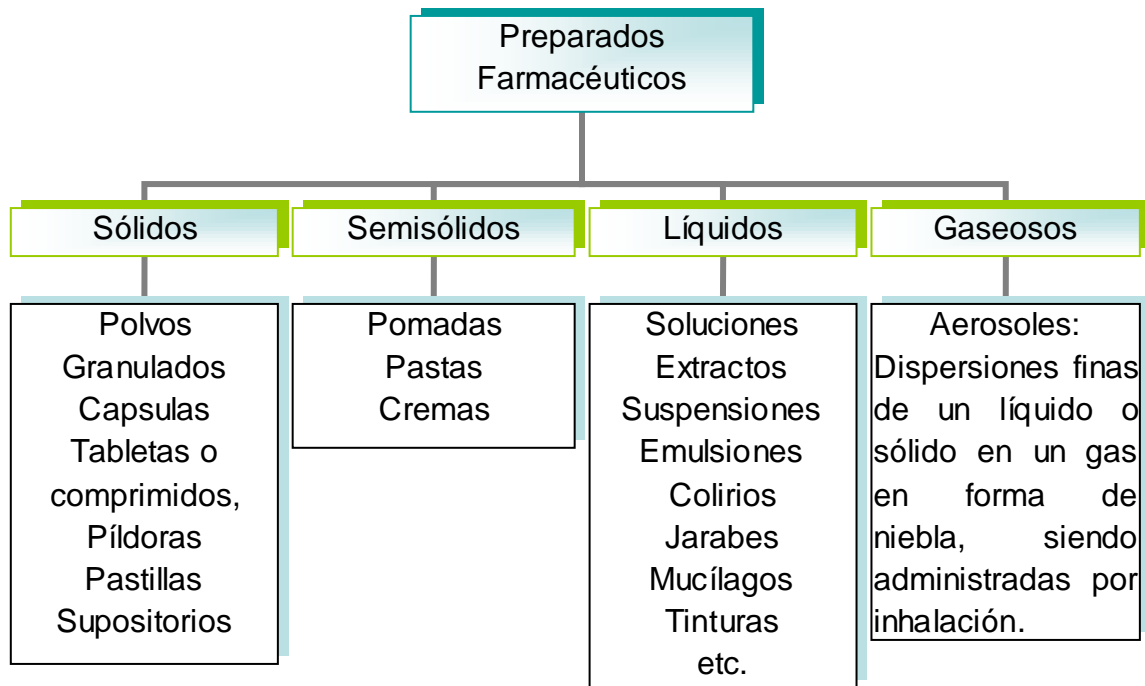


Diagrama 2.1 Clasificación de Preparados Farmacéuticos.

2.11.1 Solución Oftálmica.

Las soluciones oftálmicas son preparaciones estériles, libres de partículas extrañas, que contienen uno o más fármacos disueltos generalmente en agua y cuya finalidad es la aplicación tópica en los ojos, estable química y biológicamente y no irritante a la córnea.

Es importante considerar la toxicidad del fármaco, la isotonicidad, la elección de los agentes amortiguadores y conservadores, la esterilización y el envase adecuado.

Las soluciones oftálmicas deben ser isotónicas, viscosas, estériles y de preferencia tener un pH cercano al del líquido lacrimal entre 7.0 y 7.4.

La isotonicidad se logra agregando cloruro de sodio u otra sal en caso de existir compatibilidad. El líquido lacrimal tiene un valor de isotonicidad que corresponde a una solución al 0.9% de cloruro de sodio, idealmente una solución oftálmica deberá tener ese mismo valor de isotonicidad. Los márgenes

considerados como no irritantes para el ojo, van de 0.6 a 2.0% de cloruro de sodio. Algunas soluciones oftálmicas son necesariamente hipertónicas para favorecer la absorción y proveer de una adecuada concentración de principios activos para una acción terapéutica efectiva.

El aumentar la viscosidad de las soluciones, reduce la posibilidad de que el fármaco sea eliminado por el lagrimeo y por lo tanto aumenta el tiempo de contacto del fármaco con la córnea, aumentando el efecto terapéutico del producto. Los derivados de la celulosa: metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, en concentraciones que van desde 0.25 a 1.0% son los agentes viscosantes comúnmente usados.

Existen otras sustancias que pueden ser adicionadas a las soluciones oftálmicas como tensoactivos para favorecer la solubilidad de ciertos principios activos.

La esterilidad es primordial para no generar en el ojo enfermo una nueva lesión como sería una posible infección producida por una solución oftálmica contaminada.

Para lograr un pH adecuado, en algunos casos se agregan algunas sustancias amortiguadoras como el acetato de sodio y ácido bórico que son soluciones isotónicas con capacidad amortiguadora mayor que la de los fosfatos y que además disminuye notablemente la irritación.

Lo ideal sería elaborar soluciones oftálmicas estériles en frascos monodosis pero dado los posibles problemas que esto acarrearía en el acondicionamiento y el elevado costo de elaboración, las preparaciones se presentan en el mercado como multidosis y en este caso es imprescindible, para asegurar su esterilidad durante todo el periodo de su vida útil, el agregar conservadores.

Los conservadores no deben ser irritantes, ni tóxicos al tejido ocular, a pesar de un uso prolongado, deben ser compatibles con los demás componentes de la

formulación y tener una alta actividad bactericida frente un amplio espectro de microorganismos y no deben de interferir con los análisis propuestos.

2.12 Tobramicina.

La tobramicina es un antibiótico aminoglucósido de amplio espectro especialmente destinado para bacterias del tipo Gram (-) del tracto genital de la mujer, la cual cobra vital importancia en la recepción neonatal, debido a su uso como profilaxis antibiótica contra las conjuntivitis bacterianas de los neonatos. También es usada en cuadros de infección conjuntival de niños y adolescentes.

Presenta un espectro de actividad in vivo similar al de la gentamicina. Es particularmente útil en aerosoles para los pacientes con fibrosis quística y enfermedades pulmonares crónicas con infección por *Pseudomonas aeruginosa*. La resistencia bacteriana a la tobramicina es similar a la de la gentamicina por acción de las mismas enzimas bacterianas.

Nombre sistemático (IUPAC):

- 4-amino-2-[4,6-diamino-3-[3-amino-6-(aminometil)-5-hidroxi-tetrahidropirano-2-il]oxi-2-Hidroxi-ciclohexoxi]-6-(hidroximetil) tetrahidropirano-3,5-diol.

Formula condensada:

- $C_{18}H_{37}N_5O_9$

Estructura química:

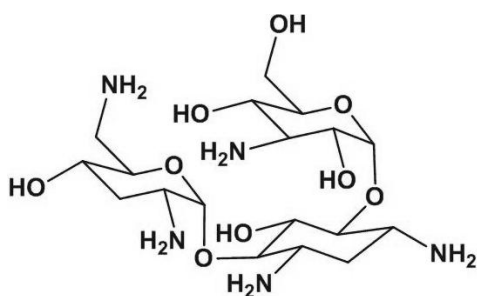


Fig. 2.4: Estructura química de la Tobramicina.

Peso molecular:

- 467.515 g/mol

Actividad:

- Bactericida

Farmacocinética:

- Unión proteica: < 30%.
- Vida media: Neonatos < 1200g: 11 hrs; > 1200g: 2-9hrs.
Adultos 2-3hrs.
- Inicio de la acción terapéutica: 30 – 90 min.
- Duración de la acción terapéutica: 6 – 8 hrs.

Vías de administración:

- IV, IM, inhalación, oftálmica.

Mecanismo de acción:

A través de la difusión, atraviesa la membrana externa bacteriana y alcanzan el espacio periplásmico. Posteriormente a través de un mecanismo activo oxígeno dependiente, penetra la membrana interna citoplasmática y provoca en esta, alteraciones en su funcionalismo, se une finalmente a polisomas e inhibe la síntesis bacteriana.

Su sitio intracelular de acción es la subunidad ribosómica 30s de los ribosomas de la célula bacteriana, que provoca error de la lectura del RNA mensajero con producción de una proteína anómala, la cual unida a las alteraciones funcionales de la membrana (induce fuga de sodio, potasio y otros componentes esenciales) producen la muerte bacteriana.

Espectro de actividad antimicrobiana:

La tobramicina es activa contra cepas susceptibles de *Staphylococcus*, incluyendo *S. aureus*, *S. epidermidis* (coagulasa positivo y coagulasa negativo),

y cepas resistentes a la penicilina, *Streptococcus*, incluyendo especies de grupo A (especies β -hemolíticas), especies no hemolíticas y *Streptococcus pneumoniae*. La tobramicina también es activa contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Haemophilus influenzae* y *H. aegyptius*, *Moraxella lacunata*, *Acinetobacter calcoaceticus* y algunas especies de *Neisseria*.

Indicaciones:

Infecciones en: hueso, SNC, intraabdominales, peritonitis, vías respiratorias, septicemias, piel y mucosas, tracto urinario.

Contraindicaciones:

Sensibilidad a aminoglucósidos, embarazó, lactancia, ancianidad, uso de otros medicamentos que interacciones con los aminoglucósidos.

2.13 Cloruro de Benzalconio.

2.13.1 Monografía del Cloruro de benzalconio. ¹²

Nombre químico:

- o Cloruro de alquildimetil-(fenilmetil)-amonio

Sinónimos:

- o Cloruro de alquil-benzil-dimetil-amonio
- o Cloruro de alquil-dimetil- benzil-amonio

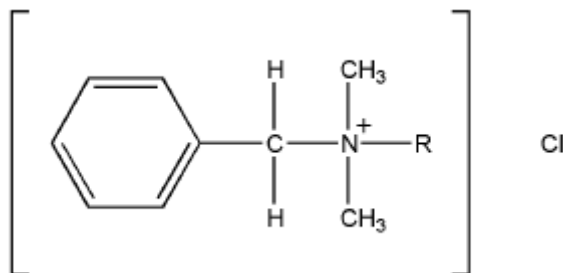
Fórmula condensada y peso molecular:

El Cloruro de Benzalconio es una mezcla de cloruros de alquil-benzil-dimetil-amonio de fórmula general $[C_6H_5CH_2N(CH_3)_2R]Cl$, 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-C₁₄H₂₉ y n-C₁₆H₃₃ comprendiendo la mayor proporción de la mezcla.

El peso molecular promedio del cloruro de benzalconio es de 360 g/mol.

Estructura química:



R= mezcla de alquilos, desde n-C₈H₁₇ hasta n-C₁₈H₃₃, principalmente n-C₁₂H₂₅ (dodecil), n-C₁₄H₂₉ (tetradecil) y n-C₁₆H₃₃ (hexadecil).

Fig. 2.5: Estructura química de Cloruro de Benzalconio.

Categoría Funcional:

Conservador antimicrobiano; antiséptico; desinfectante; agente solubilizante; agente humectante.

Aplicaciones:

Cloruro de benzalconio es un compuesto de amonio cuaternario usado en formulaciones farmacéuticas como un conservador antimicrobiano en aplicaciones similares a otros tensoactivos catiónicos, como la Cetrimida.

En preparaciones oftálmicas, el cloruro de benzalconio es uno de los conservadores más comúnmente usados, a concentraciones de 0.01 a 0.02% p/v. algunas veces es usado en combinación con otros conservadores, particularmente con Edetato disódico, para aumentar la actividad antimicrobiana contra cepas de *Pseudomonas sp.*

En formulaciones nasales y óticas es usado a concentraciones de 0.002 a 0.02% p/v, algunas veces en combinación con Timerosal. El cloruro de benzalconio a concentración de 0.01% p/v es también empleado como conservador en productos parenterales de pequeño volumen.

El cloruro de benzalconio se usa además como conservador en productos cosméticos.

Descripción:

El cloruro de benzalconio se presenta como un polvo blanco o amarillo claro y como un gel espeso o gelatinoso. Es higroscópico y jabonoso al tacto, tiene un olor suave y aromático, de sabor amargo.

Propiedades fisicoquímicas:

- o pH: 5 – 8 en solución acuosa al 10% p/v
- o Densidad: $\approx 0.98 \text{ g/cm}^3$ a 20 °C.
- o Punto de Fusión: $\approx 40 \text{ °C}$
- o Solubilidad: prácticamente insoluble en éter, muy soluble en acetona, etanol (95%), metanol, propanol y agua. Las soluciones acuosas de cloruro de benzalconio forman espuma cuando se agitan, tienen una baja tensión superficial y poseen propiedades detergentes y emulsificantes.
- o El cloruro de benzalconio es higroscópico, y puede ser afectado en presencia de luz, aire y algunos metales.

Actividad antimicrobiana:

Las soluciones de cloruro de benzalconio son activas contra un amplio rango de bacterias, levaduras y hongos. La actividad es más marcada contra

bacterias Gram (+) que Gram (-) y con actividad mínima contra endosporas bacterianas. La actividad antimicrobiana del cloruro de benzalconio es significativamente dependiente de la composición de la mezcla de homólogos alquilos.

El cloruro de benzalconio es inefectivo contra algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Trichophyton interdigitale*, y *T. rubrum*. Sin embargo, combinado con Edetato disódico o alcohol bencílico la actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* aumenta. La actividad antimicrobiana del cloruro de benzalconio también puede ser aumentada con la adición de acetato fenil mercúrico, borato fenil mercúrico, cetrimida o *m*-cresol. En la presencia de buffers de fosfato o de citrato la actividad contra *Pseudomonas sp* puede disminuir.

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.

Seguridad

El cloruro de benzalconio usualmente no causa irritación, ni sensibilidad y es bien tolerado normalmente en soluciones aplicadas en la piel. Sin embargo, el cloruro de benzalconio ha sido asociado a diversos efectos cuando se usa en algunas formulaciones farmacéuticas.

Ototoxicidad puede presentarse cuando el cloruro de benzalconio es aplicado en el oído y el contacto prolongado con la piel puede ocasionar irritación e hipersensibilidad. También se conoce que el cloruro de benzalconio puede

causar broncoconstricción en algunos pacientes asmáticos cuando es usado en soluciones nebulizadoras.

Experimentos toxicológicos en conejos han mostrado que el cloruro de benzalconio es perjudicial para el ojo en concentraciones más altas que las usadas normalmente como conservador.

La irritación local de garganta, esófago, estomago e intestino puede presentarse con un contacto prolongado y con soluciones concentradas (>0.1% p/v). La dosis mortal oral de cloruro de benzalconio en humanos es estimada de 1-3g. Los efectos adversos seguidos de una ingestión oral incluyen vomito, colapso y estado de coma. Dosis tóxicas provocan parálisis respiratoria, disnea y cianosis.

CAPÍTULO III: DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS

3.1 Introducción.

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-C₈H₁₇ y extendiéndose a través de homólogos mayores, con n-C₁₂H₂₅, n-C₁₄H₃₃ comprendiendo la porción mayor.

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

3.2 Algoritmo para la cuantificación total de Cloruro de Benzalconio.

En este método los homólogos son separados de otros excipientes de la formulación por HPLC. La respuesta o área total del cloruro de benzalconio 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.

$$Area_Total = (PM_{C_{12}} \times Area_{C_{12}}) + (PM_{C_{14}} \times Area_{C_{14}}) + (PM_{C_{16}} \times Area_{C_{16}}) + (PM_{C_{18}} \times Area_{C_{18}})$$

Para la cuantificación total de cloruro de benzalconio se utiliza el siguiente algoritmo:

$$\%RECOBRO_{BAC} = \left(\left(\frac{Area_Total_Muestra}{Area_Total_STD} \right) \left(\frac{Concentración_STD}{Concentración_Muestra} \right) \right) \times 100$$

3.3 Condiciones del método.

Columna	Phenomenex Luna Cyano de 4.6 mm de D.I. x 150 mm de longitud, 5 µm o equivalente.
---------	---

Velocidad de Flujo	1.0 ml/min.
Longitud de onda del detector	214nm
Volumen de Inyección	30 μ L
Fase móvil	Acetonitrilo: Buffer de Fosfato pH 3.0
Proporción de fase móvil	55%:45% (ACN:Buffer)

3.4 Soluciones y Reactivos

Preparación de buffer de fosfato pH 3.0

Pipetear 3.0 mL de ácido Fosfórico concentrado en 1000 mL de Agua Purificada. Ajustar el pH a 3.0 con Hidróxido de Sodio al 50%

Preparación de estándar de referencia Stock (1.0 mg/mL)

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. Caducidad 6 meses a Temperatura Ambiente.

Preparación de 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

3.5 Parámetros Cromatográficos del Sistema

Platos teóricos por columna para C12	\geq 1500
Factor de coeolo para C12	\leq 2.0
Resolución entre C12 y C14	\geq 2.0
%CV	\leq 2.0%

3.6 Preparación de la muestra

Para la preparación de la muestra del preparado farmacéutico tobramicina Solución oftálmica a la concentración de trabajo de 0.02 mg/mL se muestra en la Tabla I, como indica el método analítico:

Tabla I: Preparación de la muestra.

Preparado farmacéutico	Concentración BAC (%)	Alícuota	
		En 5 mL	En 10 mL
Tobramicina Solución Oftálmica	0.01	1.0 mL	2.0 mL

La preparación de la muestra puede ser turbia o brumosa.

CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA EXPERIMENTAL DE LA VALIDACIÓN

4.1 Parámetros de Desempeño

En función de la aplicación analítica del método, en este caso de valoración, los parámetros de desempeño a evaluar, de acuerdo a la Guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de QFB's, son los siguientes:

- o Precisión del Sistema
- o Linealidad del Sistema
- o Especificidad
- o Exactitud y Repetibilidad
- o Linealidad del Método
- o Precisión Intermedia
- o Estabilidad Analítica de la Muestra
- o Robustez
- o Tolerancia

4.2 Metodología y Criterios de Aceptación

4.2.1 Precisión de Sistema

Se preparó un sextuplicado de soluciones del estándar a la concentración nominal de trabajo 0.02 mg/ml (100% del analito en estudio) preparadas por pesadas independientes utilizando estándar de referencia secundario de Cloruro de Benzalconio. Midiendo la respuesta analítica bajo las mismas condiciones.

Procedimiento:

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

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

De la solución B, se tomó una alícuota de 4 ml y fue transferida a un matraz volumétrico de 20 ml, se llevó 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 a partir de la respuesta analítica obtenida:

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

Criterios de aceptación:

- %CV del Fr del sistema \leq al 1.5%

4.2.1.1 Adecuabilidad del sistema.

Se inyectó por sextuplicado la solución estándar. Reportándose la respuesta del analito, e informándose los siguientes datos de adecuabilidad:

- | | |
|--|-------------|
| - Platos teóricos por columna para C12 | \geq 1500 |
| - Factor de coleccionamiento para C12 | \leq 2.0 |
| - Resolución entre C12 y C14 | \geq 2.0 |
| - %CV de la respuesta analítica | \leq 2.0% |

La adecuabilidad del sistema fue reportada al inicio de cada experimento para verificar que el sistema de medición funciona apropiadamente, independientemente de los factores ambientales.

4.2.2 Linealidad del Sistema.

Se preparó un triplicado a 5 niveles de concentración (intervalo) de la solución estándar. Donde la concentración central debe ser igual al 100% del analito en estudio y el intervalo debe incluir la especificación de los límites de estabilidad que van del 90 al 120%.

La curva fue 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 se transfirió una alícuota de 5 ml a un matraz volumétrico de 50 mL. Llevándose al aforo con agua purificada. Se obtuvo una concentración final aproximada de 0.1 mg/mL (**Solución B**).

De la solución B se construyó la curva de la linealidad, tomando las alícuotas y llevando al volumen final con fase móvil indicado en la Tabla No. 4.1.

Tabla 4.1: Curva para Linealidad del Sistema

Nivel de 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

Se analizó usando un sistema cromatográfico de tal forma que se determinó el rango lineal de la respuesta como función de la concentración. Se inyectó 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 (β_1).
- Coeficiente de determinación " r^2 "

- Coeficiente de correlación “r”.

Criterios de aceptación:

- $r > 0.9925$
- $r^2 > 0.985$
- IC (β_1) no debe incluir el cero.
- IC (β_0) debe incluir al cero.
- % Error de intercepto en Y en el punto medio $< 5\%$.
- %CV $\leq 2\%$ relación resp/conc.

4.2.3 Especificidad.

Debido que no se cuenta con estándares de productos de degradación de Cloruro de Benzalconio se analizó por triplicado muestras de placebo, placebo adicionado y el analito (cloruro de benzalconio), sometiendo éstas a las cuatro vías de degradación (medio ácido, medio básico, oxidación y temperatura).

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

Procedimiento:

El placebo adicionado se preparó de la siguiente manera: se pesaron 100mg de Materia Prima (la materia prima se encuentra al 50% de concentración aproximadamente) en un matraz volumétrico de 50mL, se llevó al aforo con agua purificada. Se agitó y posteriormente se transfirió una alícuota de 5ml a un matraz volumétrico de 50mL, se llevó al aforo con placebo del producto.

Esta última solución tuvo una concentración final de 0.1mg/ml (**Solución C**).

De la solución C se tomaron 2.0 ml, 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 transvasó 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. 4.2.

Tabla 4.2: 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)	6hrs 80° C	1 mL de NaOH 38%	1 mL de HCL 37%
Acida (HCL)	6hrs 80° C	1 mL de HCL 37%	1 mL de NaOH 38%
Calor	7.5hrs/80° C	NA	NA
Oxidación H ₂ O ₂	50min 80° C	1 mL de Peróxido 85%	NA

Reporte de datos:

Tabular los resultados y calcular los siguientes datos a partir de la respuesta analítica obtenida:

- % Recobro para los placebos, placebos adicionados y el analito degradados y sin degradar.
- % CV de los placebos, placebos adicionados y el analito degradados y sin degradar.

Criterio de aceptación:

- La respuesta del método únicamente debe ser debida al analito.

4.2.4 Exactitud y Repetibilidad del Método.

Se adicionó a un placebo del producto el analito al 100% tomando los pesos correspondientes para preparar 6 muestras independientes. Se analizó los placebos adicionados contra estándar de trabajo de Cloruro de Benzalconio, como se indica en el método analítico.

Procedimiento:

Se preparó el placebo adicionado del preparado farmacéutico tobramicina solución oftálmica de la siguiente manera: se pesaron 200mg de materia prima del analito (la materia prima de cloruro de benzalconio se encuentra al 50% de concentración aproximadamente) y se depositaron en un matraz volumétrico de 100mL, se llevó al aforo con agua purificada. Se agitó, esta solución obtuvo una concentración final aproximada de 1 mg/mL.

De esta solución se tomó una alícuota de 5 mL y se transfirió a un matraz volumétrico de 50mL, se llevó al aforo con placebo de producto y se obtuvo una concentración final aproximada de 0.1mg/ml de BAC de esta solución (**Solución D**).

De la solución D se tomó una alícuota de 4 mL y fue depositada en un matraz volumétrico de 20 mL, se llevó al aforo con fase móvil, según esta indicado en el método, para tener una concentración final aproximada de 0.02 mg/ml de cloruro de benzalconio en la muestra.

Reporte de datos:

Tabular los resultados y calcular los siguientes datos estadísticos a partir de la respuesta analítica obtenida:

- Media de los datos.
- Desviación estándar.
- Coeficiente de variación o desviación estándar relativa (% CV).
- Adecuabilidad del Sistema.
- % Recobro
- Intervalo de confianza de la media poblacional (IC (μ)).

Criterios de aceptación:

- %CV \leq 2.0%

- IC (μ) debe incluir al 100%
- Recobro 100% + 2% o que el promedio aritmético se encuentre dentro
- del rango de 98 – 102%

4.2.5 Linealidad del Método

Se construyó una curva de placebos adicionados a 3 niveles de concentración (80%,100% Y 120%), de acuerdo a los límites de estabilidad, para Cloruro de Benzalconio, que van de 90 a 120% de concentración, se analizó por triplicado cada punto de la curva contra una solución de estándar de concentración conocida.

Procedimiento:

A partir de un placebo adicionado preparado de la siguiente manera:

Se pesaron 100mg de materia prima y fueron depositados en un matraz volumétrico de 50mL, se llevó al aforo con agua purificada. Se agitó, esta solución llegó a una concentración final aproximada de 1mg/ml (la materia prima esta al 50% de concentración aproximadamente). Se tomó una alícuota de 4 ml y se transfirió a un matraz volumétrico de 50 ml, se llevó al aforo con placebo del producto, esta solución llegó una concentración final aproximada de 0.08mg/ml de cloruro de benzalconio (**Solución E**).

Se añadió a un matraz volumétrico de 10 ml la alícuota establecida en la tabla No. 4.3 para tener las concentraciones necesarias de Cloruro de Benzalconio.

Tabla 4.3: Curva para Linealidad del Método

Concentración. de la curva %	Vol. de placebo adicionado mL (Solución E)	Solución	Volumen final aforo con fase móvil	Conc. Teórica final mg/ml
80	2.0	F	10.0 mL	0.016
100	2.5	G	10.0 mL	0.020
120	3.0	H	10.0 mL	0.024

De la solución **C** transferir 2.0 ml a un matraz de 10 ml. Llevar al aforo con fase móvil. Se tiene una concentración final aproximada de 0.016 mg/ml (**Solución F**).

De la solución **C** transferir 2.5 ml a un matraz de 10 ml. Llevar al aforo con fase móvil. Se tiene una concentración final aproximada de 0.020 mg/ml (**Solución G**).

De la solución **C** transferir 3.0 ml a un matraz de 10 ml. Llevar al aforo con fase móvil. Se tiene una concentración final aproximada de 0.024 mg/ml (**Solución H**).

Reporte de datos.

Tabular los resultados y calcular los siguientes datos estadísticos a partir de la respuesta analítica obtenida:

- La relación cantidad adicionada vs. cantidad recuperada.
- La pendiente (b_1)
- La ordenada al origen o intercepto en y (b_0).
- El coeficiente de determinación (r^2)
- La desviación estándar relativa de la regresión ($CV_{y/x}$).
- El intervalo de confianza para la pendiente IC (β_1).
- El intervalo de confianza para la ordenada al origen IC (β_0).
- % Recobro (Media, Desviación estándar y %CV)
- IC (μ) media poblacional del recobro.

Criterios de aceptación:

- $r^2 \geq 0.985$
- IC (β_1) debe incluir al uno.
- IC (β_0) debe incluir al cero
- $CV \leq 2\%$ relación mg recuperados entre mg adicionados.
- % Recobro $100\% \pm 2\%$
- IC (μ) debe incluir al 100% o que el promedio aritmético se encuentre dentro del rango de 98 – 102%

4.2.6 Precisión Intermedia

Determinar el % de analito en muestras de producto al 100% de analito, por 2 diferentes analistas en 2 diferentes días, usando el mismo estándar de referencia y equipo.

Procedimiento:

Se analizó por triplicado una muestra homogénea del producto en dos diferentes días y por dos analistas diferentes. Siguiendo la técnica de preparación del producto establecida en el método analítico.

Reporte de datos:

Tabular los resultados y calcular los siguientes datos a partir de la respuesta analítica obtenida:

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

Criterios de Aceptación:

- % CV \leq 2 para la reproducibilidad en cada grupo de datos.
- % CV \leq 2 para la reproducibilidad en el total de datos de las muestras.

4.2.7 Estabilidad Analítica de la Muestra

Se determinó el tiempo en que la muestra analítica es estable para su análisis en las condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente y refrigeración durante un tiempo preestablecido.

Procedimiento:

Se prepararon tres muestras de placebo adicionado al 100%, cada muestra se fraccionó en tres partes y se vaciaron en viales cada muestra fraccionada para analizar contra un estándar recientemente preparado en lapsos de tiempo inicial, 24, 48 y 72hrs. a temperatura ambiente y en refrigeración 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:

Tabular los resultados y calcular los siguientes datos a partir de la respuesta analítica obtenida:

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

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%.

4.2.8 Robustez

De acuerdo a las condiciones cromatográficas de análisis establecidas en el método analítico, se realizaron pequeñas modificaciones en estas y se evaluaron de acuerdo a las condiciones cromatográficas normales.

Procedimiento:

Se analizó una muestra de placebo adicionado al 100% por triplicado contra un estándar de concentración conocida, modificando los parámetros cromatográficos del método indicados en la Tabla No. 4.4.

Tabla 4.4: 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	45% Buffer pH 3.0 55% Acetonitrilo	50% Buffer pH 3.0 50% Acetonitrilo	40% Buffer pH 3.0 60% Acetonitrilo
Velocidad de Flujo	1.0 ml/min.	0.8 ml/min.	1.2 ml/min.
Volumen de inyección	30 µL	20 µL	50 µL

Reporte de datos:

Tabular los resultados y calcular los siguientes datos a partir de la respuesta analítica obtenida:

- 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.

Criterios de aceptación:

- La diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición alternativa respecto de la media aritmética del análisis inicial no debe variar más del 2%.
- Los parámetros de adecuabilidad del sistema deben cumplir conforme lo establecido en las condiciones cromatográficas del método.

4.2.9. Tolerancia:

Se realizaron modificaciones a factores externos del método para evaluar la reproducibilidad de los resultados analíticos bajo estas condiciones.

Procedimiento:

Se analizó una muestra de producto homogénea por triplicado contra un estándar de concentración conocida en 2 columnas diferentes y en dos equipos diferentes por un solo analista en un mismo día, como se muestra en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5: Parámetros a evaluar en la prueba de robustez.

Parámetro modificado	Condición Base	Condición Alternativa	Condición Alternativa
Marca de la Columna	Luna CN 5 micras. Phenomenex 150 mm x 4.6 mm	Spherisorb CN RP 5 micras Waters 150 mm x 4.6 mm	NA
Cromatógrafo de Líquidos	F. 087	F. 185	NA

Reporte de datos:

Tabular los resultados y calcular los siguientes datos a partir de la respuesta analítica obtenida:

- Media X
- Desviación estándar
- Coeficiente de variación $\%CV \leq 2.0\%$

Criterios de aceptación:

- La diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición alternativa respecto de la media aritmética del análisis inicial no debe variar más del 2%.
-

4.3 Resumen de Parámetros de Desempeño

PARÁMETRO DE DESEMPEÑO	DETERMINACIÓN	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
PRECISIÓN DEL SISTEMA	Determinar 6 replicas de estándares a la concentración nominal de trabajo.	CV del Fr del sistema \leq al 1.5%
LINEALIDAD DEL SISTEMA	Preparar una curva estándar de 5 puntos mínimo 2 puntos arriba del 100%, 2 puntos abajo del 100% y el 100%. Inyectar por triplicado.	$r \geq 0.9925$ ó $r^2 \geq 0.985$ IC (β_1) no debe incluir el cero. IC (β_0) debe incluir al cero % Error de intercepto en Y en el punto medio $\leq 5\%$ %CV $\leq 2\%$ relación resp/conc. Si el intervalo de confianza de la ordenada al origen o intercepto en Y no contiene al cero, calcular el % error en los límites superior e inferior
ESPECIFICIDAD	Analizar la interferencia del placebo degradado, del placebo degradado y el analito sometido a 4 diferentes vías de degradación por triplicado en cada condición.	No debe interferir ningún pico en el tiempo de retención del analito.
PRECISION DEL METODO (REPETIBILIDAD)	Determinar 6 replicas de placebos adicionados a la concentración nominal.	CV o %RSD $\leq 2.0\%$ IC(μ) debe incluir al 100% Recobro $100\% \pm 2\%$ o que el promedio aritmético se encuentre dentro del rango de 98 – 102%
LINEALIDAD DEL METODO	Determinar la linealidad a partir placebos adicionados a tres diferentes niveles de concentración de activo (LI-20%, LS + 20% y el 100%). Preparar por triplicado cada nivel.	$r^2 \geq 0.985$ IC (β_1) debe incluir al uno. IC (β_0) debe incluir al cero CV $\leq 2\%$ relación mg recuperados / mg adicionados. % Recobro $100\% \pm 2\%$ IC(μ) debe incluir al 100% o que el promedio aritmético se encuentre dentro del rango de 98 – 102%
PRECISIÓN INTERMEDIA	Determinar una muestra de producto analizado por triplicado en 2 días diferentes por 2 diferentes analistas, usando el mismo estándar de referencia y equipo.	%CV $\leq 2\%$ Calcularse la variabilidad usando la tabla de anova o anadeva.
ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	Análisis por triplicado de placebo adicionado mantenida en diferentes condiciones de almacenamiento y analizadas en diferentes tiempos de análisis pre-establecidos, contra el estándar.	La diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto de la media aritmética del análisis inicial no debe variar más del 2%.
ROBUSTEZ	Análisis de la misma muestra por triplicado bajo diferentes condiciones de corrida (% fase, flujo, Vol. inyección, long columna)	CV $< 2\%$ /di/ $\leq 2\%$. Calcular los parámetros de adecuabilidad del sistema
TOLERANCIA	Una misma muestra analizada por triplicado bajo 2 condiciones de uso diferente (equipo y columna) comparadas contra condiciones base.	CV $< 2\%$ /di/ $\leq 2\%$.

CAPITULO V: RESULTADOS

5.1 Precisión del Sistema.

Tabla 5.1: Estudio de Precisión del Sistema.

	Concentración STD mg/mL	Fr Sistema Conc. STD/Área STD
STD1	0.02112	8.032E-11
STD2	0.02112	8.069E-11
STD3	0.02112	8.059E-11
STD4	0.02112	8.066E-11
SDT5	0.02112	8.067E-11
STD6	0.02112	8.104E-11
	Media =	8.066E-11
	% CV =	0.28%

*Las áreas para realizar los calculas se obtuvieron de la tabla 10.1.

Criterio de aceptación:

Valor obtenido:

% CV \leq 1.5 %

0.28 % \leq 1.5 %

La Precisión del Sistema: **CUMPLE**

5.2 Adecuabilidad del Sistema.

Tabla 5.2: Parámetros de Adecuabilidad el Sistema.

Muestra	Platos Teóricos	Factor de Coleo	Resolución para C14
STD1	5996	1.30	2.3
STD2	5990	1.31	2.3
STD3	5490	1.30	2.3
STD4	5789	1.31	2.4
SDT5	5886	1.30	2.3
STD6	5940	1.30	2.3
Media =	5849	1.30	2.3
% CV =	1.10	0.18	0.69

Criterio de aceptación:

Platos teóricos por columna para C12 ≥ 1500

Factor de coleo para C12 ≤ 2.0

Resolución entre C12 y C14 ≥ 2.0

%CV $\leq 2.0\%$

La Adecuabilidad del Sistema: **CUMPLE**

5.3 Linealidad del Sistema:

Tabla 5.3: Estudio de Linealidad del Sistema.

	% Conc.	Respuesta		Resp. / Conc.
		Área	Media	
STD1	63.360%	162170068	158914772	2508125
		156926532		
		157647716		
STD2	84.48%	207956780	208900677	2472783
		207973360		
		210771892		
STD3	105.600%	259484384	259860296	2460798
		260445844		
		259650660		
STD4	126.720%	309354620	311140232	2455336
		309558236		
		314507840		
SDT5	147.840%	362199932	363605280	2459451
		363530836		
		365085072		

*Las áreas para realizar los cálculos se obtuvieron de la tabla 10.3.

<u>Cálculos:</u>	<u>Valor obtenido:</u>	<u>Criterio de aceptación:</u>
Sensitividad (pendiente= b1)	2461965	NA
Intercepto (b0)	500782	NA
Intervalo de confianza al 95% . Pendiente	246195 +/- 9205 2471170 a 2452759	No incluye al cero
Intervalo de confianza al 95% . intercepto	500782 +/- 1749759 -1248977 a 2250541	Contiene al cero
% error de y-intercepto del punto medio	0.20%	≤ 5%
Coef. Correlación (r)	0.999980	$r \geq 0.9925$
Coef. Determinación (r^2)	0.999961	$r^2 \geq 0.9850$
%CV resp/conc.	0.77%	≤ 2 %

La Linealidad del Sistema: **CUMPLE**

5.4 Especificidad.

A continuación se presentan los cromatogramas obtenidos en la prueba de especificidad para el placebo, placebo adicionado y estándar, en sus condiciones iniciales y las degradaciones correspondientes.

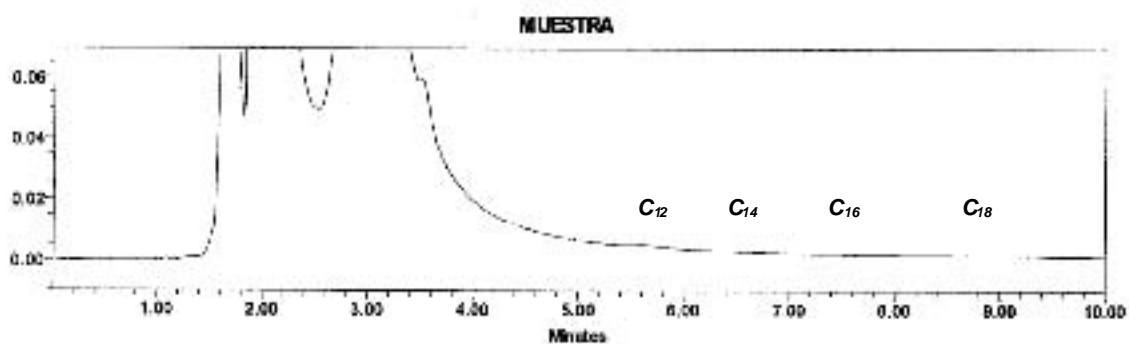


Fig. 5.4.1 Placebo Condición Inicial.

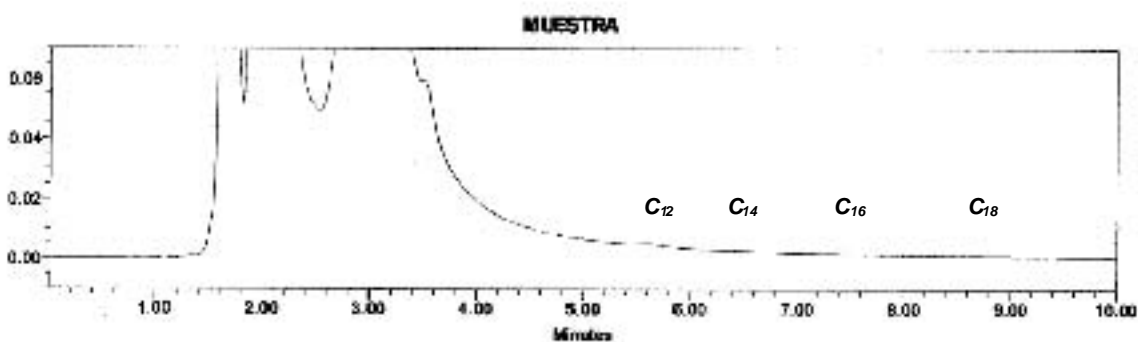


Fig. 5.4.2 Placebo degradado via acida.

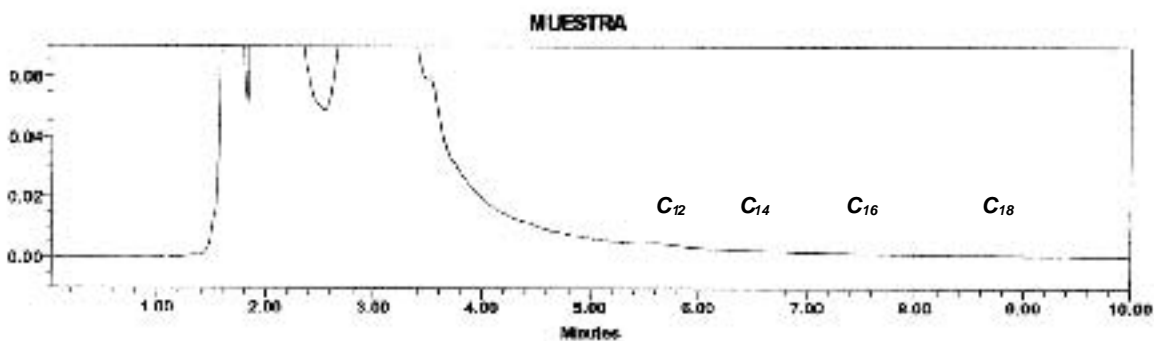


Fig. 5.4.3 Placebo degradado via básica.

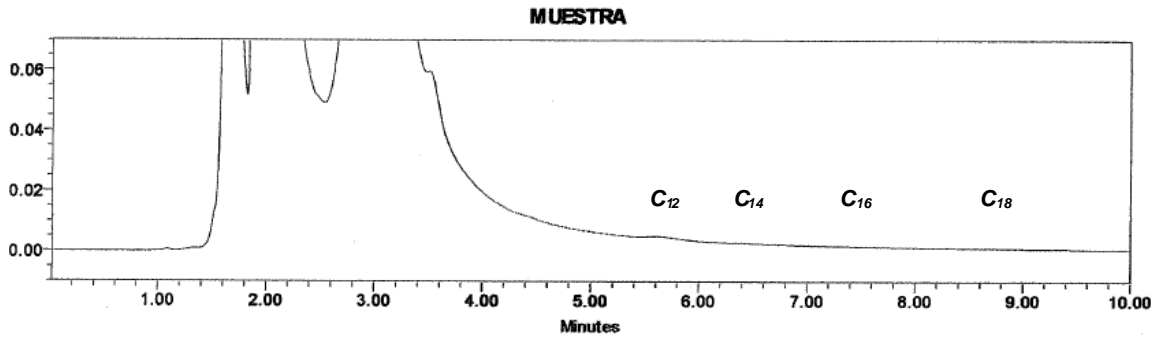


Fig. 5.4.4 Placebo degradado via calor.

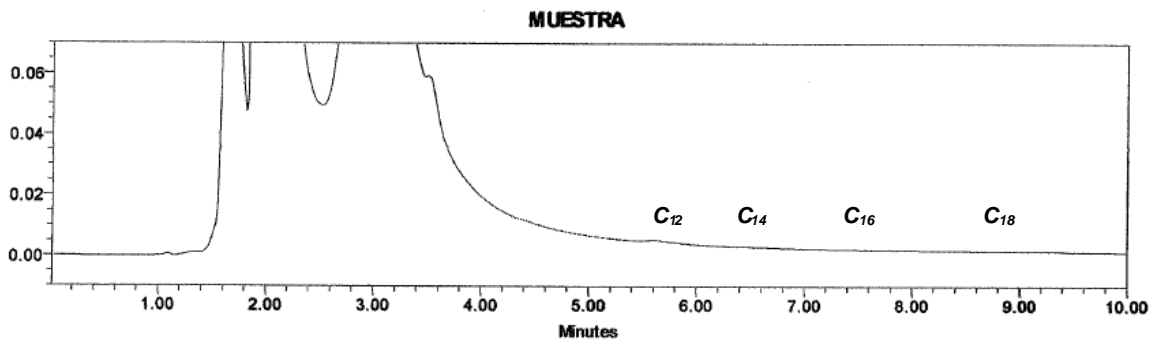


Fig. 5.4.5 Placebo degradado via oxidación.

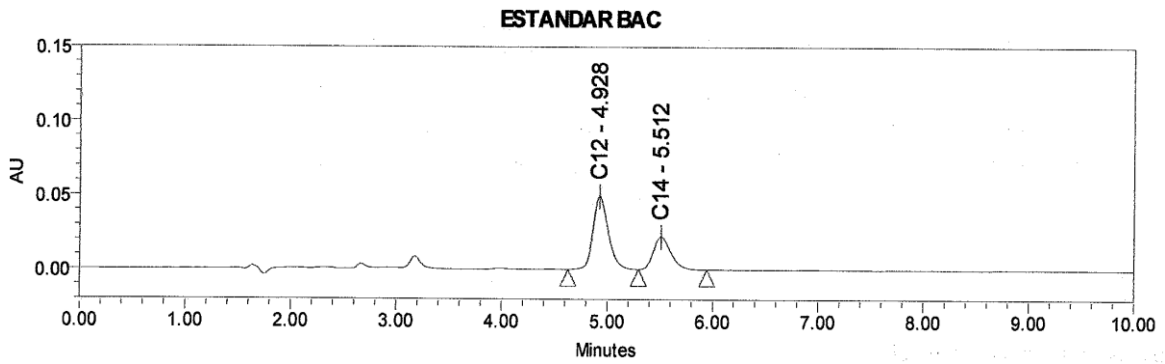


Fig. 5.4.6 Estándar condición inicial.

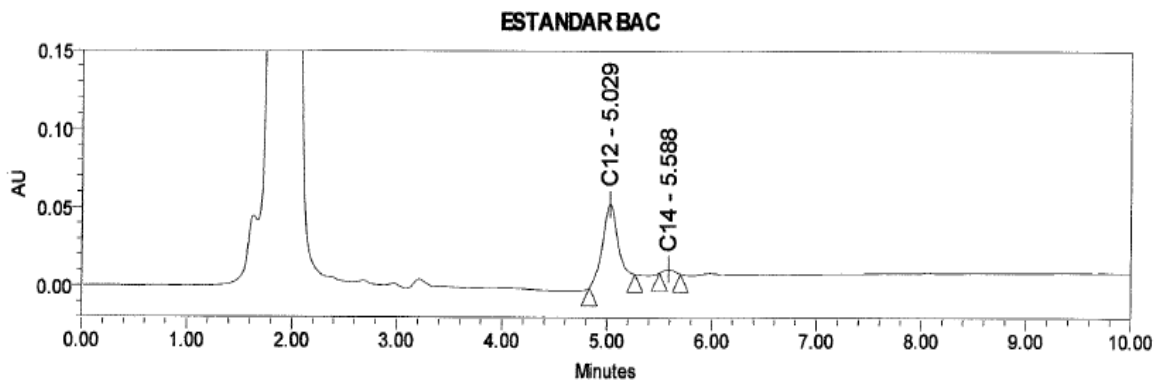


Fig. 5.4.7 Estándar degradado via acida.

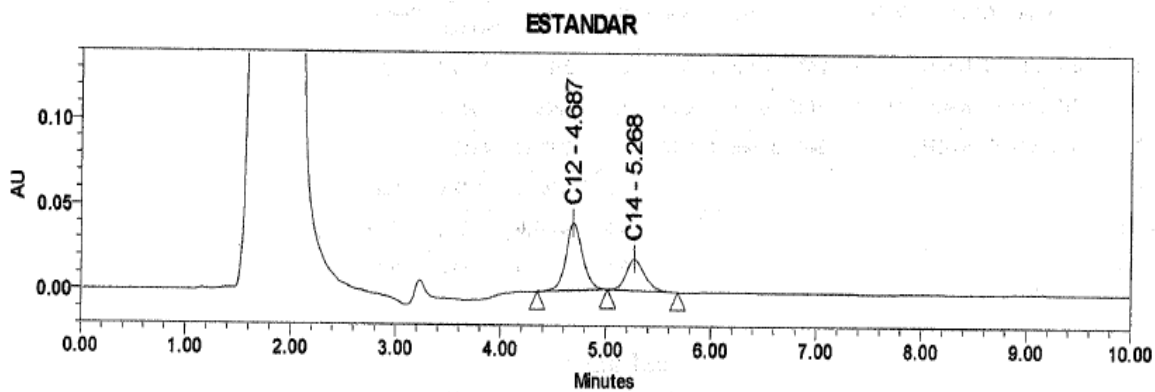


Fig. 5.4.8 Estándar degradado via básica.

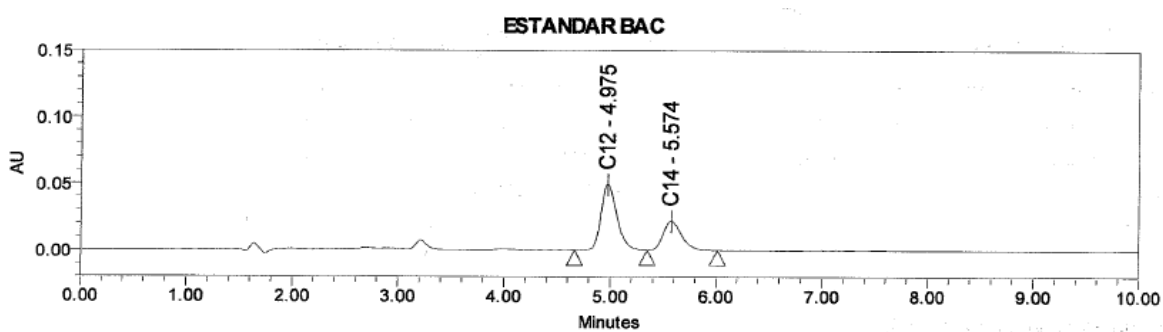


Fig. 5.4.9 Estándar degradado vía calor.

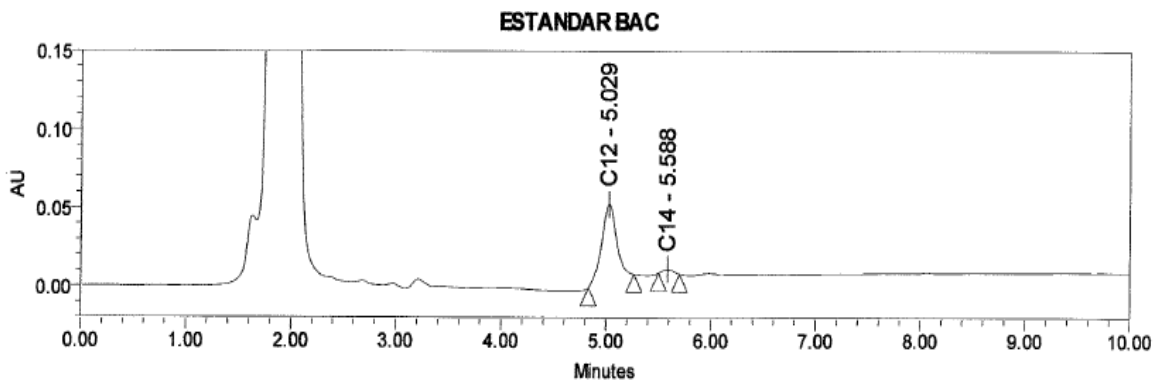


Fig. 5.4.10 Estándar degradado vía oxidación.

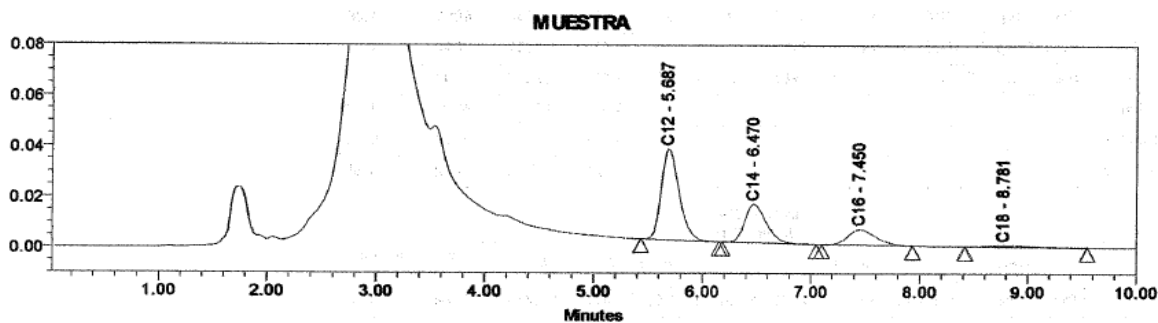


Fig. 5.4.11 PC condición inicial.

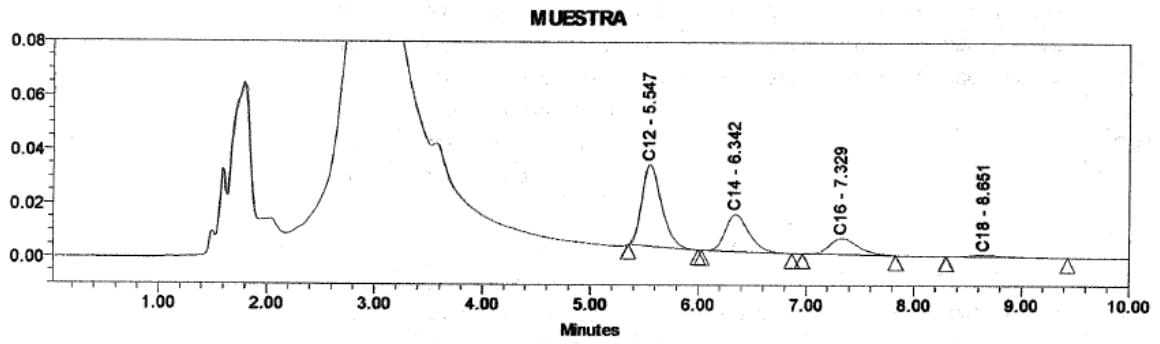


Fig. 5.4.12 PC degradado via acida.

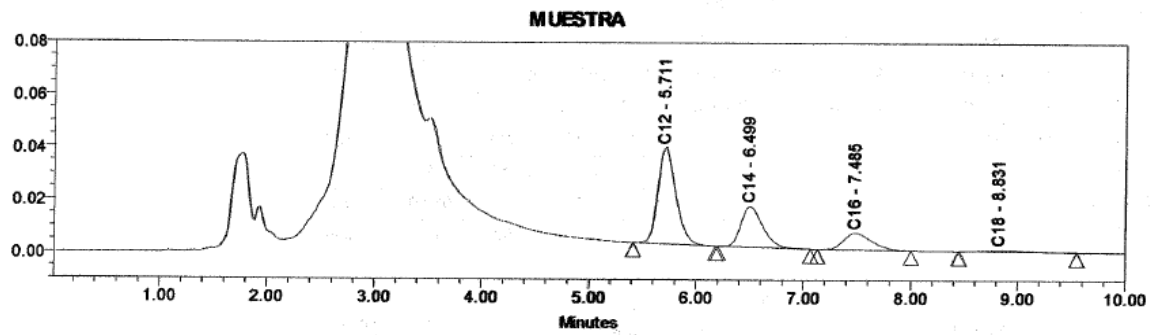


Fig. 5.4.13 PC degradado via básica.

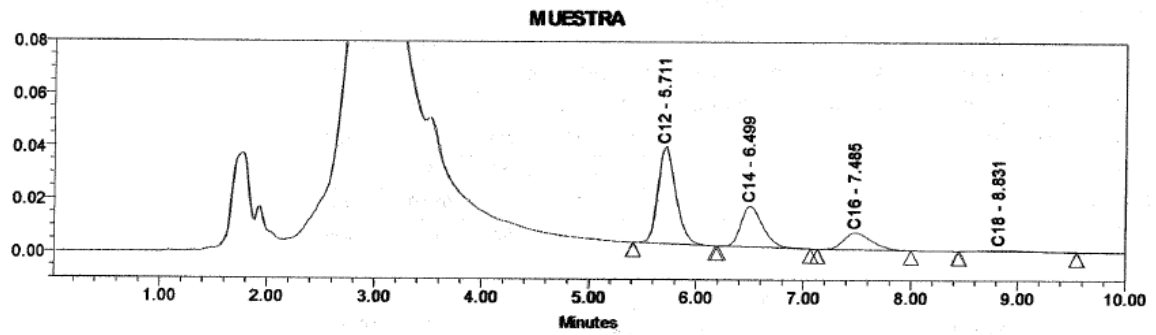


Fig. 5.4.14 PC degradado via calor.

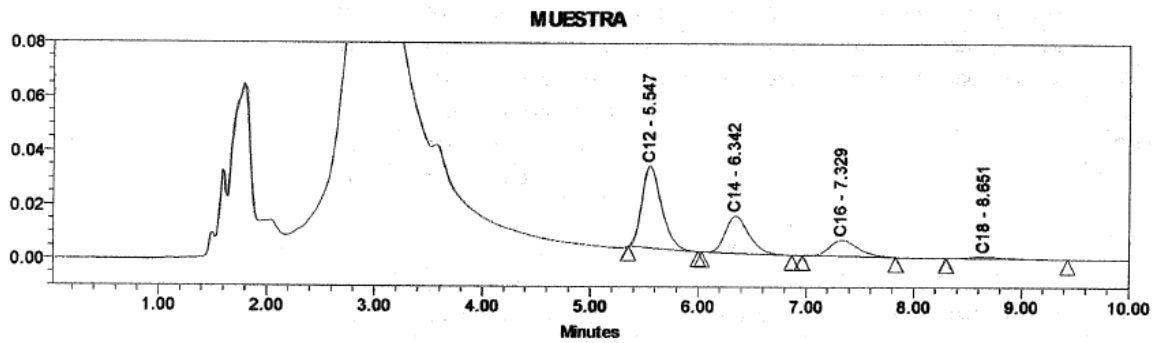


Fig. 5.4.15 PC degradado via oxidación.

En las pruebas de especificidad realizadas, los cromatogramas obtenidos por las cuatro vías de degradación no mostraron interferencia alguna con los picos principales para el análisis de cloruro de benzalconio, ni en el placebo degradado, ni en el estándar degradado y ni en el placebo cargado degradado.

Por lo anterior en método analítico es específico para el análisis de cloruro de benzalconio e indicativo de estabilidad.

Tabla 5.3.1: Estudio de Especificidad Placebo Cargado

Condición	% Base	% Degradado
Sin degradación	96.14	NA
NaOH / Calor 6 hrs	85.20	10.94
Sin degradación	95.49	NA
HCl / Calor 6 hrs	92.28	3.21
Sin degradación	98.27	NA
Calor 7.5 hrs	97.23	1.04
Peroxido / Calor	82.58	15.68

*Las áreas para realizar los cálculos se obtuvieron de las tablas 10.4.1 a la 10.4.15

Tabla 5.3.2: Estudio de Especificidad Estándar

Condición	% Base	% Degradado
Sin degradación	99.06	NA
NaOH / Calor 6 hrs	86.74	12.32
Peroxido / Calor	93.65	5.41
Sin degradación	100.55	NA
Calor 8 hrs	101.27	0.72
Sin degradación	98.40	NA
HCl / Calor 6 hrs.	64.75	33.65

*Las áreas para realizar los cálculos se obtuvieron de las tablas 10.4.16 a la 10.4.28.

Criterios de aceptación:

% CV recobro \leq 2 %

Ninguna interferencia en el tiempo de retención del cloruro de benzalconio

La Especificidad del Método: **CUMPLE**

5.4 Exactitud y Repetibilidad del Método.

Tabla 5.4: Estudio de Exactitud y Repetibilidad del Método.

	% de Recobro (Normalizado al 100%)
PC 1	100.44
PC 2	100.39
PC 3	101.69
PC 4	100.41
PC 5	101.19
PC 6	100.63
Media =	100.79
% Recobro =	0.79
% CV =	0.53

*Las áreas para realizar los cálculos se obtuvieron de las tablas 10.5.1 y 10.5.2.

Criterio de aceptación:

Valor obtenido:

Recobro de todo los valores ± 2 ($\leq 2\%$)

0.79 %

% CV ≤ 2.0 %

0.53 %

Intervalo (μ) debe contener al 100 o el promedio aritmético de recobro se incluya en el intervalo de 98 a 102%

100.79 %

La Exactitud y Repetibilidad del Método: **CUMPLE**

5.5 Linealidad del Método:

Tabla 5.5: Estudio de Linealidad del Método.

Nivel	Áreas	mg Adicionados	mg Recuperados	% Recobro
80%	209048556	0.01666	0.01658	99.56
	206129740	0.01652	0.01635	98.98
	208629280	0.01683	0.01655	98.35
100%	258786216	0.02082	0.02053	98.60
	255780804	0.02065	0.02029	98.26
	259998368	0.02103	0.02063	98.05
120%	311779436	0.02498	0.02473	98.99
	310057360	0.02478	0.02460	99.25
	312547492	0.02524	0.02479	98.23

*Las áreas para realizar los cálculos se obtuvieron de las tablas 10.6.1 y 10.6.2.

<u>Cálculos:</u>	<u>Valor obtenido:</u>	<u>Criterio de aceptación:</u>
Sensitividad (pendiente= b1)	0.9846	NA
Intercepto (b0)	0.00005	NA
Intervalo de confianza al 95% .		
Pendiente Ordenada al Origen	0.99518 a 1.00397 -0.00036 a 0.00046	Incluye al uno Incluye al cero
% CV y/x de la regresión lineal	0.41%	≤ 2%
Coef. Determinación (r ²)	0.9991	r ² ≥ 0.985
%CV resp/conc.	0.53%	≤ 2 %
% Recobro (100 ± 2 %) del 98 al 102 % para todos los puntos		

La Linealidad del Método: **CUMPLE**

5.6 Precisión Intermedia:

Tabla 5.6.1: Estudio de Precisión Intermedia
% de Recobro.

	Analista 1	Analista 2
Día 1	109.67	110.18
	109.95	110.96
	110.60	111.75
Día 2	111.67	110.74
	111.77	110.81
	111.53	108.82

Tabla 5.6.2: Estudio de Precisión Intermedia
% CV.

	Analista 1	Analista 2	
Día 1	0.43	0.71	0.69
Día 2	0.11	1.03	1.00
	0.83	0.89	

*Las áreas para realizar los cálculos se obtuvieron de las tablas 10.7.1 a la 10.7.8.

Cálculos:

Valor obtenido:

Criterio de
aceptación:

Media
S
%CV

110.70%
0.9247
0.84

CV ≤ 2%

La Precisión Intermedia: **CUMPLE**

5.7: Estabilidad Analítica de la Muestra:

Tabla 5.7: Estudio de Estabilidad Analítica de la Muestra.

Inicial	24 hrs		48 hrs		72 hrs	
96.76 %	TA %	REF %	TA %	REF %	TA %	REF %
	96.12	96.32	95.12	94.81	96.69	94.74
	Diferencia %		Diferencia %		Diferencia %	
	TA %	REF %	TA %	REF %	TA %	REF %
	0.64	0.44	1.64	1.95	0.57	1.39

Criterio de aceptación:

Diferencia del % Recobro \leq 2%

La muestra analítica es estable hasta: **72 hrs a TA y 72 hrs en REF.**

5.8: Robustez:

Tabla 5.8.1: Estudio de Robustez del Método.

Condición	% Condición inicial	% Condición Alterada	% Diferencia
% Fase Buffer/ACN	(45:55)	(50:50)	-
Resultado	96.76	96.58	0.18
% Fase Buffer/ACN	(40:60)	(45:55)	-
Resultado	96.76	99.85	3.09
pH Fase	(pH 3.0)	(pH 2.5)	-
Resultado	96.76	97.22	0.46
pH Fase	(pH 3.0)	(pH 3.5)	-
Resultado	96.76	98.87	2.11
Volumen Inyección	(30mcl)	(20mcl)	-
Resultado	96.76	97.51	0.75
Volumen Inyección	(30mcl)	(50mcl)	-
Resultado	96.76	97.70	0.94
Flujo	1.0 ml/min	0.8 ml/min	-
Resultado	96.76	96.29	0.47
Flujo	1.0 ml/min	1.2 ml/min	-
Resultado	96.76	97.34	0.58

Tabla 5.8.2: Parámetros de Adecuabilidad del Sistema.

Condición	Platos teóricos	Factor de Coleo C12	Resolución
%Fase			
Condición base	5770	1.31	2.30
50:50 (Buffer/ ACN)	6262	1.31	3.50
40:60 (Buffer / ACN)	7008	1.20	1.70
pH Fase			
Condición base	5770	1.31	2.30
pH 2.5	6120	1.31	2.20
pH 3.5	3733	0.98	2.30
Volumen de inyección			
Condición base	5770	1.31	2.30
20 mcL	5954	1.27	2.30
50 mcL	5807	1.38	2.30
Flujo			
Condición base	5770	1.31	2.30
0.8 mL/min	7095	1.32	2.60
1.2 mL/min	5865	1.26	2.30

Criterios de aceptación:

Platos teóricos por columna para C12	≥ 1500
Factor de coleo para C12	≤ 2.0
Resolución entre C12 y C14	≥ 2.0
Diferencia del % Recobro	≤ 2

La Robustez del Método: **CUMPLE**

Excepto al cambio de:
% de Fase 60 ACN: 40 Buffer
y pH 3.5 del Buffer

5.9: Tolerancia:

Tabla .1: Estudio de Tolerancia.

Condición	% Condición inicial	% Condición Alterada	% Diferencia
Marca Columna	Luna CN	Waters Spherisorb	-
Resultado	109.91	111.33	1.42
Cambio de Equipo	F. 089	f. 185	-
Resultado	110.29	111.94	1.65

Tabla 5.9.2: Parámetros de Adecuabilidad del Sistema.

Condición	Platos teóricos	Factor de Coleo C12	Resolución
Cambio de Columna			
Luna CN	6211	1.35	2.10
Waters Spherisorb	9222	1.00	2.40
Cambio de Equipo			
F. 089	4781	1.35	2.10
F. 185	5097	1.40	2.10

Criterio de aceptación:

Platos teóricos por columna para C12	≥ 1500
Factor de coleo para C12	≤ 2.0
Resolución entre C12 y C14	≥ 2.0
Diferencia del % Recobro	≤ 2

La Tolerancia: **CUMPLE**

CAPITULO VI: DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 Precisión del Sistema:

Usando las condiciones de análisis establecidas en el método se obtuvo un CV = 0.28%. En una serie de 6 muestras de solución estándar, teniendo una especificación de 1.5% (ver resultados), por lo tanto: **El Sistema es preciso por repetibilidad.**

6.1.1 Adecuabilidad del Sistema:

La adecuabilidad del sistema fue reportada al inicio de cada experimento para verificar que el sistema de medición funciona apropiadamente, independientemente de los factores ambientales. Para todos los experimentos la adecuabilidad cumplió como un criterio de aceptación de la prueba, determinándose estos parámetros en las pruebas de robustez y tolerancia para considerar los cambios de condición inicial como aceptables.

6.2 Linealidad del Sistema:

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: 63.4%, 84.5%, 105.6%, 126.7% y 147.8%. Obteniendo los siguientes resultados al aplicar la ecuación de mínimos cuadrados de la relación respuesta vs. concentración:

- Intervalo de la pendiente IC (β_1)= 2471170 a 2352759, el cual no contiene al cero.
- Intervalo del intercepto IC (β_0)= -1248977 a 2250541 contiene al cero.
- El error del intercepto en el punto medio de la curva, es 0.20%, el cual deberá ser menor o igual a 5%.
- Se calculó el Coeficiente de determinación (r^2) = 0.999961 cuyo valor deberá ser mayor o igual a 0.985.

- El Coeficiente de correlación (r) = 0.99998 cuyo valor deberá ser mayor o igual a 0.9925.

Todos los parámetros se encuentran dentro de los criterios de aceptación, por lo tanto **El sistema es lineal en el rango de concentraciones analizadas.**

6.3 Especificidad:

Se realizaron pruebas con el placebo, placebo adicionado con materia prima y solución estándar, bajo las siguientes condiciones de análisis: sin degradar, Ácido Clorhídrico conc./calor 85°C/6hrs, Hidróxido de sodio 38% conc. aproximada /calor 80°C/6hrs, calor 8hrs y Peróxido de Hidrogeno, terminando las condiciones de degradación, se terminaron de preparar 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 se concluye que el método es específico para cloruro de benzalconio en el preparado farmacéutico tobramicina Solución oftálmica.**

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

6.4 Exactitud del Método por repetibilidad:

Se evaluó la precisión del método empleando un placebo adicionado con materia prima de Cloruro de Benzalconio; preparando 6 muestras independientes de concentración aproximada de 0.02 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 = 0.53% y el promedio del porcentaje = 100.79%; 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. **El método es preciso por repetibilidad.**

6.5 Linealidad del Método:

Se analizó un placebo adicionado con Cloruro de Benzalconio con materia prima. Pesando por triplicado 100 mg aproximadamente de Cloruro de Benzalconio en 50 ml de agua purificada. De esta solución se tomó una alícuota de 5 mL en 50 mL de placebo. Finalmente se toman las alícuotas respectivas de esta solución: 4.0, 5.0 y 6.0 mL, depositándolos en un matraz volumétrico de 10 ml y diluyendo con fase móvil, para obtener concentraciones a los niveles de 80%, 100% y 120% de Cloruro de Benzalconio. Se obtuvieron los siguientes resultados:

- Intervalo de la pendiente IC (β_1)= 0.96518 a 1.003975, el cual debe **contener al uno.**
- Intervalo del Intercepto IC(β_0) =-0.00036 a 0.00046, el cual debe **contener al cero.**
- Se calculó el Coeficiente de determinación (r^2) = 0.9991 cuyo valor deberá ser **mayor o igual a 0.985.**
- El CV de la regresión = 0.41% el cual debe ser **menor de 2.0%.**
- El % de recobro de todos los puntos se encuentran en el rango de 100% \pm 2%.

Todos los parámetros se encuentran dentro de los criterios de aceptación, por lo tanto **El método es lineal en el rango de concentraciones analizadas.**

6.6 Precisión Intermedia:

Se analizó producto terminado del preparado farmacéutico tobramicina Solución oftálmica, a una concentración teórica de 0.01%; se tomaron alícuotas de 1.0 mL para cada muestra a analizar según método. El experimento se realizó con dos analistas en dos días diferentes para establecer la variación entre analistas y días, obteniendo los siguientes resultados:

- El día 1, analista 1 se obtuvo CV = 0.43%.
- El día 1, analista 2 se obtuvo CV = 0.11%.
- El día 2, analista 1 se obtuvo CV = 0.71%.
- El día 2, analista 2 se obtuvo CV = 1.03%.
- El CV del día 1 analistas 1 y 2 fue de 0.83%.
- El CV del día 2 analistas 1 y 2 fue de 0.89%.
- El CV del analista 1 día 1 y 2 fue de 0.69%.
- El CV del analista 2 día 1 y 2 fue de 1.00%.

El CV total de todas las muestras = 0.84%. El cual es menor al 2% por lo tanto **el método es preciso por reproducibilidad sin importar el día o el analista.**

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 CV menores al 2 %. **El método es tolerante a los cambios y condiciones probadas.**

6.7 Estabilidad de la Muestra

Se analizó placebo adicionado con materia prima, según el método. Se determinaron a los siguientes tiempos de análisis: Inicial, 24Hrs/Temperatura Ambiente y Refrigeración, 48Hrs/ Temperatura Ambiente y Refrigeración, 72Hrs/ Temperatura Ambiente y Refrigeración.

Por los resultados obtenidos se establece que **la muestra es estable en un periodo de 72Hrs, almacenada bajo condiciones de temperatura ambiente y de refrigeración**, para su análisis, pues la diferencia de recobro y %CV es menor a 2%.

6.8 Robustez.

En base a los resultados obtenidos, se observa que sobre la condición de cambio de proporción en la fase móvil 50:50% Buffer:ACN no existe diferencia significativa para porcentaje de recobro, pues es menor al 2%. Sin embargo, para la condición 40:60% Buffer:ACN no se cumple con los parámetros de adecuabilidad del sistema y no se cumple con la diferencia en porcentaje de recobro, ya que esta aumento de proporción de ACN implicó disminución en la resolución de los picos, es decir no hubo una buena separación de los mismos en la columna cromatográfica. **Por lo tanto el método es robusto únicamente a la disminución en la proporción de ACN (50%) pero no al aumento de esta.**

En el cambio de pH: a pH menor a lo establecido (2.5) cumple con la diferencia de porcentaje de recobro menor 2% (-0.46%), y se observan todos los picos identificados, a pH mayor (3.5) no se cumple con la diferencia de porcentaje de recobro (-2.11%) aun observándose todos los picos correspondientes a Cloruro de Benzalconio. **Por lo tanto el método cumple con la robustez para cambio de pH menor al establecido (2.5).**

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 robusto a cambio de velocidad de flujo de entre 0.8 a 1.2 mL/min.**

Para el cambio de Volumen de Inyección, en ambos casos se cumple con la diferencia de porcentaje de recobro (menor a 2%). **Por lo tanto el método es robusto a cambio de velocidad de volumen de inyección de 20 a 50 mcL.**

En cuanto a los parámetros de Adecuabilidad del Sistema, en todos los cambios realizados para la prueba de robustez se cumple con el criterio, a excepción del cambio en el de proporción de fase Buffer de Fosfatos pH 3.0:Acetonitrilo (40:60%) pues la resolución es de 1.7, que es menor a 2.0.

6.9 Tolerancia

En el cambio de Columna: Al realizar el cambio de columna Phenomenex Luna CN a Waters Spherisorb CNRP bajo las mismas condiciones de análisis, no se observó una diferencia significativa en los porcentajes de recobro entre ambas columnas. Sin embargo, para la columna de prueba la resolución se encontraba en el límite de aceptación 2.0, por lo que la Adecuabilidad del Sistema se ve comprometida. Por lo cual se realizó una prueba alterna variando la proporción de fase móvil de Buffer de Fosfatos pH 3.0:Acetonitrilo (45:55%) respectivamente a Buffer de Fosfatos pH 3.0:Acetonitrilo (50:50%), obteniendo mejores resultados de resolución. Por lo cual, se documentará en la técnica correspondiente que al usar la columna Spherisorb CNRP la proporción de fase móvil deberá modificarse según las condiciones validadas.

En base a los resultados obtenidos, se concluye que sobre la condición de cambio de equipo no existe diferencia significativa para porcentaje de recobro, es menor de 2%. **Por lo anterior existe tolerancia al cambio de columna y equipo.**

CAPITULO VII: CONCLUSIONES

De acuerdo a la validación realizada y con los resultados obtenidos durante esta, se concluye que el método analítico para la cuantificación del conservador cloruro de benzalconio a la concentración de 0.01% en el preparado farmacéutico tobramicina solución oftálmica, es:

- o Preciso para el sistema.
- o Lineal para en sistema en un rango de concentraciones del 60 al 140%.
- o Preciso y Exacto para el método.
- o Lineal para el método en un rango de concentraciones del 80 al 120%.
- o Especifico para cloruro de benzalconio.
- o Estable para la muestra hasta 72hrs a temperatura ambiente y en refrigeración.
- o Robusto, excepto para la proporción de fase Buffer de Fosfatos pH 3.0: Acetonitrilo (40:60%) y pH 3.5 del Buffer de Fosfatos. Y
- o Tolerante al cambio de columna y cambio de equipo para la cuantificación de BAC.

De acuerdo a los lineamientos básicos establecidos en la “Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C.” y del protocolo de validación establecido por Alcon Laboratorios S.A. de C.V las pruebas realizadas sustentan la validación propuesta.

CAPITULO VIII: REFERENCIAS

1. Guía de validación de Métodos Analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. Edición 2002.
2. Buenas Prácticas de Validación. Guía de Buenas Practicas de Validación. Monografía Técnica No. 24. Primera Edición. Comisión Institucional de Buenas Prácticas de Fabricación. CIPAM. México, Distrito Federal, 2006.
3. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006. Buenas prácticas de fabricación para los establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos
4. Sistema de Documentación aplicables a la Industria Farmacéutica. Guía de Buenas Prácticas de Fabricación. Monografía Técnica No. 25. Primera Edición. Comisión Institucional de Buenas Prácticas de Fabricación. CIPAM. México, Distrito Federal, 2006.
5. García, Adrián y Marina Bayo. HPLC Fundamental. 1ra Edición. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 2008. pp: 9-12.
6. Rouessac, Francis y Annick Rouessac. Análisis Químico. Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas. 1ra Edición. McGraw Hill. Madrid, España. 2003. pp:7-10, 25,26,
7. Skoog, Douglas A. Fundamentos de Química Analítica. 8va Edición. Thomson. México, DF. 2007. pp: 931-935
8. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), Décima Edición. Tomo I y II.
9. E. Verges. Formas Farmacéuticas. Cap. 17.
[med. Unne.edu/catedras/farmacología/temas_farma/.../17.forfa.pdf](http://med.unne.edu/catedras/farmacología/temas_farma/.../17.forfa.pdf).
10. Validation of Analytical Procedures. Text and Methodology Q2(R1). ICH Harmonized Tripartite Guideline. 2005.
11. Peters, Frank T. y Frank Musshoff. Validation of new methods. Forensic Science International 165 (2007). Elsevier. pp: 216-224.
12. C. Rowe, Raymond and Paul J. Sheskey. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Fifth Edition. Pharmaceutical Press. 2006. pp: 61-63.

CAPITULO IX: ANEXOS

Anexo I: Definiciones

Adecuabilidad del Sistema.- Verificación de que el sistema (instrumento, analista, equipo, sustancia de referencia, entre otros) operan con base a criterios preestablecidos, que permita asegurar la confiabilidad de los resultados en un método analítico.

Analito.- Componente específico de una muestra, a medir en un análisis.

BAC.-Cloruro de Benzalconio.

Especificaciones.- Descripción del material sustancia o productos, que incluye la definición de sus propiedades o características, con la tolerancias de variación de los parámetros de calidad.

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

Exactitud.- Concordancia entre el valor obtenido empleando el método y el valor de referencia.

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

Intervalo o rango.- Concentraciones incluidas entre la concentración superior a la inferior del analito (incluyendo estas), para las cuales se ha demostrado que el método analítico es preciso exacto y lineal.

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

Método analítico.- Descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente.

Método analítico desarrollado internamente: Método desarrollado por el propio laboratorio.

Método analítico indicativo de estabilidad.- Método cuantitativo capaz de detectar variaciones en las propiedades del material evaluado, debidas a las condiciones de almacenaje.

Método analítico oficial.- Método que aparece en la literatura oficial reconocida.

Método analítico no oficial.- Método que no aparece en la literatura oficial reconocida.

Muestra.- Porción del material a evaluar.

Muestra analítica.- Porción del material a evaluar de acuerdo al método analítico.

Parámetros de desempeño.- Parámetro específico a estudiar en un protocolo de validación.

Placebo analítico.- Muestras que contienen todos los componentes de un producto excepto el analito en estudio.

Placebo adicionado o Placebo cargado.- Muestra de un placebo analítico al cual se le adiciona una cantidad conocida del analito.

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

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.

Protocolo de validación.- Descripción de pruebas específicas para demostrar que un proceso da resultados que cumplen con los criterios preestablecidos de manera consistente.

Recobro.- Cantidad del analito determinada en el placebo adicionado o muestra analítica, empleando el método analítico.

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

Robustez.- Capacidad del método analítico a mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método. La robustez se refiere a la influencia de factores internos del método.

Sustancia de referencia (estándar).- Sustancia de uniformidad conocida destinada a utilizarse en comprobaciones analíticas físicas, químicas o microbiológicas.

Sustancia de referencia primaria (estándar primario).- Sustancia que es designada o reconocida por tener la más alta calidad metrológica, cuyas propiedades se aceptan sin referencia a otra sustancia.

Sustancia de referencia secundaria (estándar secundaria).- Sustancia cuyas propiedades se asignan por comparación con una sustancia de referencia

primaria, o bien, cuando es certificada mediante un procedimiento científico reconocido.

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

Validación del método analítico.- Proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.

%CV.- La desviación estándar relativa = $\text{Desviación estándar} / \text{media} \times 100$.

Coefficiente de correlación.- Es una medición de cómo varían las mediciones juntas. Coeficientes de +1 ó -1 indican una relación lineal estricta, mientras que un valor cercano a cero significa que no hay una relación entre las 2 propiedades medidas.

Anexo II: Símbolos y Abreviaturas

Cuando en este trabajo se haga referencia a los siguientes símbolos o abreviaturas se entenderá:

b_1	Pendiente.
B_0	Ordenada al origen.
CV	Coeficiente de variación o desviación estándar relativa.
$CV_{y/x}$	Coeficiente de variación de regresión.
d_i	Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto de la media aritmética del análisis inicial.
g	Gramos.
gl	Grados de libertad.
IC (β_1)	Intervalo de confianza de la pendiente poblacional.
IC (β_0)	Intervalo de confianza para la ordenada al origen poblacional.
IC (μ)	Intervalo de confianza para la media poblacional.
LC	Límite de cuantificación
mg	Miligramos.
n	Número de mediciones o recobros o blancos o muestras o determinaciones.
N	Número de platos teóricos.
PC	Placebo cargado o placebo adicionado.
R	Resolución

r^2	Coeficiente de determinación.
S	Desviación estándar.
S_{b0}	Desviación estándar de la ordenada al origen.
S_{b1}	Desviación estándar de la pendiente.
S²	Varianza.
σ^2	Varianza poblacional.
STD	Estándar o sustancia de referencia.
S_{y/x}	Desviación estándar de regresión.
T	Factor de coles.
t_{0.975,gl}	Valor de la distribución t de Student asociado a una confianza del 95% y a grados de libertad (gl) establecidos.
\bar{x}	Media aritmética de x.
\bar{y}	Media aritmética de y.
%	Porcentaje o por ciento.

Anexo III: Áreas obtenidas durante el análisis.

1.- Precisión del Sistema.

Tabla 10.1 Precisión del sistema.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD 1 BAC	493472	258632	262957056
2	STD 1 BAC	492246	256469	261744232
3	STD 1 BAC	492640	256949	262054832
4	STD 1 BAC	491503	257441	261849308
5	STD 1 BAC	491548	257306	261814928
6	STD 1 BAC	496655	249358	260626444
\bar{x}		493011	256026	261841133
S		1930.2	3344.9	745193.1
% CV		0.39	1.31	0.28

2.- Adecuabilidad del Sistema.

Tabla 10.2 Adecuabilidad del Sistema.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD 1 BAC	493472	258632	262957056
2	STD 1 BAC	492246	256469	261744232
3	STD 1 BAC	492640	256949	262054832
4	STD 1 BAC	491503	257441	261849308
5	STD 1 BAC	491548	257306	261814928
6	STD 1 BAC	496655	249358	260626444
\bar{x}		493011	256026	261841133
S		1930.2	3344.9	745193.1
% CV		0.39	1.31	0.28
Parámetros Cromatográficos de Adecuabilidad.				
No. de muestra	Nombre de la muestra	Resolución	Platos Teóricos	Factor Coleo
1	STD 1 BAC	2.3	5996	1.30
2	STD 1 BAC	2.3	5990	1.31
3	STD 1 BAC	2.3	5490	1.30
4	STD 1 BAC	2.4	5789	1.31
5	STD 1 BAC	2.3	5886	1.30
6	STD 1 BAC	2.3	5940	1.30
\bar{x}		2.3	5849	1.30
% CV		0.69	1.10	0.18

3.- Linealidad del Sistema.

Tabla 10.3: Linealidad del sistema.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD 60% BAC	310953	153386	162170068
2	STD 60% BAC	296085	152874	156926532
3	STD 60% BAC	297797	153252	157647716
4	STD 80% BAC	390659	204165	207956780
5	STD 80% BAC	389712	205085	207973360
6	STD 80% BAC	398837	204259	210771892
7	STD 100% BAC	486948	255223	259484384
8	STD 100% BAC	489305	255658	260445844
9	STD 100% BAC	488133	254580	259650660
10	STD 120% BAC	579435	305290	309354620
11	STD 120% BAC	580351	304997	309558236
12	STD 120% BAC	595268	304665	314507840
13	STD 140% BAC	680367	355639	362199932
14	STD 140% BAC	681805	357927	363530836
15	STD 140% BAC	687608	356789	365085072

4.- Especificidad.

Degradaciones del placebo cargado

10.4.1: Estándares de la Condición inicial del PC degradado por vía ácida.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD 1 BAC	502053	258362	265775236
2	STD 1 BAC	501383	258200	265487820
3	STD 1 BAC	501697	257982	265514356
4	STD 1 BAC	500665	258214	265248852
5	STD 1 BAC	500870	257876	265194168
6	STD 1 BAC	501324	259012	265766576
\bar{x}				265497835
S				246476
% CV				0.1

10.4.2: Condición inicial del PC degradado por vía ácida.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC				Área Total
		C12	C14	C16	C18	
1	PC M1 Inicial	408108	213138	112447	16745	268820396
2	PC M2 Inicial	410606	215587	113597	17429	271316364
3	PC M3 Inicial	413181	219666	115921	17652	274707792
\bar{x}						271614851
S						2955026
% CV						1.1

10.4.3: Estándares para el PC degradado por vía ácida.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD 1 BAC	502161	258600	265899540
2	STD 1 BAC	501428	258238	265517104
3	STD 1 BAC	501519	258318	265577484
4	STD 1 BAC	503925	257704	266169572
5	STD 1 BAC	503310	258050	266087800
6	STD 1 BAC	503952	258391	266431568
\bar{x}				265947178
S				354337
% CV				0.1

10.4.4: PC degradado por vía ácida.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC				Área Total
		C12	C14	C16	C18	
1	PC M1 Deg. HCl	398113	212755	113177	16474	265455328
2	PC M2 Deg. HCl	389284	212028	113031	16983	262343932
3	PC M3 Deg. HCl	388249	210214	112258	16888	260978092
\bar{x}						262925784
S						2294629
% CV						0.9

10.4.5: Estándares de la Condición inicial del PC degradado por vía básica.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD 1 BAC	505483	258269	266907212
2	STD 1 BAC	499181	252137	262507956
3	STD 1 BAC	502625	255448	264897364
4	STD 1 BAC	498251	258296	264458268
5	STD 1 BAC	497320	254212	262638816
6	STD 1 BAC	494564	252907	261221536
\bar{x}				263771859
S				2047132
% CV				0.78

10.4.6: Condición inicial del PC degradado por vía básica.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC				Área Total
		C12	C14	C16	C18	
1	PC M1 Inicial	409321	212069	115181	18537	270681896
2	PC M2 Inicial	409144	215506	106945	19632	269089356
3	PC M3 Inicial	410196	215132	123423	18120	275193604
\bar{x}						271654952
S						3166321
% CV						1.2

10.4.7: Estándares para el PC degradado por vía básica.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD 1 BAC	501920	252703	263647504
2	STD 1 BAC	502647	254145	264425340
3	STD 1 BAC	498332	256049	263658912
4	STD 1 BAC	501822	258715	265826600
5	STD 1 BAC	503843	251611	263899468
6	STD 1 BAC	502618	266064	268801672
\bar{x}				265043249
S				2014642
% CV				0.76

10.4.8: PC degradado por vía básica.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC				Área Total
		C12	C14	C16	C18	
1	PC M1 Deg. NaOH	369887	185915	109967	11735	242700872
2	PC M2 Deg. NaOH	370141	186644	101777	10627	239342472
3	PC M3 Deg. NaOH	374608	182110	102306	12565	240223936
\bar{x}						240755760
S						1741218
% CV						0.7

10.4.9: Estándares de la Condición inicial del PC degradado por las vías de calor y oxidación.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD 1 BAC	503851	259011	266625388
2	STD 1 BAC	504191	259315	266852860
3	STD 1 BAC	504727	259564	267126732
4	STD 2 BAC	503097	258475	266171780
5	STD 2 BAC	503411	258362	266236956
6	STD 2 BAC	504277	258602	266619716
\bar{x}				266605572
S				362603
% CV				0.14

10.4.10: Condición inicial del PC degradado por las vías de calor y oxidación.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC				Área Total
		C12	C14	C16	C18	
1	PC M1 Inicial	423484	221303	116678	17815	279182112
2	PC M2 Inicial	425148	223245	117584	17183	280553336
3	PC M3 Inicial	426200	225119	118991	17421	282258732
\bar{x}						280664727
S						1541332
% CV						0.5

10.4.11: Estándares para el PC degradado por la vía de calor.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD 1 BAC	503851	258610	266477820
2	STD 1 BAC	502073	259011	266020868
3	STD 1 BAC	504191	259315	266852860
4	STD 1 BAC	501973	259155	266039860
5	STD 1 BAC	502444	259564	266350512
6	STD 1 BAC	504727	258596	266770508
\bar{x}				266418738
S				352760
% CV				0.13

10.4.12: PC degradado por la vía de calor.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC				Área Total
		C12	C14	C16	C18	
1	PC M1 Deg. Calor	425337	219804	115584	17192	278563124
2	PC M2 Deg. Calor	422781	219342	115350	17080	277383916
3	PC M3 Deg. Calor	422437	218331	114713	16941	276583720
\bar{x}						277510253
S						995731
% CV						0.4

10.4.13: Estándares para el PC degradado por la vía de oxidación.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD 1 BAC	500005	257591	264795188
2	STD 1 BAC	498640	258188	264550784
3	STD 1 BAC	500906	258619	265479832
4	STD 1 BAC	500005	257917	264915156
5	STD 1 BAC	499954	258043	264944184
6	STD 1 BAC	501129	257992	265324916
\bar{x}				265001677
S				343467
% CV				0.13

10.4.14: PC degradado por la vía de oxidación.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC				Área Total
		C12	C14	C16	C18	
1	PC M1 Deg. H ₂ O ₂	340445	193942	108098	17038	237152876
2	PC M2 Deg. H ₂ O ₂	337757	193430	108032	16788	235918404
3	PC M3 Deg. H ₂ O ₂	320147	191038	110553	17345	230285232
\bar{x}						234452171
S						3661081
% CV						1.6

Degradaciones de la sustancia de referencia (STD).

10.4.15: Estándares de la Condición inicial del STD degradado por la vía de básica y de oxidación.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD 1 BAC	505483	258269	266907212
2	STD 1 BAC	499191	252137	262511356
3	STD 1 BAC	502625	255448	264897364
4	STD 2 BAC	498251	258296	264458268
5	STD 2 BAC	497320	254212	262638816
6	STD 2 BAC	494564	252907	261221536
\bar{x}				263772425
S				2046712
% CV				0.8

10.4.16: Condición inicial del STD degradado por la vía básica y de oxidación.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD M1 Inicial	491805	258507	262344276
2	STD M2 Inicial	488969	258027	261203396
3	STD M3 Inicial	497145	258062	263996116
\bar{x}				262514596
S				1404129
% CV				0.5

10.4.17: Estándares para la degradación del STD por vía de básica.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD 1 BAC	501920	252703	263647504
2	STD 1 BAC	498332	258715	264640000
3	STD 1 BAC	502618	269445	270045880
4	STD 1 BAC	488288	256569	260435312
5	STD 1 BAC	500946	254848	264105704
6	STD 1 BAC	490586	252933	259878584
\bar{x}				263792164
S				3647783
% CV				1.4

10.4.18: STD degradado por vía básica.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD M1 Deg. NaOH	431965	218322	227210596
2	STD M2 Deg. NaOH	433186	224873	230036504
3	STD M3 Deg. NaOH	437909	226832	232363236
\bar{x}				229870112
S				2580347
% CV				1.1

10.4.19: Estándares para la degradación del STD por la vía de oxidación.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD 1 BAC	505483	252137	264650636
2	STD 1 BAC	496310	253205	261924840
3	STD 1 BAC	504245	258296	266496228
4	STD 1 BAC	502625	255988	265096084
5	STD 1 BAC	501462	254212	264047096
6	STD 1 BAC	497320	252203	261899504
\bar{x}				264019065
S				1820675
% CV				0.7

10.4.20: STD degradado por la vía de oxidación.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD M1 Deg. H ₂ O ₂	479361	240687	251555556
2	STD M2 Deg. H ₂ O ₂	471984	239688	248679744
3	STD M3 Deg. H ₂ O ₂	463207	235785	244259260
\bar{x}				248164853
S				3675298
% CV				1.5

10.4.21: Estándares de la Condición inicial del STD degradado por la vía de calor.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD 1 BAC	504869	257251	266323828
2	STD 1 BAC	504653	257512	266346436
3	STD 1 BAC	503420	260052	266861936
4	STD 1 BAC	508642	256441	267308568
5	STD 1 BAC	505716	259493	267436864
6	STD 1 BAC	504159	255542	265453516
\bar{x}				266621858
S				737990
% CV				0.3

10.4.22: Condición inicial del STD degradado por la vía de calor.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD M1 Inicial	504404	259241	266898048
2	STD M2 Inicial	501371	254879	264261612
3	STD M3 Inicial	507058	260349	268208152
\bar{x}				266455937
S				2010072
% CV				0.8

10.4.23: Estándares para la degradación del STD por la vía de calor.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD 1 BAC	504869	257251	266323828
2	STD 1 BAC	504653	257512	266346436
3	STD 1 BAC	503420	260052	266861936
4	STD 1 BAC	508642	256441	267308568
5	STD 1 BAC	505716	259493	267436864
6	STD 1 BAC	504159	255542	265453516
\bar{x}				266621858
S				737990
% CV				0.3

10.4.24: STD degradado por la vía calor.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD M1 Deg. Calor	506219	260636	268028508
2	STD M2 Deg. Calor	505077	259633	267271124
3	STD M3 Deg. Calor	510180	261823	269812064
\bar{x}				268370565
S				1304548
% CV				0.5

10.4.25: Estándares de la Condición inicial del STD degradado por vía ácida.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD 1 BAC	501848	249762	262540736
2	STD 1 BAC	495501	256273	262778804
3	STD 1 BAC	500195	255772	264190396
4	STD 1 BAC	501717	255842	264733636
5	STD 1 BAC	502433	258309	265884932
6	STD 1 BAC	500151	256021	264267068
\bar{x}				264065929
S				1248476
% CV				0.5

10.4.26: Condición inicial del STD degradado por vía ácida.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD M1 Inicial	493256	252099	260479472
2	STD M2 Inicial	494185	253776	261412468
3	STD M3 Inicial	493104	252087	260423376
\bar{x}				260771772
S				555567
% CV				0.2

10.4.27: Estándares para la degradación del STD por vía ácida.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD 1 BAC	501848	249762	262540736
2	STD 1 BAC	495501	256273	262778804
3	STD 1 BAC	500195	255772	264190396
4	STD 1 BAC	494821	252576	261187108
5	STD 1 BAC	496665	251555	261438340
6	STD 1 BAC	497531	253480	262441180
\bar{x}				262429427
S				1073426
% CV				0.4

10.4.28 STD degradado por vía ácida.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD M1 Deg. HCl	485634	17982	171732936
2	STD M2 Deg. HCl	483717	17841	171029268
3	STD M3 Deg. HCl	486595	17839	172007052
\bar{x}				171589752
S				504373
% CV				0.3

5.- Precisión: Exactitud y Repetibilidad del Método.

10.5.1: Estándares para precisión del método.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD 1 BAC	482891	250176	256247708
2	STD 1 BAC	481330	250969	256008792
3	STD 1 BAC	483914	250773	256815224
4	STD 1 BAC	481595	249084	255405212
5	STD 1 BAC	482967	250646	256446508
6	STD 1 BAC	483120	251385	256770480
\bar{x}				256282321
S				528124.71
% CV				0.21

10.5.2: Precisión del método.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC				Área Total
		C12	C14	C16	C18	
1	PC 100-M1 BAC	406114	217766	116279	13457	269968900
2	PC 100-M2 BAC	408344	214716	115851	13779	269571740
3	PC 100-M3 BAC	407760	218083	116186	14098	270880152
4	PC 100-M4 BAC	404152	214228	115896	13944	268054656
5	PC 100-M5 BAC	416000	213996	118011	15392	273449092
6	PC 100-M6 BAC	407734	215948	115316	14139	269758496
\bar{x}						270280506
S						1801436
% CV						0.67

6.- Linealidad del Método.

10.6.1: Estándares para la linealidad del método.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD 1 BAC	499323	261425	265974220
2	STD 1 BAC	504869	258144	266652452
3	STD 1 BAC	505101	257251	266402708
4	STD 1 BAC	504754	258811	266858808
5	STD 1 BAC	503420	258127	266153536
6	STD 1 BAC	502130	260052	266423336
7	STD 1 BAC	501902	255542	264686136
8	STD 1 BAC	505716	256694	266406832
9	STD 1 BAC	504432	258318	266567904
\bar{x}				266236215
S				636490.3
% CV				0.23

10.6.2: Linealidad del método.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC				Área Total
		C12	C14	C16	C18	
1	PC 80%	313704	167844	86435	15081	209048556
2	PC 80%	305647	166940	86550	15335	206129740
3	PC 80%	312079	167397	86811	15432	208629280
4	PC 100%	392655	207472	104123	18163	258786216
5	PC 100%	378373	208365	108450	17711	255780804
6	PC 100%	391300	200331	112584	20404	259998368
7	PC 120%	468840	249553	127229	23952	311779436
8	PC 120%	466467	248274	126889	23221	310057360
9	PC 120%	467666	249957	130133	23642	312547492

7.- Precisión Intermedia.

10.7.1 Estándares precisión intermedia: Analista 1 Día 1.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD 1 BAC A1D1	499541	257505	264605780
2	STD 1 BAC A1D1	501048	257948	265281184
3	STD 1 BAC A1D1	500684	258250	265268560
4	STD 1 BAC A1D1	502422	257717	265663336
5	STD 1 BAC A1D1	501221	258348	265487204
6	STD 1 BAC A1D1	500577	257268	264870804
\bar{x}				265196145
S				392386.5
% CV				0.15

10.7.2 Muestras de producto del Analista 1 Día 1.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC				Área Total
		C12	C14	C16	C18	
1	Muestra 1 A1D1	414021	223140	116828	14799	275421324
2	Muestra 2 A1D1	417027	222384	116824	14693	276118628
3	Muestra 3 A1D1	420257	223529	117340	14461	277744156
\bar{x}						276428036
S						1191925.8
% CV						0.43

10.7.3 Estándares precisión intermedia: Analista 2 Día 1.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD 1 BAC A2D1	504542	259809	267153992
2	STD 1 BAC A2D1	503701	259613	266795924
3	STD 1 BAC A2D1	504449	259849	267137092
4	STD 2 BAC A2D1	493564	253129	260963232
5	STD 2 BAC A2D1	493215	253059	260818812
6	STD 2 BAC A2D1	493113	253028	260772724
\bar{x}				263940296
S				3386503.9
% CV				1.28

10.7.4 Muestras de producto del Analista 2 Día 1

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC				Área Total
		C12	C14	C16	C18	
1	Muestra 1 A2D1	421375	225279	117836	14819	279116484
2	Muestra 2 A2D1	422489	225072	117549	14923	279349512
3	Muestra 3 A2D1	421628	224082	117752	14904	278764784
\bar{x}						279076927
S						294364.2
% CV						0.11

10.7.5 Estándares precisión intermedia: Analista 1 Día 2.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD 1 BAC A1D2	501947	257574	265449212
2	STD 1 BAC A1D2	500447	258039	265110332
3	STD 1 BAC A1D2	501373	258318	265527844
4	STD 1 BAC A1D2	499533	257326	264537188
5	STD 1 BAC A1D2	500735	258212	265271916
6	STD 1 BAC A1D2	501644	257139	265186112
\bar{x}				265180434
S				352140.9
% CV				0.13

10.7.6 Muestras de producto del Analista 1 Día 2.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC				Área Total
		C12	C14	C16	C18	
1	Muestra 1 A1D2	414375	223488	116899	17103	276674760
2	Muestra 2 A1D2	418612	224151	117789	16923	278635444
3	Muestra 3 A1D2	420133	226681	119077	16988	280621232
\bar{x}						278643812
S						1973249.3
% CV						0.71

10.7.7 Estándares precisión intermedia: Analista 2 Día 2.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC		Área Total
		C12	C14	
1	STD 1 BAC A2D2	502853	258370	266050180
2	STD 1 BAC A2D2	502507	258076	265824348
3	STD 1 BAC A2D2	503455	258038	266132684
4	STD 2 BAC A2D2	503624	257980	266168800
5	STD 2 BAC A2D2	504428	257683	266332864
6	STD 2 BAC A2D2	503448	258175	266180720
\bar{x}				266114933
S				169511.8
% CV				0.06

10.7.8: Muestras de producto del Analista 2 Día 2.

No. de muestra	Nombre de la muestra	Área de los Homólogos de BAC				Área Total
		C12	C14	C16	C18	
1	Muestra 1 A2D2	416499	223585	116977	20887	279067920
2	Muestra 2 A2D2	425846	223390	116867	14099	279252468
3	Muestra 3 A2D2	413659	223004	116512	12665	274218244
\bar{x}						277512877
S						2854727.8
% CV						1.03



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Química
2012