



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

***TESIS:** VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA EL ANALISIS
DE RIMEXOLONA POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA
RESOLUCIÓN EN UNA SUSPENSIÓN OFTÁLMICA.*

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

PRESENTA

CLAUDIA VIANEY RODRÍGUEZ LEÓN

MÉXICO, D.F.

DE

AÑO 2012





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Carolina Muñoz Padilla
VOCAL: María del Socorro Alpizar Ramos
SECRETARIO: Daniel García Escandón
1er. SUPLENTE: Araceli Patricia Peña Álvarez
2° SUPLENTE: Silvia Citlalli Gama Gonzalez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Alcon Laboratorios S. A. de C. V.

ASESOR DEL TEMA:

Q. B. P. Daniel García Escandón.

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.F.B. Luz Ma. Espinosa

SUSTENTANTE:

Claudia Vianey Rodríguez León

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas especiales a las que me gustaría agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en el corazón. Sin importar en donde estén o si alguna vez llegan a leer estas dedicatorias quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

A ti mamá por ser la mejor mamá del mundo, gracias por todo tu esfuerzo, tu apoyo y por la confianza que depositaste en mí. Gracias porque siempre, has estado a mi lado y siempre me has sabido guiar en cualquier momento. Te quiero mucho.

A ti papá, éste es un logro que quiero compartir contigo, gracias por ser mi papá y por creer en mí. Quiero que sepas que ocupas un lugar muy especial en mi corazón, espero ser tu orgullo.

A mi gran hermana Levy, gracias por apoyarme en esto y por las porras que me hechaste. Eres la mejor hermana que una hermana puede tener, gracias.

A mi amor y amigo Oldaís porque sus ojos hacen de guía en mi camino, iluminan y alegran mi vida. En el largo camino de la vida, gracias por tu compañía.

A todos mis amigos, sin excluir a ninguno, pero en especial a Hugo, Magda, Kyke y Marco, mil gracias por todos los momentos que hemos pasado juntos y porque han estado conmigo siempre. Sólo puedo decir que son mis mejores amigos gracias por todas esas aventuras que vivimos.

Gracias también a mi tutor Daniel y a Alcon laboratorios por apoyarme durante este proyecto.

INDICE GENERAL

	Pág.
Capítulo I. Introducción	
1.1 Objetivos	9
1.2 Marco Teórico	9
1.2.1 Validación de Métodos Analíticos	9
1.2.2 Método Analítico	10
1.2.3 Rimexolona	10
1.2.4 Suspensión Oftálmica	11
1.2.5 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)	11
1.2.5.1 Tipos de Cromatografía en HPLC y sus aplicaciones.	12
1.2.5.1.1 Cromatografía de Adsorción	12
1.2.5.1.2 Cromatografía de Partición	13
1.2.5.1.3 Cromatografía de Intercambio Iónico	14
1.2.5.1.4 Cromatografía en Gel	15
1.2.5.1.5 Cromatografía Plana	16
1.2.5.1.6 Cromatografía en Papel	16
1.2.5.1.7 Cromatografía en Capa fina	17
1.2.5.2 Instrumentación	22
1.2.6 Parámetros Cromatográficos	27
1.2.7 Parámetros de Desempeño	32

	Pág.
Capítulo II. Reactivos, Materiales, Equipos e Instrumentos	
2.1 Reactivos	33
2.2 Materiales	33
2.3 Equipos e Instrumentos	33
Capítulo III. Metodología	
3.1 Resumen de los Parámetros de Desempeño Analizados	34
3.2 Precisión del Sistema	36
3.3 Precisión del Método	36
3.4 Linealidad del sistema	36
3.5 Linealidad del Método	37
3.6 Precisión Intermedia	38
3.7 Tolerancia	38
3.8 Robustez	38
3.9 Pruebas Límite	39
3.9.1 Límite de Cuantificación	39
3.9.2 Límite de Detección	39
3.10 Especificidad	40
3.11 Estabilidad de la Muestra	40

	Pág.
Capítulo IV. Resultados	
4.10 Precisión del Sistema	41
4.11 Precisión del Método	41
4.12 Linealidad del sistema	42
4.13 Linealidad del Método	42
4.14 Precisión Intermedia	43
4.15 Tolerancia	43
4.16 Robustez	44
4.17 Pruebas Límite	44
4.17.1 Límite de Cuantificación	44
4.17.2 Límite de Detección	44
4.18 Especificidad	45
4.19 Estabilidad de la Muestra	45

	Pág.
Capítulo V. Cálculos	
5.1 Precisión del Sistema	46
5.2 Precisión del Método	47
5.3 Linealidad del sistema	48
5.4 Linealidad del Método	51
5.5 Precisión Intermedia	54
5.6 Tolerancia	57
5.7 Robustez	59
5.8 Pruebas Límite	
(Límite de Cuantificación y Límite de Detección)	66
5.9 Especificidad	70
5.10 Estabilidad de la Muestra	74
Capítulo VI. Análisis de Resultados	79
Capítulo VII. Conclusiones	84
Capítulo VIII. Bibliografía y Referencias.	85

	Pág.
Capítulo XI. Anexos	
9.1 Ejemplo de Áreas y Cromatogramas obtenidos durante el Análisis	86
- Linealidad del sistema	
- Linealidad del Método	
9.2 Gráficas	89
- Linealidad del Sistema	
- Linealidad del Método	
9.3 Procedimiento analítico	92
9.4 Glosario	100

Capítulo I. INTRODUCCIÓN

1.1 OBJETIVOS

Objetivo General:

Validar el Método Analítico para cuantificar Rimexolona en una suspensión oftálmica al 1.0% por cromatografía de líquidos de alta resolución.

Objetivos Particulares:

Confirmar que El sistema analítico sea lineal, preciso, exacto y que la adecuabilidad del sistema cumple con los parámetros de exactitud. Así como también que el método analítico sea preciso, lineal, reproducible, robusto y tolerante.

Llevar a cabo las pruebas indicadas para la validación para verificar que cumplen con la “Guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de QFB’s” para validación de métodos analíticos.

1.2 MARCO TEÓRICO

1.2.1 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación de métodos analíticos es parte fundamental del desarrollo de una nueva formulación, de la técnica de análisis de control de calidad 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 está siendo evaluado sistemáticamente, cumple con los propósitos para el cual fue diseñado.

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

La validación de métodos analíticos se considera como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

La validación demuestra por medio de estudios experimentales la confiabilidad de lo que se está midiendo. Desde este enfoque, la validación de métodos analíticos es un sistema involucrado en los procesos de fabricación en el área de calidad de la empresa y bajo la filosofía de la validación. Las Autoridades Regulatorias verifican que las empresas sustenten estos sistemas con actividades documentales, como se indica en la NOM- 059 SSA1 numerales 5.6.3, 5.7.4, 9.11.3, 9.11.5 y 9.12.3 y en los lineamientos regulatorios internacionales.

El objetivo final de un dictamen de calidad, es la liberación o no liberación de un producto sobre la base de las especificaciones previamente establecidas. Esta decisión es tomada generalmente por el profesional farmacéutico, en gran medida está dada por los resultados obtenidos al aplicar uno o diversos métodos analíticos; si estos 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 empresa. 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. La validación de métodos analíticos también impacta en otras áreas relacionadas a la calidad de un producto (estabilidad, limpieza de equipos, entre otras).

No se puede pasar por alto el hecho de que el factor más importante durante la validación de todo método analítico es siempre el criterio del profesional, responsable de ésta decisión, criterio que es necesario aplicar después de tomar en cuenta todos los factores relacionados con el, o los principios activos, concentraciones, forma farmacéutica, tipo de muestra, método de análisis, propósito de la técnica analítica, instrumentación, sustancias relacionadas, etc., estos constituyen únicamente una guía para dar al químico un soporte técnico adecuado para resolver cada paso particular [3].

1.2.2 MÉTODO ANALÍTICO

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 la muestra. Un analito se define como un componente específico de la 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 ser confiable para ser utilizado con un propósito definido [3].

1.2.3 RIMEXOLONA

La rimexolona es un corticosteroide presenta el característico núcleo esteroídico (ciclopentanoperhidrofenantreno). Estructuralmente, su principal característica, en comparación con otros corticosteroides similares, es la casi nula presencia de grupos hidroxilo (-OH), si se exceptúa el correspondiente a C11 (indispensable para la actividad glucocorticoide). De hecho, es de los pocos corticosteroides que carecen de un resto hidroxilo (libre o esterificado) en **C17**. Asimismo, se caracteriza por presentar varios restos metilo (-CH₃), situados en **C16, C17 y C20**.

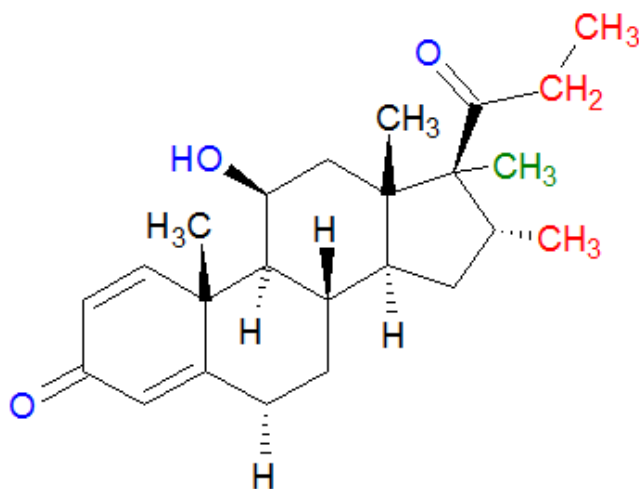


Fig. 1 Rimexolona

Este conjunto de características determina una baja hidrofilia en la molécula, lo que le hace prácticamente insoluble en agua [7].

Rimexolona es un corticosteroide. Los corticosteroides reducen la inflamación, principalmente por la inhibición del metabolismo del ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana y la prevención de la síntesis y liberación de los principales mediadores de la inflamación. Los corticosteroides suprimen las fases de la inflamación, como lo son:

- Temprana: Depósito de fibrina, la dilatación capilar, aumento de la permeabilidad vascular, la migración de los leucocitos con la liberación de factores quimiotácticos y de destrucción tisular, y la actividad fagocítica.
- Tardía: proliferación de capilares y fibroblastos, depósito de colágeno y cicatrización [8].

Rimexolona es un corticosteroide potente. La suspensión oftálmica de Rimexolona 1% está autorizada para el tratamiento post-operatorio sensible a la inflamación después de la cirugía ocular. La inflamación debe ser de naturaleza no infecciosa [8,9].

Los corticosteroides tópicos son el estándar de tratamiento de primera línea para el tratamiento de condiciones oftálmicas inflamatorias, pero puede conducir a una elevación de la presión intraocular que puede conducir a la pérdida de visión [9].

Rimexolona es un corticosteroide tópico nuevo con un bajo potencial para aumentar la presión intraocular [10].

1.2.4 SUSPENSIÓN OFTÁLMICA

Sistema disperso, compuesto de dos fases, las cuales contienen el o los fármacos y aditivos. Una de las fases, la continua o la externa es generalmente un líquido y la fase dispersa o interna, está constituida de sólidos (fármacos) insolubles, pero dispersables en la fase externa [14].

1.2.5 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN^{19,20,21,22,23,24,25.}

La cromatografía es un método físico de separación, basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una estacionaria y otra móvil. En cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase estacionaria. La cromatografía líquida se lleva a cabo en una columna de vidrio. Después se coloca la muestra por la parte superior y se hace fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad. Para aumentar la eficiencia en las separaciones, en la cromatografía de alta resolución; el tamaño de las partículas de fase fija se disminuye hasta los micrones, usando altas presiones para lograr que la fase móvil pueda fluir.

1.2.5.1 TIPOS DE CROMATOGRAFÍA EN HPLC Y APLICACIONES

La Cromatografía de líquidos, es una técnica de análisis químico ampliamente utilizada, la cual permite separar físicamente y cuantitativamente los distintos componentes de una solución por la absorción selectiva de los constituyentes de una mezcla, consta de dos fases, una fija que suele llamarse fase estacionaria, y una móvil (fase móvil) que fluye permanente durante el análisis, y que en este caso es un líquido. La tabla 1 nos muestra los tipos de cromatografía líquida que existen así como su separación cromatográfica.

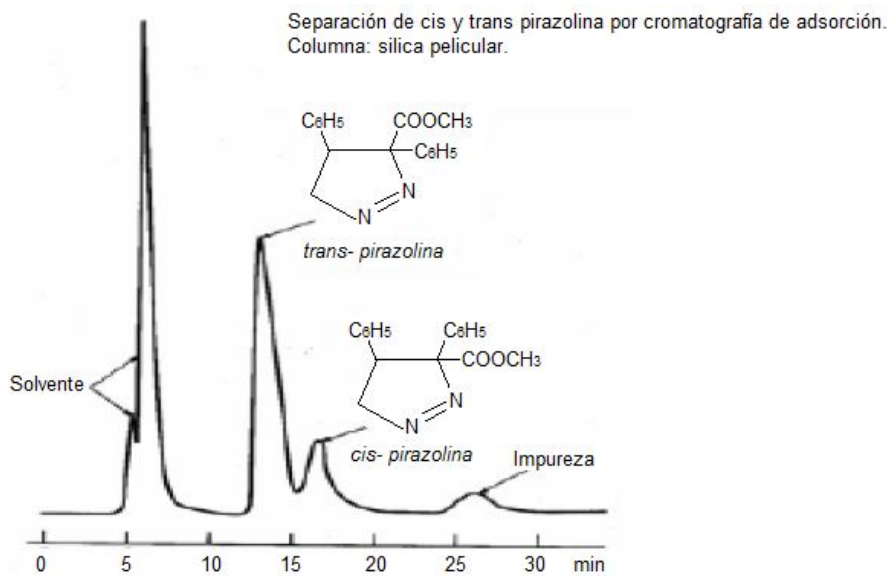
Nombre	Tipo de fase móvil	Tipo de fase estacionaria	Método de fijación de la fase estacionaria
Partición	Líquido	Líquido	Adsorbida en un sólido poroso en una columna tubular
Adsorción	Líquido	Sólido	Sostenida en una columna tubular
Papel	Líquido	Líquido	Sostenida en los poros de un papel grueso
Capa delgada	Líquido	Líquido ó sólido	Sólido finamente dividido sostenido sobre una placa de vidrio el líquido puede ser absorbente sobre las partículas
Gel	Líquido	Líquido	Sostenido en los intersticios de un polímero sólido
Intercambio iónico	Líquido	Sólido	Resina de intercambio iónico finamente dividida en una columna tubular

Tabla 1 Clasificación de las separaciones cromatográficas.

1.2.5.1.1 CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN

Es la técnica más usada para la separación de compuestos orgánicos neutros, es adecuada para compuestos no polares probablemente con masas moleculares inferiores a 5 000. Se basa en la afinidad de adsorción, su fase estacionaria es la superficie de un sólido finamente dividido. El soluto compete por los sitios sobre la superficie del sólido con el disolvente utilizado como eluyente; la retención es el resultado de la adsorción. Las únicas fases que se utilizan en este tipo de cromatografía son la sílice y la alúmina, siendo la primera la preferida. La elección de la fase móvil es fundamental para el éxito de una cromatografía líquido-sólido; variando el disolvente, si este presenta una alta fuerza de elución eluirá las especies absorbidas más rápidamente que uno que tenga un valor más bajo. La cromatografía de capa fina (TLC) es un ejemplo especial de cromatografía por adsorción en la cual la fase estacionaria es un plano, en la forma de un soporte sólido en un plato inerte.

Aplicaciones: se utiliza para compuestos no polares con masas <5000, muestras solubles en disolventes no polares y es capaz de diferenciar entre compuestos isómeros. Es particularmente adecuada para el análisis de moléculas no ionizantes, insolubles en agua y relativamente simples, que frecuentemente son isómeros o compuestos muy relacionados. Se utiliza en la separación de la vitamina D3 y sus metabolitos las vitaminas A, D y E (y compuestos muy relacionados a estas vitaminas), muchas drogas de abuso (LSD, por ejemplo), antidepresivos tricíclicos y bloqueadores beta. Los aceites naturales y los extractos de esencias se analizan fácilmente y los pigmentos menos polares de las plantas, tales como los carotenoides y las porfirinas, La tendencia a ser adsorbido disminuye en el siguiente orden: ácido>alcohol>carbonilo>éster>hidrocarburo. A continuación se muestra una cromatografía de adsorción.



1.2.5.1.2 CROMATOGRAFÍA DE PARTICIÓN

Cromatografía líquido-líquido. La separación de las sustancias se logra por migración diferencial de los solutos. La fase estacionaria de la cromatografía de partición es un líquido soportado en un sólido inerte, el más usado es el ácido silícico o gel de sílice. La fase móvil puede ser un disolvente puro o una mezcla de disolventes, la polaridad puede ser notablemente diferente al del líquido estacionario. Esta consiste en aplicar una gota de la solución con la mezcla de sustancias a separar en la parte inferior de una tira de papel o en una delgada capa de un material inerte, como silicagel o celulosa, el papel o material inerte (los denominaremos soportes) se colocan en un recipiente con un solvente, de manera que, este los vaya impregnando; el disolvente se elige de manera tal que uno de ellos se adsorba más al soporte que el otro; a medida que el disolvente avanza a lo largo del soporte los líquidos suben espontáneamente por capilaridad, aquellos componentes de la muestra que sean más solubles en el líquido que queda adsorbido serán retenidos, y los que tengan mayor afinidad por el que no se adsorbe serán arrastrados por este.

Aplicaciones: es un poderoso instrumento para la separación de sustancias estrechamente relacionadas. Ejemplos típicos son la resolución de los numerosos aminoácidos formados en la hidrólisis de una proteína, la separación y análisis de alcoholes alifáticos y la separación de derivados de azúcares.

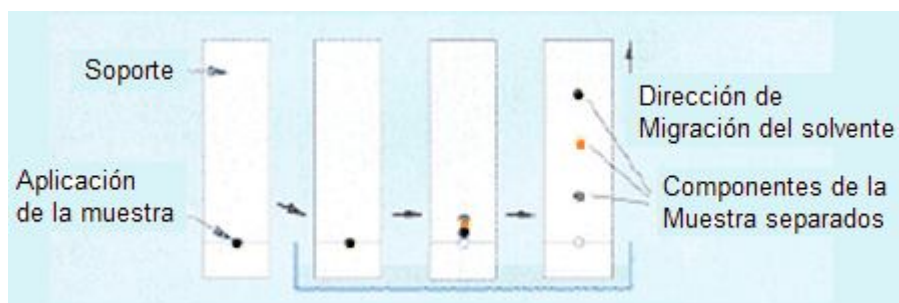


Fig. 3 Separación de moléculas pequeñas por cromatografía de partición.

1.2.5.1.3 CROMATOGRAFÍA DE INTECAMBIO IONICO.

El disolvente por lo general es agua y las especies a separar son iones, es muy utilizada en la química inorgánica, también se usa para la separación de aminoácidos y otros ácidos y bases orgánicas. Está basada en la atracción entre iones del soluto y puntos cargados que existen en la fase estacionaria. El intercambio iónico es un proceso en el cual ocurre un intercambio de iones de signo igual entre una solución y un sólido esencialmente insoluble en contacto con la solución. La fase estacionaria es una resina de intercambio iónico que contiene grupos cargados, teniendo la propiedad de separar especies ionizadas (Cationes o Aniones); la Fase Móvil es generalmente una solución amortiguadora de pH.

Dentro de los intercambiadores encontramos a las arcillas así como resinas sintéticas. Estas últimas pueden ser usadas para intercambio de cationes se usan: resinas ácidas fuertes las cuales contienen grupos de ácidos sulfónico y resinas ácidas débiles con grupos de ácido carboxílico. En el caso de intercambiadores aniónicos, contienen grupos funcionales básicos adheridos a la molécula de polímero generalmente son aminas. La Fase Estacionaria es una resina de intercambio iónico que contiene grupos cargados, teniendo la propiedad de separar especies ionizadas (Cationes o Aniones); la Fase Móvil es generalmente una solución amortiguador de pH.

Aplicaciones: encuentra mucho uso en los analizadores para aminoácidos, se ha aplicado a una gran variedad de sistemas orgánicos y bioquímicos incluyendo fármacos y sus metabolitos, sueros, conservantes de alimentos, mezclas de vitaminas, azúcares y preparaciones farmacéuticas.

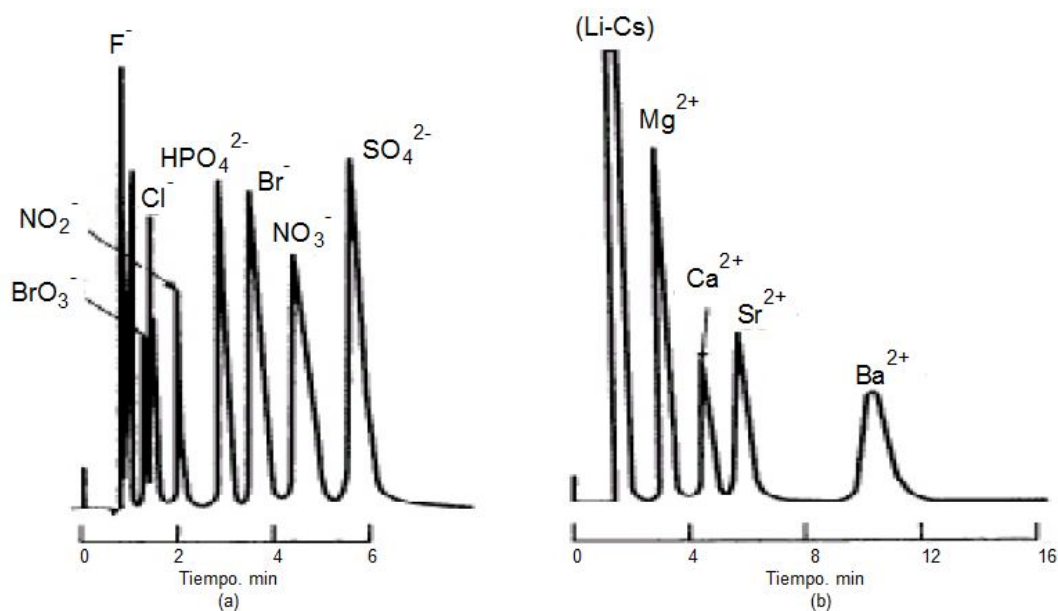


Fig. 4 Cromatografía Iónica (a) Separación de aniones en una columna de intercambio aniónico. (b) separación de iones alcalinotérreos en una columna de intercambio catiónico.

1.2.5.1.4 CROMATOGRAFÍA EN GEL.

Es una técnica de caracterización de polímeros que proporciona la distribución completa de pesos moleculares de una muestra y sus distintos promedios. El fraccionamiento se basa, por lo menos en parte, en el tamaño y la forma molecular de las especies de la muestra, también se le conoce como cromatografía de permeación en gel, cromatografía de exclusión y cromatografía de tamizado molecular. Se efectúa en una columna por el método de elución. La fase fija está formada por partículas poliméricas o de sílice que contienen una red uniforme de poros por los que pueden penetrar las moléculas de pequeño tamaño. Las moléculas de tamaño grande se excluyen totalmente y son eluidas en primer lugar, mientras que las de pequeño tamaño tienen acceso a todo el volumen poroso y son las últimas que se eluyen, los factores que determinan la separación de las moléculas son el tamaño del poro, el tamaño de la partícula y el flujo de elución. Los diferentes tipos de partículas usadas deben ser estables, mecánica y químicamente, tener bajo contenido en grupos iónicos, uniformidad de poro y tamaño. Los compuestos pueden ser derivados de dextranos (Sephadex), derivados de agarosa (Sephacosa), derivados de acrilamidas (Biogel P) y esferas de vidrio. Hay diferentes tamaños de partícula para un gel: a menor tamaño mayor resolución y menor gasto en la columna.

Aplicaciones: Esta técnica se emplea en la separación de proteínas de alimentos, determinación de glucosa y fructosa en zumos de fruta, así como para la separación de compuestos de alto peso molecular como proteínas y polímeros, ácidos grasos y azúcares. Cambios de buffers, después de cromatografías de intercambio iónico, afinidad o de interacción hidrofóbica; proteínas, polisacáridos, polipéptidos etc. pueden ser desalados antes de ser concentrados o liofilizados; eliminación de fenol de las preparaciones de ácidos nucleicos; eliminación de compuestos de bajo peso molecular marcados. I125, FITC de las soluciones de marcaje de proteínas; para reacciones entre macromoléculas y reactivos de bajo peso molecular; eliminación de productos, cofactores, inhibidores, etc. de las enzimas; Purificación de macromoléculas; determinación del peso molecular de las proteínas.

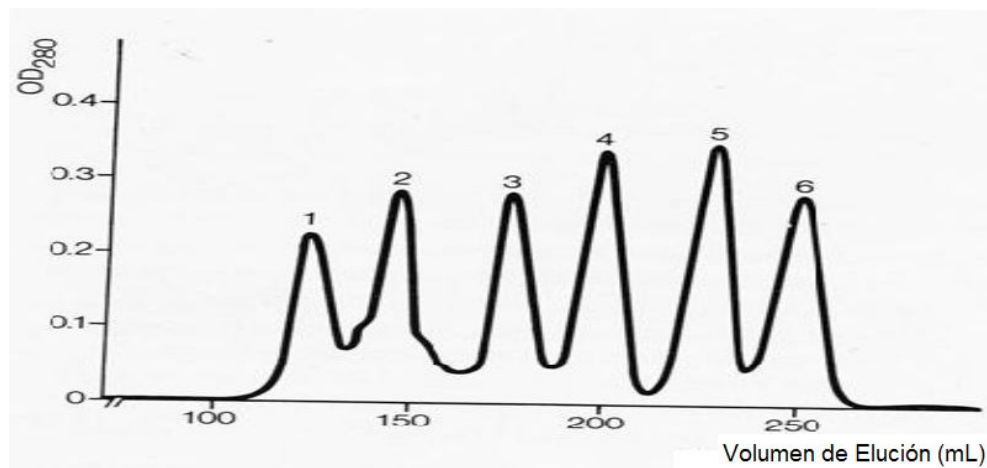


Fig. 5 Cromatograma Sephadex G-200 superfine. Peaks: 1. catalase; 2. aldolase; 3. Bovine serumalbumin; 4. ovoalbumin; 5 chymotrypsinogen A; 6 ribonuclease A.

1.2.5.1.5 CROMATOGRAFÍA PLANA

La separación se produce sobre una capa de un sólido finamente dividido que se ha fijado sobre una superficie plana, es un método notablemente simple y de bajo costo. Técnica de separación en la que la fase estacionaria está en forma de plano o sobre un plano, éste puede ser un papel, que esté impregnado con una sustancia que actúe de fase estacionaria o una capa de partículas sólidas extendida sobre un soporte, tal como una placa de vidrio. A veces a la se la llama Cromatografía de Lecho Abierto.

La cromatografía plana tiene como fase móvil un líquido y como fase estacionaria un líquido o un sólido dispuestos sobre una superficie plana; existen tres tipos, cromatografía en papel, donde una hoja o tira de papel de filtro sirve como fase estacionaria y medio de separación; cromatografía en capa fina, en la que la separación se produce sobre una capa de sólido finamente dividido que se ha fijado sobre una superficie plana; y la electroforésis. La fase móvil se mueve a través de la fase estacionaria por capilaridad, a veces es ayudado por gravedad o por potencial eléctrico.

Aplicaciones: se utiliza para separar e identificar los componentes de pequeñas muestras de sustancias inorgánicas, orgánicas y bioquímicas, se usa en determinadas aplicaciones con una finalidad didáctica, también para la separación de muestras clínicas y bioquímicas así como en otras aplicaciones analíticas generales por su gran sencillez y bajo costo.

1.2.5.1.6 CROMATOGRAFÍA EN PAPEL.

Se utilizan papeles especiales de elevada pureza, Es una técnica muy sencilla, se utiliza una tira de papel de filtro (Whatman nº 1 por ejemplo) como soporte para la separación. El mecanismo que interviene en la separación fundamentalmente de reparto. La fase estacionaria esta constituida por el agua absorbida sobre las moléculas de celulosa del papel. El papel utilizado puede ser papel de filtro estándar o papel, La fase móvil se selecciona empíricamente, se emplean mezclas consistentes en compuestos orgánicos, agua y otras especies (ácidos, bases, agentes complejantes) que modifiquen la solubilidad de los compuestos de la muestra.

1.2.5.1.7 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.

Se realiza en placas de vidrio o plástico recubiertos con una capa delgada de partículas finamente divididas contenidas en la fase estacionaria. El mecanismo predominante es la adsorción. Los materiales más usados han sido: gel de sílice, alúmina, celita, poliamidas. La fase móvil el disolvente a utilizar debe reunir una serie de características: inerte frente a los componentes de la muestra y de la fase estacionaria, elevada pureza, adecuada viscosidad y tensión superficial, bajo punto de ebullición para facilitar el secado de las placas, económico y baja inflamabilidad y toxicidad.

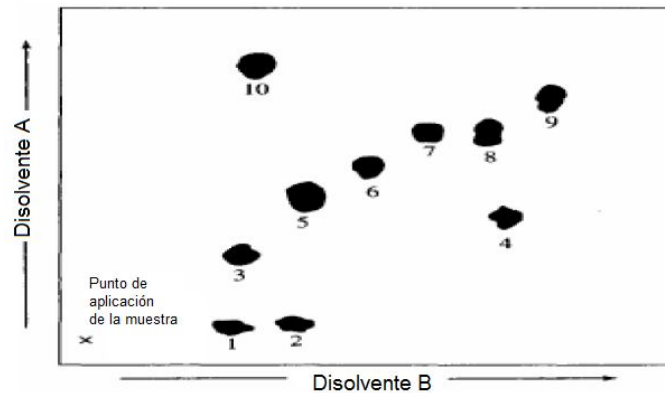


Fig. 6 Cromatograma en capa fina bidimensional (gel de sílice) de algunos aminoácidos. Disolvente A: tolueno/2-cloroetanol/piridina. Disolvente B: cloroformo/alcohol bencilico/ácido acético. Aminoácidos: (1) ácido aspártico, (2) ácido glutámico, (3) serina, (4) f3-alanina, (5) glicina, (6) alanina, (7) metionina, (8) valina, (9) isoleucina y (10) cisteína.

COMPONENTES BÁSICOS DE UN SISTEMA PARA HPLC.

Un equipo para HPLC puede ser representado por la siguiente figura 7.



Fig. 7 Esquema de los componentes de un HPLC

La fase móvil puede ser un disolvente puro o una mezcla de disolventes; algo importante es que deben ser grado HPLC, esto implica un 99% o más de pureza para evitar contaminantes que puedan interferir en la elución de la muestra o bien que contengan algunas pequeñas partículas que puedan tapar la columna; por lo que es necesario filtrarlos antes de que entren a la columna.

Dependiendo del equipo, cuando se trata de una mezcla de disolventes; se puede o no programar la bomba para que tome las cantidades adecuadas de cada disolvente o bien, algunas otras bombas (las más antiguas) no tienen la capacidad de realizar esta mezcla y por lo tanto esta se tiene que preparar por nosotros. Cuando durante toda la separación se usa el mismo disolvente, se denomina *isocrática*.

La bomba envía el disolvente hacia la válvula inyectora que es una válvula de seis vías que permite introducir al disolvente, la muestra contenida en el *loop* de volumen calibrado. Luego de que se produzca la separación en la columna, los componentes de la mezcla pasan al detector. El cual da una señal eléctrica proporcional a la cantidad de materia; esta señal es enviada al registrador que a su vez da un cromatograma de intensidad en función del tiempo (figura 8); en el cual, lo ideal es obtener picos gaussianos los cuales corresponden cada uno a un componente diferente de la muestra.

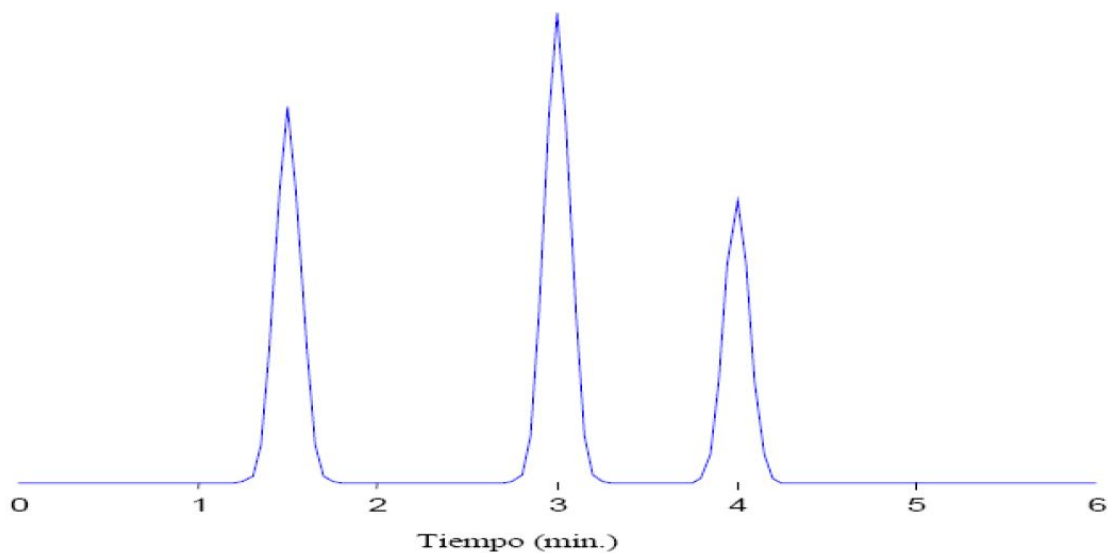


Fig. 8 Cromatograma típico obtenido por un HPLC

En HPLC existen dos tipos básicos de detectores:

- Los basados en una propiedad de la disolución.
- Los basados en una propiedad del soluto

Algunos de los detectores más usados son: detectores de absorbancia, detectores de fluorescencia, detectores de Índice de refracción, detector de dispersión de luz, detectores electroquímicos, detectores por espectrometría de masas.

El integrador calcula el área de cada pico, la cual se puede relacionar con la concentración del componente si se tiene una curva patrón; si no se cuenta con ella, sólo sería cualitativa. Debido a que los detectores que se usan en estos equipos no son destructivos, es posible recuperar los productos que salen de él, y de esta manera realizar otro tipo de separaciones (por ejemplo) analíticas (también depende del tamaño del *loop*, de la columna y del tipo de bomba).

Volumen y tiempo de retención

El volumen de fase móvil (o tiempo para T_r) necesario para transportar la banda de soluto desde el punto de inyección a través de la columna, hasta el detector, en el punto máximo del pico del soluto se define como volumen de retención (V_r).

El volumen muerto (V_0) representa lo que se conoce como espacio muerto o volumen de retraso de la columna, incluye las contribuciones efectivas del volumen del inyector, tubería, conexión, columna y detector.

Factor de capacidad (K)

Actualmente, se conoce como factor de retención (k). El factor de retención es un parámetro experimental importante que se utiliza para describir las velocidades de migración de los solutos en columnas. Para el soluto A, el factor de retención, k_A se define como:

$$K_A = \frac{K_A * V_S}{V_M}$$

donde K_A es la constante de distribución del soluto A, V_S es el volumen del soluto en la fase estacionaria y V_M el volumen del soluto en la fase móvil (Skoog y cols., 2001).

Selectividad

El factor de selectividad α de una columna para dos solutos, A y B, se define como la relación de la constante de distribución del soluto retenido con más fuerza, B, y la constante de distribución del soluto retenido con menos fuerza, A:

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

donde K_B es la constante de distribución de la especie retenida con más fuerza, especie B, y K_A es la constante de la especie retenida con menos fuerza, es decir, la especie A, que eluye más rápido. De acuerdo con esta definición, α siempre es mayor que la unidad (Skoog y cols., 2001).

Eficiencia

La eficiencia de una columna cromatográfica depende del ensanchamiento de banda que ocurre cuando un compuesto pasa a través de la columna. Para las mediciones cuantitativas de la eficiencia de las columnas cromatográficas se emplean dos términos: (1) *altura del plato* H y (2) *cantidad de platos o número de platos teóricos* N. Los dos están relacionados por la ecuación:

$$N = \frac{L}{H}$$

donde L es la longitud del empaque de la columna (en cm). La eficiencia de las columnas cromatográficas aumenta a medida que es mayor el número de platos N y la altura H es menor. Se observan grandes diferencias en la eficiencia de las columnas como resultado de las diferencias en el tipo de columna y de las fases móvil y estacionaria. En términos de número de platos teóricos, la eficiencia puede variar desde unos centímetros hasta varios cientos de miles; la altura de los platos varía desde unas décimas hasta milésimas de centímetro y son comunes incluso mas pequeñas (Skoog y cols., 2001).

Resolución cromatográfica

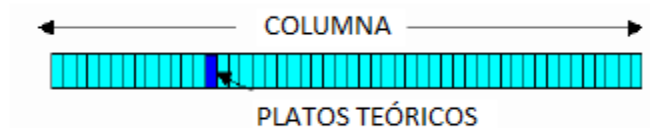
Es una medida cuantitativa de su capacidad para separar dos analitos A y B. la resolución de cada columna queda definida como:

$$R_S = \frac{2\Delta Z}{W_A + W_B} = \frac{2((t_{rA}) - (t_{rB}))}{W_A + W_B}$$

Se puede mejorar la resolución para una fase estacionaria determinada alargando la columna, lo que incrementa el número de platos. Sin embargo, una consecuencia adversa de añadir platos es un incremento en el tiempo necesario para la separación de los componentes (Skoog y cols., 2001).

Número de platos teóricos

Expresada como una cantidad adimensional, refleja el número de veces que el soluto se reparte entre las dos fases durante su paso a través de la columna.



$$N = \frac{L}{H}$$

Asimetría (AF)

El factor de asimetría del pico (AF, de asymetry factor) se define como la razón de las mitades del ancho del pico a una altura dada. Conforme se mida más abajo la asimetría del pico AF es mayor, debido al ruido del detector, un compromiso aceptable es medir AF en 10% de la altura del pico.

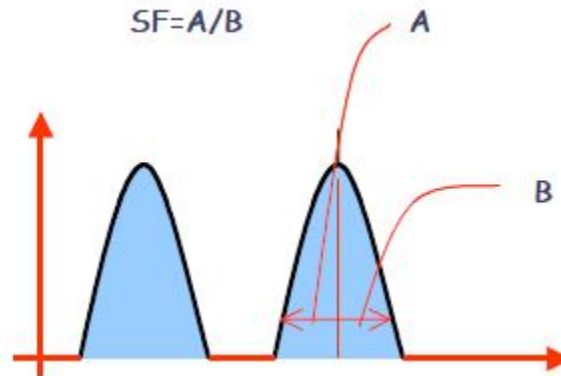


Fig. 9 Representación esquemática del factor de asimetría. Skoog, 2001

1.2.5.2 INSTRUMENTACIÓN

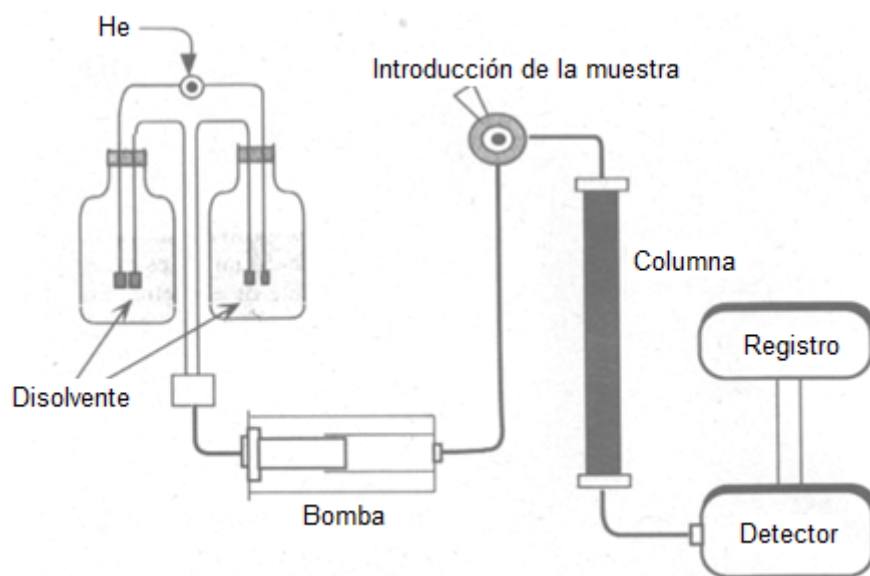


Fig. 10 Componentes básicos de un sistema para HPLC. Hernández, 2002.

Los componentes básicos de un sistema para HPLC son:

A) Depósitos para la fase móvil (disolventes)

Como algunas de las fases móviles usadas en HPLC pueden ser químicamente activas como ácidos, bases o líquidos corrosivos, es esencial que los componentes del sistema estén fabricados con materiales resistentes, por lo que la mayoría de las partes en contacto con la fase móvil suelen estar fabricadas con acero inoxidable (Hernández L. 2002).

Los disolventes más usados en HPLC son agua, disoluciones tampón acuosas y disolventes orgánicos como el metanol. Deben ser espectroscópicamente puros, exentos de partículas sólidas y degasificados, esto se lleva a cabo con un gas inerte muy poco soluble como el helio.

Como fase estacionaria lo más común es usar partículas microporosas esféricas de sílice muy puro, que son permeables al disolvente (Harris, D. 2001).

Los recipientes que se utilicen para almacenar la fase móvil tienen que ser inertes, es decir, el disolvente no deberá extraer especie alguna del material con el que estén contruidos. Suelen ser botellas de vidrio y tubos de teflón. Están provistos de unos filtros, indispensables para eliminar los gases disueltos y partículas que pueda contener la fase móvil (Harris, 2001).

B) Sistema de bombeo para proporcionar presión a la fase móvil

Debido a las elevadas presiones de trabajo y al pequeño tamaño de las partículas de la fase estacionaria, se utiliza una bomba que es la encargada de introducir la fase móvil o disolvente a través de la columna.

Los sistemas de bombeo deberán reunir las siguientes características: (Hernández, L. 2002).

Generar presiones superiores a 6000 psi.

Capaces de cubrir un amplio rango de flujo entre 0,1 y 10 ml/min con una precisión del 0,5 % y que esté libre de pulsaciones.

Construidos con materiales inertes respecto a los disolventes empleados.

Las bombas empleadas en HPLC son de tres tipos:

Bombas recíprocas o de vaivén, son las más utilizadas. Están formadas por una pequeña cámara cilíndrica que se llena y luego se vacía por oscilación de un pistón de zafiro. El bombeo produce un flujo pulsado que después debe amortiguarse. Sus principales ventajas son que se consiguen presiones elevadas y se suministra un caudal constante, pudiéndose adaptar a la técnica de elución con gradiente, debido a su pequeño volumen interno (Skoog, D. A. et al. 2001).

Bombas neumáticas o de presión constante, hacen uso de la presión de un gas aplicado al recipiente conteniendo la fase móvil. Son sencillas, no provocan pulsaciones pero están limitadas a presiones relativamente bajas. (Hernández, L. 2002).

Bombas de desplazamiento o tipo jeringa, consisten en una cámara equipada con un mecanismo de tornillo. Suministran un flujo libre de pulsaciones pero con una capacidad limitada a unos 250 ml. (Harris, D.C. 2001).

C) Sistema de inyección de muestras

Los volúmenes que se inyectan de muestra deberán ser pequeños para evitar la sobrecarga de la columna. Hay varios tipos:

El método más simple es la utilización de una *jeringa de alta presión* con un diafragma ("septum") a la entrada de la columna. Está limitado a una presión máxima de operación de 1500 psi.

Las *válvulas de inyección* con bucles de volumen conocido, es el método más utilizado (Harris, D. C. 2001).

D) Columna cromatográfica

En las columnas cromatográficas es donde se produce la velocidad diferencial de los solutos que permite su separación (Harris, D. C. 2001). El material de las columnas cromatográficas suele ser de acero inoxidable cuya longitud varía de 5 a 30 cm y un diámetro de 1 a 5 mm. La eficacia de las columnas aumenta al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria. El tamaño típico de las partículas es de 3-10 μm (Harris, D. 2001).

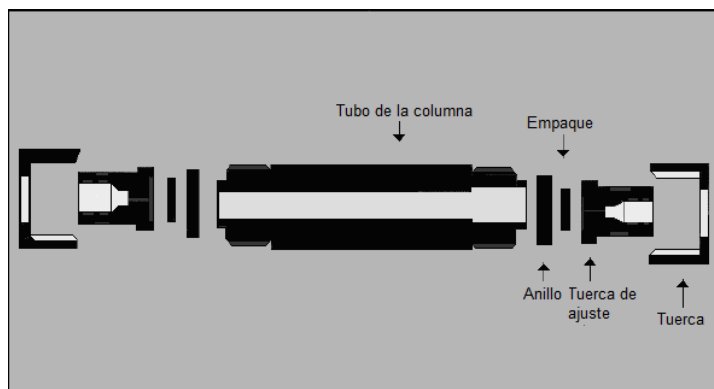


Fig. 11 Columna para HPLC. Fuente: P.V.G. Lab. 3-D, Facultad de Química, 2007

Las columnas son caras y se degradan con facilidad, por eso, se protege la entrada de la columna con otra más corta, la precolumna, que retiene por adsorción las impurezas de forma irreversible (Harris, D. 2001).

E) Termostatos para las columnas

No es necesario el control estricto de la temperatura de la columna, pero las separaciones resultan más reproducibles cuando la temperatura se mantiene constante. Los instrumentos comerciales modernos están equipados con calentadores que regulan la temperatura de la columna.

F) Detectores

El papel del detector es indicar los momentos de aparición de los componentes, y proporcionar indicación cuantitativa y cualitativa de los mismos. El detector utilizado depende de la naturaleza de la muestra y deberá reunir una serie de características como son, tener una sensibilidad elevada, buena estabilidad y reproducibilidad. Amplio margen de respuesta lineal, insensible a cambios en la presión y la temperatura. Se pueden clasificar de la forma siguiente: (Hernández, L. 2002)

El detector se coloca al final de las columnas, responde a la concentración del soluto y se registra en función del tiempo y obteniéndose una serie de picos, generándose un gráfico que se denomina cromatograma. La posición de los picos en el eje del tiempo puede servir para identificar los componentes de la muestra.

Los detectores basados en una propiedad del soluto que no la suele presentar la fase móvil. Suelen ser muy selectivos y sensibles:

Detectores de absorción ultravioleta, son los más utilizados. Su fundamento es la espectrofotometría de absorción de luz visible y ultravioleta de un componente a una determinada longitud de onda. Los más potentes son los que utilizan un montaje de fotodiodos para registrar el espectro completo de cada soluto que pasa por el detector. Los datos de absorción se representan en función de la longitud de onda y del tiempo.

Detectores de fluorescencia, son muy sensibles y selectivos, el principio de operación se basa en la irradiación con la luz UV al componente de interés y la posterior medida de la luz fluorescente emitida por éste. (Harris, D. C. 2001)

Detectores electroquímicos, ofrece ventajas debido a su especificidad, sensibilidad y amplia aplicabilidad, especialmente para compuestos orgánicos. Responde a analitos que puedan oxidarse o reducirse. Es el ejemplo de fenoles, aminas, peróxidos (pueden detectarse por oxidación) y cetonas, aldehídos (detectados por reducción). Las técnicas electroquímicas más utilizadas con esta finalidad son la amperometría, voltamperometría y coulombimetría.

Los detectores basados en una propiedad de la disolución, responden a un conjunto amplio de solutos, pero suelen ser poco sensibles:

Detectores de índice de refracción, está formado por una celda con dos compartimentos, en uno se introduce el disolvente puro y en el otro la muestra, se hace pasar luz visible paralela. Cuando entra en la celda soluto de distinto índice de refracción al disolvente el haz se desvía y varía la señal dada por la fotocélula (Harris, D. C. 2001). El principal inconveniente es que son muy sensibles a los cambios de temperatura y no resultan apropiados para trabajar con la modalidad de elusión con gradiente.

Detectores de conductividad, son los más utilizados cuando los solutos eluidos son iónicos, como ácidos y bases, así como cationes y aniones inorgánicos después de su separación por cromatografía de cambio iónico. Tienen elevada sensibilidad, baratos y de larga duración.

Características de los detectores:

Sensibilidad. Medida de la efectividad de un detector para convertir la muestra en una señal eléctrica medible.

Linealidad. Rango de masa ó concentración de muestra sobre el cual el detector mantiene una sensibilidad constante sin una desviación arbitraria.

El significado práctico de la linealidad del detector es el que le indica al analista la concentración para la cual el detector es confiable. Hay dos límites en la curva de linealidad:

El límite de concentración inferior, que es dado por el límite de detección.

El límite Superior, definido por un porcentaje de desviación arbitrario de la curva de linealidad.

Rango Dinámico Lineal. Rango sobre el cual la sensibilidad del detector es constante.

Ruido. Es cuantificado por el promedio de la amplitud pico-pico de la señal. El significado de conocer el nivel de ruido de un detector es un factor determinante en la determinación de la cantidad mínima detectable y el límite inferior del rango lineal.

Límite de Detección. Está definido como la mínima cantidad de sustancia que puede producir una señal que sea el doble del nivel de ruido.

Corriente de Fondo. Señal constante de salida generada por el proceso en el que un detector está operativo sin que alguna sustancia pase a través de él. Esta señal es muy importante, ya que permite diagnosticar el buen o mal funcionamiento del detector.

La separación efectuada se conserva en un registro individual llamado cromatograma. Un cromatograma es una imagen que traduce visualmente en una pantalla o en un papel la evolución, en función del tiempo, de un parámetro que depende de la concentración instantánea del soluto a la salida de la columna. Este gráfico se obtiene gracias a un detector situado a la salida de la columna (Rouessac y Rouessac, 2003).

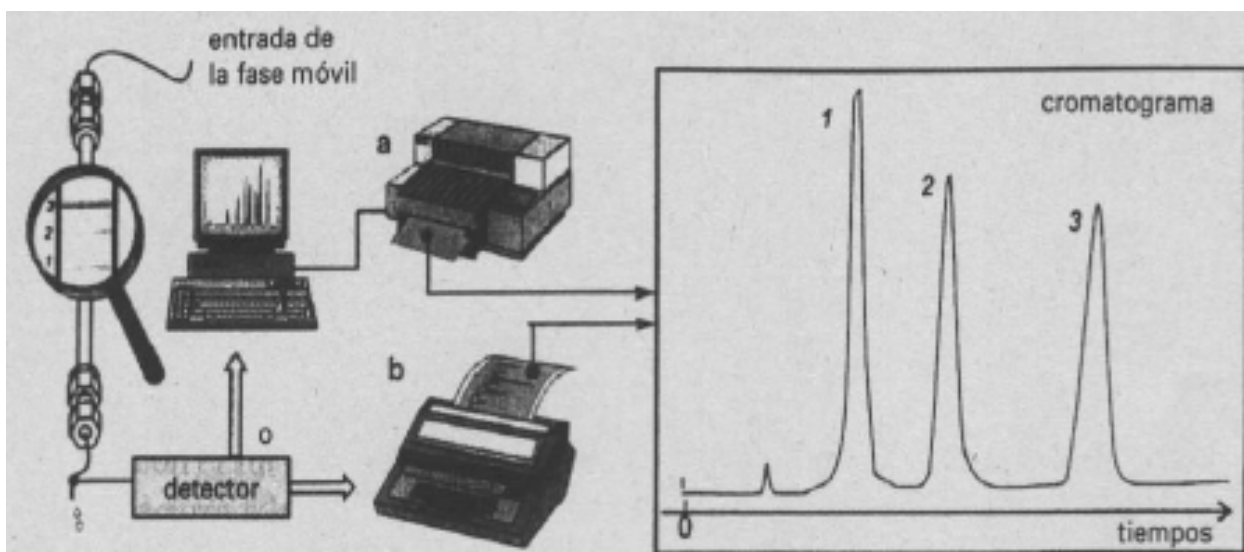


Fig. 12 Montaje cromatográfico y cromatograma (Skoog, A. D. Et. Al, 2001).

G) Sistema para el tratamiento de datos y registrador.

El procesamiento de datos en cromatografía incluye tres objetivos:

- coleccionar y procesar la señal proveniente del detector de modo de producir un cromatograma y la información correspondiente como área de los picos, tiempos de retención y ancho de picos
- coleccionar y analizar los datos de modo de obtener información cualitativa y cuantitativa y generar los reportes correspondientes
- optimizar los parámetros cromatográficos.

1.2.6 PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS

Un parámetro es una cantidad que puede tener distintos valores y que caracteriza un proceso, una operación o un resultado. La parametrización de datos en cromatografía, como en otros métodos facilita la tabulación y la comunicación de dichos datos. Se puede parametrizar la forma, la posición y la resolución de las bandas de una cromatografía. Estos pueden correlacionarse satisfactoriamente con descripciones de los procesos moleculares que tienen lugar durante la separación.

Constantes de Distribución.

Al encontrarse un soluto disperso en una fase que entra en contacto con otra, ocurre un fenómeno de distribución, en el cual dicho soluto puede tener mayor afinidad a alguna de las dos fases. De esta manera, se genera un equilibrio entre la cantidad de soluto que existe en una fase y en otra. La constante asociada es la llamada constante de distribución, que se define para un soluto A como:

$$D_A = \frac{[A]_1}{[A]_2}$$

donde $[A]_1$ y $[A]_2$ son la concentración de A en la fase 1 y 2 respectivamente. Concretamente, en cromatografía la fase 1 es la fase estacionaria y la fase 2 es la fase móvil y el soluto A es el analito de interés. Esta constante es específica para cada compuesto con cada determinada fase estacionaria y fase móvil.

Factores de influencia en la retención.

La retención que ocurre del soluto en la fase estacionaria, se debe generalmente a la diferencia de polaridades entre las fases estacionaria y la móvil, promoviendo que el soluto se reparta entre ellas según su coeficiente de distribución. De esta manera, al separarse una mezcla que contenga solutos con polaridad distinta, y por lo mismo coeficientes de distribución distintos, la retención será diferente para cada uno. En la cromatografía de gases, el t_0 , es evaluado convenientemente a partir del tiempo de retención del "pico de aire". En la cromatografía de líquidos, cualquier compuesto no retenido puede usarse como muestra para medir el t_0 . El tiempo muerto de la columna puede usarse para determinar el llamado tiempo de retención ajustado o corregido, $t'R$.

$$t'R = tR - t_0$$

Una medida conveniente y útil de la retención del soluto está dada por el factor de capacidad (o factor de retención), k'

$$K' = \frac{t_r}{t_0}$$

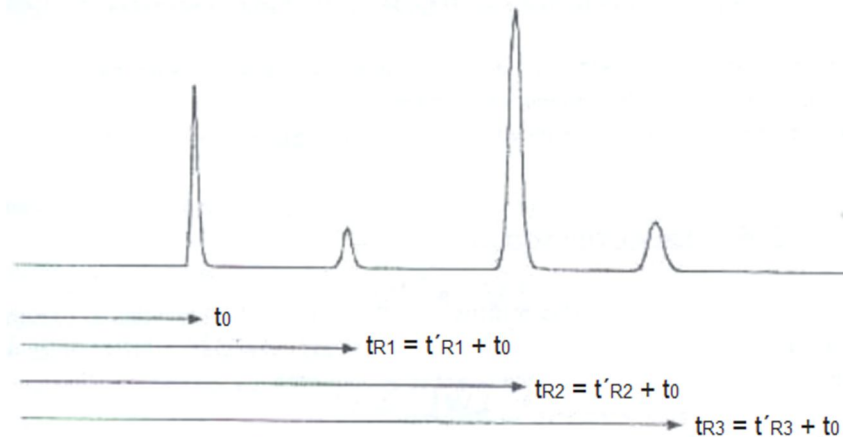


Fig. 13 Cromatograma que muestra diferentes picos con tiempos de retención diferentes, así como el tiempo muerto.

Los valores de k' no tienen un significado simple en un gradiente de elución o en temperatura programada, y usualmente no son reportados cuando esos procedimientos son usados. Los valores de k' pueden ser determinados a partir del tiempo de retención, t_R . En los modos de retención de cromatografía se tiene: $k' > 0$, que significa que no hay bandas eluidas antes del tiempo muerto, t_0 . A menudo es útil expresar el tiempo de retención o el volumen en términos del factor de capacidad, k' .

$$t_R = t_0 (1 + k')$$

$$V_R = V_m (1 + k')$$

La retención del soluto en la fase estacionaria depende de la afinidad, y de los factores que puedan afectar a la misma. El fenómeno de adsorción depende fuertemente de la temperatura, a mayor sea ésta se fomentará la desorción, y debe por tanto controlarse dependiendo de la naturaleza del análisis.

Retención y Equilibrio en Cromatografía

El soluto se encuentra en un equilibrio de distribución entre la fase móvil y la estacionaria, y dependiendo del desplazamiento de dicho equilibrio es la retención del mismo. Una separación cromatográfica típica se muestra en la figura 14. La separación está fuertemente afectada por la proximidad de bandas adyacentes en el cromatograma.

Una importante medida de la proximidad de bandas es el llamado factor de separación, α , donde dos bandas adyacentes, teniendo los valores k_1 y k_2 : $\alpha = k_2 / k_1$. El factor de separación, α , es usualmente identificado con la selectividad del sistema cromatográfico, es decir, la habilidad del sistema a prever diferentes tiempos de retención para dos compuestos específicos. Dicho factor debe tener un valor mayor a uno, pues esto significaría que no hay separación, pero es recomendable que sea menor a dos puesto que tiempos de retención muy largos se traducen en tiempo desperdiciado durante la operación experimental. Los valores de α depende de los dos solutos y de

- 1) La composición química de la fase estacionaria.
- 2) La composición química de la fase móvil (excepto en cromatografía de gases).
- 3) La temperatura.

En cromatografía de fluidos supercríticos, la presión también puede afectar a α al cambiar la densidad de la fase móvil.

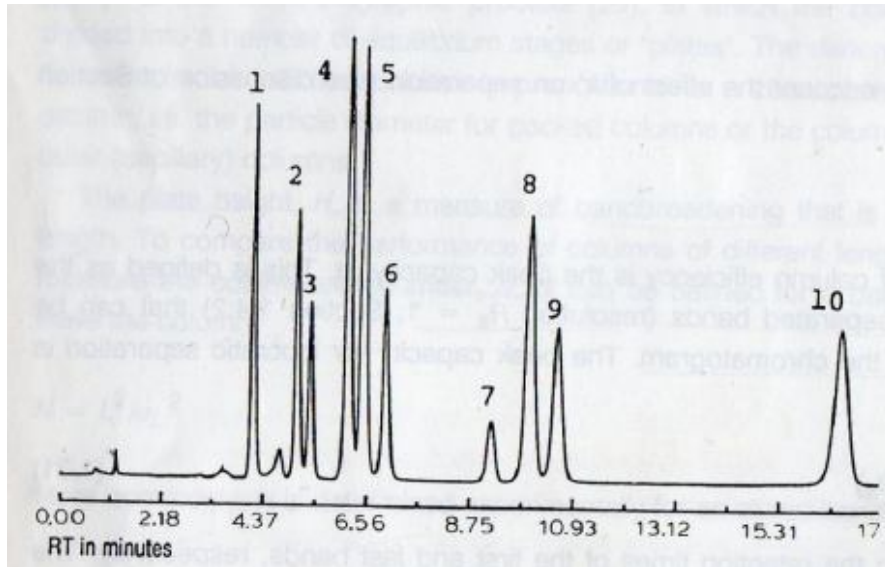


Fig. 14 Separación de una muestra de un compuesto nitrado con 10 componentes por cromatografía de líquidos.

Eficiencia de separación de una columna

Las columnas cromatográficas consisten en un número de zonas adyacentes en cada una de las cuales hay suficiente espacio para que un analito esté en equilibrio entre dos fases. Cada una de estas zonas se conoce con el nombre de plato teórico (de los que hay N en cada columna). La longitud de una columna contiene una altura del plato, H , que tiene unidades de longitud, normalmente en micras. El valor numérico de N y H para cada columna en particular es expresado en referencia a cada analito. La altura del plato está relacionada con la anchura del pico del analito y la distancia que recorre dentro de la columna, X :

$$H = \frac{\sigma^2}{X}$$

donde σ es un estándar de desviación de la banda gaussiana. Para los picos gaussianos simétricos la anchura de la base es igual a 4σ y la anchura del pico al punto de inflexión, w_i es igual a 2σ . Por lo tanto el valor de H puede ser calculado desde el cromatograma midiendo la anchura del pico. El número de platos teóricos en la columna entera viene dado por:

$$N = \frac{L}{H} = \frac{L * X}{\sigma^2}$$

donde L es la longitud de la columna. Si consideramos la posición del pico a $X = L$ con el hecho de que la anchura del pico en su base es w , obtenida de las tangentes dibujadas desde los dos puntos con más pendiente del pico, es igual a 4σ , la ecuación anterior se convierte en

$$N = \frac{16 * L^2}{W^2}$$

Si en lugar de medir L y ω en unidades de longitud se hace en tiempo, la ecuación quedará:

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

La medición del ancho del pico es más confiable cuando se realiza a la mitad de la altura del pico, con lo cual se puede utilizar

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

También puede hacerse en función de la altura y área del pico

$$N = 2\pi \left(\frac{t_R}{\text{area/altura}} \right)^2$$

Es importante que tanto t_R , W ó $W_{1/2}$ ó área/altura se expresen en las mismas unidades ya que N es adimensional.

Para que un sistema sea eficiente, se necesitan fases poco viscosas, espesores de película delgados y columnas de poco diámetro, para que se favorezca la transferencia de masa. La velocidad promedio de la fase móvil también afecta la altura del pico, por lo que hay una velocidad óptima para obtener el máximo de eficiencia. Generalmente se trabaja a flujos mayores de éste para no perder demasiado tiempo en análisis.

Procesos de ensanchamiento de banda

El número de platos de una columna (eficiencia, N) es una medida del ensanchamiento de la banda cromatográfica. Cuando inyectamos un pequeño volumen de analito en una columna forma una banda estrecha en su inicio, pero a medida que el analito migra la banda se va ensanchando. La anchura de pico aumenta con la raíz cuadrada de la longitud que la banda ha recorrido. Según la ecuación de Van Deemter

$$H = \frac{A + B}{v + C * v}$$

A representa el término de caminos múltiples. Esto es porque las moléculas no siguen únicamente un camino, hay multicanales, que se deben a la densidad de empaqueo de la fase estacionaria y afecta según el tamaño y forma de la partícula.

B representa la difusión axial, la cual depende de la movilidad de las moléculas en las fases. El soluto se difunde desde la zona central que es la más concentrada hacia las regiones más diluidas. En esto influye la velocidad v , pues a velocidades muy altas no se alcanza a difundir y predomina el término A . Para encontrar la velocidad óptima puede trazarse una curva de Van Deemter al graficar H en función de v .

Por último, C representa la resistencia a la transferencia de masa. Es necesario éste término porque en realidad los fenómenos que ocurren están fuera del equilibrio. Esto es porque las corrientes de la fase móvil como la capa de fase estacionaria tienen una anchura determinada. Por

lo que las moléculas de analito necesitan primero migrar desde el centro de ellas hasta la interfase donde ocurre la transferencia, y este retraso temporal se traduce en ensanchamiento de bandas.

Resolución

La separación relativa de dos bandas a menudo se refiere a su resolución, R_s . La resolución se define como

$$R_s = \frac{t_2 - t_1}{\frac{1}{2}(w_1 + w_2)}$$

Aquí, t_1 y t_2 se refieren a los tiempos de retención (t_R) de la primera y la segunda banda, y W_1 y W_2 son el ancho de dichas bandas. La figura 3 ilustra la separación de dos bandas adyacentes como una función de sus valores de R_s y su tamaño relativo. Se observa que la separación mejora sistemáticamente a mayores valores de R_s , y la separación es generalmente mejor para dos bandas de igual tamaño (y el mismo valor de R_s). Esto es, mayores valores de R_s se requerirán normalmente para la separación de las bandas desiguales.

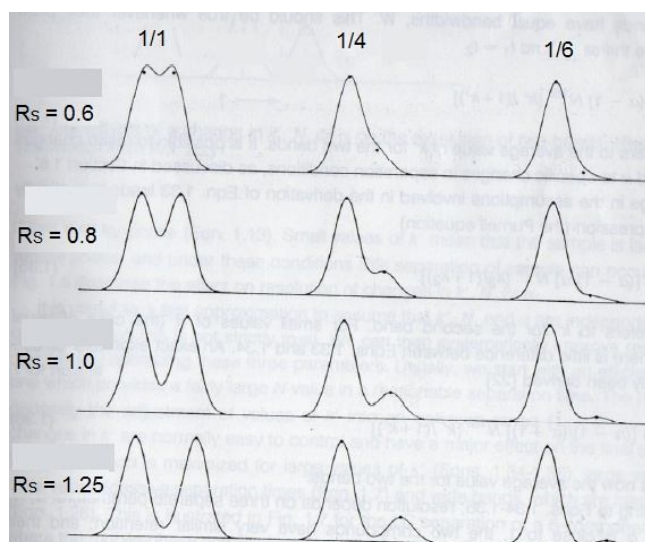


Fig. 15 Separación de dos bandas como una función de la resolución (R_s) y el tamaño relativo de banda.

La resolución depende de la retención y selectividad de manera proporcional. A mayor selectividad y retención k' , mayor resolución. Para tener una buena separación se recomienda utilizar $k' > 2$, y generalmente se trabaja con $\alpha \approx 1$. Para el análisis cuantitativo es deseable (pero no siempre práctico) alcanzar la resolución de al menos $R_s = 1.5$, desde que esto corresponde a la separación a la línea base de bandas de tamaño similar. La separación de la línea base hace que los sistemas de datos midan el tamaño de cada banda apropiadamente y esto significa una cuantificación fiable. Una resolución pobre puede deberse a que el método utilizado no es apropiado, pues no discrimina entre los solutos, o que hay mucha muestra en proporción a la columna cromatográfica.

1.2.7 PARÁMETROS DE DESEMPEÑO

En función de la aplicación analítica de un método, la siguiente tabla indica los parámetros de desempeño a estudiar [3].

PARAMETRO DE DESEMPEÑO	CONTENIDO/ POTENCIA/ VALORACIÓN	PRUEBAS DE IMPUREZAS		IDENTIFICACIÓN
		CONTENIDO/ VALORACIÓN	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 METODO O PRECISIÓN INTERMEDIA ²	SI	SI	NO	NO
ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA ²	*	*	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 es exacto y lineal, por definición es específico al placebo analítico o a otros componentes de la muestra.

Capítulo II. REACTIVOS, MATERIALES, EQUIPOS E INSTRUMENTOS

2.1 REACTIVOS

- Estándar de referencia: Rimexolona
- Suspensión Oftálmica al 1% de Rimexolona
- Acetonitrilo- Grado HPLC
- Metanol- Grado HPLC
- Fase móvil: Mezclar 600mL de Acetonitrilo con 400mL de Agua purificada, filtrar a través de un filtro de 0.45µ antes de usar.

Precauciones:

Rimexolona- Evitar contacto con la piel y ojos.

Acetonitrilo- (PELIGRO, VENENO)- Extremadamente flamable, dañino si es inhalado absorbido a través de la piel.

Metanol- (VENENO, FLAMABLE)- Puede ser fatal si es ingerido o absorbido a través de la piel.

2.2 MATERIALES

- Matraces volumétricos de 25 mL y 50 mL.
- Pipetas volumétricas de: 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL y 7 mL.
- Pipeta graduada de 1 mL
- Espátula de cromo- níquel
- Viales para HPLC de la marca Waters.
- La Columna que se utilizó para realizar la validación es:
Water Spherisorb C18 5micras 250 mm x 4.6 mm.
- La Columna a probar fue:
Phenomenex Spherisorb ODS (2) 5micras 250 mm x 4.6 mm.

2.3 EQUIPOS E INSTRUMENTOS

Equipos e Instrumentos	Marca	Modelo	Codificación
Balanza analítica	Mettler Toledo	XS205DU	F103
Estufa	Lindenberg blue	V0914A	F080
HPLC equipado con un detector UV a 242 nm	Waters	2487	F098
HPLC equipado con un detector UV a 242 nm	Waters	2489	F157

Capítulo III. METODOLOGÍA

3.1 RESUMEN DE LOS PARÁMETROS DE DESEMPEÑO ANALIZADOS

PARÁMETRO DE DESEMPEÑO	DETERMINACIÓN	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
<p>PRECISIÓN DEL SISTEMA</p> <p>PRECISIÓN DEL METODO (EXACTITUD Y REPETIBILIDAD)</p>	<p>Determinación de la lectura de 6 estándares a la concentración nominal (Sistema).</p> <p>Determinar 6 replicas de placebos cargados a la concentración nominal (Método).</p>	<p>CV o %RSD \leq al 1.5% (Sistema)</p> <p>CV o %RSD \leq 2.0% (Método)</p> <p>IC(μ) debe incluir al 100%</p> <p>Recobro $100\% \pm 2\%$(Método) o que el promedio aritmético se encuentre dentro del rango de 98 – 102%</p>
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.	<p>$r \geq 0.9925$ ó $r^2 \geq 0.985$</p> <p>IC(β_1) no debe incluir el cero.</p> <p>IC(β_0) debe incluir al cero</p> <p>% Error de intercepto en Y en el punto medio $\leq 5\%$</p> <p>%CV $\leq 2\%$ relación resp/conc. (sistema tolerante y preciso)</p> <p>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</p>
LINEALIDAD DEL METODO	Determinar la linealidad a partir placebos cargados a tres diferentes niveles de concentración de activo (LI-20%, LS + 20% y el 100%). Preparar por triplicado cada nivel.	<p>$r^2 \geq 0.985$</p> <p>IC(β_1) debe incluir al uno.</p> <p>IC(β_0) debe incluir al cero</p> <p>CV $\leq 2\%$ relación mg recuperados entre mg adicionados.</p> <p>% Recobro $100\% \pm 2\%$</p> <p>IC(μ) debe incluir al 100% o que el promedio aritmético se encuentre dentro del rango de 98 – 102%</p>
PRECISION DEL METODO (PRECISIÓN INTERMEDIA)	Determinar una muestra de placebo cargado al 100% ó producto analizado por triplicado en 2 días diferentes por 2 diferentes analistas, usando el mismo estándar de referencia y equipo.	<p>%CV $\leq 2\%$</p> <p>Calcularse la variabilidad usando la tabla de anova o anadeva.</p>
TOLERANCIA	Una misma muestra analizada por triplicado bajo 2 condiciones de uso diferente (equipo y columna) comparadas contra condiciones base.	CV $\leq 2\%$

PARÁMETRO DE DESEMPEÑO	DETERMINACIÓN	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
ROBUSTEZ	Análisis de la misma muestra por triplicado bajo diferentes condiciones de corrida (% fase, flujo, Vol. inyección, marca de columna)	$ di \leq 2\%$ Calcular los parámetros de adecuabilidad del sistema
PRUEBAS LIMITE (LIMITE DE CUANTIFICACIÓN)	Preparar 5 concentraciones a partir de placebos cargados a niveles de concentración de activo (menores o que incluya la especificación del contenido). Preparar por triplicado cada nivel. Simultáneamente preparar por lo menos 5 blancos.	$r^2 \geq 0.98$ IC (β_1), no debe incluir el cero LC debe ser menor a la especificación del contenido/ Valoración de las impurezas.
PRUEBAS LIMITE (LIMITE DE DETECCIÓN)	Preparar 5 concentraciones a partir de placebos cargados a niveles de concentración de activo (menores o que incluya la especificación del contenido). Preparar por triplicado cada nivel. Simultáneamente preparar por lo menos 5 blancos.	$r^2 \geq 0.98$ IC (β_1), no debe incluir el cero LD debe ser menor a la especificación de la prueba de impurezas límite.
ESPECIFICIDAD	Analizar la interferencia del placebo, la interferencia del placebo degradado y el activo sometido a 4 diferentes vías de degradación por triplicados en cada condición.	%Recobros $\pm 2\%$ (el %CV del producto sin degradar $\leq 2\%$ con respecto al producto degradado) No debe interferir ningún pico en el tiempo de retención del activo.
ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	Análisis de triplicados de una muestra representativa mantenida en diferentes condiciones y analizadas en diferentes tiempos pre-establecidos, contra estándar recientemente preparado.	La diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto de la media aritmética del análisis inicial no debe variar más del 2%.

3.2 PRECISIÓN DEL SISTEMA.

Metodología.- Un analista debe preparar por lo menos un sextuplicado de soluciones a la concentración nominal de trabajo del estándar 0.2 mg/mL (100% del analito en estudio) preparadas por pesadas independientes o por diluciones utilizando estándar Primario de Rimexolona.

Partir de una solución stock de 1 mg/mL de Rimexolona (**solución A**)

De la **solución A** transferir una alícuota de 5 mL a un matraz volumétrico de 25 mL. Llevar al aforo con fase móvil. Se tiene una concentración final aproximada de 0.2 mg/mL.

Reporte de datos

Tabular los resultados y calcular los siguientes datos estadísticos:

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

3.3 PRECISION DEL MÉTODO (EXACTITUD Y REPETIBILIDAD)

Metodología.- Esta prueba se realizará haciendo diluciones al producto final para obtener las concentraciones requeridas para esta prueba y observar que los porcentajes de recobro sean reproducibles y no se deba a un error de analista o del método.

Preparar 6 muestras independientes. Analizar las muestras como lo indica el Método Analítico.

Reporte de datos

Tabular los resultados y calcular los siguientes datos estadísticos:

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

En la determinación de Precisión reportar:

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

3.4 LINEALIDAD DEL SISTEMA (CURVA ESTANDAR)

Metodología.- Preparar la curva de 5 puntos de estándares, por triplicado.

La curva será construida a partir de la concentración de trabajo del estándar 0.1 mg/mL (100%), por lo cual las concentraciones serán las siguientes: 0.12, 0.16, 0.2, 0.24 y 0.28 mg/mL aproximadamente. A partir de una solución stock de 50mg/50mL.

TABLA NO. I CURVA PARA LINEALIDAD DEL SISTEMA

Concentración de la curva	Alícuota de solución stock 0.1mg/mL	Volumen final aforo con fase móvil	Concentración Teórica final
60 %	3 mL	25.0 mL	0.12 mg/mL
80 %	4 mL	25.0 mL	0.16 mg/mL
100%	5 mL	25.0 mL	0.20 mg/mL
120%	6 mL	25.0 mL	0.24 mg/mL
140%	7 mL	25.0 mL	0.28 mg/mL

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

Reporte de datos:

Tabular los resultados y calcular los siguientes datos estadísticos:

- Pendiente (b_1)
- Intercepto en Y u ordenada al origen (b_0).
- Relación respuesta vs concentración para cada punto.
- CV de la relación resp/conc.
- Intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1)$.
- Coeficiente de determinación " r^2 " y Coeficiente de correlación " r ".

3.5 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Metodología.- Esta prueba se realizará construyendo una curva de producto realizando la segunda dilución a 3 niveles de concentración (80%,100% y 120% correspondientes a 0.16, 0.2 y 0.24 mg/mL), analizar por triplicado cada punto de la curva contra estándar de concentración conocida.

Preparación de la muestra:

La muestra se encuentra a una concentración del 100% aproximadamente. El producto contiene 1.0g/mL, tomar una muestra de 5.0g y depositarla en el matraz volumétrico de 50mL disolver y llevar a volumen con metanol realizar la segunda dilución de acuerdo a la siguiente tabla.

TABLA NO. II CURVA PARA LINEALIDAD DEL METODO PARA RIMEXOLONA

Concentración de la curva	Volumen de muestra (1.0mg/mL)	Volumen de Solución Estándar de Referencia Stock (1.0mg/mL)	Volumen con Fase móvil	Concentración Teórica final del producto.
80 % (0.16mg/ml)	2.0 mL	2.0 mL	25.0mL	0.16 mg/mL
100% (0.20mg/ml)	2.0 mL	3.0 mL	25.0mL	0.20 mg/mL
120% (0.24mg/ml)	2.0 mL	4.0 mL	25.0mL	0.24 mg/mL

3.6 PRECISIÓN INTERMEDIA

Metodología.- Determinar el % de activo en muestras de producto terminado por triplicado, por 2 diferentes analistas en 2 diferentes días, usando el mismo estándar de referencia y equipo. Seguir la técnica de preparación según sea el producto.

La preparación del stock del estándar y muestra se hará como se indica en el punto 3.3 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL METODO.

Reporte de datos:

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

3.7 TOLERANCIA

Metodología.- Analizar una muestra de producto final por triplicado contra un estándar en 2 columnas y equipo diferentes por un analista en un mismo día. Analizar como lo indica el método analítico.

Reporte de datos:

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

3.8 ROBUSTEZ.

Metodología.- Analizar una muestra de producto final por triplicado contra un estándar, modificando los parámetros cromatográficos del método indicados en la Tabla No. III Analizar como lo indica el método analítico.

TABLA NO. III PARAMETROS A EVALUAR EN LA PRUEBA DE ROBUSTEZ

Parámetro modificado	Condición base	Condición Alternativa	
Proporción de fase móvil	40% Agua Purificada 60% Acetonitrilo	35% Agua Purificada 65% Acetonitrilo	45% Agua Purificada 55% Acetonitrilo
Velocidad de Flujo	1.0 mL/min	0.8 mL/min	1.2 mL/min
Volumen inyección	20 µL	10 µL	30 µL
Columna	Waters Spherisorb C18 5 µ 250 mm x 4.6 mm	Phenomenex Spherisorb ODS(2) 5 µ 250 mm x 4.6 mm	NA
Equipo	HPLC 2487	HPLC 2489	NA

Reporte de datos:

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

3.9 PRUEBAS LÍMITE.

3.9.1 LIMITE DE CUANTIFICACIÓN

Metodología.- Preparar 5 concentraciones a partir de placebos cargados a niveles de concentración de activo (menores o que incluya la especificación del contenido), ya sea por dilución o por pesada independiente. Preparar por triplicado cada nivel.

Simultáneamente preparar por lo menos 5 blancos.

Analizar como lo indica el método analítico.

Reporte de datos:

Tabular los resultados y calcular los siguientes datos estadísticos:

- Pendiente (b_1)
- Intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1)$.
- Coeficiente de determinación " r^2 " y Coeficiente de correlación " r ".
- Desviación estándar de los blancos.
- Calcular en límite de cuantificación.

3.9.2 LIMITE DE DETECCIÓN

Metodología.-Preparar 5 concentraciones a partir de placebos cargados a niveles de concentración de activo (menores o que incluya la especificación del contenido), ya sea por dilución o por pesada independiente. Preparar por triplicado cada nivel.

Simultáneamente preparar por lo menos 5 blancos.

Analizar como lo indica el método analítico.

Reporte de datos:

Tabular los resultados y calcular los siguientes datos estadísticos:

Para la curva de calibración sin incluir los blancos:

- Pendiente (b_1)
- Intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1)$.
- Coeficiente de determinación " r^2 " y Coeficiente de correlación " r ".

Para los blancos:

- Desviación estándar.
- Calcular en límite de detección.

3.10 ESPECIFICIDAD

Metodología.-Debido que no se cuenta con estándares de productos de degradación de Rimexolona se analizará por triplicado placebo, placebo cargado y el principio activo, degradando por las cuatro vías (medio ácido, medio básico, oxidación y temperatura) con respecto a las muestras sin degradar. Al analizar las muestras degradadas en el sistema cromatográfico, se inyectarán muestras de placebo, placebo cargado y activo sin degradar, con el fin de observar en los cromatogramas los posibles picos de degradación del activo.

Para las condiciones de degradación y forma de preparación de la muestra ver tabla No. III

TABLA NO. IV CONDICIONES DE ANALISIS PARA PRUEBA DE ESPECIFICIDAD

Vía de Degradación	Peso de la muestra (Rimexolona 1%)	Condición de Análisis	Vol. adicionado de reactivo	Vol. adicionado de reactivo para detener reacción
Calor	5g	12 hrs/85°C	NA	NA
Básica (NaOH)	5g	4 hrs/85°C	0.3 mL de NaOH 50%	0.3 mL de HCL 50%
Ácida (HCL)	5g	4 hrs/85°C	0.3 mL de HCL concentrado	0.3 mL de NaOH concentrado
Peróxido	5g	4 hrs/85°C	0.3 mL de Peróxido 30%	NA

Reporte de datos:

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

3.11 ESTABILIDAD ANALITICA DE LA MUESTRA

Metodología.- Preparar tres muestras de placebo cargado o producto terminado de acuerdo al método analítico, vaciar en tres viales cada una 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:

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

Capítulo IV. RESULTADOS

4.1 PRECISION: SISTEMA

	Concentración del estándar mg/mL	FR Sistema Concentración del estándar/ Área
STD 1	0.2001888	2.177E-08
STD 2	0.2001888	2.187E-08
STD 3	0.2001888	2.189E-08
STD 4	0.2001888	2.197E-08
STD 5	0.2001888	2.199E-08
STD 6	0.2001888	2.209E-08

Media = 2.193E-08
RSD ó CV = 0.51%

Criterio de aceptación $\leq 1.5\%$

0.51 % < 1.5 % CUMPLE

4.2 PRECISION: MÉTODO

Muestra	Porciento Recobro (Normalizado al 100%)
1	101.31
2	101.19
3	99.93
4	100.47
5	101.32
6	100.29

Media = 100.76
Recobro = 0.761 %
RSD ó CV = 0.61 %

Criterio sugerido:

Recobro $\leq 2\%$ ó Recobro de todos los valores $\pm 2\%$
CV $\leq 2\%$

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

Recobro: 0.761% < 2% CUMPLE
%RSD ó CV: 0.61 % < 2% CUMPLE
Intervalo (μ): 100.15 a 101.37 CUMPLE

4.3 LINEALIDAD DEL SISTEMA: (curva estándar)

	Concentración %	Respuesta		Respuesta / Concentración
		Valor	Media	
STD 1	0.120	5487538	5490771	45713274
		5462846		
		5521930		
STD 2	0.160	7421314	7371157	46026282
		7349158		
		7342999		
STD 3	0.200	9120815	9172170	45817600
		9218907		
		9176789		
STD 4	0.240	11130537	11057653	46030100
		11078442		
		10963979		
STD 5	0.280	12820370	12884513	45972718
		12999166		
		12834002		

Cálculos:

Resultado:

Criterio sugerido:

- Sensitividad (pendiente=b1)	45955241	NA
- Intercepto (b0)	-4472	NA
- Intervalo de confianza al 95%. Pendiente	45955241 ± 70080.6	46025322 a 45885160 No incluye al cero
- % error de y intercepto del punto medio	0.00%	≤ 5%
- Coef. De correlación (r)	1.0000	r ≥ 0.9925
- Coef. Determinación (r ²)	0.999994	r ² ≥ 0.985
- CV de la relación Resp./ Concentración	0.27%	≤ 2%

4.4 LINEALIDAD DEL MÉTODO

	Áreas	mg adicionados	mg recuperados	% Recobro
80%	7366304	0.16084	0.16076	100
	7377887	0.16084	0.16101	100
	7392804	0.16084	0.16133	100
100%	9071779	0.20056	0.19798	99
	9176207	0.20056	0.20025	100
	9257638	0.20056	0.20203	101
120%	10956296	0.24028	0.23910	100
	10959073	0.24028	0.23916	100
	11125249	0.24028	0.24279	101

Cálculos:

Resultados:

Criterio sugerido:

- Pendiente (b1)=	0.9985	NA
- Ordenada al origen (b0)= Ó Intercepto en Y	0.0002	NA

- Intervalo de Confianza Pendiente 0.9698 a 1.0271 Debe contener al uno
- Ordenada al origen -0.0056 a 0.0061 Debe contener al cero
- Coef. De determinación (r^2)= 0.9981 $r^2 \geq 0.985$
- % CV recobro= 0.70% %CV \leq 2%
- % Recobro para todos los puntos 98 a 102 Recobro \pm 2%
- % CV y/x de la regresión lineal 0.59% %CV \leq 2%

4.5 PRECISIÓN INTERMEDIA

A N A L I S T A		DIA	
		1	2
		1	107.66
		106.80	106.27
		107.56	107.78
	2	109.04	107.95
		109.37	108.48
		107.45	108.99

Media= 107.82%
 S= 1.0011
 CV= 0.93%

Criterio de aceptación:
 CV \leq 2%

CV

A N A L I S T A		DIA		
		1	2	
		1	0.44%	
	2	0.93%	0.48%	0.67%
		0.93%	0.99%	

4.6 TOLERANCIA

Marca de la Columna	Waters Spherisorb C18 5 μ	Phenomenex Spherisorb ODS(2) 5 μ	di
Resultado	107.30	107.33	0.03 %
Equipo	HPLC 2487	HPLC 2489	di
Resultado	107.30	108.40	1.10 %

Criterio: $|di| \leq 2\%$ CUMPLE

4.7 ROBUSTEZ

Diferencia media (di)= Media condición base - Media de la condición alterada

Condición	Base			Alterada			di
Volumen de Inyección	20 µL			10µL			
	107.34	%	-	107.15	% =	0.19	%
Velocidad de Flujo	20 µL			30µL			
	107.34	%	-	106.76	% =	0.58	%
Velocidad de Flujo	1.0 mL/min			0.8 mL/min			
	107.34	%	-	107.04	% =	0.30	%
% Fase Agua purificada/ Acetonitrilo	1.0 mL/min			1.2 mL/min			
	107.34	%	-	107.07	% =	0.27	%
% Fase Agua purificada/ Acetonitrilo	(40/60)			(35:65)			
	107.34	%	-	105.96	% =	1.38	%
Condición	(40/60)			(45:55)			
	107.34	%	-	106.30	% =	1.04	%
Condición	Base 2			Alterada			di
Columna	Waters Spherisorb C18			Phenomenex Spherisorb ODS(2)			
	107.31	%	-	107.33	% =	0.02	%
Equipo	HPLC 2487			HPLC 2489			
	107.31	%	-	108.40	% =	1.09	%

Criterio: $|di| \leq 2\%$ CUMPLE

4.8 PRUEBAS LÍMITE

4.8.1 Límite de Cuantificación

Sy/x = 348.9511632
Pendiente (b1)= 95625.05819

$\beta_1 = 95910.44679$ a 95339.67
 $r^2 = 0.999975$
 $r = 0.99999$

CRITERIO SUGERIDO:
El cual **no contiene al cero**
 $r^2 \geq 0.985$
 $r^2 \geq 0.9925$

$$LD = \frac{10 \times Sy/x}{b1} = \frac{10 \times 348.9511632}{95625.05819} = 0.0364916 \mu\text{g/mL}$$

4.8.2 Límite de Detección

Sy/x = 348.9511632
Pendiente (b1)= 95625.05819

$$LD = \frac{3.3 \times Sy/x}{b1} = \frac{3.3 \times 348.9511632}{95625.05819} = 0.0120422 \mu\text{g/mL}$$

4.9 ESPECIFICIDAD

Condición	CV (%)	
Sin degradar Resultado	0.28	CUMPLE
Peroxido/ calor 4 hrs Resultado	1.68	CUMPLE
HCL conc./ calor 4 hrs Resultado	1.67	CUMPLE
Calor 12 hrs Resultado	1.72	CUMPLE
NaOH 50%/ calor 4 hrs Resultado	0.69	CUMPLE

CRITERIO: No debe interferir ningún pico en el tiempo de retención del activo.
%Recobros \pm 2% (el %CV del producto sin degradar y estándar \leq 2% con respecto al producto degradado y estándar degradado)

RESULTADO: El producto final y la solución estándar 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, aunque para la condición básica no se cumpla con en CV se concluye que cumple, ya que lo que nos interesa es que no haya interferencias.
CV \leq 2%

4.10 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Diferencia de la media $|di| = \text{Media condición base} - \text{Media de la condición alterada}$

INICIAL 106.54 %	24 hrs		48 hrs		72 hrs	
	T.A %	Refrigeración %	T.A %	Refrigeración %	T.A %	Refrigeración %
	106.14	105.11	104.75	105.61	106.75	105.73
	Diferencia %		Diferencia %		Diferencia %	
	T.A	Refrigeración	T.A	Refrigeración	T.A	Refrigeración
	0.40	1.43	1.79	0.93	-0.20	0.81

Criterio: $|di| \leq 2\%$ CUMPLE

Capítulo V. CÁLCULOS

5.1 PRECISIÓN: SISTEMA

Operador: V. Rodríguez

Fecha: 05 09 11

Equipo: HPLC 2487

$$\text{FR std} = \frac{\text{Conc std}}{\text{Área std}}$$

$$\text{Conc. std} = \frac{50.4 \text{ mg}}{50 \text{ mL}} \times \frac{5 \text{ mL}}{25 \text{ mL}} \times 0.993 \text{ (pureza std)}$$

$$\text{Conc. std} = 0.200188 \text{ mg/mL}$$

	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5	Std 6
Área	9195239	9154858	9143905	9113185	9102488	9061693
FR	<u>2.17709E-08</u>	2.18669E-08	2.18931E-08	2.197E-08	2.19928E-08	2.20918E-08
Media=	2.19304E-08					
Desv std=	1.11455E-10					
% CV=	0.51					

5.2 PRECISIÓN: (EXACTITUD DEL MÉTODO)

Operador: V. Rodríguez

Fecha: 05 09 11

Equipo: HPLC 2487

Conc std prom= 0.203191632 mg/mL

	Area	FR
STD1	9195239	2.21E-08
STD1	9154858	2.22E-08
STD1	9143905	2.22E-08
STD1	9113185	2.23E-08
STD1	9102488	2.23E-08
STD1	9061693	2.24E-08
FR prom =	9128561	2.226E-08
S =	46390.68518	1.13127E-10
CV =	0.51	%

$$\text{Conc mtra} = \frac{\text{peso de la mtra}}{25 \text{ mL}} \times \frac{5 \text{ mL}}{25 \text{ mL}} \times \text{marbete} \times 1.0150 \text{ (densidad de la susp.)}$$

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{Area mtra}}{\text{Area std}} \times \frac{\text{C std}}{\text{C mtra}} \times 100$$

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
peso g	2.5068	2.5061	2.5308	2.5244	2.5030	2.5227
Conc. mtra	0.200544	0.200488	0.202464	0.201952	0.200240	0.201816
%Recobro	9133350	9114196	9089053	9115065	9114870	9093008
	101.37	101.19	99.93	100.47	101.32	100.29

MEDIA de 6	=	100.76 %
Desv std	=	0.613
Porciento RSD	=	0.61 %

Intervalo de confianza de la media poblacional (μ):

Media	±	Desv std
100.8	±	0.613
100.15	a	101.37

Criterio:

El IC debe incluir el 100%

Se incluye en el intervalo de 98- 102%

5.3 LINEALIDAD DEL SISTEMA (Curva estándar).

Operador: V. Rodríguez

Fecha: 08 09 11

Equipo: HPLC 2487

$$\text{Conc sol.stock} = \frac{25.2 \text{ mg Rimexolona}}{25 \text{ mL MetOH}} \times 0.993(\text{pureza std})$$

Conc. sol. Stock= 1.000944 mg Rimexolona/ mL

S 60% =	3 ml / 25 ml fase ----->	0.12 %RIMEXOLONA
S 80% =	4 ml / 25 ml fase ----->	0.16 %RIMEXOLONA
S100% =	5 ml / 25 ml fase ----->	0.20 %RIMEXOLONA
S120% =	6 ml / 25 ml fase ----->	0.24 %RIMEXOLONA
S140% =	7 ml / 25 ml fase ----->	0.28 %RIMEXOLONA

STD	60%	80%	100%	120%	140%	
%	0.12	0.16	0.20	0.24	0.28	x-eje
	5487538	7421314	9120815	11130537	12820370	
	5462846	7349158	9218907	11078442	12999166	
	5521930	7342999	9176789	10963979	12834002	
MEDIA	5490771.333	7371157	9172170.3	11057652.67	12884512.67	y-eje
RSD	0.5404	0.5908	0.5365	0.7705	0.7724	

	x-eje	x ²	y-eje	y ²	xy
	0.36	0.13	16472314	2.71337E+14	5935630.991
	0.48	0.23	22113471	4.89006E+14	10624486.14
	0.60	0.36	27516511	7.57158E+14	16525491.95
	0.72	0.52	33172958	1.10045E+15	23907076.76
	0.84	0.71	38653538	1.4941E+15	32499622.63
SUMA	3.002832	1.95	137928792	4.11204E+15	89492308.46
MEDIA	0.2002		9195252.8		

n= 15

$$\text{sum } xx = \frac{\text{sum } x^2 - (\text{sum } x)^2}{n} = 1.34653867$$

$$\text{sum } yy = \frac{\text{sum } y^2 - (\text{sum } y)^2}{n} = 2.84375 \times 10^{15}$$

$$\text{sum } xy = \frac{\text{sum } xy - (\text{sum } x \cdot \text{sum } y)}{n} = 61880509.11$$

$$\text{pendiente} = b_1 = \frac{\text{sum } xy}{\text{sum } xx} = \frac{61880509}{1.3465387} = 45955241.02$$

$$\text{Intercepto} = b_0 = \text{media } y - b_1 (\text{media } x) = -4471.753571$$

$$S^2_{y/x} = \frac{\text{sum } yy - b_1 \text{sum } xy}{n-2} = 1417445761$$

$$\text{coeficiente de correlación} = r = \frac{\text{sum } xy}{\sqrt{\text{sum } xx \cdot \text{sum } yy}} = 0.9999968$$

$$\text{Coeficiente de determinación} = r^2 = 0.9999935$$

El intervalo de confianza al 95% se calcula: T 0.975, 13= 2.16

$$\text{intercepto} = b_0 = -4471.753571 \pm 2.16 \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\text{media } x)^2}{\text{sum } xx}} \cdot S^2_{y/x}$$
$$b_0 = -4471.753571 \pm 25252.81762$$

$$\text{pendiente} = b_1 = 45955241.02 \pm 2.16 \sqrt{\frac{1}{\text{sum } xx}} \cdot S^2_{y/x}$$

$$\text{pendiente} = b_1 = 45955241.02 \pm 70080.55958$$

El intervalo de confianza de la regresión lineal:

$$y = b_0 + b_1 \cdot x_0 \pm 2.16 \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{x_0 - (\text{media } x)^2}{\text{sum } xx}} \cdot S^2_{y/x}$$

1) x0 =	60	%	y = 2.757E+09	+-	4190856.832
2) x0 =	100	%	y = 4.596E+09	+-	6994058.133
3) x0 =	140	%	y = 6.434E+09	+-	9797271.498

x-eje	y-eje	y-eje - interv. conf.	y-eje + interv. conf.
50	2757309989	2753119133	2.762E+09
100	4595519630	4588525572	4.603E+09
150	6433729271	6423932000	6.444E+09

Sesgo del error debido al intercepto diferente de cero

$$y = b_0 + b_1 \cdot x$$

y-intercepto : <= 5% de el punto medio de respuesta

$$\text{y-intercepto} = -4471.754$$

$$\text{punto medio} = 4.596E+09$$

$$\% \text{ error} = 0.0000973 \%$$

Sobre la curva

$$\text{Y- limite inf: } 60 \% \quad 2757309989$$

$$\text{Y-100%: } 100 \% \quad 4595519630$$

$$\text{Y-limite sup.: } 140 \% \quad 6433729271$$

a) Límite inferior: 60%

$$\%E = \left(1 - \frac{Y\text{-inferior}}{Y\text{-100\%}}\right) \left(\frac{100b_0}{60b_1}\right) = 0.400000389 \times -0.000162178 = -0.000065\%$$

b) Límite superior: 140%

$$\%E = \left(1 - \frac{Y\text{-superior}}{Y\text{-100\%}}\right) \left(\frac{100b_0}{140b_1}\right) = -0.400000389 \times -6.95048E-05 = 0.000028\%$$

Análisis de residuales:

x-eje conc	y-eje Resp	resp/conc	y sobre curva	% error de y
0	-4472			
0.12	5490771	45713274	5515363	0.447872325
0.16	7371157	46026282	7355308	-0.215015237
0.20	9172170.333	45817600	9195252.8	0.251657632
0.24	11057652.67	46030100	11035197.71	-0.203071634
0.28	12884512.67	45972718	12875142.62	-0.072723319

$$\text{MEDIA} = 45911995$$

$$\text{RSD resp / conc} = 0.27 \%$$

5.4 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Operador: V. Rodríguez

Fecha: 26 09 11

Equipo: HPLC 2487

$$\text{Conc.del std 1era dilución} = \frac{25\text{mg}}{25\text{mL}} \times 0.993 = 0.993 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Conc.std} = \frac{25\text{mg}}{25\text{mL}} \times 0.993 \times \frac{5\text{mL}}{25\text{mL}} = 0.201579 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Conc.mtra} = \frac{1000}{100} \times \frac{5.0123\text{g}}{50\text{mL}} = 1.0184969 \text{ mg/mL}$$

	Area	FR
STD1	9203212	2.19E-08
STD2	9219666	2.19E-08
STD3	9225472	2.19E-08
STD4	9242552	2.18E-08
STD5	9277542	2.17E-08
STD6	9253432	2.18E-08

$$\text{FR prom} = 2.18\text{E-}08$$

$$S = 6.263\text{E-}11$$

$$\text{CV} = 0.29 \%$$

Placebos cargados por pesada independiente

Pureza st= 99.3 mg/mL

Teórico= 0.9930 mg/mL

$$\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \text{adicionados} = \frac{(\text{Vol mtra} * \text{Conc mtra}) + (\text{Vol stock sin diluir} * \text{Conc.stock sin diluir})}{25 \text{ mL}}$$

Muestra tomada por nivel
teorico:

80%	2 mL
100%	2 mL
120%	2.0 mL

Vol.Stock:

2 mL
3 mL
4 mL

Aforo:

25 mL
25 mL
25 mL

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{mg recuperados} \times 100}{\text{mg adicionados}}$$

$$\text{mg recuperados} = \text{Area mtra} \times \text{FR}$$

ml adicionados en 50 ml	Nivel Conc	Areas	mg/mL Adicionados	mg/mL Recuperados	%Recobro	
3	80%	7366304	0.160839752	0.16076	99.9481	100
3		7377887	0.160839752	0.16101	100.1053	100
3		7392804	0.160839752	0.16133	100.3077	100
5	100%	9071779	0.200559752	0.19798	98.7113	99
5		9176207	0.200559752	0.20025	99.8476	100
5		9257638	0.200559752	0.20203	100.7337	101
7	120%	10956296	0.240279752	0.23910	99.5096	100
7		10959073	0.240279752	0.23916	99.5348	100
7		11125249	0.240279752	0.24279	101.0441	101

MEDIA **100.0**
S **0.69554**
CV (%) **0.70**

Parametros de Linealidad del Método

mg Adicionados			mg Recuperados		
Datos	x-eje	x ²	y-eje	y ²	Sum xy
1	0.16084	0.02587	0.16076	0.02584	0.02586
2	0.16084	0.02587	0.16101	0.02592	0.02590
3	0.16084	0.02587	0.16133	0.02603	0.02595
4	0.20056	0.04022	0.19798	0.03919	0.03971
5	0.20056	0.04022	0.20025	0.04010	0.04016
6	0.20056	0.04022	0.20203	0.04082	0.04052
7	0.24028	0.05773	0.23910	0.05717	0.05745
8	0.24028	0.05773	0.23916	0.05720	0.05747
9	0.24028	0.05773	0.24279	0.05895	0.05834
SUMA =	1.80504	0.37148	1.80441	0.37122	0.37134
MEDIA =	0.20056		$\hat{y} =$ 0.20049		

NUMERO DE DATOS (n) = 9

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

$$\text{pendiente} = b_1 = \frac{3.34210 - 3.25703}{3.34336 - 3.25816} = 0.9984553$$

$$\text{intercepto en } y = b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n} = \frac{1.80441 - 1.80225}{9} = 0.00024$$

$$\text{Coeficiente de determinación } r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x \cdot \sum y))^2}{n(\sum x^2) - (\sum x)^2 - n(\sum y^2) - (\sum y)^2}$$

$$r^2 = \frac{(3.342095308 - 3.257032273)^2}{0.0852 \times 0.08509} = 0.998087275$$

- Intervalo de confianza

$$S_{\frac{y}{x}} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}} = \sqrt{\frac{0.371222 - 0.3707703 - 0.0004336}{7}} = 0.00117$$

Pendiente (b1)

$$S_{b_1} = S_{\frac{y}{x}} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}} = 0.001179462 \sqrt{\frac{1}{0.37148 - 0.36202}} = 0.012123$$

El intervalo de confianza al 95% se calcula:

$$t_{0.975, 7} = 2.365$$

$$IC(b_1) = b_1 \pm t_{0.975, 7} S_{b_1}$$

$$IC(b_1) = 0.99846 \pm 0.0286702$$

$$IC(b_1) = 0.96979 \text{ a } 1.02713$$

Intercepto u ordenada al origen (b0)

$$S_{b_0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\text{media } x)^2}{\sum x^2 - \left(\frac{(\sum x)^2}{n}\right)}} = 0.001179462 \sqrt{4.360415} = 0.002462906$$

El intervalo de confianza al 95% se calcula:

$$t_{0.975, 7} = 2.365$$

$$IC(b_0) = b_0 \pm t_{0.975, 7} S_{b_0}$$

$$IC(b_0) = 0.00024 \pm 0.0058248$$

$$IC(b_0) = -0.005584473 \text{ a } 0.0060651$$

$$CV_{y/x} = \frac{0.001179462}{0.20049} \times 100 = 0.59\% \leq 2\%$$

5.5 PRECISIÓN INTERMEDIA

Día 1

Operador: V. Rodríguez

Fecha: 29 09 11

Equipo: HPLC 2487

ANALISTA 1: V. Rodríguez

% Recobro= (area mtra/ area std)* (Cstd/ Cmtra)*100

Conc std= 0.201579 mg/mL

Area	FR	Area de	Mtras	peso g	Conc. Mtra	Recobro %
9180482	2.19573E-08					
9149174	2.20325E-08					
9142376	2.20489E-08	9821215	2.5123	0.200984	107.6628	
9133441	2.20704E-08	9747736	2.5137	0.201096	106.7978	
9149334	2.20321E-08	9840959	2.5198	0.201584	107.5582	
9140402	2.20536E-08				Media =	107.34
Media =	9149202	2.20325E-08			Desv std =	0.47
Desv std =	16437.15306	3.95008E-11			CV=	0.44
CV=		0.18				

ANALISTA 2: C. Pierre

% Recobro= (area mtra/ area std)* (Cstd/ Cmtra)*100

Conc std= 0.20359479 mg/mL

Area	FR	Area de	Mtras	peso g	Conc. Mtra	Recobro %
9078791	2.24253E-08					
9080599	2.24209E-08					
9123650	2.23151E-08	9932632	2.5505	0.204040	109.03893	
9054510	2.24855E-08	10022124	2.5657	0.205256	109.369559	
9083164	2.24145E-08	9918173	2.5844	0.206752	107.452002	
9115547	2.23349E-08				Media =	109
Media =	9089377	2.23994E-08			Desv std =	1
Desv std =	25701.87996	6.33099E-11			CV =	0.94
CV=		0.28				

Global

DIA 1

Media = 107.98

Desv std = 1.00

CV = 0.93

Día 2

Operador: V. Rodríguez
Fecha: 02 11 11
Equipo: HPLC 2487

ANALISTA 1: V. Rodríguez

% Recobro= (area mtra/ area std)* (Cstd/ Cmtra)*100

Conc std= 0.201579 mg/mL

	<u>Area</u>	<u>FR</u>				
	8758846	2.30143E-08	Area de			
	8769641	2.29860E-08	<u>Mtras</u>	<u>peso g</u>	<u>Conc. Mtra</u>	<u>Recobro %</u>
	8756088	2.30216E-08	9437134	2.5262	0.202096	106.55
	8856442	2.27607E-08	9432172	2.5315	0.202520	106.27
	8922172	2.25930E-08	9568077	2.5319	0.202552	107.78
	8944844	2.25358E-08			Media =	107
Media =	8834672	2.28186E-08			Desv std =	1
Desv std =		2.19888E-10			CV =	0.75
CV =		0.96				

ANALISTA 2: C. Pierre

% Recobro= (area mtra/ area std)* (Cstd/ Cmtra)*100

Conc std= 0.20359479 mg/mL

	<u>Area</u>	<u>FR</u>				
	9041925	2.27397E-08	Area de			
	8989437	2.28725E-08	<u>Mtras</u>	<u>peso g</u>	<u>Conc. Mtra</u>	<u>Recobro %</u>
	9001028	2.28430E-08	9590002	2.5371	0.202968	107.95
	8961233	2.29445E-08	9585612	2.5235	0.201880	108.48
	8979234	2.28985E-08	9627881	2.5227	0.201816	108.99
	9024643	2.27832E-08			Media =	108
Media =	8999583	2.28469E-08			Desv std =	1
Desv std =	29700.78183	7.53521E-11			CV =	0.48
CV =	0.330	0.33				

Global

DIA 2

Media = 107.67
Desv std = 1.07
CV = 0.99

5.5 PRECISIÓN INTERMEDIA

% RIMEXOLONA

		D I A	
		1	2
A N A L 1	I	107.66	106.55
	S	106.80	106.27
	T	107.56	107.78
2 A	I	109.04	107.95
	S	109.37	108.48
	T	107.45	108.99

Media = 107.82 %
 S = 1.00
CV = 0.93 %

Criterio de Aceptación

CV ≤ 2%

% CV

		D I A		% CV ANA
		1	2	
A N A L 1	I	0.44	0.75	0.60
	S			
	T			
2 A	I	0.93	0.48	0.67
	S			
	T			
%CV DIA		0.93	0.99	

5.6 TOLERANCIA

Columna: Waters Spherisorb C18 5µ 250mm x 4.6mm

Operador: V. Rodríguez

Fecha: 03 11 11

Equipo: HPLC 2487

Conc. std= 0.202586895 mg/mL

FR= Conc std / Area std

% Recobro= (area mtra/ area std) * (conc std/ C mtra)* 100

Área	FR	muestras			
		areas	peso g	Conc. Mtra	Recobro %
8960950	2.26077E-08				
8985775	2.25453E-08	9488775	2.5213	0.201704	107.21
8984690	2.2548E-08	9546072	2.5243	0.201944	107.72
8800239	2.30206E-08	9486696	2.5263	0.202104	106.97
8822869	2.29616E-08				
8784096	2.30629E-08				
Media =	8889770			Media =	107.30
Desv std =	96903.96985			Desv std =	0.39
CV =	1.09			CV =	0.36

Columna: Phenomenex Spherisorb ODS (2) 5µ 250mm x 4.6mm

Conc. std= 0.202586895 mg/mL

FR= Conc std / Area std

% Recobro= (area mtra/ area std) * (conc std/ C mtra)* 100

Área	FR	muestras			
		areas	peso g	Conc. Mtra	Recobro %
9050882	2.23831E-08				
9135635	2.21755E-08				
9162948	2.21094E-08	9688346	2.5213	0.201704	106.42
9213121	2.1989E-08	9842383	2.5243	0.201944	107.98
9171606	2.20885E-08	9813590	2.5263	0.202104	107.58
9128679	2.21924E-08				
Media =	9143812			Media =	107.33
Desv std =	54542.25212			Desv std =	0.81
CV =	0.60			CV =	0.76

5.6 TOLERANCIA

Equipo: HPLC 2487

Operador: V. Rodríguez
 Fecha: 03 11 11
 Equipo: HPLC 2487

Conc. std= 0.202586895 mg/mL

FR= Conc std / Area std
 % Recobro= (area mtra/ area std) * (conc std/ C mtra)* 100

Área	FR	muestras			
		areas	peso g	Conc. Mtra	Recobro %
8960950	2.26077E-08				
8985775	2.25453E-08	9488775	2.5213	0.201704	107.21
8984690	2.2548E-08	9546072	2.5243	0.201944	107.72
8800239	2.30206E-08	9486696	2.5263	0.202104	106.97
8822869	2.29616E-08				
8784096	2.30629E-08				
Media =	8889770			Media =	107.30
Desv std =	96903.96985			Desv std =	0.39
CV =	1.09			CV =	0.36

Equipo: HPLC 2489

Conc. std= 0.202586895 mg/mL

FR= Conc std / Area std
 % Recobro= (area mtra/ area std) * (conc std/ C mtra)* 100

Área	FR	muestras			
		areas	peso g	Conc. Mtra	Recobro %
8957328	2.26169E-08				
8996861	2.25175E-08				
8997596	2.25157E-08	9672647	2.5213	0.201704	107.85
9055414	2.23719E-08	9725015	2.5243	0.201944	108.31
9006934	2.24923E-08	9797320	2.5263	0.202104	109.03
9031096	2.24321E-08				
Media =	9007538			Media =	108.40
Desv std =	33410.60116			Desv std =	0.59
CV =	0.37			CV =	0.55

MARCA: Columna	Waters Spherisorb C18 5 µ	Phenomenex Spherisorb ODS(2) 5 µ	di
Resultado	107.30	107.33	0.03 %
Equipo	HPLC 2487	HPLC 2489	di
Resultado	107.30	108.40	1.10 %

5.7 ROBUSTEZ

VARIABLE	CONDICION BASE	CONDICION ALTERNATIVA	
Cambio velocidad de flujo	1.0	0.8	1.2
Cambio proporción FM	40;60	35;65	45;55
Cambio vol. de inyección	20	10	30
Cambio de Columna	Waters Spherisorb C18 5 µ 250 mm x 4.6 mm	Phenomenex Spherisorb ODS(2) 5 µ 250 mm x 4.6 mm	
Cambio de Equipo	HPLC 2487	HPLC 2489	

CONDICIÓN BASE

Operador: V. Rodríguez

Fecha: 29 09 11

Equipo: HPLC 2487

Conc. std= 0.2016 mg/mL

FR= Conc std / Area std

$$\% \text{ Ensayo} = \frac{\text{Area mtra}}{\text{Conc mtra}} \times \text{FR} \times 100$$

	Area	FR std
	9180482	2.196E-08
	9149174	2.203E-08
	9142376	2.205E-08
	9133441	2.207E-08
	9149334	2.203E-08
	9140402	2.205E-08
FR MEDIA	2.203E-08	9149202
RSD	0.1793	%

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en ml
peso mtra g	2.5123	2.5137	2.5198	25
con. mta mg/mL	0.200984	0.201096	0.201584	
resp mta	9821215	9747736	9840959	
ENSAYO	107.66 %	106.80 %	107.56 %	
promedio	107.34			
des std	0.47			
c.v	0.44			

Ensayo 1

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 10µL

Operador: V. Rodríguez

Fecha: 29 09 11

Equipo: HPLC 2487

Conc. std= 0.2016 mg/mL

	Area	FR std
	4523910	4.456E-08
	4537374	4.443E-08
	4532456	4.448E-08
	4519533	4.461E-08
	4504571	4.475E-08
	4502128	4.478E-08
FR MEDIA	4.460E-08	4519995
RSD	0.3177	%

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en ml
peso mtra g	2.5123	2.5137	2.5198	25
con. mta mg/mL	0.200984	0.201096	0.201584	
resp mta	4848754	4808753	4844948	
ENSAYO	107.60	106.66	107.20	%
promedio	107.15			
des std	0.48			
c.v	0.44			

VOLUMEN DE INYECCIÓN: 30µL

	Area	FR std
	13757114	1.465E-08
	13730952	1.468E-08
	13785642	1.462E-08
	13691019	1.472E-08
	13695468	1.472E-08
	13708044	1.471E-08
FR MEDIA	1.469E-08	13728040
RSD	0.2723	%

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en ml
peso mtra g	2.5123	2.5137	0.25198	25
con. mta mg/mL	0.200984	0.201096	0.201584	
resp mta	14635586	14552703	14695410	
ENSAYO	106.94	106.27	107.06	%
promedio	106.76			
des std	0.42			
c.v	0.40			

Ensayo 2

VELOCIDAD DE FLUJO: 0.8 mL/min

Operador: V. Rodríguez

Fecha: 29 09 11

Equipo: HPLC 2487

Conc. std= 0.2016 mg/mL

	Area	FR std
	11427018	1.764E-08
	11464996	1.758E-08
	11452772	1.760E-08
	11531088	1.748E-08
	11570256	1.742E-08
	11579665	1.741E-08
FR MEDIA	1.752E-08	
RSD	0.5621	%

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en ml
peso mtra g	2.5123	2.5137	2.5198	25
con. mta mg/mL	0.200984	0.201096	0.201584	
resp mta	12268832	12274094	12330901	
ENSAYO	106.98 %	106.96 %	107.20 %	
promedio	107.04			
des std	0.13			
c.v	0.12			

VELOCIDAD DE FLUJO: 1.2 mL/min

	Area	FR std
	7634919	2.640E-08
	7629941	2.642E-08
	7642097	2.638E-08
	7665858	2.630E-08
	7647320	2.636E-08
	7655864	2.633E-08
FR MEDIA	2.637E-08	
RSD	0.1743	%

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en ml
peso mtra g	2.5123	2.5137	2.5198	25
con. mta mg/mL	0.200984	0.201096	0.201584	
resp mta	8191347	8120945	8201729	
ENSAYO	107.46 %	106.48 %	107.28 %	
promedio	107.07			
des std	0.52			
c.v	0.49			

Ensayo 3

% FASE: 35 Agua purificada: 65 Acetonitrilo

Operador: V. Rodríguez

Fecha: 29 09 11

Equipo: HPLC 2487

Conc. std= 0.2016 mg/mL

	Area	FR std
	9308349	2.166E-08
	9315234	2.164E-08
	9317853	2.164E-08
	9292302	2.170E-08
	9311578	2.165E-08
	9280388	2.172E-08
FR MEDIA	2.167E-08	
RSD	0.1587	%

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en ml
peso mtra g	2.5123	2.5137	2.5198	25
con. mta mg/mL	0.200984	0.201096	0.201584	
resp mta	9866507	9802686	9852757	
ENSAYO	106.37 %	105.62 %	105.90 %	
promedio	105.96			
des std	0.38			
c.v	0.36			

% FASE: 45 Agua purificada: 55 Acetonitrilo

	Área	FR std
	9204690	2.190E-08
	9186412	2.195E-08
	9222991	2.186E-08
	9261333	2.177E-08
	9268294	2.175E-08
	9261723	2.177E-08
FR MEDIA	2.183E-08	
RSD	0.3735	%

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en ml
peso mtra g	2.5123	2.5137	2.5198	25
con. mta mg/mL	0.200984	0.201096	0.201584	
resp mta	9823928	9773550	9795316	
ENSAYO	106.71 %	106.11 %	106.09 %	
promedio	106.30			
des std	0.36			
c.v	0.34			

CONDICIÓN BASE 2 Columna: Waters Spherisorb C18 5µ 250mm x 4.6mm

Operador: V. Rodríguez

Fecha: 03 11 11

Equipo: HPLC 2487

Conc. std= 0.2025869 mg/mL

	Área	FR std
	8960950	2.261E-08
	8985775	2.255E-08
	8984690	2.255E-08
	8800239	2.302E-08
	8822869	2.296E-08
	8784096	2.306E-08
FR MEDIA	2.279E-08	
RSD	1.0903	%

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en ml
peso mtra g	2.5213	2.5243	2.5263	25
con. mta mg/mL	0.201704	0.201944	0.202104	
resp mta	9488775	9546072	9486696	
ENSAYO	107.22 %	107.74 %	106.98 %	
Promedio	107.31			
des std	0.39			
c.v	0.36			

Ensayo 3

Columna: Phenomenex Spherisorb ODS (2) 5µ 250mm x 4.6mm

	Área	FR std
	9050882	2.238E-08
	9135635	2.218E-08
	9162948	2.211E-08
	9213121	2.199E-08
	9171606	2.209E-08
	9128679	2.219E-08
FR MEDIA	2.216E-08	
RSD	0.5985	%

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en ml
peso mtra g	2.5213	2.5243	2.5263	25
con. mta mg/mL	0.201704	0.201944	0.202104	
resp mta	9688346	9842383	9813590	
ENSAYO	106.42 %	107.99 %	107.58 %	
promedio	107.33			
des std	0.81			
c.v	0.76			

Ensayo 4 CAMBIO DE EQUIPO

Operador: V. Rodríguez

Fecha: 03 11 11

Equipo: HPLC 2489

Conc. std= 0.2025869 mg/mL

	Área	FR std
	8957328	2.262E-08
	8996861	2.252E-08
	8997596	2.252E-08
	9055414	2.237E-08
	9006934	2.249E-08
	9031096	2.243E-08
	<hr/>	
	2.249E-08	
FR MEDIA		
RSD	0.371	%

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en ml
peso mtra g	2.5213	2.5243	2.5263	25
con. mta mg/mL	0.201704	0.201944	0.202104	
resp mta	9672647	9725015	9797320	
ENSAYO	107.86 %	108.31 %	109.03 %	
promedio	108.40			
des std	0.59			
c.v	0.55			

Diferencia media (di)= Media de la condición base – Media de la condición alterada

Condición	Base	Alterada			di
Volumen de Inyección	20µL	10µL			0.19
	107.34 % -	107.15	% =		
	20µL	30µL			0.58
	107.34 % -	106.76	% =		
Velocidad de Flujo	1.0 mL/min	0.8 mL/min			0.30
	107.34 % -	107.04	% =		
	1.0 mL/min	1.2 mL/min			0.27
	107.34 % -	107.07	% =		
% Fase	(40/60)	(35:65)			1.38
	107.34 % -	105.96	% =		
Agua purificada/Acetonitrilo	(40/60)	(45:55)			1.04
	107.34 % -	106.30	% =		
Columna	Base 2	Alterada			0.02
	Waters Spherisorb C18	Phenomenex Spherisorb ODS(2)			
	107.31 % -	107.33	% =		
Equipo	HPLC 2487	HPLC 2489			1.09
	107.31 % -	108.40	% =		

CRITERIO:

$di \leq 2\%$

5.8 PRUEBAS LÍMITE

Operador: V. Rodríguez

Fecha: 26 09 11

Equipo: HPLC 2487

$$\text{Stock} = \frac{25 \text{ mg Rimexolona}}{25 \text{ mL Metanol}} \times 0.993 \times \frac{2.5 \text{ mL}}{50 \text{ mL fase}} = 0.05 \text{ mg/mL Rimexolona}$$

Concentración final en cada punto de la curva:

$$= \text{Conc stock} \times \frac{\text{Alícuota de stock}}{\text{Volumen final con fase}} \times \frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}} = \text{mcg/mL de Rimexolona}$$

	mcg/ml		
S 0.1% =	0.0993	1 ml /500 ml Fase ----->	0.0993 mcg / mlRimexolona
S0.25%=	0.24825	1 ml /200 ml Fase ----->	0.2483 mcg / mlRimexolona
S 0.5% =	0.4965	1 ml /100 ml Fase ----->	0.497 mcg / mlRimexolona
S 1.0% =	0.993	2 ml /100 ml Fase ----->	0.993 mcg / mlRimexolona
S 2.0% =	1.986	4 ml /100 ml Fase ----->	1.986 mcg / mlRimexolona

STD	0.0993	0.24825	0.4965	0.993	1.986	mg/ml
%	0.1	0.25	0.5	1.0	2.0	x-eje
	8719	23466	47332	94062	189965	
	8880	23632	47208	94664	189238	
	8798	23751	47750	94509	189511	
MEDIA	8799	23616	47430	94412	189571	y-eje
RSD	0.9149	0.6061	0.5987	0.3311	0.1937	

	x-eje	x ²	y-eje	y ²	xy
	0.2979	0.02958147	26397	2.32E+08	2621
	0.7448	0.18488419	70849	1.67E+09	17588
	1.4895	0.73953675	142290	6.75E+09	70647
	2.9790	2.9581470	283235	2.67E+10	281252
	5.9580	11.8325880	568714	1.08E+11	1129466
SUMA	11.4692	15.7447374	1091485	1.43E+11	1501575
MEDIA	0.76461		72765.67		

n= 15

$$\text{sum } xx = \frac{\text{sum } x^2 - (\text{sum } x)^2}{n} = 6.975311$$

$$\text{sum } yy = \frac{\text{sum } y^2 - (\text{sum } y)^2}{n} = 6.38 \times 10^{10}$$

$$\text{sum } xy = \frac{\text{sum } xy - (\text{sum } x \cdot \text{sum } y)}{n} = 667014.5$$

$$\text{pendiente} = b_1 = \frac{\text{sum } xy}{\text{sum } xx} = \frac{61880509}{1.3465387} = 95625.05819$$

$$\text{Intercepto} = b_0 = \text{media } y - b_1 (\text{media } x) = -350.209075$$

$$S^2_{y/x} = \frac{\text{sum } yy - b_1 \text{sum } xy}{n-2} = 121766.9$$

$$\text{coeficiente de correlación} = r = \frac{\text{sum } xy}{\sqrt{\text{sum } xx \cdot \text{sum } yy}} = 0.99999$$

$$\text{Coeficiente de determinación} = r^2 = 0.999975$$

El intervalo de confianza al 95% se calcula: T 0.975, 13= 2.16

$$\text{intercepto} = b_0 = -350.20908 \pm 2.16 \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\text{media } x)^2}{\text{sum } xx}} \cdot S^2_{y/x}$$

$$\begin{array}{l} b_0 = -350.209075 \quad \pm \quad 292.3874 \\ b_0 = -57.82163969 \quad a \quad 642.5965 \end{array}$$

$$\text{pendiente} = b_1 = 95625.05819 \pm 2.16 \sqrt{\frac{1}{\text{sum } xx}} \cdot S^2_{y/x}$$

$$\begin{array}{l} \text{pendiente} = b_1 = 95625.05819 \quad \pm \quad 285.3886 \\ b_1 = 95910.44679 \quad a \quad 95339.67 \end{array}$$

El intervalo de confianza de la regresión lineal:

$$y = b_0 + b_1 \cdot x_0 \pm 2.16 \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{x_0 - (\text{media } x)^2}{\text{sum } xx}} \cdot S^2_{y/x}$$

1) x0 =	40	%	y =	3824652	+ -	11199.02423
2) x0 =	100	%	y =	9562156	+ -	28321.31796
3) x0 =	120	%	y =	11474657	+ -	34028.97786

x-eje	y-eje	y-eje - interv. conf.	y-eje + interv. conf.
50	3824652	3813453	3835851
100	9562156	9533834	9590477
120	11474657	11440628	11508686

Sesgo del error debido al intercepto diferente de cero

$$y=b_0 + b_1*x$$

y- intercepto: $\leq 5\%$ del punto medio de respuesta

y- intercepto	=	-350.209	
punto medio	=	9562156	
% error	=	0.00366	mcg/ml

Sobre la curva

Y- limite inf :	40	mcg/ml	3824652
Y-100% :	100	mcg/ml	9562156
Y-limite sup. :	120	mcg/ml	11474657

a) Límite inferior: 40%

$$\%E = \left(1 - \frac{Y\text{-inferior}}{Y-100\%}\right) \times \frac{100 b_0}{40 b_1} = 0.600022 x - 0.00916 = -0.005\% \text{ mcg/mL}$$

b) Límite superior: 120%

$$\%E = \left(1 - \frac{Y\text{-superior}}{Y-100\%}\right) \times \frac{100 b_0}{120 b_1} = -0.2000073 x - 0.00305 = 0.006\% \text{ mcg/mL}$$

Análisis de Residuales:

x-eje conc	y-eje resp	y resp/conc	y sobre curva	% error de y
0				
0.0993	8799	88610	9145	3.936
0.2483	23616	95131	23389	-0.964
0.497	47430	95529	47128	-0.638
0.993	94412	95077	94605	0.205
1.986	189571	95454	189561	-0.005
MEDIA =		93960		
RSD resp / conc =		0.0319	mcg/ml	

Límite de Detección:

S y/x= 348.9511632

Pendiente (b1)= 95625.05819

$$LD = \frac{3.3 * Sy/x}{b_1}$$

$$LD = \frac{3.3 \times 348.9512}{95625.05819} = 0.012042229 \text{ mcg/mL}$$

Límite de Cuantificación:

$$LC = \frac{10 * Sy/x}{b_1}$$

$$LD = \frac{10 \times 348.9512}{95625.05819} = 0.036491603 \text{ mcg/mL}$$

5.9 ESPECIFICIDAD

Condiciones de Analisis
Condición Base (sin degradar)
Calor 85°C x 4 hrs
Peroxido/calor 85°C 4 hrs
HCL conc./calor 85°C 12hrs
NaOH 50%/calor 85°C 4 hrs

CONDICIÓN BASE (Sin Degradar)

$$\text{Conc. std} = \frac{25.1 \text{ mg Rimexolona}}{25 \text{ mL Metanol}} \left(\frac{2 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \right) = 0.20238532 \text{ mg/mL}$$

Pureza std= 0.993

Densidad mtra= 1.015g/mL

$$\text{Conc. mtra} = \frac{\text{peso de la mtra}}{50 \text{ mL Metanol}} \left(\frac{5 \text{ mL}}{25 \text{ mL}} \right)$$

$$\text{FR std} = \frac{\text{Conc std}}{\text{Area std}}$$

$$\% \text{ Ensayo} = \frac{\text{Area mtra}}{\text{Conc mtra}} * \text{FR} * 100$$

	<u>Area</u>	<u>FR std</u>
	9193956	2.201E-08
	9261718	2.185E-08
	9233524	2.192E-08
	9247912	2.188E-08
	9237324	2.191E-08
	9226092	2.194E-08
FR MEDIA	2.192E-08	9233421
RSD	0.2491	%

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en ml
Peso (g)	5.0218	5.0267	5.0448	50
con. mta mg/mL	0.200872	0.201068	0.201792	
resp mta	9713796	9778416	9780590	
ENSAYO	106.00 %	106.60 %	106.24 %	
promedio	106.28			
des std	0.30			
c.v	0.28			

Ensayo 1**Calor 85°C/ 12 hrs**

Operador: V. Rodríguez

Fecha: 09 11 11

Equipo: HPLC 2487

Conc. std= 0.202385316 mg/mL

	Area	FR std
	6685441	3.027E-08
	6737441	3.004E-08
	6826640	2.965E-08
	6857953	2.951E-08
	6835441	2.961E-08
	6887661	2.938E-08
FR MEDIA	2.974E-08	6805096
RSD	1.1434	%

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en ml
Peso (g)	5.0218	5.0267	5.0448	50
con. mta mg/mL	0.200872	0.201068	0.201792	
resp mta	5313067	5423593	5523259	
ENSAYO	57.98	59.12	59.99	%
promedio	59.03			
des std	1.01			
c.v	1.72			

Ensayo 2**Peróxido 85°C/ 12 hrs**

Operador: V. Rodríguez

Fecha: 09 11 11

Equipo: HPLC 2487

Conc. std= 0.202385316 mg/mL

	Area	FR std
	1633985	1.239E-07
	1633481	1.239E-07
	1628187	1.243E-07
	1599058	1.266E-07
	1604463	1.261E-07
	1598677	1.266E-07
FR MEDIA	1.252E-07	1616309
RSD	1.0706	%

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en ml
Peso (g)	5.0218	5.0267	5.0448	50
con. mta mg/mL	0.200872	0.201068	0.201792	
resp mta	8581178	8541630	8845771	
ENSAYO	93.64 %	93.11 %	96.08 %	
promedio	94.3			
des std	1.59			
c.v	1.68			

Ensayo 3

HCl conc. 85°C/ 12 hrs

Operador: V. Rodríguez

Fecha: 09 11 11

Equipo: HPLC 2487

Conc. std= 0.202385316 mg/mL

	Area	FR std
	1452545	1.393E-07
	1441335	1.404E-07
	1438119	1.407E-07
	1440947	1.405E-07
	1441336	1.404E-07
	1425852	1.419E-07
FR MEDIA	1.405E-07	
RSD	0.5948	%

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en ml
Peso (g)	5.0218	5.0267	5.0448	50
con. mta mg/mL	0.200872	0.201068	0.201792	
resp mta	9277213	9007112	9290814	
ENSAYO	101.23 %	98.19 %	100.92 %	
promedio	100.11			
des std	1.67			
c.v	1.67			

Ensayo 4**NaOH al 50% 85°C/ 12 hrs**

Operador: V. Rodríguez

Fecha: 09 11 11

Equipo: HPLC 2487

Conc. std= 0.202385316 mg/mL

	Area	FR std
	1774037	1.141E-07
	1772437	1.142E-07
	1765077	1.147E-07
	1765529	1.146E-07
	1770289	1.143E-07
	1769078	1.144E-07
FR MEDIA	1.144E-07	
RSD	0.2043	%

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en ml
Peso (g)	5.0218	5.0267	5.0448	50
con. mta mg/mL	0.200872	0.201068	0.201792	
resp mta	9354015	9490813	9256092	
ENSAYO	102.07 %	103.46 %	100.54 %	
promedio	102.02			
des std	1.46			
c.v	1.43			

5.10 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Condición Base

Operador: V. Rodríguez

Fecha: 24 10 11

Equipo: HPLC 2487

$$\text{Conc. std} = \frac{10.1 \text{ mg Rimexolona}}{10 \text{ mL Metanol}} \left(\frac{5 \text{ mL}}{25 \text{ mL}} \right) \times 0.993 = 0.200586 \text{ mg/mL}$$

Pureza std= 0.993

$$\text{FR std} = \frac{\text{Conc std}}{\text{Area std}}$$

$$\% \text{ Ensayo} = \frac{\text{Area mtra}}{\text{Conc mtra}} * \text{FR} * 100$$

Area	FR std
8571289	2.34021E-08
8607773	2.33029E-08
8584408	2.33663E-08
8634058	2.32319E-08
8717966	2.30083E-08
8809419	2.27695E-08
FR MEDIA	2.31802E-08
RSD	1.0564 %

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en ml
peso mtra g	2.5224	2.5187	2.5242	25
con. mta mg/mL	<u>0.2017920</u>	<u>0.2115708</u>	<u>0.2120328</u>	
resp mta	<u>9512893</u>	<u>9556155</u>	<u>9663953</u>	
ENSAYO	109.28 %	104.70 %	105.65 %	
promedio	106.54			
des std	2.42			
c.v	2.27 %			

T1= 24 hrs

Operador: V. Rodríguez

Fecha: 25 10 11

Equipo: HPLC 2487

$$\text{Conc. std} = \frac{10.2 \text{ mg Rimexolona}}{10 \text{ mL Metanol}} \left(\frac{5 \text{ mL}}{25 \text{ mL}} \right) \times 0.993 = 0.202572 \text{ mg/mL}$$

Area	FR std
8579435	2.3611345E-08
8567570	2.3644044E-08
8582876	2.3601879E-08
8529188	2.3750444E-08
8549707	2.3693444E-08
8529142	2.3750572E-08
FR MEDIA	2.368E-08
RSD	0.2808 %

Temperatura ambiente

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en ml
peso mtra g	0.25224	0.25187	0.25242	25
con. mta mg/mL	0.2118816	0.2115708	0.2120328	
resp mta	9482634	9498272	9509511	
ENSAYO	105.96 %	106.29 %	106.18 %	
promedio	106.14			
des std	0.17			
c.v	0.16 %			

Refrigeración

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en ml
peso mtra g	0.25224	0.25187	0.25242	25
con. mta mg/mL	0.2118816	0.2115708	0.2120328	
resp mta	9486610	9386189	9341514	
ENSAYO	106.00 %	105.03 %	104.31 %	
promedio	105.11			
des std	0.85			
c.v	0.81 %			

T2= 48 hrs

Operador: V. Rodríguez
 Fecha: 26 10 11
 Equipo: HPLC 2487

$$\text{Conc. std} = \frac{10.2 \text{ mg Rimexolona}}{10 \text{ mL Metanol}} \left(\frac{5 \text{ mL}}{25 \text{ mL}} \right) \times 0.993 = 0.202572 \text{ mg/mL}$$

Area	FR std
8634830	2.3459871E-08
8737954	2.3183001E-08
8631450	2.3469058E-08
8740080	2.3177362E-08
8738489	2.3181582E-08
8793523	2.3036501E-08
FR MEDIA	2.3251229E-08
RSD	0.75 %

Temperatura ambiente

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en ml
peso mtra g	0.25224	0.25187	0.25242	25
con. mta mg/mL	0.2118816	0.2115708	0.2120328	
resp mta	9566309	9559990	9504454	
ENSAYO	104.98 %	105.06 %	104.22 %	
promedio	104.75			
des std	0.46			
c.v	0.44 %			

Refrigeración

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en ml
peso mtra g	0.25224	0.25187	0.25242	25
con. mta mg/mL	0.2118816	0.2115708	0.2120328	
resp mta	9676678	9638260	9549740	
ENSAYO	106.19 %	105.92 %	104.72 %	
promedio	105.61			
des std	0.78			
c.v	0.74 %			

T3= 72 hrs

Operador: V. Rodríguez
Fecha: 27 10 11
Equipo: HPLC 2487

$$\text{Conc. std} = \frac{10.2 \text{ mg Rimexolona}}{10 \text{ mL Metanol}} \left(\frac{5 \text{ mL}}{25 \text{ mL}} \right) \times 0.993 = 0.202572 \text{ mg/mL}$$

Area	FR std
8774767	2.30857E-08
8708643	2.3261E-08
8778370	2.30763E-08
8611376	2.35238E-08
8682070	2.33322E-08
8560938	2.36624E-08
FR MEDIA	2.33236E-08
RSD	1.0084 %

Temperatura ambiente

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en ml
peso mtra g	0.25224	0.25187	0.25242	25
con. mta mg/mL	<u>0.2118816</u>	<u>0.2115708</u>	<u>0.2120328</u>	
resp mta	<u>9608909</u>	<u>9732279</u>	<u>9743412</u>	
ENSAYO	105.77 %	107.29 %	107.18 %	
promedio	106.75			
des std	0.84			
c.v	0.79 %			

Refrigeración

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	en ml
peso mtra g	0.25224	0.25187	0.25242	25
con. mta mg/mL	<u>0.2118816</u>	<u>0.2115708</u>	<u>0.2120328</u>	
resp mta	9598725	9545323	<u>9663530</u>	
ENSAYO	105.66 %	105.23 %	106.30 %	
promedio	105.73			
des std	0.54			
c.v	0.51 %			

5.10 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Diferencia media (di)= Media condición base – Media de la condición alterada

Inicial	24 hrs		48 hrs		72 hrs	
	T.A %	Refrigeración %	T.A %	Refrigeración %	T.A %	Refrigeración %
106.54 %	106.14	105.11	104.75	105.61	106.75	105.73
	Diferencia %		Diferencia %		Diferencia %	
	T.A	Refrigeración	T.A	Refrigeración	T.A	Refrigeración
	0.40	1.43	1.79	0.93	-0.20	0.81

CRITERIO: $d_i \leq 2\%$

Capítulo VI. ANÁLISIS DE RESULTADOS

-PRECISIÓN DEL SISTEMA:

Usando las condiciones de análisis establecidas en el método se obtuvo un CV = 0.51% En una serie de 6 muestras de solución estándar, teniendo una especificación de 1.5% (ver tabla), por lo tanto: **El Sistema es Preciso por Repetibilidad.**

-LINEALIDAD DEL SISTEMA:

Se preparó una curva estándar del 60 al 140% de la concentración de Rimexolona con respecto la concentración de trabajo (0.20 mg/ml) para verificar la linealidad del sistema. Las concentraciones reales de trabajo en la curva fueron: 0.120%, 0.160%, 0.200%, 0.240% y 0.280%. Obteniendo los siguientes resultados al aplicar la ecuación de mínimos cuadrados de la relación respuesta vs concentración:

- Intervalo de la pendiente IC (β_1)= 45955241.02 a 70080.55958, el cual **no contiene al cero.**
- Intervalo del intercepto IC(β_0)= -4471.753571 a 25252.81762, el cual **contiene al cero.**
- El error del intercepto en el punto medio de la curva, es **0.00%**, el cual **deberá ser menor o igual a 5%.**
- Se calculó el Coeficiente de determinación (r^2) = **0.999994** cuyo valor deberá ser **mayor o igual a 0.985.**
- El Coeficiente de correlación (r) = **1.0000** 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.**

-PRECISIÓN DEL MÉTODO POR REPETIBILIDAD:

Se evaluó la precisión del método a través de un placebo adicionado con solución estándar de Rimexolona; tomando 6 pesadas independientes de un solución stock preparada de concentración aproximada de 0.203191632 mg/mL; se analizaron bajo las condiciones establecidas en el método analítico.

Los porcentajes de recobro de Rimexolona obtenidos de las 6 determinaciones presentan un CV = 0.61% y el promedio del porcentaje = 99.78%; 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.**

-LINEALIDAD DEL MÉTODO:

Se analizó por triplicado producto cargado con Rimexolona materia prima. Pesando 25mg de Rimexolona en 25 ml de Metanol (solución estándar 1mg/mL), añadiendo a un matraz volumétrico una alícuota de ésta solución, como se indica en la tabla, así como también depositando en cada uno de los matraces una alícuota de 2mL de muestra. Depositando ambas alícuotas en un matraz volumétrico de 25 ml y diluyendo con fase móvil, para obtener concentraciones a los niveles de 80%, 100% y 120% de Rimexolona.

Conc. de la curva %	Volumen de muestra (1.0mg/mL)	Volumen de Solución Estándar de Referencia Stock (1.0mg/mL)	Volumen con Fase móvil	Conc. Teórica final del producto en mg/mL
80 (0.16mg/ml)	2.0 mL	2.0 mL	25.0mL	0.16
100 (0.20mg/ml)	2.0 mL	3.0 mL	25.0mL	0.20
120 (0.24mg/ml)	2.0 mL	4.0 mL	25.0mL	0.24

Se obtuvieron los siguientes resultados:

- Intervalo de la pendiente IC (β_1)= 0.96979 a 1.02713, el cual debe **contener al uno**.
- Intervalo del Intercepto IC (β_0) = -0.005584473 a 0.0060651, el cual debe **contener al cero**.
- Se calculó el Coeficiente de determinación (r^2) = 0.998087 cuyo valor deberá ser **mayor o igual a 0.985**.
- El CV de la regresión = 0.59% 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**.

-PRECISIÓN INTERMEDIA:

Se analizó una suspensión de producto terminado a una concentración teórica 1.0% de Rimexolona por triplicado por 2 diferentes analistas en 2 diferentes días, usando el mismo estándar de referencia y equipo, siguiendo el método analítico. Obteniéndose los siguientes resultados:

	Analista 1	Analista 2	CV por día
Día 1	0.44	0.93	0.93
Día 2	0.75	0.48	0.99
CV por Analista	0.60	0.67	

El CV total de todas la muestras= 0.93%, El cual es menor al 2% por lo tanto **El Método es Preciso por Reproducibilidad sin importar el Día o el Analista**.

-TOLERANCIA:

Se analizó una suspensión de producto terminado a una concentración teórica 1.0% de Rimexolona por triplicado contra un estándar en 2 columnas y equipo diferentes por un analista en un mismo día.

La columna que se utilizó para realizar la validación es: Water Spherisorb C18 5micras 250 mm x 4.6 mm.

La columna a probar fue: Phenomenex Spherisorb ODS (2) 5micras 250 mm x 4.6 mm

HPLC marca: Waters

Modelos: 2487 y 2489

	Waters Spherisorb C18 5 µ 150 mm x 4.6 mm	Phenomenex Spherisorb ODS(2) 5 µ 150 mm x 4.6 mm	HPLC 2487	HPLC 2489
% de recobro	107.30	107.33	107.30	108.40
CV	0.36	0.76	0.36	0.55
di =	107.30% - 107.33%= 0.03%		107.30% - 108.40%= 1.10%	

La diferencia absoluta entre las columnas y el equipo es menor 2% por lo tanto **El Método es Tolerante al Cambio de Columna y Equipo.**

-ROBUSTEZ:

Se realizaron cambios sobre las condiciones de la técnica de análisis como se observa en la tabla, obteniéndose los siguientes resultados:

Condición	Base	Alterada	di
Volumen de Inyección	20µL 107.34 % -	10µL 107.15 % =	0.19
	20µL 107.34 % -	30µL 106.76 % =	0.58
Velocidad de Flujo	1.0 mL/min 107.34 % -	0.8 mL/min 107.04 % =	0.30
	1.0 mL/min 107.34 % -	1.2 mL/min 107.07 % =	0.27
% Fase Aguapurificada/Acetonitrilo	(40/60) 107.34 % -	(35:65) 105.96 % =	1.38
	(40/60) 107.34 % -	(45:55) 106.30 % =	1.04
	Base 2	Alterada	 di
Columna	Waters Spherisorb C18 107.31 % -	Phenomenex Spherisorb ODS (2) 107.33 % =	0.02
Equipo	HPLC 2487 107.31 % -	HPLC 2489 108.40 % =	1.09

CRITERIO: $|di| \leq 2\%$

El cambio en el Volumen de Inyección, Velocidad de Flujo, Proporción de Fase, así como el cambio de Columna y Equipo, no afecta significativamente en el análisis ya que la diferencia que se obtuvo es menor al 2%.

La diferencia absoluta de cada uno de los parámetros es menor 2% por lo tanto **El Método es Robusto.**

-PRUEBAS LÍMITE:

Se prepararon 5 concentraciones a partir de materia prima Rimexolona, a niveles de concentración de activo (0.1%, 0.25%, 1.0% y 2.0%), por dilución. Preparando por triplicado cada nivel. Así como también simultáneamente se prepararon 5 blancos. Obteniendo los siguientes resultados al aplicar la ecuación de mínimos cuadrados de la relación respuesta vs concentración:

- Intervalo de la pendiente IC (β_1)= 95910.44679 a 95339.67, el cual **no contiene al cero.**
- Se calculó el Coeficiente de determinación (r^2) = **0.999975** cuyo valor deberá ser **mayor o igual a 0.985.**
- El Coeficiente de correlación (r) = **0.99999** cuyo valor deberá ser **mayor o igual a 0.9925.**

El LC obtenido fue de 0.036491603 mcg/mL lo cual nos indica la concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas.

LD obtenido fue de 0.012042229 mcg/mL lo cual nos indica la concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

Todos los parámetros se encuentran dentro de los criterios de aceptación, por lo tanto **El Método es Cuantificable y Detectable a estas condiciones de estudio.**

-ESPECIFICIDAD:

Se realizaron pruebas con una suspensión de producto terminado a una concentración teórica 1.0% de Rimexolona y de Materia Prima bajo las siguientes condiciones de análisis, ver tabla:

Vía de Degradación	Peso de la muestra (Rimexolona 1%)	Condición de Análisis	Vol. adicionado de reactivo
Calor	5g	12 hrs/85°C	NA
Básica (NaOH)	5g	4 hrs/85°C	0.3 mL de NaOH 50%
Acida (HCL)	5g	4 hrs/85°C	0.3 mL de HCL concentrado
Peróxido	5g	4 hrs/85°C	0.3 mL de Peróxido 30%

Una vez terminadas las condiciones de degradación, se terminaron de preparar bajo las condiciones de análisis que establece el método.

El producto final y la solución estándar 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 Rimexolona en una suspensión de prueba.**

-ESTABILIDAD DE LA MUESTRA:

Se analizó una suspensión de producto terminado a una concentración teórica 1.0% de Rimexolona; 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, obteniendo los siguientes resultados:

Inicial 106.54%	24 hrs		48 hrs		72 hrs	
	T.A %	Refrigeración %	T.A %	Refrigeración %	T.A %	Refrigeración %
	106.14	105.11	104.75	105.61	106.75	105.73
	Diferencia%		Diferencia %		Diferencia %	
	T.A %	Refrigeración %	T.A %	Refrigeración %	T.A %	Refrigeración %
	0.40	1.43	1.79	0.93	-0.20	0.81

Por lo cual se establece que la muestra de suspensión probada es estable en un periodo de 72 hrs, almacenada bajo condiciones de temperatura ambiente o en refrigeración, para su análisis, pues la diferencia de recobro es menor a 2%.

Capítulo VII. CONCLUSIONES

- De acuerdo a la Validación realizada el método analítico cumple con los lineamientos establecidos en el protocolo general de validación por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Por lo cual en base a los resultados obtenidos en el trabajo de Validación de Rimexolona se confirma que el sistema analítico es lineal, preciso, y exacto.
- La adecuabilidad del sistema cumple con los parámetros de exactitud. Además de que se asegura que el método es específico, preciso, lineal, reproducible, robusto y tolerante. De acuerdo a los lineamientos básicos establecidos en la “guía de validación de métodos analíticos del colegio nacional de QFB´S” Y Del protocolo de validación..
- Este método permite cuantificar Rimexolona contra un estándar, usando un sistema HPLC equipado con una columna C-18 y fase móvil Acetonitrilo: agua 60:40, con una detección del pico a 242nm.
- Este método constituye identificación positiva de Rimexolona por el tiempo de retención del estándar.

Capítulo VIII. BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

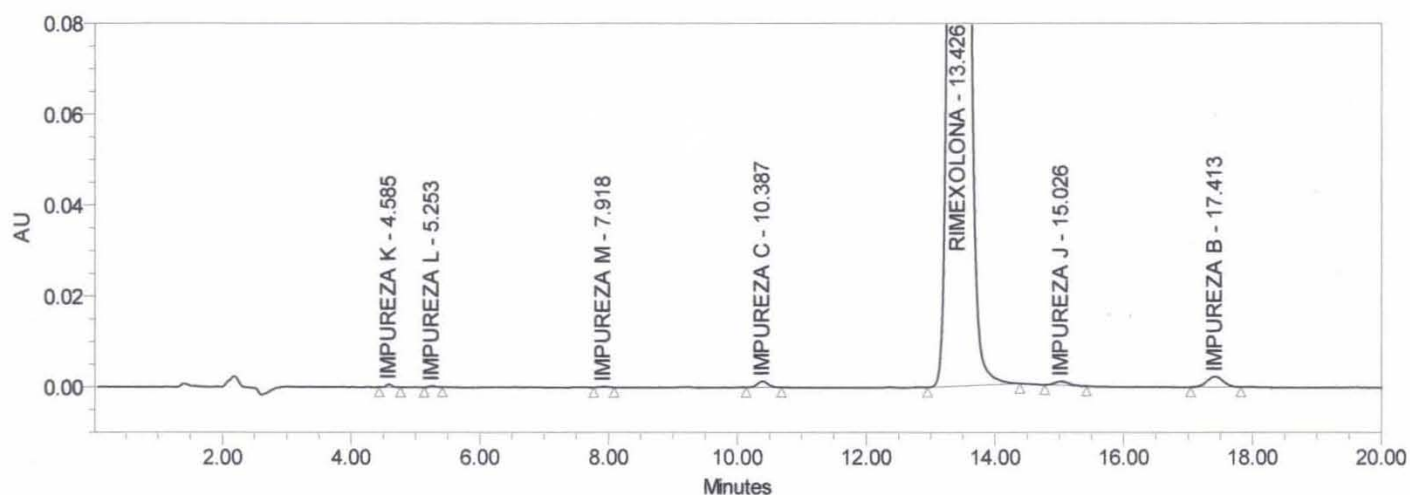
1. Validation and qualification in analytical laboratories, Ludwig Huber, Interpharm Press Inc. USA 1999.
2. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.
3. Guía de validación de métodos analíticos, Comisión de validación de métodos analíticos, Colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos, A. C.
4. Protocolo general de validación de métodos analíticos ME.L93.3SOP2.0001 ultima revisión.
5. FWMDOC-03093. RIMEXOLONE ASSAY IN COMPONENT CHEMICALS AND SUSPENSIONS BY HPLC. Version 3.0; 11-Sep-2010 .
6. PROC 60.8-00610. High-Performance Liquid Chromatographic Assay Procedure for Rimexolone and Related Substances in Ophthalmic Suspensions.
7. [http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000011.nsf/voDocumentos/D23ED4D5F4AE6E23C125695F00243365/\\$File/266_nuevos_productos_03.htm](http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000011.nsf/voDocumentos/D23ED4D5F4AE6E23C125695F00243365/$File/266_nuevos_productos_03.htm)
8. Summary of Product Characteristics- Vexol Ophthalmic Suspensión 1%. Alcon Laboratories Ltd, June 1997.
9. Halpern MT et al. A pharmaco-economic analysis of rimexolone for the treatment of ophthalmic inflammatory conditions. Am J Managed Care 1988; 4(6): 854-862.
10. Anon. Rimexolone: a topical corticosteroid with a low potential to cause intraocular hypertension. Drugs and Therapy Perspectives 19 Jan 1988; 11(1):1.
11. Brodgen RN and Wagstaff AJ. Rimexolone. A review of the pharmacological properties and clinical potential in the management of ocular inflammation. Biodrugs 1977; 8(1): 68-79.
12. Leibowitz HM et al. Intraocular pressure- raising potential of 1.0% rimexolone in patients responding to corticosteroids. Arch Ophthalmol Aug 1996;114:933-937.
13. <http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8248/4/T4cromatliquid.pdf>
14. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 9a. Ed. México (2008).
15. Heftmann, E. *Chromatography: Fundamentals and Applications of chromatography and related differential migration methods*, Elsevier Science Publishers B.V, 5a. edición, EUA, 1992, pp. 2-14 Rojo Callejas F., Manual de Química Analítica Instrumental II, Anexo III, Facultad de Química UNAM, México 2002
16. <http://www.textoscientificos.com/quimica/cromatografia>
17. http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/manchi/alim/Trabajo5.pdf
18. http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/apquim-an-instr-14/skoog/26d.html
19. BERMEJO, M. F. – “Química analítica general, cuantitativa e instrumental “. Vol. 2. Ed. Paraninfo, S. A. Madrid. 1991.
20. HARRIS, D. C. – “Análisis químico cuantitativo”. Ed. Reverte, S. A. Barcelona. 2001.
21. HERNÁNDEZ, L. y GONZÁLEZ, C. – “Introducción al análisis instrumental”. Ed. Ariel Ciencia. 2002.
22. KIRK, R. S., SAWYER, R., EGAN, H. – “Compuestos y análisis de alimentos de Pearson” Ed. Continental, S. A. México. 1996.
23. LORO, J. F. – “Manual de cromatografía”. Colección Textos Universitarios. 2001 ROUESSAC, F. y ROUESSAC, A. – “Análisis químico: Métodos y técnicas instrumentales modernas”. Ed. Mc Graw Hill. 2003.
24. SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J. – “Química analítica”. Ed. Mc Graw Hill. 7ª edición. 2001.
25. SKOOG, A y LEARY – “Análisis instrumental”. Ed. Mc Graw Hill. 1998

Capítulo IX. ANEXOS

9.1 EJEMPLO DE ÁREAS Y CROMATOGRAMAS OBTENIDOS DURANTE EL ANÁLISIS.

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: STD	Acquired By: Claudia
Sample Type: Standard	Date Acquired: 9/5/2011 1:31:21 PM CDT
Vial: 2	Acq. Method Set: VEXOL87
Injection #: 1	Date Processed: 9/6/2011 10:42:39 AM CDT
Injection Volume: 20.00 ul	Processing Method: ADECUARIME
Run Time: 20.0 Minutes	Channel Name: 2487Channel 1
Sample Set Name: LINEALIDAD SISTEMA	Proc. Chnl. Descr.: RIMEXOLONA



	Name	SampleName	Area (μV*sec)	Platos teóricos	Coleo	Resolución
1	IMPUREZA K	STD	3632	13888.721210	1.165	
2	IMPUREZA L	STD	1614	17069.935928	1.094	4.161
3	IMPUREZA M	STD	1499	19832.437377	1.050	13.488
4	IMPUREZA C	STD	14788	20052.840361	1.039	9.322
5	RIMEXOLONA	STD	9313298	20169.598072	1.100	8.902
6	IMPUREZA J	STD	13396	21369.296927	1.279	3.973
7	IMPUREZA B	STD	41398	21238.312453	1.010	5.277

Criterios de edecabilidad:

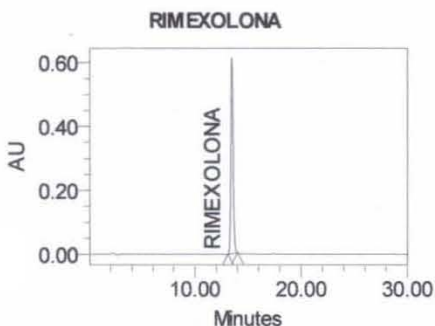
Platos teóricos > 1500

Resolución con impureza J > 1.0

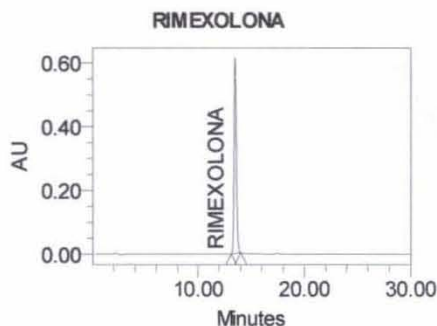
COLUMN WATERS SPHERISORB C18 016330021136-71

LINEALIDAD METODO

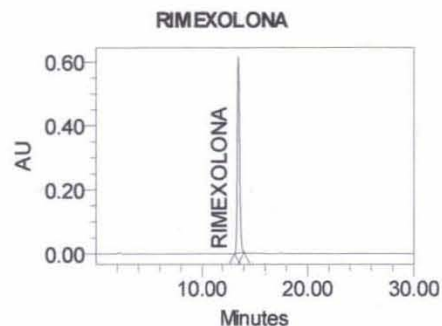
	Vial	Name	Injection	SampleName	Channel	Area
1	26	RIMEXOLONA	1	STD	2487Channel 1	9203212
2	26	RIMEXOLONA	2	STD	2487Channel 1	9219666
3	26	RIMEXOLONA	3	STD	2487Channel 1	9225472
4	27	RIMEXOLONA	1	STD	2487Channel 1	9242552
5	27	RIMEXOLONA	2	STD	2487Channel 1	9277542
6	27	RIMEXOLONA	3	STD	2487Channel 1	9253432
Mean						9236979
Std. Dev.						26530.8
% RSD						0.3



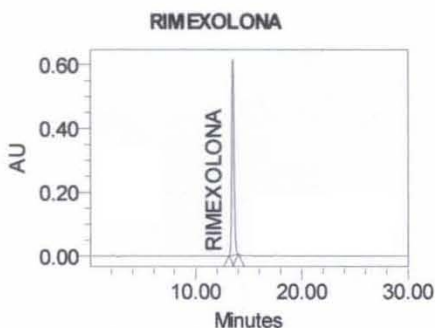
SampleName STD ; Vial 26; Date Acquired 9/27/2011 9:26:52 PM CDT



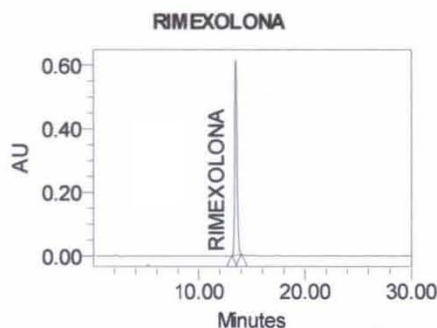
SampleName STD ; Vial 26; Date Acquired 9/27/2011 9:57:43 PM CDT



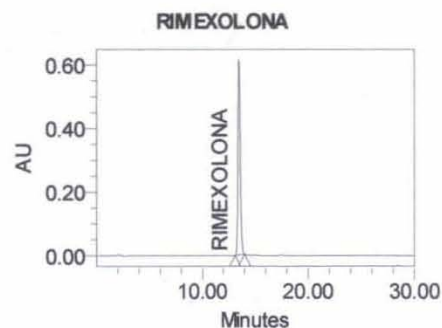
SampleName STD ; Vial 26; Date Acquired 9/27/2011 10:28:34 PM CDT



SampleName STD ; Vial 27; Date Acquired 9/27/2011 10:59:29 PM CDT



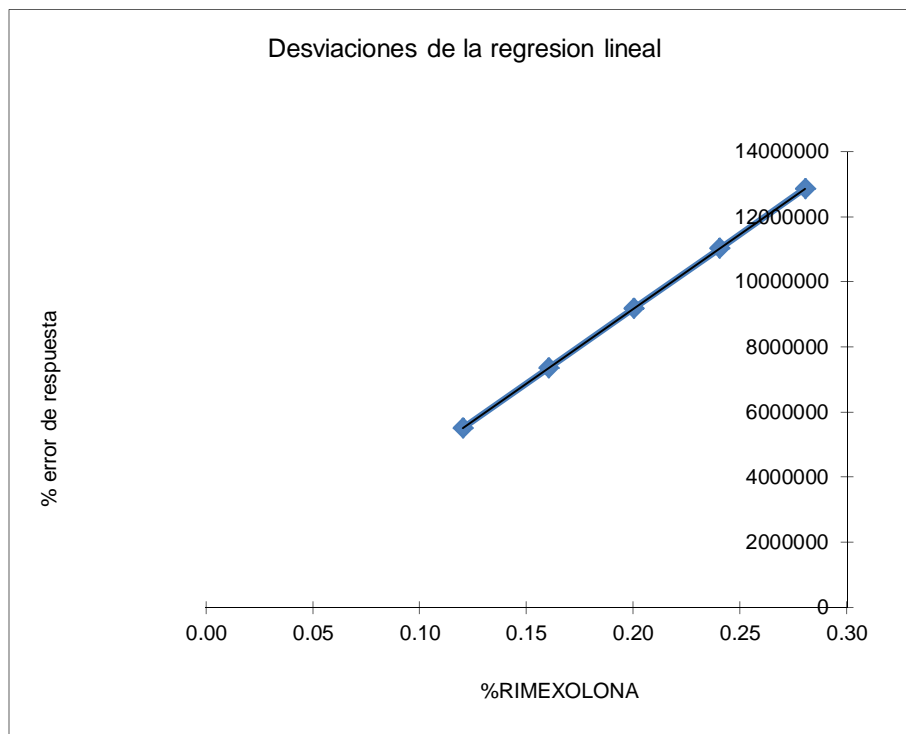
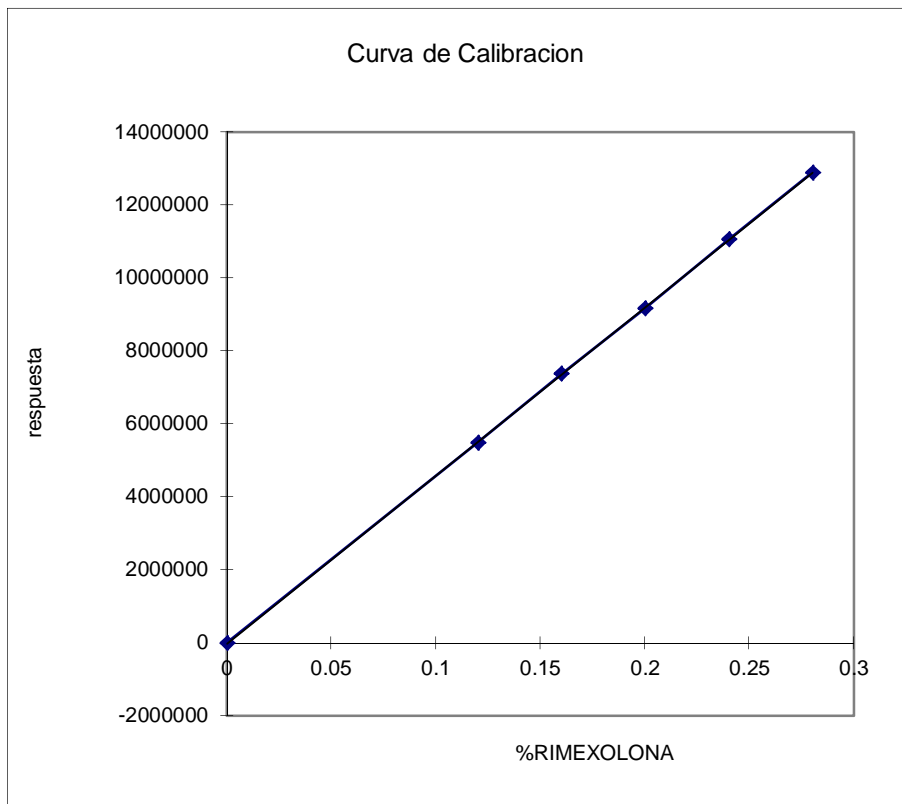
SampleName STD ; Vial 27; Date Acquired 9/27/2011 11:30:20 PM CDT

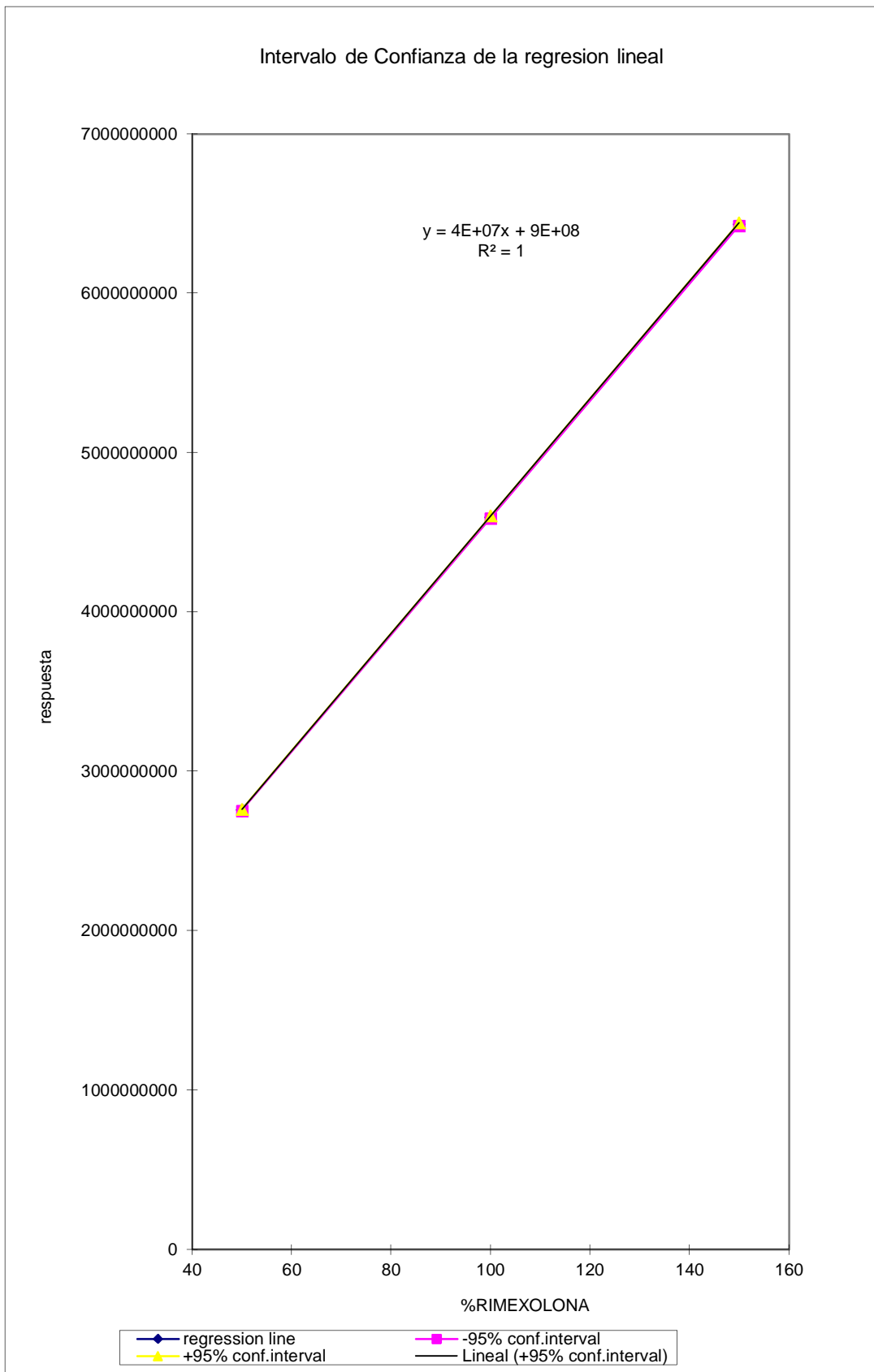


SampleName STD ; Vial 27; Date Acquired 9/28/2011 12:01:10 AM CDT

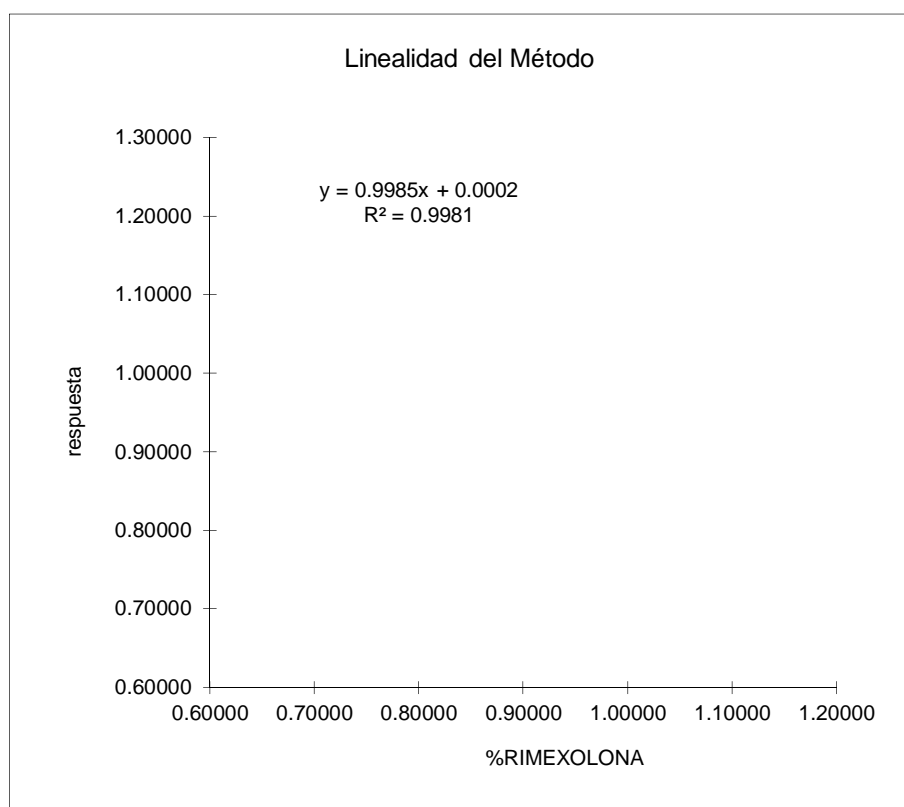
9.2 GRÁFICAS

9.2.1 Linealidad del Sistema





9.2.2 Linealidad del Método



9.3 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

NO. PROCED.:	PAG.: 1 DE 7
TITULO: ENSAYO DE RIMEXOLONA EN COMPONENTES QUIMICOS Y SUSPENSIONES POR HPLC	
NO. PROCED. ANTECEDE:	FECHA EF.:

I. OBJETIVO

Describir el ensayo de Rimexolona en componentes químicos y suspensiones por HPLC.

II. ALCANCE

Control Fisicoquímico

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

NO. PROCED. :

PAG. :
2 DE 7

III. RESPONSABILIDAD

- Es responsabilidad de los Químicos Analistas seguir este procedimiento.
- Es responsabilidad del Jefe de Control Físicoquímico verificar que este procedimiento se cumpla.

IV. INTRODUCCIÓN Y/O DEFINICIONES

Este método permite cuantificar rimexolona contra un estándar, usando un sistema HPLC equipado con una columna C-18 y fase móvil acetonitrilo:agua 60:40, con una detección del pico a 242nm.

Este método constituye identificación positiva de rimexolona por el tiempo de retención de la muestra que coincida con el tiempo de retención del estándar.

Este método es indicativo de estabilidad.

V. REACTIVOS

Rimexolona - Estándar de referencia

Acetonitrilo - Grado HPLC

Metanol - Grado HPLC

Nitrato de sodio - Grado reactivo

Fase móvil - Mezclar 600 ml de acetonitrilo con 400 ml de agua purificada, filtrar a través de un filtro de 0.45µ antes de usar.

Nota: Las diluciones del estándar y producto son en fase móvil. Preparar volumen adecuado.

VI. PRECAUCIONES

Rimexolona - Evitar contacto con la piel y ojos.

Acetonitrilo - (PELIGRO, VENENO) - Extremadamente flamable, dañino si es inhalado o absorbido a través de la piel.

Metanol - (VENENO, FLAMABLE) - Puede ser fatal si es ingerido o absorbido a través de la piel.

Nitrato de sodio - (TÓXICO, PELIGROSO, FUERTE OXIDANTE) - Al contacto con otros materiales puede causar fuego, puede reaccionar violentamente con golpes, fricción o calor. Puede ser fatal si es ingerido, dañino si es inhalado.

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

CONT'N.

NO. PROCED. :	PAG. : 3 DE 7
---------------	------------------

VII. EQUIPO

Cromatografo de líquidos de alta resolución equipado con un detector UV a 242nm
Columna C-18 capaz de medir los requerimientos de adecuabilidad del sistema

VIII. PARAMETROS DE OPERACION SUGERIDOS

Columna: Waters Spherisorb C18, 5 μ , 0.46 x 25 cm, o equivalente.
Fase móvil: Acetonitrilo : agua, 60:40. Adicionar agua para incrementar el tiempo de retención y resolución.
Velocidad de flujo: 1ml/min
Volumen de inyección: 20 μ l
Tiempo de retención: Aproximadamente 15 min. Este parámetro es crítico para el análisis de sustancias relacionadas y productos de degradación, para el propósito de separación.
Platos teóricos: ≥ 3000
Factor de capacidad (K'): ≥ 5
Factor de coeio (T): 0.7 - 1.8
% RSD : $\leq 2\%$

IX. PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR

Pesar aproximadamente cerca de 25 mg de rimexolona en un matraz de 25 ml, disolver y llevar a volúmen con metanol. La concentración de esta solución es cerca de 1 mg/ml de rimexolona.

Nota: La rimexolona se disuelve lentamente en metanol. No usar la solución hasta que la disolución sea completada. Sonicar levemente si es necesario.

Diluir 5 ml de la solución anterior a 25 ml con fase móvil. La concentración final es aproximadamente a 0.2 mg/ml de rimexolona.

X. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PRUEBA DE NITRATO DE SODIO

Pesar cerca de 16 mg de nitrato de sodio en un matraz volumétrico de 50 ml. Adicionar 10 ml de la solución estándar de rimexolona de 1 mg/ml y diluir a volumen con fase móvil. Use esta solución para identificar sólo el frente del solvente. Expira en 3 meses.

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

CONT'N.

NO. PROCED.:	PAG.: 4 DE 7
--------------	-----------------

XI. PREPARACIÓN DEL BLANCO

Diluir 5 ml de metanol a 25 ml con fase móvil.

XII. PREPARACIÓN DE MUESTRA

Materia prima:

Preparar como se prepara el estándar.

Suspensiones:

Agitar la muestra vigorosamente, pesar aproximadamente 2.5 g de suspensión de rimexolona en un matraz de 25 ml, diluir y aforar con metanol. Sonicar 2 minutos para disolver la suspensión. La muestra puede quedar turbia.

Diluir 5 ml de la solución a 25 ml con fase móvil. La concentración final es cercana a 0.2 mg/ml de rimexolona.

XIII. PROCEDIMIENTO

Prueba de adecuabilidad del sistema:

Realizar la adecuabilidad del sistema y calcular los siguientes parámetros.

Desviación estándar relativa (%RSD)

Factor de capacidad (K')

Platos teóricos (N)

Factor de coileo (T)

Tiempo de retención relativo (RRT)

$$RRT = \frac{\text{Tiempo de retención del analito}}{\text{Tiempo de retención de rimexolona}}$$

Ensayo para rimexolona:

Inyectar un blanco de fase móvil y asegurarse de que no se observen interferencias significativas.

Inyectar 20 µl del estándar y la muestra en el cromatógrafo y obtener los picos de respuesta. Calcular el porcentaje de activo, usando el promedio de la respuesta de los estándares. Ver figura 1 para cromatograma típico.

Materia prima y productos:

Calcular los resultados usando el promedio de la respuesta de los estándares.

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

CONT'N.

NO. PROCED.:

PAG.:

5 DE 7

Sustancias relacionadas o productos de degradación:

De todos los picos en la muestra que no sean del blanco o del frente del solvente, determinar el porcentaje de cada pico en relación al de rimexolona.

Nota: Dejar eluir la muestra 30 min para ensayo de impurezas, sustancias relacionadas y/o productos de degradación.

Paro del sistema:

Después de correr los últimos estándares lavar y almacenar el sistema HPLC con metanol.

XIV. CÁLCULOS

% Pureza:

$$\% \text{ Pureza tal cual} = \frac{A_p \times C_s}{A_s \times C_p} \times 100$$

% Pureza en base seca:

$$\% \text{ Pureza base seca} = \% \text{ Pureza tal cual} \times \frac{100}{100 - W}$$

% Activo (para soluciones):

$$\% \text{ Activo} = \frac{A_p \times C_s}{A_s \times C_p} \times 100$$

Donde:

A_p = Área de la muestra

A_s = Área del estándar (promedio)

C_p = Concentración teórica final de la muestra

C_s = Concentración final del estándar

W = % Pérdida al secado

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

CONT'N.

NO. PROCED.:	PAG. : 6 DE 7
--------------	------------------

Substancias relacionadas:

Calcular el porcentaje de algunas substancias relacionadas por:

$$\% R_{Si} = \frac{RR_{Si}}{RT} \times 100$$

Calculo del total de substancias relacionadas por:

$$R_{St} = \sum \% R_{Si}$$

Donde:

RR_{Si} = Pico de respuesta de algunos picos (excluyendo rimexolona) no observados en el blanco.

RT = Respuesta total de todos los picos incluyendo rimexolona, no observados en el blanco.

R_{St} = Total de substancias relacionadas.

Substancias relacionadas (formulaciones de rimexolona y suspensiones al 1%):

Calcular el porcentaje de algunas substancias relacionadas mediante la fórmula:

$$\% R_{Si} = \frac{A_p \times C_s}{A_s \times C_p} \times 100$$

Calcular el total de la substancia relacionada por:

$$\% R_{St} = \sum \% R_{Si}$$

Donde:

A_p = Area del pico de la substancia relacionada en la muestra

A_s = Promedio de las áreas de estándar de rimexolona

C_p = Concentración teórica final de rimexolona en la muestra

C_s = Concentración final de rimexolona en el estándar

R_{St} = Total de substancia relacionada

Nota: Para algunos estudios (por ejemplo, estabilidad de materia prima) el porcentaje específico para lumirimexolona y compuesto D pueden ser reportados. En adición el número total de picos no observados en el blanco (excluyendo el pico de rimexolona) pueden ser requeridos para ser reportados.

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

CONT 'N.

NO. PROCED. :	PAG. : 7 DE 7
---------------	------------------

XV. REFERENCIAS

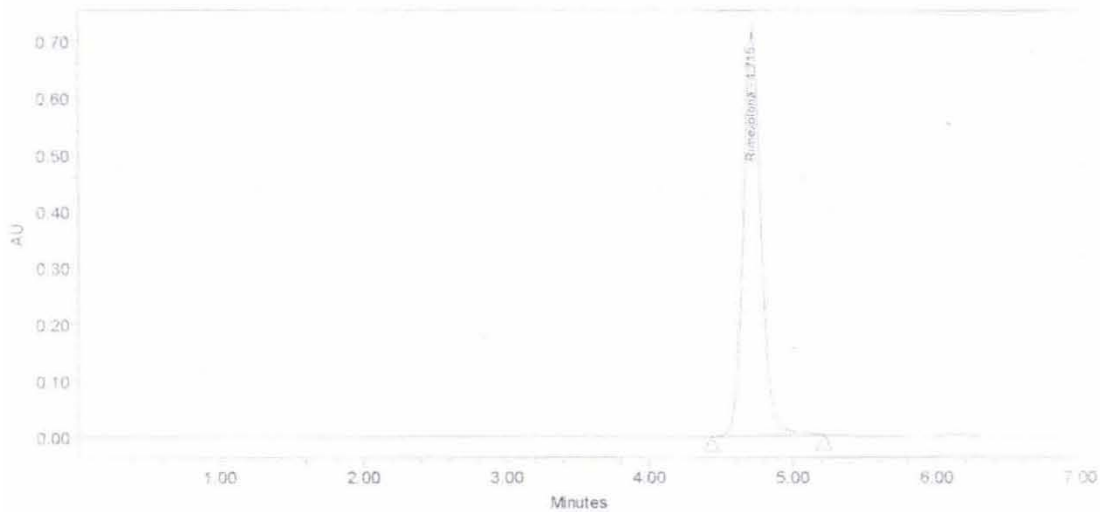
FW.C93.2ATP.S5071.R03.

XVI. REFERENCIA CRUZADA

N/A.

ANEXO 1

CROMATOGRAMA TÍPICO



9.4 GLOSARIO

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

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

Anchura de base: suele ser el intervalo de longitud de frecuencia de un pico; el intervalo pasa por un separador de banda.

Banda: Es una situación ideal, es una distribución gaussiana. La cantidad de compuesto que sale del cromatógrafo ó de una columna electroforética.

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.

Coefficiente de difusión: Medida de la movilidad de una especie en unidades de cm^2/s .

Coefficiente de reparto: constante de equilibrio que describe la distribución de un soluto entre dos fases, para definir el coeficiente de partición solo se utiliza una forma de un soluto (kD).

Coefficiente de selectividad: medida de la sensibilidad de un método para un interferente dado en comparación con su sensibilidad para el analito (K_A/I).

Cola: prolongación final de un pico cromatográfico, generalmente debida a la presencia de lugares muy activos en la fase estacionaria.

Constante de disociación: constante de equilibrio de una reacción en la que un complejo metal-ligando se disocia para formar un ión metálico libre y un ligando (kD).

Constante de equilibrio: K' Constante que se basa en las concentraciones molares al equilibrio, su valor numérico de K' depende de la fuerza iónica del medio.

Cromatografía: separación en la que los solutos se distribuyen entre fase móvil y estacionaria.

Cromatograma: registro de la señal de detección en función del tiempo de elusión o del volumen.

Eficiencia de la columna: medida del grado de ensanchamiento de una banda, se suele expresar en términos de la altura H , de los platos o del número N de platos teóricos. En la medida en que la distribución del analito dentro de la banda es gaussiana, la altura de los platos está dada por la varianza dividida entre la longitud de la columna del empacado.

Ensanchamiento de banda: aumento de la anchura de base de un soluto a medida que se desplaza desde el punto de inyección al detector.

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

Estabilidad Analítica de la Muestra: 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.

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

Factor de capacidad: medida de la fortaleza con la que la fase estacionaria retiene en soluto dado (k').

Factor de selectividad: cociente de los factores de capacidad de dos solutos que muestra la selectividad de la columna para uno de ellos (α).

Factor de separación: medida de la eficacia de una separación en lo que se refiere a la separación entre el analito y el interferente.

Fase estacionaria: fase extractante que permanece en posición fija.

Fase móvil: fase extractante que se desplaza a través del sistema.

Intervalo ó Rango: Concentraciones incluidas que van de la concentración superior a la inferior, para las cuales se ha demostrado que el método analítico es preciso exacto y lineal.

Límite de Cuantificación: Concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas.

Límite de Detección: Concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo condiciones de operación establecidas.

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.

Número de platos teóricos: característica de una columna cromatográfica que se emplea para medir su eficiencia.

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

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

Plato teórico: medio cuantitativo para evaluar la eficacia de una columna y que consiste en tratar una columna, como si estuviera compuesta de pequeñas zonas o platos, en las que tiene lugar el reparto entre las fases móvil y estacionaria.

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

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.

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

Relación de distribución: cociente que expresa la concentración total de soluto en una fase en relación con una segunda fase; en su definición participan todas las zonas del soluto (D).

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.

Reproducibilidad: Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios.

Resolución: separación entre dos bandas cromatográficas (R).

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

RSD ó %CV: La desviación estándar relativa = Desviación estándar / media x 100.

Selectividad: Medida de la ausencia de interferencia de un método que se mide ante el cociente de selectividad del mismo.

Tiempo de retención: es el tiempo entre la inyección en una columna cromatográfica y la llegada a un pico de analito al detector.

Tiempo muerto: tiempo necesario para que una especie no retenida pase a través de la columna.

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