

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA
VALORACIÓN CUANTITATIVA DE VITAMINA C EN EL PRODUCTO
TERMINADO VITAMINA C INYECTABLE COMO REQUISITO PARA LA
OBTENCIÓN DEL REGISTRO SANITARIO OTORGADO POR EL INVIMA**

VIVIANA CRISTINA MORALES ANDRADE

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2015**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA
VALORACIÓN CUANTITATIVA DE VITAMINA C EN EL PRODUCTO
TERMINADO VITAMINA C INYECTABLE COMO REQUISITO PARA LA
OBTENCIÓN DEL REGISTRO SANITARIO OTORGADO POR EL INVIMA**

VIVIANA CRISTINA MORALES ANDRADE

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Químico**

Director:

**JAIME ALONSO CARMONA
Químico Farmacéutico**

Co-Director:

**JUAN JOSE LOZADA
Ph.D Ciencias Químicas**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2015**

NOTA DE RESPONSABILIDAD

Las ideas y conclusiones aportadas en este Trabajo de Grado son Responsabilidad de los autores.

Artículo 1 del Acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Concejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de Aceptación:

JUAN JOSE LOZADA

Asesor

JUAN PABLO JIMENEZ

Jurado

DAVID ARTURO PERDOMO

Jurado

San Juan de Pasto, Noviembre de 2015.

RESUMEN

El trabajo a realizar es de tipo cuantitativo utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia, en el que se incluye un análisis químico de tipo cuantitativo del ácido ascórbico y de ascorbato de sodio, que son de interés para cuantificar la vitamina C en el medicamento. El consumo diario en grandes dosis se afirma que reduce los riesgos de enfermedad coronaria, arterosclerosis, la hipertensión, la catarata y el SIDA. Recientemente, algunos de estos efectos beneficiosos de la vitamina C han sido objeto de debate, sin embargo, la investigación en esta área aún continúa.

ABSTRACT

The work to be performed is quantitative technique using high efficiency liquid chromatography , in which a quantitative chemical analysis of ascorbic acid and sodium ascorbate , which are of interest to quantify vitamin C is included in the drug . Daily consumption in large doses is claimed to reduce the risk of coronary heart disease , atherosclerosis , hypertension , cataracts and AIDS. Recently, some of these beneficial effects of vitamin C have been debated , however , research in this area continues.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. OBJETIVOS.....	19
1.1 OBJETIVO GENERAL	19
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
2. MARCO TEÓRICO	20
2.1 VALIDACIÓN	21
2.1.1 Tipos de validación:	21
2.1.1.1. Validación Prospectiva.....	21
2.1.1.2. Validación Retrospectiva.....	21
2.1.1.3. Revalidación.	21
2.2 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN	22
2.2.1 Exactitud.	22
2.2.1.1. Determinación.....	22
2.2.1.2. Aplicación.....	22
2.2.2 Especificidad.....	22
2.2.2.1. Determinación.....	22
2.2.2.2. Aplicación.....	23
2.2.3 Linealidad.....	23

2.2.3.1 Determinación.....	23
2.2.3.2. Aplicación.....	23
2.2.4 Precisión.....	23
2.2.4.1. Determinación.....	24
2.2.4.2. Aplicación.....	24
2.2.5 Límite de detección.....	24
2.2.5.1 Determinación.....	24
2.2.5.2. Aplicación.....	25
2.2.6 Límite de cuantificación.....	25
2.2.6.1. Determinación.....	25
2.2.6.2. Aplicación.....	25
2.2.7 Intervalo.....	25
2.2.7.1 Determinación.....	26
2.2.7.2. Aplicación.....	26
2.2.8 Robustez.....	26
2.2.8.1 Determinación.....	26
2.2.8.2. Aplicación.....	26
2.2.9 Idoneidad.....	26
2.2.9.1 Determinación.....	26
2.2.9.2. Aplicación.....	27
3. ANTECEDENTES.....	27
3.1 ESTRUCTURA QUÍMICA.....	30

3.2 ACIDEZ.....	31
3.3 TAUTOMERISMO.....	31
3.4 ESTEREOQUÍMICA	32
3.5 OXIDACIÓN.....	33
4. METODOLOGÍA	35
4.1 SISTEMA CROMATOGRÁFICO.....	35
4.2 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	36
4.3 PROTOCOLO O METODO ANALÍTICO	37
4.3.1 Preparación de la fase móvil.....	37
4.3.2.1 Preparación del Estándar.....	38
4.3.2.2 Preparación de la muestra.....	38
4.3.2.3 Procedimiento	38
4.3.3 hasta que el sistema se estabilizó.	39
4.3.4.1 Evaluación del system suitability test.	40
4.3.4.2 Preparación de la muestra para valoración.....	40
4.3.4.3. Procedimiento.....	41
4.4 CRITERIOS/ LÍMITES DE ACEPTACIÓN DE VALIDACIÓN.....	42
4.5 PREPARACION DEL BLANCO	42
4.6 EVALUACION DE LINEALIDAD DEL SISTEMA	43
4.6.1 Solución de estándar de vitamina C(100%): solución a.....	44
4.6.2 Solución de estándar de vitamina c(50%): solución B.	44
4.6.3 Solución de estándar de vitamina c(80%): solución C	44

4.6.4 Solución de estándar de vitamina c(120%): solución D.	45
4.7 LINEALIDAD DEL METODO.	45
4.7.1 Blanco adicionado al 100%.....	45
4.7.2 Solución de blanco: solución F.	45
4.7.3 Solución de blanco adicionado al 47%: solución G.....	45
4.7.4 Solución de blanco adicionado al 77%: solución H.....	46
4.7.5 Solución de blanco adicionado al 100%: solución I.	46
4.7.6 Solución de blanco adicionado al 120%: solución J.....	46
4.7.8 Solución de blanco adicionado al 147%. Solución K.	46
4.7.9 Filtración.	46
4.8 IDONEIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO.....	46
4.9 SELECTIVIDAD	47
4.10 SOLUCIONES DE DEGRADACIÓN ARTIFICIAL.....	47
4.10.1 Degradación sobre principio activo (vitamina c):.....	47
4.10.1.1 Hidrólisis ácida.....	47
4.10.1.2 Hidrólisis alcalina.	48
4.10.1.3 Hidrólisis neutra con fotolisis.....	48
4.10.1.4 Oxidación con Peróxido de Hidrógeno. Se	48
4.10.2 Degradación sobre muestras de vitamina c inyectable	48
4.10.2.1 Hidrólisis ácida.....	48
4.10.2.2 Hidrólisis alcalina.	49
4.10.2.3 Hidrólisis neutra con fotolisis.....	49
4.10.2.4. Oxidación con Peróxido de Hidrógeno.....	49

4.10.3 Filtración e inyección.....	49
4.11 LINEALIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO.....	49
4.12 LINEALIDAD DEL MÉTODO	50
4.13 PRECISION (REPETIBILIDAD) DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO:.....	50
4.14 PRECISION DEL MÉTODO ANALÍTICO:.....	50
4.14.1 Repetibilidad con blanco adicionado al 100%.....	50
4.14.2 PRECISION INTERMEDIA	51
4.15 LIMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.....	51
4.16 EXACTITUD.....	52
4.17 ROBUSTEZ	52
5. RESULTADOS.....	53
5.1 IDONEIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO.....	55
5.2 SELECTIVIDAD	56
5.2.1 Solución de blanco.....	56
5.2.2 Solución de blanco adicionado al 100%.	56
5.3 SOLUCIONES DE DEGRADACIÓN:.....	56
5.3.1. Degradación sobre principio activo	56
5.3.1.1 Hidrólisis neutra	56
5.3.1.2. Hidrólisis ácida.....	56
5.3.1.3. Hidrólisis alcalina.	57
5.3.1.4. Oxidación.....	57
5.3.2. Degradación sobre blanco adicionado al 100%:	57

5.3.2.1. Hidrólisis neutra.	57
5.3.2.2. Hidrólisis ácida.....	57
5.3.2.3. Hidrólisis alcalina	58
5.3.2.4. Oxidación.....	58
5.4 LINEALIDAD.....	59
5.4.1. Linealidad del sistema.....	59
5.4.2 Linealidad del método:.....	63
5.5 PRECISIÓN DEL MÉTODO.....	67
5.5.1 Repetibilidad del método:.....	67
5.5.2. Precisión intermedia	69
5.5.3 Límites de detección y cuantificación.....	70
5.6 EXACTITUD.....	72
5.7 ROBUSTEZ	72
CONCLUSIONES	75
BIBLIOGRAFÍA.....	76
ANEXOS.....	78

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Datos requeridos para la validación USP 32.....	20
Tabla 2. Sistemas cromatográficos según el tipo de muestra.....	36
Tabla 3. Condiciones del Sistema Cromatográfico.	37
Tabla 4. Parámetros a evaluar y sus límites de aceptación.....	42
Tabla 5. Composición de vitamina C inyectable por cada 100mL de producto.....	43
Tabla 6. Resultados de los parámetros evaluados	53
Tabla 7. Repetibilidad de inyección de la solución estándar de Vitamina C.	55
Tabla 8. Parámetros cromatográficos de idoneidad del sistema.....	55
Tabla 9. Cálculos sobre la recta de calibración Grafica 3.	60
Tabla 10. Coeficiente de variación de los factores de respuesta f.....	61
Tabla 11. Desviación estándar relativa de la pendiente b.....	61
Tabla 12. Cálculos sobre la recta de calibración Grafica 4.	64
Tabla 13. Coeficiente de variación de los factores de respuesta f grafica 4.	65
Tabla 14. Desviación estándar relativa de la pendiente b.....	65
Tabla 15. Áreas obtenidas repetibilidad solución del estándar.	67
Tabla 16. Áreas obtenidas de diferentes muestras blanco adicionado al 100%. ...	67
Tabla 17. Coeficiente de variación de la áreas promedio obtenidas en las muestras blanco adicionado al 100%.	68
Tabla 18. Coeficiente de variación porcentaje de vitamina C encontrado en las muestras blanco adicionado 100%.	68

Tabla 19. Porcentaje de Vitamina C encontrado en muestras con concentraciones de 50 %, 100% y 150%.....	69
Tabla 20. Áreas obtenidas en muestras con concentraciones menores a la zona inferior curva de calibración de linealidad del método Grafica 4.	70
Tabla 21. Porcentaje de Vitamina C recuperado en muestras con concentraciones de 50 %, 100% y 150%.....	72
Tabla 22. Factores nominales y alternativos evaluados.	73
Tabla 23. Matriz resultante de los factores evaluados.	73

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura del ácido ascórbico	30
Figura 2. Puentes de hidrogeno de los hidroxilo enólicos.....	30
Figura 3. Movimiento de los pares de electrones en la desprotonación.	31
Figura 4. Ataque nucleofílico del enol ascórbico sobre el protón para dar 1,3- dicetona.	32
Figura 5. Estereoisómeros del ácido ascórbico	33
Figura 6. Acido 2,3-dicetogulonico.....	34
Figura 7. Cromatografo de líquidos HP 1050.....	36

LISTA DE GRAFICAS

	Pág.
Grafica 1. Cromatograma muestra vitamina C inyectable.....	39
Grafica 2. Cromatograma estándar vitamina C.....	40
Grafica 3. Concentración estándar vitamina C Vs áreas promedio.....	59
Grafica 4. Concentración vitamina C en muestras de blanco adicionado Vs áreas promedio.....	63
Grafica 5. Cálculo de la respuesta a concentración cero.....	70
Grafica 6. Cálculo de la desviación estándar de la respuesta a concentración cero.....	71

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. CROMATOGRAMA SOLUCIÓN ESTÁNDAR AL 100%.....	79
ANEXO B. CROMATOGRAMA SOLUCIÓN BLANCO.....	80
ANEXO C. CROMATOGRAMA SOLUCIÓN BLANCO ADICIONADO.....	81
ANEXO D. CROMATOGRAMA HIDROLISIS ALCALINA SOBRE PRINCIPIO ACTIVO	82
ANEXO E. CROMATOGRAMA HIDROLISIS ACIDA SOBRE PRINCIPIO ACTIVO	83
ANEXO F. CROMATOGRAMA OXIDACIÓN SOBRE PRINCIPIO ACTIVO.....	84
ANEXO G. CROMATOGRAMA HIDROLISIS NEUTRA SOBRE MUESTRAS VITAMINA C INYECTABLE	85
ANEXO H. CROMATOGRAMA HIDROLISIS ACIDA SOBRE MUESTRAS VITAMINA C INYECTABLE	86
ANEXO I. CROMATOGRAMA HIDRÓLISIS ALCALINA SOBRE MUESTRAS VITAMINA C INYECTABLE	87
ANEXO J. CROMATOGRAMA OXIDACIÓN SOBRE MUESTRAS VITAMINA C INYECTABLE.....	88

LISTA DE ACRÓNIMOS

AA	Ácido ascórbico
AOAC	Asociación de comunidades analíticas
FDA	Dirección de alimentos y medicamentos
USP 32	Farmacopea de los estados unidos edición 32
OMS	Organización mundial de la salud
Uv-vis	Ultravioleta- visible
INVIMA	Instituto nacional de vigilancia de medicamentos y alimentos
DHAA	Ácido deshidroascórbico
EDTA	Ácido Etilendiamínico Tetracético
ISO	Organización internacional para la estandarización
IEC	Comisión internacional electrotécnica
BP2009	Farmacopea británica 2009
IUPAC	Unión internacional de química pura y aplicada
g	Gramos
L	Litros
m	Metros
m³	Metro cúbico
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
ppm	Partes por millón
µg	Microgramos
µm	Micrómetro.

INTRODUCCIÓN

La vitamina C es el L-enantiomero del ácido ascórbico, la parte principal de la sustancia es el ion ascorbato que posee propiedades tanto de ácido como de base. El término "vitamina C" no sólo es utilizado para referirse a "ácido L-ascórbico", sino también para el producto obtenido de la oxidación "ácido dehidroascórbico".¹ El descubrimiento y la aplicación médica de la vitamina C se remontan a los siglos XVI y XVII en la prevención de la enfermedad "escorbuto" entre los marineros. También están familiarizadas con muchos usos de la vitamina C, la agricultura, las áreas farmacéutica, alimentaria e industrial".² Es necesaria para muchas funciones fisiológicas en el cuerpo humano, tal vez las funciones más importantes de la vitamina C son la mejora de la respuesta del sistema inmune del organismo, la función pulmonar y la absorción de hierro. Muchos beneficios de salud se han atribuido la vitamina C en la prevención o curación; estados desde el resfriado común, la cicatrización de las heridas y hasta las enfermedades crónicas e infecciosas. El consumo diario en grandes dosis se afirma que reduce los riesgos de enfermedad coronaria, arterosclerosis, la hipertensión, la catarata y el SIDA. Recientemente, algunos de estos efectos beneficiosos de la vitamina C han sido objeto de debate, sin embargo, la investigación en esta área aún continúa.

La Food and Drug Administration, clasifica el ácido ascórbico sintético como un aditivo alimenticio "generalmente reconocido como seguro". Se adiciona a una amplia variedad de alimentos, tanto por razones nutricionales como técnicas.

El AA, es conocida como una vitamina termolábil; varios autores,³ han estudiado la cinética de degradación térmica en jugos y frutas naturales, bajo diferentes condiciones de tratamiento; por ejemplo, la oxidación del AA al ácido dehidroascórbico y dicetogulónico, hace que se pierda la actividad vitamínica, razón por la cual, el seguimiento de la variación en la concentración del AA en medicamentos, es relevante para establecer los mecanismos que afectan su estabilidad y por tanto influyen en el tiempo de vida útil de los mismos.

¹ THE COORDINATION CHEMISTRY OF VITAMIN C. An overview B. Zumreoglu-Karan Department of Chemistry. Ankara, Turkey: Hacettepe University, Beytepe Campus, 06800. S.f.

² BAUERNFEIND, P. y SEIB, B.M. TOLBERT. Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism and Uses, Advances in Chemistry Series 200. Washington, DC: American Chemical Society, 1989. Pp. 395–497.

³ JHNSON, J. y BRADDOCK, R. Kinetics of ascorbic acid loss and onenzymatic browning in orange juice serum: Experimental rate constants. USA: Journal of Food Science, 1995.

“La determinación de AA por diferentes técnicas analíticas, ha sido ampliamente estudiada, teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas de la molécula”.⁴

Torregrosa cuantifica el AA en jugos de naranja y zanahoria por técnicas polarográficas, dadas las características redox del analito; empleando la gota de mercurio como electrodo de trabajo, pulso diferencial con velocidad de barrido de 10 mV/s y cuantificación por adición estándar”.⁵ En investigaciones con alimentos el uso de la espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis) es ampliamente utilizado,^{6,7} pues este ácido presenta transiciones electrónicas fuertes en la región UV, facilitando su identificación y cuantificación por esta técnica. Sin embargo, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), garantizan límites de detección y cuantificación más bajos, que facilita además la eliminación de los efectos causados por la matriz (interferencias en otros métodos de análisis); esta técnica se utiliza como herramienta esencial en los estudios cinéticos detallados.^{8,9}

Con frecuencia se encuentra durante una experiencia inicial de aplicación o validación de un método que aparecen deficiencias o interferencias inesperadas, reactivos o equipos que no están disponibles, instrumentos modificados y otros problemas no anticipados que requieren se retome la fase de desarrollo del método. Frecuentemente un método que funciona satisfactoriamente en un laboratorio deja de funcionar de una u otra manera. Frecuentemente no está bien definida una diferencia entre desarrollo y validación y los dos procedimientos constituyen un procedimiento iterativo. Por esa razón algunos aspectos del desarrollo del método que proporcionan una idea del desempeño del método tales como robustez se incluyen en este trabajo.

El trabajo a realizar es de tipo cuantitativo utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia, en el que se incluye un análisis químico de tipo cuantitativo del ácido ascórbico y de ascorbato de sodio, que son de interés para cuantificar la vitamina C en el medicamento.

⁴ VIEIRA, Margarida y TEIXEIRA, A. Mathematical modelling of the thermal degradation kinetic of vitamin C in cupuacu nectar. USA: Journal of Food Engineering, 2000.

⁵ TORREGROSA, F. y ESTEVE, M. Ascorbic acid stability during refrigerated storage of orange carrot juice treated by high pulsed electric field and comparison with pasteurized juice. USA: Journal of Food Engineering, 2005.

⁶ ESTEVE, M. y BLASCO, R. Ascorbic acid degradation kinetic in mushrooms in a high temperature short-time process controlled by a thermoresistometer. USA: Journal of Food Quality, 2004.

⁷ BURDURLU, Hande; KOCA, Nuray. y KARADENIZ, Feryal. Degradation of vitamin C in citrus juice concentrates during storage. USA: Journal of Food Engineering, 2005.

⁸ ARYA, Stya. y MAHAJAN, Meenakshi. Photometric methods for the determination of vitamin C. USA: Analytical Sciences, 1998.

⁹ THIN, Mai. y FARID, Mohammed. Ultraviolet treatment of orange juice. USA: Innovate Food Science and Emerging Technologies, 2004.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Estandarizar y validar el método analítico asociado para la determinación cuantitativa de vitamina C en un producto terminado inyectable, mediante la técnica de HPLC, para la obtención de su registro sanitario.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Evaluar el método y procedimiento analítico por HPLC empleado en la determinación y análisis químico de la vitamina C, en el producto terminado vitamina c inyectable.
- ✓ Determinar exactitud, precisión, especificidad, linealidad, intervalo del método analítico para vitamina C en producto terminado vitamina C inyectable, por cromatografía líquida de alta eficiencia.
- ✓ Demostrar que el método es adecuado para el análisis de ácido ascórbico en el producto terminado vitamina C inyectable en las condiciones descritas, evaluando los parámetros de validación.
- ✓ Implementar la medición analítica del producto vitamina C inyectable en el laboratorio de Keops Farmacéutica E.U.

2. MARCO TEÓRICO

Validación es el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá con un alto grado de seguridad la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos para tal propósito o aplicación.

No existe una guía oficial que indique la secuencia perfecta de experimentos analíticos necesarios para el desarrollo de un método, ya que esto depende de este en sí mismo, sin embargo el desarrollo lógico de un método analítico transcurre en diferentes fases, donde se evalúan las características de desempeño tales como precisión, sensibilidad, selectividad, linealidad, rango, exactitud, límites de detección y cuantificación, dependiendo del tipo de ensayo se evaluarán unos u otros parámetros.

Los requisitos de las pruebas farmacopeicas varían desde determinaciones analíticas rigurosas hasta evaluaciones subjetivas de atributos, considerando esta amplia variedad, es lógico que diferentes esquemas de prueba requieran diferentes esquemas de validación según tabla 1

Tabla 1. Datos requeridos para la validación USP 32.

Características de desempeño analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis cuantitativos	Pruebas de límite		
Exactitud	Si	Si	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Si	*	Si
Límite de detección	No	No	Si	*	No
Límite de cuantificación	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No
Intervalo	Si	Si	*	*	No

* Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica
Fuente: USP 32

Categoría I: Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes

principales de fármacos a granel o ingredientes activos en productos farmacéuticos terminados.

Categoría II: Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas.

Categoría III: Procedimientos analíticos para la determinación de características de desempeño.

Categoría IV: Pruebas de identificación.

2.1 VALIDACIÓN

El termino validación ha sido definido en la literatura de diversas maneras y por numerosos autores aunque los términos dados son diferentes, el significado de estos son siempre los mismos a) especificar e implementar b) aprobar y documentar. Típicamente la validación de un método químico es el análisis de resultados en la especificación de varios aspectos de fiabilidad y aplicabilidad.

2.1.1 Tipos de validación:

2.1.1.1. Validación Prospectiva. Se realiza cuando la verificación del cumplimiento de las condiciones para un proceso o método analítico, se lleva a cabo antes de la comercialización, generalmente se usa cuando se elabora un nuevo método analítico en los laboratorios de investigación y desarrollo y se realiza mediante un protocolo.

2.1.1.2. Validación Retrospectiva. se realiza cuando la idoneidad del proceso o método analítico se basa en la garantía constatada a través de los datos analíticos del producto ya comercializado; se utiliza en métodos validados previamente y de los que se tiene un amplio historial de resultados, este tipo de validación es aplicable a métodos por cromatografía líquida, espectrofotometría y volumetría.

2.1.1.3. Revalidación. “Una nueva validación total o parcial del método analítico que se realiza debido a un cambio que pueda afectar la idoneidad del método, los cuales podrían ser cambios en la matriz del producto, cambios del método analítico, cambios en las especificaciones”¹⁰.

¹⁰ MORALES DE LA CRUZ, C. Desarrollo y validación prospectiva de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para el enalapril 10 mg tabletas recubiertas. Bogotá: s.n, 2000.

2.1.2 Método analítico. El método analítico es el conjunto detallado de instrucciones de preparación de la muestra problema que reporta resultados los cuales deben ser exactos para que estos sean aceptados para el propósito indicado. El término “método de analítico” es algunas veces asignado a la técnica Ej: cromatografía líquida o absorción atómica, en cuyo caso el conjunto de instrucciones se denomina protocolo.

2.2 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

2.2.1 Exactitud. “La exactitud de un método analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese método y el valor verdadero, la exactitud de un método analítico debe establecerse en todo su intervalo”. “De la definición de exactitud surge el principal problema de cuál sería el verdadero valor del analito en la muestra, en muchos casos se desconoce pero cuando existen patrones o estándares de referencia el valor de dicho estándar es el que se acepta como verdadero”.

2.2.1.1. Determinación. la exactitud puede evaluarse aplicando el método sobre el estándar de referencia o bien analizando muestras blanco o de problema a las que se les ha adicionado una cantidad conocida de dicho estándar, además se acepta la comparación de resultados de un método de referencia validado con el valor hallado del nuevo método a validar.

2.2.1.2. Aplicación. La exactitud se debe evaluar en métodos de análisis donde se desee valorar materia prima o producto terminado, también en cuantificación de impurezas.

2.2.2 Especificidad. “La especificidad o selectividad según IUPAC o AOAC-I es la capacidad del método para evaluar únicamente el principio activo integro de forma exacta y específica en presencia de cualquier otro componente que pueda estar presente, como por ejemplo impurezas, productos de degradación o componentes de la matriz”.¹¹

2.2.2.1. Determinación. La especificidad de un método analítico se debe determinar antes de iniciar el estudio de cualquier otro parámetro de validación ya que debe conocerse en qué condiciones el método proporciona una respuesta dada por el analito únicamente.

¹¹ Ibid.

En análisis cualitativo, la demostración de selectividad requiere evidencia de que el procedimiento no se ve afectado por impurezas y excipientes, esto puede hacerse adicionando al producto una cantidad conocida de excipientes impurezas en concentraciones adecuadas y así se podría demostrar que el análisis no se ve afectado por presencia de estos materiales extraños.

2.2.2.2. Aplicación. Puede aplicar para ensayos de identificación, pureza o determinación cuantitativa de un compuesto o riqueza de un principio activo, en el campo farmacéutico se tiende a utilizar los métodos más selectivos posibles, en los que la presencia de otros componentes tiene escasa influencia en los resultados como lo son los diferentes tipos de cromatografía.

2.2.3 Linealidad. La linealidad de un procedimiento analítico es la capacidad para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido.

2.2.3.1 Determinación. En especialidades farmacéuticas los límites de determinación se han establecido entre 90% - 110%. En materia prima los límites se encuentran en un promedio de 98%-102%. Debido a esto la linealidad de los métodos se evalúa en un rango más amplio la ICH recomienda 80%-120%.

Debe establecerse inicialmente mediante un examen visual de un gráfico de señales como función de la concentración de analito del contenido, si parece existir una relación lineal los resultados se evalúan mediante métodos estadísticos adecuados por ejemplo el cálculo de una línea de regresión por el método de cuadrados mínimo, los datos obtenidos proporcionan estimaciones matemáticas del grado de linealidad, además se calcula el coeficiente de correlación, la intersección con el eje de ordenadas, la pendiente de la recta y la suma de cuadrados.

Dentro del rango establecido se recomienda estudiar al menos 5 niveles de concentración y analizarlas por triplicado con un total de 15 determinaciones.

2.2.3.2. Aplicación. Se recomienda estudiar la linealidad en todos los métodos de tipo cuantitativo, tales como valoración de un principio activo, uniformidad de contenido, velocidad de disolución, cuantificación de impurezas.

2.2.4 Precisión. Se relaciona con la dispersión de la medida alrededor de un valor medio o central, que puede ser expresada en términos de varianza, desviación estándar o coeficiente de variación.

La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o repetibilidad del procedimiento analítico en condiciones normales de operación. Así la reproducibilidad se refiere al uso de método analítico en diferentes laboratorios; la precisión intermedia también conocida como tolerancia expresa la variación dentro de un laboratorio y la repetibilidad se refiere a la utilización del método analítico sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas, en un mismo laboratorio y por un periodo corto de tiempo.

2.2.4.1. Determinación. Se determina mediante el análisis de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea con las cuales se pueda calcular estadísticamente la desviación estándar o la desviación estándar relativa.

La ICH recomienda que se evalúe la repetibilidad del método utilizando como mínimo nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado.

2.2.4.2. Aplicación. El estudio de precisión se realiza principalmente para las determinaciones cuantitativas de principios activos o impurezas.

2.2.5 Límite de detección. Concentración mínima del analito que puede detectarse en una muestra pero no es necesariamente cuantificada, bajo condiciones analíticas específicas (OGA-016 2005).

2.2.5.1 Determinación. El límite de detección se determina generalmente mediante el análisis de muestras con concentraciones de analito conocidas, estableciendo el nivel mínimo del analito que puede detectarse confiablemente.

En el caso de métodos analíticos instrumentales que presentan ruido se puede comparar las señales medidas a partir de bajas concentraciones conocidas de analito con las de muestras con ausencia del mismo o muestras blanco. Para métodos de HPLC y GC se tiene en cuenta la señal obtenida del análisis del blanco o ruido Y_B , y el límite de detección será:

$$LD: \frac{Y_B + (3 \cdot S_B)}{b} \cdot \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Y_B : Señal del blanco

S_B : desviación estándar blanco

b : pendiente de curva de calibrado obtenida al representar la respuesta del método frente a la concentración del analito.

n : número de medidas

2.2.5.2. Aplicación. Siempre que el método de análisis se emplee en la determinación de impurezas o trazas de un principio activo, se recomienda establecer no solamente el límite de detección sino también el de cuantificación, pero cuando el método se define como un método de análisis de valoración de contenido en el cual siempre se trabajara en rangos muy alejados de la mínima cantidad detectable o cuantificable por el equipo no será necesario la determinación de estos parámetros.

2.2.6 Límite de cuantificación. Corresponde a la concentración mínima del analito que puede ser cuantificada con una exactitud y precisión aceptable en una muestra bajo condiciones analíticas específicas (OGA-016 2005). El límite de cuantificación se expresa habitualmente en forma de concentración de analito en la muestra.

2.2.6.1. Determinación. El límite de cuantificación se determina habitualmente mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo el nivel mínimo del analito que se puede determinar con exactitud y precisión aceptables, en procedimientos farmacéuticos debe demostrarse que el límite de cuantificación es lo suficientemente bajo mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito superiores e inferiores al nivel de cuantificación. Para métodos de HPLC y GC se tiene en cuenta la señal obtenida del análisis del blanco o ruido Y_B , y el límite de cuantificación será:

$$LC: \frac{Y_B + (10 \cdot S_B)}{b} * \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Y_B : Señal del blanco

S_B : desviación estándar blanco

b : pendiente de curva de calibrado obtenida al representar la respuesta del método frente a la concentración del analito.

n : número de medidas

2.2.6.2. Aplicación. En métodos de análisis destinados a la evaluación de impurezas mediante ensayos límite se establece como necesaria la determinación del límite de detección.

2.2.7 Intervalo. El intervalo de un procedimiento analítico es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el procedimiento, el intervalo se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados de la prueba obtenidos mediante el procedimiento analítico.

2.2.7.1 Determinación. El intervalo del procedimiento se valida verificando que el procedimiento analítico proporcione precisión, exactitud y linealidad aceptables cuando se aplica a muestras que contienen el analito en los extremos del intervalo, al igual que dentro del intervalo. La ICH recomienda que se consideren los intervalos específicos mínimos: Valoración de un fármaco o de un producto terminado de 80.0% a 120.0%

2.2.7.2. Aplicación. Se recomienda estudiar el intervalo en todos los métodos de tipo cuantitativo.

2.2.8 Robustez. La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para no ser afectado por variaciones pequeñas, aunque deliberadas, en los parámetros del procedimiento indicados en la documentación, y provee una indicación de su aptitud durante las condiciones normales de uso.

2.2.8.1 Determinación. En el caso de un análisis cuantitativo resulta evidente que se debe analizar la influencia de cada variable interferente sobre la concentración del analito calculada, en el caso de la cromatografía se interesa estudiar la influencia que tienen los factores después en el test de idoneidad, los factores a evaluar en cualquier método pueden ser tanto cuantitativos como por ejemplo influencia del valor de pH, temperatura, porcentaje de composición de la fase móvil, como cualitativos, por ejemplo la columna y la marca de los reactivos.

2.2.8.2. Aplicación. Todos los métodos sin importar la técnica empleada son susceptibles de ser sometidos a un estudio de robustez, los factores a evaluar no solo tienen que ser relacionados con la medida final sino que también pueden serlo de cualquier etapa del procedimiento.

2.2.9 Idoneidad. Es un conjunto de parámetros que garantizan que el sistema responderá en el momento del análisis a los requisitos fijados, dichas características se reúnen en un ensayo conocido como ensayo de idoneidad o system suitability test y se determinarán a partir del estudio de robustez, incluyendo desde los primeros estudios de tanteo con patrones hasta la utilización del método en muestras reales que garanticen el buen funcionamiento del sistema en el momento del análisis.

2.2.9.1 Determinación. Generalmente una prueba de idoneidad del sistema contendrá como mínimo parámetros pertenecientes a dos categorías, por ejemplo precisión y resolución o precisión y límite de detección.

2.2.9.2. Aplicación. Los parámetros de idoneidad encuentran su mayor difusión dentro de las técnicas separativas y por ello los parámetros de evaluación son principalmente de carácter cromatográfico, pero sin embargo podría aplicarse a cualquier tipo de técnica analítica.

3. ANTECEDENTES

Un equipo de investigadores estadounidenses ha renovado la esperanza en la acción de la vitamina C como agente anticanceroso, una propiedad que se ha discutido en la comunidad científica durante más de 30 años. Pero es sólo la vitamina C inyectada la que logra vencer la estricta regulación fisiológica de este compuesto y reducir a la mitad el crecimiento de los tumores en ratones.

En 1973, el químico Linus Pauling, doblemente laureado con el Nobel de química y de la paz demostró, en un ensayo clínico, que la vitamina C inhibía la proliferación tumoral. Sin embargo, estudios posteriores en la clínica Mayo de EEUU cuestionaron este efecto. Una diferencia fue el método de administración; Pauling tanteó las vías oral e intravenosa, mientras que en Mayo sólo se empleó la primera.

Un nuevo estudio, publicado en PNAS revista oficial de la academia nacional de ciencias de los Estados Unidos, es obra de un equipo del Instituto Nacional de la Salud de EEUU que lleva varios años investigando esta acción terapéutica de la vitamina C. Mark Levine y sus colaboradores cuentan con un dato hoy constatado: las vitaminas son nutrientes esenciales pero se emplean en cantidades muy bajas, por lo que el organismo mantiene un control riguroso de sus niveles. La administración oral, por muy abundante que sea, no logra elevar estas concentraciones al nivel que precisa un efecto farmacológico.¹²

El mecanismo de acción propuesto vuelve al revés la acción clásica de la vitamina C: mientras que habitualmente es un antioxidante, su acumulación alrededor de las células tumorales tiene un efecto oxidante; posiblemente, sugieren los autores, a través de una proteína intermediaria asociada a un metal. La oxidación libera peróxido de hidrógeno, tóxico para el tumor pero no para las células normales a las dosis producidas.

Debido a lo anterior los autores concluyen que la vitamina C podría considerarse para quimioterapia cuando ya se hayan descartado otras opciones.

Dentro de los métodos oficiales descritos para el análisis de la vitamina C en producto terminado, uno de los más empleados es la valoración directa con 2,6-diclorofenol indofenol por resultar simple y rápido. El método es válido si se conoce que en la composición de la muestra no existen sustancias interferentes y la concentración de ácido dehidroascórbico es inapreciable, por tanto, se puede

¹² LEVINE, M.; WANG, Y.; PADAYATTY, S. J., & MORROW, J. A new recommended dietary allowance of vitamin C for healthy young women. USA: Proc Natl Acad Sci, 1998.

aplicar a una muestra recién preparada, pero no resulta de utilidad en estudios de estabilidad de la vitamina C, ni en productos donde los excipientes puedan interferir, puesto que la vitamina C se descompone con facilidad por factores como: la humedad, la luz, el aire, el calor, los iones metálicos como hierro y cobre, el oxígeno y el medio alcalino, transformándose fácilmente en diferentes compuestos como son: el ácido oxálico, ácido L-treónico, ácido L-xilónico, ácido L-lixónico y ácido dehidroascórbico, y a su vez este último se transforma irreversiblemente en ácido 2.3 diceto-L glucónico, el cual constituye su principal producto de degradación.

El propósito primario de la validación de un método de análisis es mostrar que el método es apto para el propósito que se pretende, algunos de estos propósitos pueden ser:

- “Determinar la cantidad necesaria o característica que está presente en el producto.
- Determinar si un producto se encuentra dentro de especificaciones.
- Determinar si un producto cumple los requisitos normativos.
- Inspeccionar un entorno para determinar la presencia y cantidad de un componente, contaminante o nutriente.
- Identificar un producto o sus componentes”.¹³

Al menos en la etapa inicial de un problema los laboratorios requieren validación de un método de análisis. Esas circunstancias incluyen situaciones similares a las siguientes:

- Métodos para investigaciones.
- Solo se tienen pocas muestras para el ensayo.
- Evaluar la fiabilidad de un método importado de otro origen o fuente.
- Reevaluar la fiabilidad de un método previamente usado después de un periodo de desuso.
- Situaciones donde hay falta de interés de otros laboratorios en participar en ejercicios de interlaboratorios.
- Métodos de multianálisis o multimatrices donde un convencional ejercicio de validación entre laboratorios es impráctico.

“En algunos casos, ya que es imposible establecer requisitos específicos debido a que no se conocen o están incompletos, lo mejor es aceptar cualquier información que se genera durante el desarrollo y la validación que permiten generalmente acercarse asintóticamente a parámetros de rendimiento desarrollados para otros análisis en la misma o en una clase similar”.¹⁴

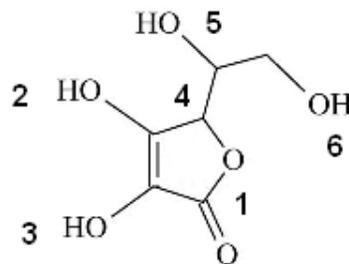
¹³ Ibid.

¹⁴ Ibid.

3.1 ESTRUCTURA QUÍMICA

Los estudios estructurales revelan que en la forma cristalina el ácido L-ascórbico presenta una estructura monocíclica con cuatro moléculas por celda, la celda contiene dos moléculas no equivalentes, y ocho distintos enlaces de hidrógeno intramoleculares de tipo O-H-O, el hidroxilo alcohólico O-H **5** y O-H **6** participan en enlaces de puentes de hidrogeno débiles a moderadamente fuertes, cuyas longitudes de enlace varían desde 2,71 Å hasta 2,94 Å.⁴³

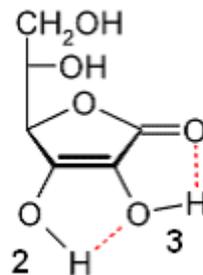
Figura 1. Estructura del ácido ascórbico



Fuente: Blanco A. Vitaminas. En: Blanco A editor. Química Biológica. 8°. ed. Buenos Aires: El Ateneo, 2006. Pp. 447-79.

Los dos hidroxilos enólicos O-H **2** y O-H **3** tienen un pronunciado carácter ácido y participan en enlaces de puentes hidrógeno fuertes, cuya longitud varía de 2.61 a 2.67 Å; estos contribuyen de manera decisiva a la estabilidad, y con eso a las cualidades químicas de la estructura endiol. (Figura 2).

Figura 2. Puentes de hidrogeno de los hidroxilo enólicos.



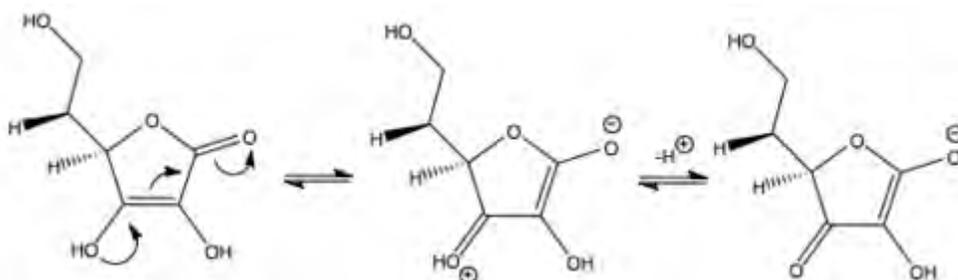
Fuente: www.acidoascorbico.com/quimica_del_acido_ascorbico

Sólo enlaces de hidrógeno intramoleculares están presentes en la forma cristalina. Pero una característica subestructural molecular de importante cuidado es que la evidencia experimental prueba que en Soluciones acuosas todavía se encuentra la conformación de la red cristalina de los Carbono 4 y Carbono 5 (Figura1). La similitud entre la conformación de estos carbonos de la cadena lateral, tanto en el cristal y la solución acuosa puede ser una posible consecuencia de la falta de hidrógeno intramolecular en ambas fases.

3.2 ACIDEZ

El ácido ascórbico se comporta como un ácido carboxílico vinílico, en donde el doble enlace ("vinilo") transmite pares de electrones entre el hidroxilo y el carbonilo. Hay dos estructuras de resonancia para la forma desprotonada, que se diferencian en la posición del doble enlace.(Figura 3). Otro modo de ver el ácido ascórbico es considerarlo como un enol. La forma desprotonada es un enolato, que por lo general es fuertemente básico. Sin embargo, el doble enlace adyacente estabiliza la forma desprotonada.

Figura 3. Movimiento de los pares de electrones en la desprotonación.

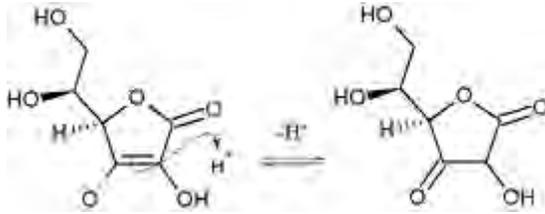


Fuente: www.acidoascorbico.com/quimica_del_acido_ascorbico

3.3 TAUTOMERISMO

El ácido ascórbico se interconvierte rápidamente en dos tautómeros de dicetona inestables por la transferencia de protón, aunque es el más estable en la forma de enol. El protón del enol se pierde, y se adquiere de nuevo por los electrones a partir del doble enlace, para producir una dicetona. Esta es una reacción enol. Hay dos formas posibles: 1,2-dicetona y 1,3-dicetona.(Figura 4)

Figura 4. Ataque nucleofílico del enol ascórbico sobre el protón para dar 1,3-dicetona.



Fuente: www.acidoascorbico.com/quimica_del_acido_ascorbico

3.4 ESTEREOQUÍMICA

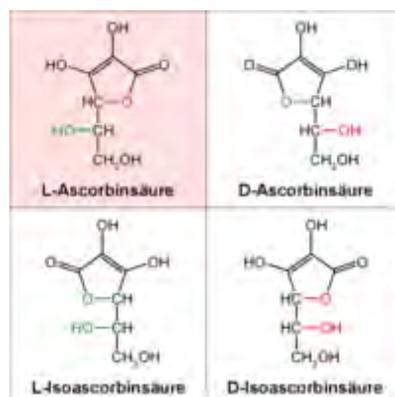
El ácido ascórbico existe en cuatro formas estereoisómeras diferentes que muestran actividad óptica:

- Ácido L-ascórbico.
- Ácido D-ascórbico.
- Ácido L-isoascórbico.
- Ácido D-isoascórbico.

Las moléculas L- y D- de ácido ascórbico son enantiómeros entre sí; de igual forma, las L- y D- del isoascórbico.

El ácido L-ascórbico y el D-isoascórbico son epímeros, ya que se distinguen sólo en la configuración de uno de los átomos de carbono. A pesar de estas pequeñas diferencias, los estereoisómeros del ácido ascórbico son inactivos en el organismo, dado que las enzimas reconocen específicamente al L-ascórbico. El D-isoascórbico solo presenta un pequeño efecto.

Figura 5. Estereoisómeros del ácido ascórbico



Fuente: www.acidoascorbico.com/quimica_del_acido_ascorbico

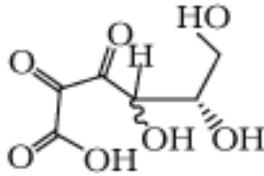
3.5 OXIDACIÓN

El ácido ascórbico es particularmente sensible a las reacciones de oxidación, degradándose con gran facilidad durante el procesamiento de los alimentos en presencia de oxígeno. La oxidación es dependiente del pH, ya que la forma ionizada es más sensible que la forma no ionizada. El dianión es todavía más sensible, pero para que se forme en proporciones significativas es necesario un pH alcalino que no suele encontrarse en los alimentos.¹⁵

Inicialmente en la oxidación pasa de ascorbato a dehidroascorbato, en una reacción que es reversible, por lo que el dehidroascorbato mantiene en principio el valor como vitamina C. Sin embargo, la lactona correspondiente al dehidroascorbato es mucho menos estable que la del ascorbato, por lo que se hidroliza con gran facilidad para producir ácido 2,3 dicetoglucónico, que posteriormente puede degradarse por descarboxilación. Ni el ácido 2,3-dicetoglucónico (Figura 6) ni sus productos de degradación tienen actividad como vitamina C.

¹⁵ TAUGUINAS, Alicia I; AVALLONE, Carmen; HOYOS, Silvia; y CRAVSOV, Alicia. Análisis de niveles de concentración de vitamina c en mieles de la provincia del chaco. Argentina: Facultad de Agroindustrias, 2000.

Figura 6. Acido 2,3-dicetogulonico.



Fuente: www.acidoascorbico.com/quimica_del_acido_ascorbico

La reacción de oxidación puede estar catalizada por la enzima ascorbato oxidasa, abundante en algunos vegetales, y se produce también como reacción lateral en las oxidaciones catalizadas por peroxidasas u olifenoloxidasas.

También se produce la oxidación del ácido ascórbico de forma química, especialmente en presencia de metales como el hierro o el cobre, que actúan como catalizadores. El cobre es alrededor de 80 veces más potente que el hierro. En ausencia total de metales, el ácido ascórbico es relativamente estable, incluso en presencia de oxígeno. Los agentes quelantes son relativamente efectivos frente al cobre, pero no frente al hierro.

El ácido ascórbico puede degradarse también en reacciones no oxidativas, especialmente en medio ácido (entre pH 3 y 4), por apertura del anillo lactónico y posterior descarboxilación. Este efecto puede ser importante para determinar tanto el diluyente como la fase móvil a utilizar en el montaje de la metodología de análisis. En cualquier caso, a temperatura ambiente esta reacción es mucho más lenta que la de oxidación.

4. METODOLOGÍA

Se realizó una validación prospectiva a partir de dos lotes piloto fabricados, a los cuales se les aplicó el método de cromatografía líquida de alta eficiencia.

4.1 SISTEMA CROMATOGRÁFICO

El sistema cromatográfico utilizado en el montaje y validación del método analítico satisface las siguientes características:

EQUIPO: HEWLETT PACKARD SERIES 1050.

DETECTOR: UV Detector longitud de Onda variable, Series HP 1050.

HORNO: N/A (Compartimento termostato, Serie HP 1050).

AUTOMUESTREADOR: Inyector automático estándar, micro-preparatorio, Series HP1050.

BOMBA: Bomba Isocrática, Serie HP1050.

DEGASIFICADOR: Branson 8210

SOFTWARE: Software HP ChemStation family for Software Products for LC System.

Figura 7. Cromatografo de líquidos HP 1050



Fuente: Laboratorio de control de calidad Keops Farmacéutica E.U.

4.2 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

“Se definieron las condiciones cromatográficas teniendo en cuenta que el ácido ascórbico es un ácido débil; el tipo de cromatografía que se utilizó de acuerdo a la tabla 2 fue la de fase reversa”¹⁶

Tabla 2. Sistemas cromatográficos según el tipo de muestra

<i>Compuestos</i>	<i>Método de elección</i>	<i>Columna</i>	<i>Fase móvil Aditivos</i>
Neutros no iónicos	BPC-RP o RP	C18-C8 Phe-CN	Agua-Modificador (MeO-AcN-THF)
Ácidos débiles	RP Control de la ionización	C18-C8 Phe-CN	Agua-modificador Ácido fosfórico pH 3-3.5
Bases débiles	RP	C18-C8 Phe-CN	Agua-modificador 30 mM trietilamina

¹⁶ QUATTROCCHI, Oscar; ABELAIRA, Sara y LABA, Raul. Introducción al HPLC, aplicación y práctica. Buenos Aires, Argentina: s.n., 1992.

Tabla 2. (Continuación).

Iónicos e ionizables	RP apareamiento iónico	de Preferida C18 Alternativa C8 – CN	Agua-MeOH Alquilsulfonatos pH 3.5 bases Tetraquilamonio pH ácidos
Lipofilicos e insolubles en solventes hidroalcoholicos iones inorgánicos, aminoácidos, derivados de ácidos nucleicos	LSC IEC	CN-NH2 Silica SAX-SCX Base sílice o polimérica	Solventes no polares Agua-Modificador pH controlado fuerza iónica controlada
Macromoléculas	SEC, IEC	Base sílice o polimérica	Acuosos (GFC) Orgánicos (GPC)
Esteroisómeros	LCS	Sílice	Solventes no polares
Enantiómeros	Columna quiral RP	Quirales C18	Acuosos Compuestos quirales
Carbohidratos	Columna amino	NH ₂	Agua – Modificador

Fuente: Quattrocchi O, Introducción al HPLC, aplicación y práctica. 1992.

Tabla 3. Condiciones del Sistema Cromatográfico.

LONGITUD DE ONDA:	254 nm.
VOLUMEN DE INYECCION:	20 µL.
FLUJO:	1.0 mL/ minuto.
TEMPERATURA:	25 °C.
DILUENTE:	FASE MÓVIL
COLUMNA:	HYDRO RP 80 A de 15cms C18

Fuente: Farmacopea de los estados unidos USP 32.

4.3 PROTOCOLO O METODO ANALITICO

4.3.1 Preparación de la fase móvil. Se tomó como referencia la fase móvil descrita en USP 32, la cual se utilizó como diluyente y solución tampón para la muestra, su composición evita que el ácido ascórbico presente en la muestra sufra reacciones de oxidación; se disolvieron 15,6g de Fosfato Dibásico de Sodio y 12,2g de Fosfato Monobásico de Potasio en 2000mL de agua, y se ajustó con Ácido Fosfórico a un pH de 2,5, para controlar la ionización, ya que generalmente

los solutos ionizables como el ácido ascórbico dan picos con baja retención y fuerte asimetría.

Se filtró la fase móvil mediante vacío, por filtro Sartorius de 0,45 µm tipo poliamida, esto como parte de un tratamiento preventivo para cuidar el adecuado funcionamiento del equipo de HPLC, puesto que las partículas presentes en la fase móvil pueden bloquear los filtros y tuberías del instrumento, acelerar el desgaste de los sellos y rotores del inyector y por otra parte como el material de la columna es de 4m constituye un filtro para la retención de cualquier material en suspensión, ya sea fase móvil o muestra.¹⁷

La fase móvil preparada se desgasificó por 10 minutos esto con el fin de evitar que los gases disueltos causen liberación de burbujas en el cabezal de la bomba y el caudal sea irregular, estas burbujas en la celda del detector pueden dar picos espurios y variaciones en la línea base, además el oxígeno disuelto puede oxidar la sustancia a analizar.

4.3.2 Identificación

4.3.2.1 Preparación del Estándar. Se pesó 50,0mg de estándar de referencia USP de VITAMINA C (Ácido ascórbico), en una balanza analítica Metler Toledo AE 200; luego se llevó a un balón de 100 mL y se completó el volumen con fase móvil¹⁸. Se filtró la muestra por membrana de 0,45 µm tipo poliamida Sartorius y se transfirió la muestra a viales de 2.5mL para inyección.

4.3.2.2 Preparación de la muestra. A partir de las muestras de un lote piloto de vitamina C inyectable, se tomó con una pipeta graduada 1,0mL de la Solución, equivalente a 100,0mg de Ácido Ascórbico, se llevó a un balón de 100,0mL, y mezclando se completó volumen con fase móvil.

Luego se tomó una alícuota de 10,0mL de la solución anterior, se llevó a un matraz volumétrico de 20,0mL, y se aforo con fase móvil.

La muestra preparada se filtró por membrana de 0,45 µm tipo poliamida Sartorius y se transfirió a viales de 2.5mL para inyección.

4.3.2.3 Procedimiento. Se programó el sistema descrito en el numeral 4.1. En las condiciones especificadas en la tabla 3 y se dejó fluir la fase móvil preparada en el

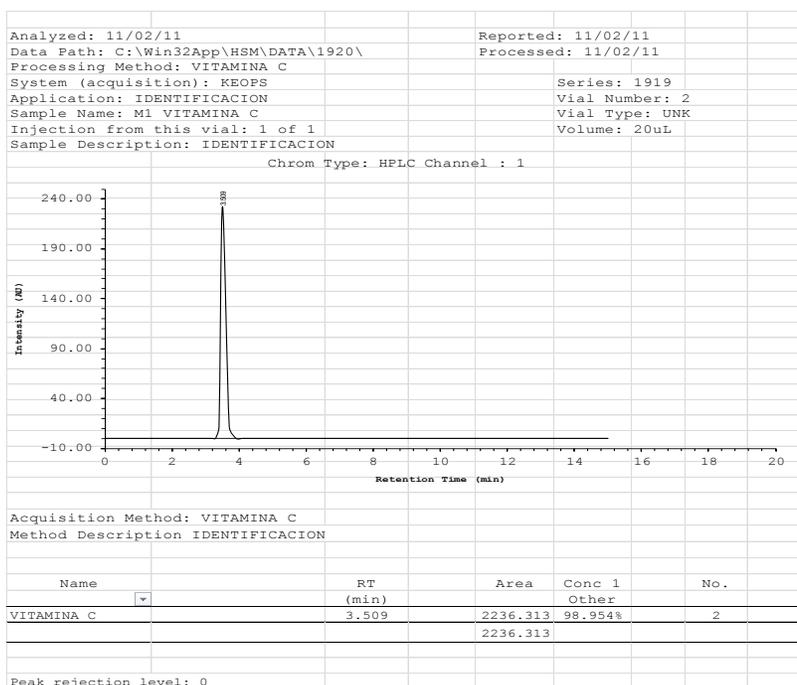
¹⁸ Ibid.

numeral

4.3.1 hasta que el sistema se estabilizó. Se inyectó por triplicado 20µL de la solución estándar preparada en el numeral 4.3.2.1 y 20µL de la solución de muestra del numeral 4.3.2.2.

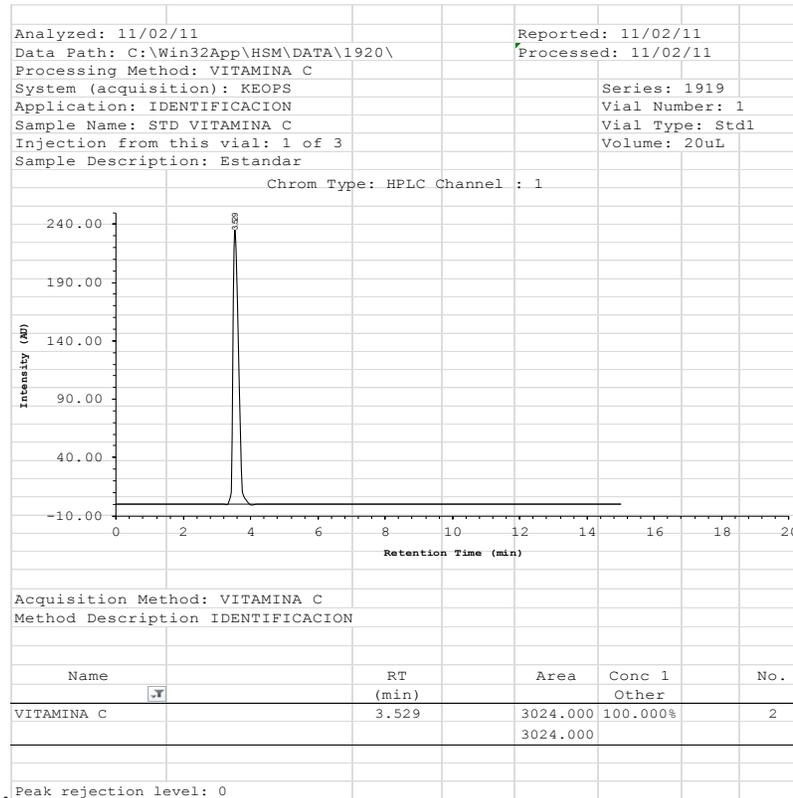
El tiempo de retención del pico de la VITAMINA C en el cromatograma obtenido por la inyección de la muestra de vitamina C inyectable, grafica 1, corresponde al pico obtenido al inyectar el estándar de vitamina C, grafica 2.

Grafica 1. Cromatograma muestra vitamina C inyectable



Fuente. Este estudio

Grafica 2. Cromatograma estándar vitamina C.



Fuente. Este estudio

4.3.4 Valoración de vitamina c (ácido ascórbico):

4.3.4.1 Evaluación del system suitability test. Una vez el sistema cromatográfico se estabilizó se procedió a inyectar por triplicado 20 µL de la solución estándar preparada en el numeral 4.3.2.1 la cual tiene una concentración de 0.5mg/ml; Para la serie consecutiva de inyecciones del estándar se obtuvo: Para el pico de la VITAMINA C (Ácido ascórbico), un número de platos teóricos (N) no menor a 2,000, un factor de cola o Tailing T no mayor a 2,0, una desviación estándar relativa entre inyecciones no mayor al 2,0 %.

4.3.4.2 Preparación de la muestra para valoración. A partir de las muestras del lote piloto de vitamina C inyectable, se tomó con pipeta graduada 1,0mL de Solución Inyectable de Vitamina C, equivalente a 100,0mg de Vitamina C (Ácido Ascórbico), se llevó a un balón de 100,0mL, y mezclando se completó volumen con fase móvil.

Se tomó una alícuota de 10,0mL de la solución anterior, se llevó a un matraz volumétrico de 20,0mL, y se aforo con fase móvil, esperando obtener una concentración de 0.5mg/ml.

La muestra preparada se filtró por membrana de 0,45 µm tipo poliamida Sartorius. Se desgasificó por 15 minutos.

Este proceso se repitió sobre 2 muestras diferentes del producto vitamina C inyectable.

4.3.4.3. Procedimiento. Una vez el sistema cromatográfico se estabilizó se procedió a inyectar por triplicado 20 µL de la solución de estándar preparada en el numeral 4.3.2.1 y posteriormente se inyectó por triplicado 20 µL de cada una de las Soluciones de muestra del producto vitamina C inyectable del numeral 4.3.3.2.

Para determinar la cantidad de VITAMINA C (Ácido ascórbico) se tomó como referencia las áreas promedio encontradas con la solución de estándar correspondiente al pico de VITAMINA C y las obtenidas para cada una de las muestras así:

$$\% \text{ ACTIVO}^{19} = \frac{\text{Cstd} \times \text{POT std} \times \text{AREA m} \times 100}{\text{AREA std} \times \text{Cm}}$$

Donde,

Cstd: Concentración de Activo en la solución del estándar en mg/ mL.

POT std: Potencia real del estándar de: VITAMINA C (ÁCIDO ASCÓRBICO)

AREA std: Área promedio obtenida para la serie de inyecciones de la solución de estándar correspondiente al pico de VITAMINA C (ÁCIDO ASCÓRBICO).

AREA m: Área promedio obtenida para la serie de inyecciones de cada muestra correspondiente al pico de VITAMINA C (ÁCIDO ASCÓRBICO).

Cm: Concentración de activo en la solución de muestra en mg/ml de **VITAMINA C** (ÁCIDO ASCÓRBICO).

¹⁹ Ibid.

4.4 CRITERIOS/ LÍMITES DE ACEPTACIÓN DE VALIDACIÓN

Para la validación del método analítico se evaluaron los parámetros descritos en la tabla 4, Los cuales se encontraron dentro de las especificaciones o límites descritos.

Tabla 4. Parámetros a evaluar y sus límites de aceptación.

CARACTERISTICA ANALITICA A VALIDAR	CRITERIO DE ACEPTACION
<p>IDONEIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO (SYSTEM SUITABILITY TEST)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • PLATOS TEORICOS $N > 2000$ • ASIMETRIA $T < 2,0$ • $\%CV < 2,0 \%$ $n= 6$ • Rango del TR $< 10\%$ para Ácido ascórbico
<p>SELECTIVIDAD</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Al inyectar las siguientes Soluciones no debe aparecer otros picos en el tiempo de retención correspondiente a VITAMINA C (ÁCIDO ASCÓRBICO): - Solución de blanco de VITAMINA C INYECTABLE. - Solución de blanco adicionado de VITAMINA C INYECTABLE <p>Degradación sobre principio activo de VITAMINA C (ÁCIDO ASCÓRBICO) y blanco adicionado de VITAMINA C INYECTABLE:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hidrólisis ácida HCl 0.1 N - Hidrólisis alcalina NaOH 0.1N - Hidrólisis neutra (agua) - Oxidación H_2O_2 <p>Si aparecen picos adyacentes la resolución no debe ser menor a 2,0</p>
<p>LINEALIDAD SISTEMA</p> <p style="text-align: center;">Y</p> <p>LINEALIDAD METODO</p>	<ul style="list-style-type: none"> • $r > 0,99$ y $t_{exp} > t_{tab}$ con $GL= n-2$, $p = 0,05$ • $\%CV_f < 5\%$ • $\%Sb_{rel} \leq 2\%$ • Test de Student para la pendiente: $t_{exp} > t_{tablas}$ • Los límites de confianza del intercepto deben incluir el cero • Los límites de confianza para la pendiente no deben incluir el cero
<p>LIMITE DE DETECCION:</p>	<p>$LC > LD$</p>

Tabla 4. (Continuación).

LIMITE CUANTIFICACION:	
PRECISION	
PRECISION SISTEMA:	CV% < 2,0% para n = 6
PRECISION METODO:	
- REPETIBILIDAD:	CV% < 2,0% para n = 6, y al 100%
- PRECISION INTERMEDIA (Reproducibilidad intralaboratorio):	CV% GLOBAL menor al doble de Repetibilidad
EXACTITUD (% recuperación)	- t exp < t tab - %RECUP = 98-102%
SOLIDEZ (robustez)	Si $V_x < s\sqrt{2}$ indica que no hay influencia significativa del parámetro x evaluado

Fuente. Este estudio

4.5 PREPARACION DEL BLANCO

La solución blanco o placebo es una solución que contiene los excipientes que hacen parte en la formulación del producto y la cual no contiene el principio activo, por lo cual se utiliza como blanco; tomando como referencia la fórmula cualicuantitativa del producto **VITAMINA C INYECTABLE** (Tabla 5), se preparó 100 mL de solución blanco de VITAMINA C.

Esta solución se conservó en un recipiente hermético, rotulado y protegido de la luz para los posteriores análisis.

Tabla 5. Composición de vitamina C inyectable por cada 100mL de producto.

ÁCIDO ASCÓRBICO	10,00g	ACTIVO
EDTA DISODICO	0,10g	AGENTE QUELANTE
METILPARABENO SODICO	0,02g	PRESERVANTE
PROPILPARANENO SODICO	0,01g	PRESERVANTE
HIDROXIDO DE SODIO	0,20g	MODIFICADOR DE pH
AGUA PARA INYECTABLE C.S.P	100,00mL	VEHICULO

Fuente: Departamento de desarrollo Keops Farmacéutica E.U.

4.6 EVALUACION DE LINEALIDAD DEL SISTEMA

En la determinación de la linealidad del sistema cromatográfico se prepararon las

siguientes soluciones, inyectando primero 20µL de muestra con una concentración de 500µg/mL preparada con el procedimiento del numeral 4.3.2.2. “Para verificar la elución del analito y así evitar confundir el pico buscado con otros picos que eluyen en el tiempo muerto durante el ensayo, reduciendo la concentración de las muestras hasta obtener una respuesta no mayor a 0.5 AUFS, Según QUATROCCHI de este modo se obtiene cierta garantía de trabajar dentro del rango del detector U.V”.²⁰

Durante el ensayo se determinó que se obtienen señales del detector con muestras a concentraciones por debajo de 100µg/mL, por lo cual se prepararon muestras para evaluar la linealidad del sistema con cinco concentraciones de principio activo por encima de 100µg/mL y de acuerdo al contenido teórico de ácido ascórbico en producto se evaluaron diluciones del estándar comprendiendo los ámbitos de trabajo del 50% debajo de la concentración optima y 50% por encima de esta concentración preparada según numeral 4.6.1.

4.6.1 Solución de estándar de vitamina C (100%): solución a. Se pesó con exactitud 30,3 mg de estándar de referencia de VITAMINA C y se llevó a un balón de 50,0mL, completando volumen con fase móvil. Se tomó 10mL de la solución anterior y se aforo a 25,0mL con fase móvil. Se filtró la muestra por membrana de 0,45 µm tipo poliamida Sartorius antes de inyectar en el equipo para HPLC.

Concentración de la solución: 242,4ug/mL.

4.6.2 Solución de estándar de vitamina c (50%): solución B. Se pesó con exactitud 15,1 mg de estándar de referencia de VITAMINA C y se llevó a un balón de 50mL, completando volumen con fase móvil. Se tomó 10mL de la solución anterior y se aforo a 25mL con fase móvil. Se filtró la muestra por membrana de 0,45 µm tipo poliamida Sartorius antes de inyectar en el equipo para HPLC.

Concentración de la solución: 121ug/mL

4.6.3 Solución de estándar de vitamina c (80%): solución C. Se pesó con exactitud 24,0 mg de estándar de referencia de VITAMINA C y se llevó a un balón de 50mL, completando volumen con fase móvil. Se tomó 10mL de la solución anterior y se aforo a 25mL con fase móvil. Se filtró la muestra por membrana de 0,45µm tipo poliamida Sartorius antes de inyectar en el equipo para HPLC.

Concentración de la solución: 192ug/mL

²⁰ Ibíd.

4.6.4 Solución de estándar de vitamina c (120%): solución D. Se pesó con exactitud 36,3 mg de estándar de referencia de VITAMINA C y se llevó a un balón de 50mL, completando volumen con fase móvil. Se tomó 10mL de la solución anterior y se aforo a 25mL con fase móvil. Se filtró la muestra por membrana de 0,45µm tipo poliamida Sartorius antes de inyectar en el equipo para HPLC.

Concentración de la solución: 290ug/mL.

4.6.5 Solución de estándar de vitamina c (150%): solución E. Se pesó con exactitud 45,3 mg de estándar de referencia de VITAMINA C y se llevó a un balón de 50mL, completando volumen con fase móvil. Se tomó 10mL de la solución anterior y se aforó a 25mL con fase móvil. Se filtró la muestra por membrana de 0,45µm tipo poliamida Sartorius antes de inyectar en el equipo para HPLC.

Concentración de la solución: 362ug/mL

4.7 LINEALIDAD DEL METODO.

Para determinar la linealidad del método se prepararon las siguientes soluciones que luego fueron inyectadas en el equipo para HPLC.

4.7.1 Blanco adicionado al 100%. Tomando como referencia la fórmula cualicuantitativa del producto **VITAMINA C INYECTABLE** se preparó 100 mL del producto, el cual es una solución de blanco o blanco como se describe en el numeral 4.5 pero a la cual se adiciona la cantidad de vitamina C correspondiente al 100% de la cantidad declarada según la composición del producto Tabla 5.

Este blanco adicionado se conservó en un recipiente hermético, rotulado y protegido de la luz para los posteriores análisis.

4.7.2 Solución de blanco: solución F. Tomando como referencia la fórmula cualicuantitativa del producto **VITAMINA C INYECTABLE** se preparó 100 mL del producto, el cual es una solución de blanco o blanco como se describe en el numeral 4.5. Se midió 300µL de blanco de **VITAMINA C INYECTABLE**. Se llevó a un balón aforado de 50mL y se completó el volumen con fase móvil. Se tomó 10ml de la solución anterior y se transfirió a un balón de 25mL llevando a aforo con fase móvil.

4.7.3 Solución de blanco adicionado al 47%: solución G. Se midió 140µL de blanco adicionado de **VITAMINA C INYECTABLE** (Equivalente a 14,0 mg de

VITAMINA C). Se llevó a un balón aforado de 50mL completando volumen con fase móvil. Se tomó 10ml de la solución anterior y se transfirió a un balón de 25mL aforando con fase móvil.

4.7.4 Solución de blanco adicionado al 77%: solución H. Se midió 230µL de blanco adicionado de **VITAMINA C INYECTABLE** (Equivalente a 23,0 mg de VITAMINA C). Se llevó a un balón aforado de 50mL y se completó volumen con fase móvil. Se tomó 10ml de la solución anterior y se transfirió a un balón de 25mL completando volumen con fase móvil.

4.7.5 Solución de blanco adicionado al 100%: solución I. Se midió 300µL de blanco adicionado de **VITAMINA C INYECTABLE** (Equivalente a 30,0 mg de VITAMINA C) se llevó a un balón de 50mL, se completó a volumen con fase móvil y se mezcló. Se tomó 10mL de la solución anterior y se llevó a un balón de 25mL, y se aforó volumen con fase móvil.

4.7.6 Solución de blanco adicionado al 120%: solución J. Se midió 360µL de blanco de **VITAMINA C INYECTABLE** (Equivalente a 36,0 mg de VITAMINA C), se llevó a un balón de 50mL, se completó a volumen con fase móvil. Se tomó 10mL de la solución anterior y se llevó a un balón de 25mL, completando el volumen con fase móvil.

4.7.8 Solución de blanco adicionado al 147%. Solución K. Se midió 440µL de blanco de **VITAMINA C INYECTABLE** (Equivalente a 44,0 mg de VITAMINA C). Llevando a un balón de 50mL, y completando volumen con fase móvil. Se tomó 10mL de la solución anterior y llevó a un balón de 25mL, completando volumen con fase móvil.

4.7.9 Filtración. Todas las soluciones se filtraron por membrana nylon-poliamida sartorius 0.45µm y se llenaron en viales de vidrio para inyectar al cromatógrafo.

4.8 IDONEIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO

(system suitability test).

En la determinación de idoneidad se realizaron consecutivamente seis (6) inyecciones de 20µL cada una de una solución de estándar; preparada en el numeral 4.3.2.1.

De acuerdo a los cromatogramas obtenidos se determinó los siguientes parámetros de idoneidad del sistema cromatográfico y se compararon con los criterios de aceptación:

- PLATOS TEORICOS **N**:
- ASIMETRIA **T**:
- %CV de las áreas obtenidas para el pico de VITAMINA C de las 6 inyecciones realizadas.
- % del Rango del tiempo de retención para el pico de VITAMINA C.

4.9 SELECTIVIDAD

“Se determinó la selectividad preparando las siguientes soluciones, las cuales demuestran que el método produce una señal medible debido solamente a la presencia del analito, libre de interferencias de otros componentes en la matriz de la muestra”²¹.

Se utilizaron muestras sometidas a estrés como se describe en el numeral 4.10.1 y 4.10.2 para generar los compuestos posiblemente interferentes.

- Solución de estándar al 100%: **solución A** numeral 4.6.1.
- Solución de blanco: **solución F** numeral 4.7.2.
- Solución de blanco adicionado al 100%: **solución I** numeral 4.7.5.

4.10 SOLUCIONES DE DEGRADACIÓN ARTIFICIAL

Las soluciones de degradación artificial son muestras tanto de principio activo como de producto sometidas a procesos químicos y físicos, para determinar si alguno de los productos resultantes de degradación interfiere en el análisis del principio activo ácido ascórbico, con lo cual se determinó si el método validado es específico para ácido ascórbico en el producto terminado VITAMINA C INYECTABLE.

4.10.1 Degradación sobre principio activo (vitamina c):

4.10.1.1 Hidrólisis ácida. Se pesó aproximadamente 30,0 mg de VITAMINA C estándar de referencia y se transfirió a un erlenmeyer de 100 mL adicionando 10 mL de HCl 0,1N. Se colocó a reflujo por 15 minutos; posteriormente se dejó enfriar

²¹ Ibíd.

y se neutralizo con NaOH 0,1N a pH 6. Se llevó a un balón de 50mL completando volumen con fase móvil y agitando. Se tomó 10mL de la solución anterior y llevó a un balón de 25mL, completando volumen con fase móvil.

4.10.1.2 Hidrólisis alcalina. Se pesó aproximadamente 30,0 mg de VITAMINA C estándar de referencia y se transfirió a un erlenmeyer de 100 mL adicionando 10 mL de NaOH 0,1N. Se colocó a reflujo por 15 minutos; posteriormente se dejó enfriar para luego neutralizar con HCl 0,1 N a pH 6, posteriormente se llevó a un balón de 50mL completando el volumen con fase móvil y agitando. Se tomó 10mL de la solución anterior y se llevó a un balón de 25mL, completando volumen con fase móvil.

4.10.1.3 Hidrólisis neutra con fotólisis. Se pesó aproximadamente 30,0 mg de VITAMINA C estándar de referencia y se transfirió a un erlenmeyer de 100 mL adicionando 10 mL de agua posteriormente se sometió a reflujo por 45 minutos y se expuso a la luz U.V a 365nm; posteriormente se dejó enfriar y se llevó a un balón de 50mL aforando con fase móvil y agitando. Se tomó 10mL de la solución anterior y se llevó a un balón de 25mL, completando volumen con fase móvil.

4.10.1.4 Oxidación con Peróxido de Hidrógeno. Se pesó aproximadamente 30,0 mg de VITAMINA C estándar de referencia y se transfirió a un erlenmeyer de 100 mL adicionando 10 mL de peróxido de Hidrógeno diluido (Agua oxigenada). Se sometió a reflujo por 15 minutos; posteriormente se dejó enfriar y se llevó a un balón de 50mL completar volumen con fase móvil y agitando. Se tomó 10mL de la solución anterior y se llevó a un balón de 25mL, completando volumen con fase móvil.

4.10.2 Degradación sobre muestras de vitamina c inyectable

4.10.2.1 Hidrólisis ácida. Se midió con exactitud 300µL de blanco adicionado de **VITAMINA C INYECTABLE** (equivalente a 30,0mg de VITAMINA C). y se transfirió a un erlenmeyer de 100 mL adicionando 10 mL de HCl 0,1N. Se sometió a reflujo por 15 minutos; posteriormente se dejó enfriar y se neutralizo con NaOH 0,1N a pH 6. Se llevó a un balón de 50mL completando volumen con fase móvil y agitando. Se tomó 10mL de la solución anterior y se llevó a un balón aforado de 25mL completando volumen con fase móvil.

Se mezcló por 30minutos en el agitador magnético, y se centrifugo la solución.

4.10.2.2 Hidrólisis alcalina. Se tomó con precisión un volumen de 300µL de blanco adicionado de **VITAMINA C INYECTABLE** (equivalente a 30,0mg de VITAMINA C). y se transfirió a un erlenmeyer de 100 mL adicionando 10 mL de NaOH 0,1N. Se sometió a reflujo por 15 minutos; posteriormente se deja enfriar y se neutralizar con HCl 0,1N a pH 6. Se llevó a un balón de 50mL completando el volumen con fase móvil y agitando. Se tomó 10mL de la solución anterior y se llevó a un balón de 25mL aforando con fase móvil.

Se mezcló durante 30 minutos en el agitador magnético, y se centrifugó la solución.

4.10.2.3 Hidrólisis neutra con fotólisis. Se midió con exactitud 300µL de blanco adicionado de **VITAMINA C INYECTABLE** (equivalente a 30,0mg de VITAMINA C) y se transfirió a un erlenmeyer de 100 mL adicionando 10 mL de agua. Se sometió a reflujo por 45 minutos y se expuso a luz U.V-visible a 365nm; posteriormente se dejó enfriar y se llevó a un balón de 50mL completar volumen con fase móvil y agitando. Se tomó 10mL de la solución anterior y se llevó a un balón de 25mL, completando volumen con fase móvil.

Se mezcló por 30 minutos en el agitador magnético, y se centrifugó la solución.

4.10.2.4. Oxidación con Peróxido de Hidrógeno. Se midió con exactitud cerca de 300µL de blanco adicionado de **VITAMINA C INYECTABLE** (equivalente a 30,0mg de VITAMINA C). y se transfirió a un erlenmeyer de 100 mL adicionando 10 mL de peróxido de Hidrógeno diluido (Agua oxigenada). Se sometió a reflujo por 15 minutos; posteriormente se dejó enfriar y se llevó a un balón de 50mL completar volumen con fase móvil y agitando. Se tomó 10mL de la solución anterior y se llevó a un balón de 25mL, completando volumen con fase móvil.

Se mezcló por 30 minutos en el agitador magnético, y se centrifugó la solución.

4.10.3 Filtración e inyección. Se filtraron todas las Soluciones por membrana de nylon-poliamida Sartorius de 0.45µm y luego se Inyectó en su orden 20µL de cada una de las Soluciones anteriores, eluyendo las muestras por 10 minutos. Los cromatogramas obtenidos se compararon y su resultado se trató estadísticamente.

4.11 LINEALIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Se inyectaron en su orden y por triplicado 20µL de cada una de las siguientes Soluciones y se construyó con los resultados obtenidos la gráfica de área vs concentración de vitamina C

Solución A numeral 4.6.1.
Solución B numeral 4.6.2.
Solución C numeral 4.6.3.
Solución D numeral 4.6.4.
Solución E numeral 4.6.5.

4.12 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Se inyectaron en su orden y por triplicado 20µL de cada una de las siguientes Soluciones y se construyó con los resultados obtenidos la gráfica de área vs concentración de vitamina C

Solución G numeral 4.7.3.
Solución H numeral 4.7.4.
Solución I numeral 4.7.5.
Solución J numeral 4.7.6.
Solución K numeral 4.7.7.

4.13 PRECISION (REPETIBILIDAD) DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO:

Se inyectó consecutivamente seis (6) veces 20 µL de una solución de estándar; **solución A** y se determinó el respectivo coeficiente de variación %CV de las áreas obtenidas para el pico de la VITAMINA C.

4.14 PRECISION DEL MÉTODO ANALÍTICO:

4.14.1 Repetibilidad con blanco adicionado al 100%. Se prepararon 6 soluciones diferentes como está indicado en solución de blanco adicionado al 100%, **solución I**.

Paralelamente se preparó una solución de estándar **solución A** como se describe en el numeral 4.6.1.

Se inyectó por triplicado 20µL de la solución estándar y luego 20µL de cada solución de muestra.

Con las áreas promedio obtenidas y las cantidades medidas de blanco adicionado en cada caso, se determinó el porcentaje de VITAMINA C encontrado en cada una de las 6 muestras.

4.14.2 Precisión intermedia (reproducibilidad intralaboratorio):

Se prepararon las siguientes soluciones

Nivel 50 %: Solución G numeral 4.7.3.

Nivel 100 %: Solución I numeral 4.7.5.

Nivel 150 %: Solución K numeral 4.7.7.

Y paralelamente una solución de estándar, **Solución A**

Se procedió a Inyectar por triplicado 20 µL de la solución de estándar y en su orden y por triplicado cada una de las soluciones problema.

Con las áreas promedio obtenidas y las cantidades tomadas se determinó el porcentaje de VITAMINA C encontrado en cada nivel.

4.15 LIMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

A partir de la solución blanco, adicionado al 100% se prepararon soluciones equivalentes a 12mg, 10mg y 6mg de vitamina C, cada una de estas se disolvieron en diferentes balones aforados de 50mL con fase móvil, se tomaron alícuotas de 10mL cada una y se transfirieron a balones de 25mL, obteniendo así disoluciones de blanco adicionado al 100% con concentraciones de 96ug/mL; 80ug/mL; 48ug/mL respectivamente. Posteriormente se procedió a inyectar por triplicado cada una de las soluciones y con el promedio de las áreas obtenidas se obtiene la recta de regresión lineal con la cual se obtiene la pendiente Y_B y graficando las desviaciones estándar de cada punto vs la concentración se obtiene la pendiente S_B para calcular los límites de detección y cuantificación, utilizando las ecuaciones.

$$LD = \frac{Y_B + (3 + S_B)}{B} * \frac{1}{\sqrt{n}}$$

$$LC = \frac{Y_B + (10 + S_B)}{B} * \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Donde B es la pendiente de la curva de calibrado obtenida al representar la respuesta del método frente a la concentración del analito y n es el número de determinaciones.

4.16 EXACTITUD (porcentaje de recuperación)

Se preparó una (1) serie de Soluciones:

Nivel 50 %: Solución G numeral 4.7.3.

Nivel 100 %: Solución I numeral 4.7.5.

Nivel 150 %: Solución K numeral 4.7.7.

Y paralelamente una solución de estándar, **Solución A**

Se procedió a Inyectar por triplicado 20 µL de la solución de estándar y en su orden y por triplicado cada una de las soluciones problema.

Con las áreas promedio obtenidas y las cantidades tomadas se determinó el porcentaje de VITAMINA C recuperado en cada nivel.

5.17 ROBUSTEZ

Se preparó una solución estándar (Solución A) descrita en el numeral 4.6.1.

Se preparó por duplicado una solución de muestra (Solución I) descrita en el numeral 4.7.5 y se procedió de la siguiente manera:

Se inyectó por triplicado 20µL de la solución de estándar y por triplicado cada solución de muestra.

Con las áreas promedio obtenidas en cada caso y las cantidades pesadas se determinó el porcentaje de VITAMINA C en la muestra.

La determinación anterior se repitió pero haciendo (uno a la vez) los siguientes cambios en las condiciones cromatograficas establecidas:

FLUJO: 0,4 mL/min

CAMBIO DE ANALISTA: Analista 2

DILUYENTE: agua

Con las áreas obtenidas en cada uno de los cambios se determina el porcentaje de recuperación y se calcula la influencia que tiene cada cambio de variable.

5. RESULTADOS

Una vez concluido el proceso de toma y recopilación de datos se realizó el respectivo tratamiento y análisis y se compararon con los límites o criterios de aceptación.

Tabla 6. Resultados de los parámetros evaluados

CARACTERISTICA ANALITICA VALIDADA IDONEIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO (SYSTEM SUITABILITY)	CRITERIO DE ACEPTACION	RESULTADO
	PLATOS TEORICOS $N > 2000$	N: 4154
	ASIMETRIA ⁶⁷ $T < 2,0$ %CV $< 2,0 \%$ $n = 6$ Rango del TR $< 10\%$ para Ácido ascórbico.	As: 1,144 %CV :0,195 % %TR = 3,519%
SELECTIVIDAD	Al inyectar las siguientes soluciones no debe aparecer picos en el tiempo de retención correspondiente a Ácido ascórbico - Blanco de Vitamina C inyectable 100mg/mL. - Solución de blanco adicionado con Ácido ascórbico	No hay interferencia No hay interferencia
	Degradación sobre Principio activo - Hidrólisis ácida HCl 0,1 N - Hidrólisis alcalina NaOH 0,1N - Hidrólisis neutra (agua) - Oxidación Peróxido de Hidrógeno	No hay interferencia No hay interferencia No hay interferencia No hay interferencia
SELECTIVIDAD	Degradación sobre Blanco Adicionado al 100% - Hidrólisis ácida HCl 0,1 N - Hidrólisis alcalina NaOH 0,1N - Hidrólisis neutra (agua) - Oxidación Peróxido de Hidrógeno	No hay interferencia No hay interferencia No hay Interferencia No hay interferencia
	Si aparecen picos adyacentes la R no debe ser menor a 1,0	La resolución R en todos los casos resulto mayor a 1,0

Tabla 6. (Continuación).

		SISTEMA	METODO
LINEALIDAD DEL SISTEMA Y DEL METODO	$r > 0.99$	$r : 0,99984$	$r : 0,99988$
	$t_{exp} > t_{tab}$ con $GL = n-2$, $p=0.05$	$t_{exp}: 203,91$	$t_{exp}: 242,09$
	$\%CV_f < 5\%$	$>t_{tab}: 2.106$	$>t_{tab}: 2.160$
	$\%Sb_{rel} \leq 2\%$	$CV_f: 0.900 \%$	$CV_f: 2.052\%$
	Test de Student para la pendiente: $t_{exp} > t_{tab}$	$Sb_{rel}: 0.343\%$	$Sb_{rel}: 0,982\%$
	Los límites de confianza para la pendiente no deben incluir el cero.	$t_{exp} = 290,994$ $> t_{tab} = 2.160$	$t_{exp} = 101,848$ $> t_{tab} = 2,160$
Los límites de confianza del intercepto deben incluir el cero	(4,9171 ; 4,9907)	(5,1369 ; 5,3595)	
		(-34,7639 ; 34,7639)	(-41,5401 ; 26,4411)
LIMITE DE DETECCION:		LD :32.66ug/mL	
LIMITE CUANTIFICACION:	LC > LD	LC: 109.36ug/mL	
PRECISION	$CV\% < 2\%$ para $n=6$	$\%CV = 0,219 \%$	
PRECISION SISTEMA:	$CV\% < 6,0\%$ para $n= 6$, y al 100%	$\%CV = 0,753 \%$	
PRECISION METODO: (REPETIBILIDAD)	$CV\%_{GLOBAL}$ menor al doble del de Repetibilidad	$\% CV = 0,712 \%$	
PRECISION INTERMEDIA (Reproducibilidad intralaboratorio):	$t_{exp} < t_{tab}$ $\%RECUP = 98-102\%$	$t_{exp} = 0,00077 < t_{tab} = 2,306$ $\%RECUP = 100,581 \%$	
EXACTITUD recuperación)	(% Si $V_x < s\sqrt{2}$ indica que no hay influencia significativa del parámetro x evaluado	V_x para cambio de Flujo: $0,017$ mayor a $0,011 \sqrt{2} = 0,011$ V_x para cambio de diluyente:	
SOLIDEZ (robustez)		$0,020$ mayor a $0,011 \sqrt{2} = 0,011$	

Fuente. Este estudio

5.1 IDONEIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Tabla 7. Repetibilidad de inyección de la solución estándar de Vitamina C.

INYECCION	AREA
1	1161,669
2	1155,739
3	1160,383
4	1160,074
5	1158,160
6	1161,453
%CV	0,195

Fuente. Este estudio

DISCUSIÓN: El coeficiente de variación calculado para las áreas de los picos se encuentra menor al 2% y hasta menor al 1% el recomendado por la FDA para principios activos, lo cual indica que el método tiene una precisión del test de idoneidad aceptable.

Tabla 8. Parámetros cromatográficos de idoneidad del sistema.

N =	4154
Asimetría=	1,44
k' =	0,640

Fuente. Este estudio

Tiempo de retención máximo = **3,47**

Tiempo de retención mínimo = **3,35**

Tiempo de retención medio = **3,41**

% del rango del TR = $0,120 / 3,41 \times 100 = 3,519 \%$

DISCUSIÓN: La eficiencia o poder separativo de la columna determinado por el número de platos teóricos N, muestra un poder separativo aceptable.

Los picos perfectamente gaussianos son poco frecuentes, pero la magnitud de la desviación de la asimetría 1,44% menor al 2% nos indica que puede tolerarse y que no conducirá a errores de cuantificación o solapamiento de picos.

El factor de capacidad k se ajustó mayor a 0.5 teniendo en cuenta que la muestra

es un producto con varios excipientes que podrían presentar varios picos.

5.2 SELECTIVIDAD

Del conjunto de cromatogramas obtenidos según lo establecido en el protocolo y por comparación con los cromatogramas de la solución de estándar de Vitamina C, se observa cómo se describe a continuación:

5.2.1 Solución de blanco. Bajo las condiciones de ensayo (Condiciones Normales) y al nivel de ruido < 10 no se observa ningún pico o señal que interfiera con el pico correspondiente a Vitamina C. Se presenta un pico a un tiempo de retención de 1.01 mín aproximadamente, correspondiente probablemente a un excipiente de la formulación del producto **VITAMINA C INYECTABLE 100mg/mL**. Como se puede observar en el anexo B.

5.2.2 Solución de blanco adicionado al 100%. Al comparar el cromatograma obtenido Anexo C, con el correspondiente para la solución estándar Anexo A, se ve que aparece un único pico a un tiempo de retención de 3,3 mín, que corresponde al compuesto Ácido ascórbico. En el cromatograma del anexo C, igualmente se observa un pico a un tiempo de retención de 1.009 mín, el cual posee un área de 216.754 y corresponde a un excipiente propio de la formulación del producto **VITAMINA C INYECTABLE 100mg/mL**.

5.3 SOLUCIONES DE DEGRADACIÓN:

5.3.1. Degradación sobre principio activo

6.3.1.1 Hidrólisis neutra. Bajo las condiciones del ensayo, no se observa una descomposición significativa de la molécula de ácido ascórbico, el tiempo de retención que presenta el pico producto de la posible degradación es 3,42 mín y el número de platos teóricos es 4457, lo que indica que el único pico que se observa en el cromatograma, es el correspondiente al compuesto de interés analizado. Por tanto, la molécula es estable en condiciones de hidrólisis neutra.

5.3.1.2. Hidrólisis ácida. Bajo las condiciones del ensayo, no se observa una descomposición significativa de la molécula de ácido ascórbico, el tiempo de retención que presentan los picos producto de la degradación acida de la muestra en el rango del tiempo de retención de la vitamina C muestra a 3.39 mín un único pico, el número de platos teóricos es 3086, lo que indica que el único pico que se observa en el cromatograma Anexo E, es el correspondiente al compuesto de

interés analizado. Por tanto, la molécula es estable en condiciones de hidrólisis ácida.

5.3.1.3. Hidrólisis alcalina. Se observa en el anexo D, una descomposición leve de la molécula de Ácido ascórbico a las condiciones de ensayo, puesto que, se evidencia una reducción en el área del compuesto de interés en un 17.346%, respecto al área presentada por el estándar en condiciones normales, los parámetros propios del pico de ácido ascórbico no cambian, el tiempo de retención es 3,347 mín; el número de platos teóricos es 4503. Al igual que se observa la aparición de dos picos adicionales al pico del ácido ascórbico, los cuales presentan un tiempo de retención de 0,991 y 2,320, el número de platos teóricos para éstos picos es mayor, pues es de 2000, el segundo pico muy probablemente corresponda a un producto de degradación del Ácido ascórbico. Sin embargo, la resolución entre los picos es mayor a 1,70, por tanto, se concluye que no existe interferencia con el análisis de ácido ascórbico.

5.3.1.4. Oxidación. En condiciones de degradación de la molécula de ácido Ascórbico con peróxido de hidrógeno, se observa que existe una leve descomposición del compuesto de interés, Anexo F, pues el área del pico de Ácido ascórbico se ve reducida en un 7.52%; Sin embargo, el tiempo de retención 3,397 mín y el número de platos teóricos 3524, se hacen equivalentes a los parámetros evidenciados por la muestra de estándar en condiciones normales. No se observa la aparición de algún tipo de pico cercano al del Ácido ascórbico, que afecte su análisis.

5.3.2. Degradación sobre blanco adicionado al 100%:

5.3.2.1. Hidrólisis neutra. Bajo las condiciones del ensayo, no se observa una descomposición significativa de la molécula de Ácido ascórbico, el tiempo de retención que presenta el pico producto de degradación es 3.377 mín y el número de platos teóricos es 3879, lo que indica que el único pico que se observa en el cromatograma, es el correspondiente al compuesto de interés analizado. El pico que observa en el cromatograma a un tiempo de retención de aproximadamente 0.921 mín es el correspondiente probablemente a un excipiente de la formulación de **Vitamina C inyectable 100mg/mL**. Por tanto, la molécula es estable en condiciones de hidrólisis neutra. Anexo G.

5.3.2.2. Hidrólisis ácida. En las condiciones de ensayo para éste análisis, se observa en el cromatograma descrito en el anexo H, que la molécula de ácido ascórbico no sufre una degradación considerable, evidenciada en el área para el

compuesto de interés, referente al área presentada por el estándar de Ácido ascórbico sin someterse a condiciones de degradación; el tiempo de retención 3.388 mín y el número de platos teóricos de 4676 es equivalente al estándar utilizado. Se observa la aparición de dos picos adicionales a un Tiempo de retención de 0.965 y 1.765 mín, el segundo posee un área de 151.982, perteneciente muy probablemente a algún compuesto de degradación del activo y los reactivos utilizados en la degradación, el primer pico es específico para el excipiente de la formulación del producto en análisis. Sin embargo, dichos picos, no afectan el análisis de la molécula de Ácido ascórbico ya que existe una resolución mayor a 1.5. Teniendo en cuenta lo anteriormente enunciado, se concluye que no hay interferencia por parte de las sustancias de degradación con el análisis del compuesto de interés. No se observa la presencia de algún pico adyacente al pico del compuesto de interés.

5.3.2.3. Hidrólisis alcalina. En condiciones del ensayo de degradación básica, se observa una considerable descomposición de la molécula de Ácido ascórbico. El área que presenta el pico disminuye en un 61.29%, el número de platos teóricos encontrados para el mismo equivalentes a 4154, no varía en gran medida al número de platos presentado por el pico del estándar. No se observa la presencia de algún pico adyacente al pico del compuesto de interés. Por tanto, es posible concluir que aunque en condiciones de estrés alcalino la molécula de Ácido ascórbico se degrada, los picos de degradación, no afectan el análisis y valoración del mismo. Estos picos producto de los posibles compuestos de descomposición no afectan la valoración de la molécula de Ácido ascórbico. Anexo I.

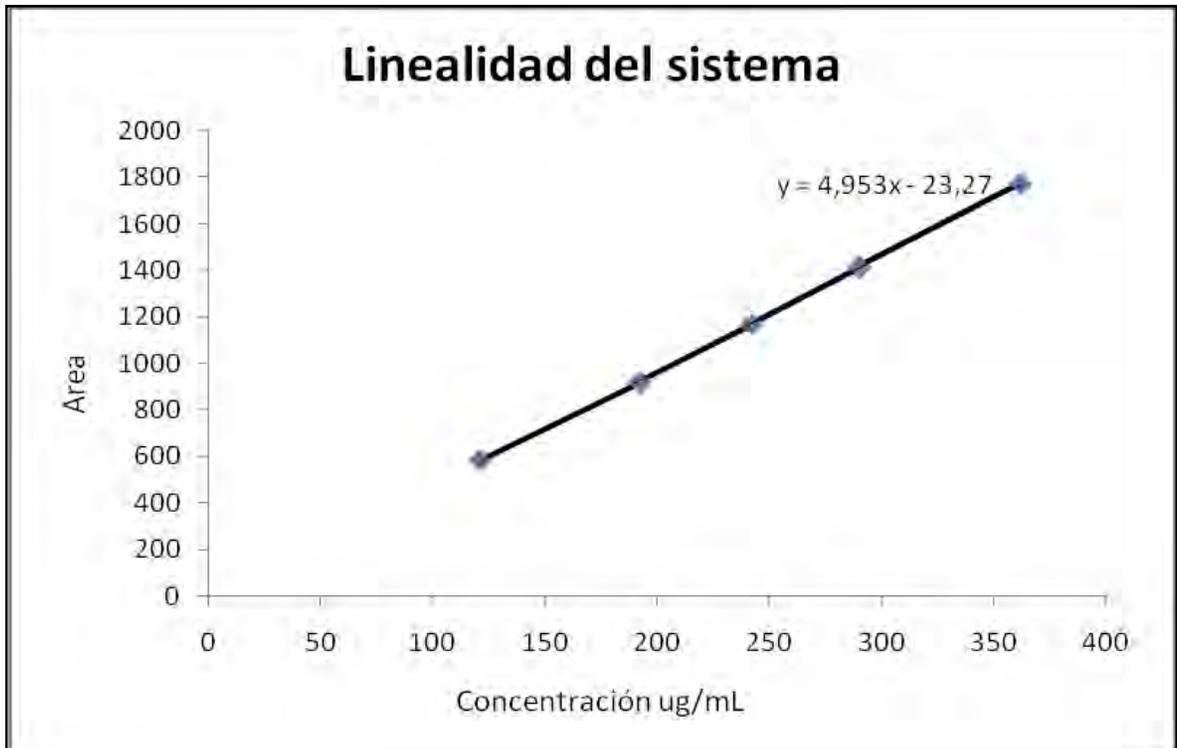
5.3.2.4. Oxidación. En condiciones de degradación con peróxido de Hidrógeno, se observa que el producto sufre un proceso de degradación, ya que hay evidencia de una reducción en el área del pico respectivo, Anexo J, el cual posee un tiempo de retención de 3.391 mín y un número de platos teóricos de 4059, equivalente al pico de ácido ascórbico presentado por la solución estándar. Adicionalmente, en el cromatograma se presentan tres picos adyacentes con una resolución mayor a 1.5, dos de los cuales pueden ser propios del reactivo utilizado para realizar la degradación, el tercer pico que se observa a un tiempo de retención de 2.83 mín y posee un área de 154.365.

Los picos que se observan en el cromatograma corresponden muy probablemente a los picos característicos que genera la reacción del compuesto utilizado para llevar a cabo la degradación oxidativa, puesto que en condiciones de pH alto (pH 5.5 de la solución de blanco adicionado vitamina C inyectable) el ácido ascórbico se encuentra en forma ionizada y esta forma es sensible a las reacciones de oxidación en donde el ascorbato se convierte a dehidroascorbato y este se hidroliza produciendo ácido 2,3 dicetogulónico.

5.4 LINEALIDAD

5.4.1. Linealidad del sistema.

Grafica 3. Concentración estándar vitamina C Vs áreas promedio



Fuente. Este estudio

r = 0.99984
Intercepto = -23.2780
Pendiente = 4.9539

ECUACIÓN DE LA RECTA

$$Y = 4,9539 X - (23,2780)$$

DISCUSIÓN: La respuesta del sistema frente a los cambios de concentración de analito es aceptable como se puede observar con el valor de la pendiente 4,9539 lo cual nos indica que el sistema es sensible ya que a mayor valor de la pendiente mayor sensibilidad.

El grado de relación entre la concentración y la respuesta determinada por el coeficiente de variación r nos indica que hay un grado de probabilidad alto de que haya correlación.

Tabla 9. Cálculos sobre la recta de calibración Grafica 3.

	<i>X</i> µg/mL	<i>Y</i> (AREA)	<i>XY</i>	<i>XX</i>	<i>YY</i>
50%	121,0	585,936	70898	14641	343321
		584,912	70774	14641	342122
		584,145	70682	14641	341225
80%	192,0	915,935	175860	36864	838937
		918,812	176412	36864	844215
		922,357	177093	36864	850742
100%	242,0	1166,573	282311	58564	1360893
		1168,337	282738	58564	1365011
		1170,591	283283	58564	1370283
120%	290,0	1410,684	409098	84100	1990029
		1420,209	411861	84100	2016994
		1418,405	411337	84100	2011873
150%	362,0	1774,089	642220	131044	3147392
		1774,206	642263	131044	3147807
		1773,889	642148	131044	3146682
Sumatoria	3621,000	17589,080	4748976,391	975639,000	23117527,065
Promedio	241,400	1172,605	316598,426	65042,600	2889690,883

Fuente. Este estudio

- **Test de t-student para el coeficiente de correlación r :**

$t_{exp} = 203.91$

$t_{tab} = 2.160$ para $15-2 = 13$ grados de libertad y $p = 0.05$

DISCUSIÓN: Como $t_{exp} > t_{tab}$ se rechaza la hipótesis nula, por lo cual la correlación lineal es significativa con un 95% de confianza.

Tabla 10. Coeficiente de variación de los factores de respuesta f

FACTOR DE RESPUESTA f	
1	4,8424
2	4,8340
3	4,8276
4	4,7705
5	4,7855
6	4,8039
7	4,8205
8	4,8278
9	4,8372
10	4,8644
11	4,8973
12	4,8911
13	4,9008
14	4,9011
15	4,9002
PROMEDIO	4,8470
Desv STD	0,0436
% CVf	0,9002

Fuente. Este estudio

DISCUSIÓN: Ya que % CVf encontrado es menor al 5% se puede indicar con alta seguridad que en el rango (50%- 150%) estudiado la respuesta del sistema presenta una elevada tendencia a un comportamiento lineal.

Tabla 11. Desviación estándar relativa de la pendiente b

S² y,x =	97,24341
Sb₂ =	0,00029
Sb=	0,01702

Fuente. Este estudio

$$Sb \text{ rel } \% = 0,01702 / 4,9539 \times 100 = 0,3436 \%$$

Ya que S_b rel % es menor al 2% se cumple con el límite establecido de aceptación

- **Test de t-student para la pendiente b:**

$$t_{exp} = 4,9539 / 0,01702 = \mathbf{290.994}$$

$$t_{tab} = 2,160 \quad \text{para } 15-2 \text{ grados de libertad y } p= 0.05$$

DISCUSIÓN: Como $t_{exp} > t_{tab}$ se rechaza la hipótesis nula (La pendiente es igual a cero) con lo cual hay un 95% de confianza en que b sea diferente de cero

- **Límites de confianza de la pendiente b:**

Límites de confianza para la pendiente con un 95% de confianza: (4,9171; 4,9907)

- **Límites de confianza para el intercepto a:**

$$S_{a \text{ rel}} = 5,31756 / 23,2780 \times 100 = \mathbf{22,84\%}$$

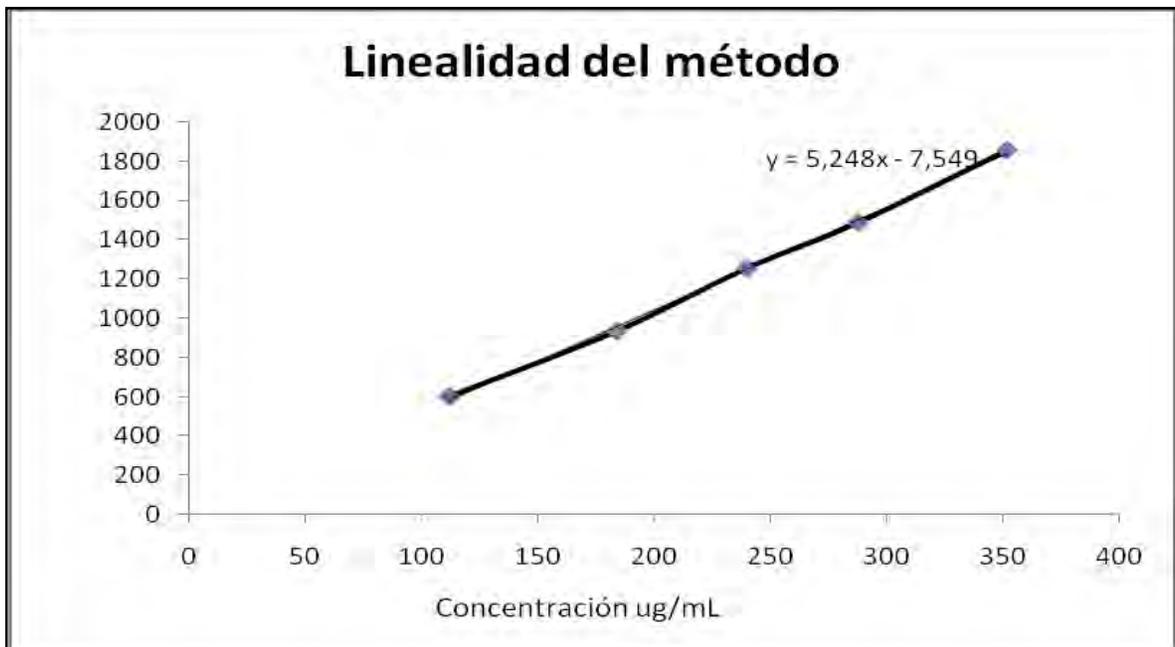
$$S_a = 5,31756$$

Límites de confianza para el intercepto con un 95% de confianza: (-34,7639; 34,7639)

La pendiente y el intercepto de la recta obtenida cumplen los criterios de aceptación con un 95% de confianza

5.4.2 Linealidad del método:

Grafica 4. Concentración vitamina C en muestras de blanco adicionado Vs áreas promedio.



Fuente. Este estudio

r = 0,99883
Pendiente= 5,24826
Intercepto= -7,54952

.ECUACIÓN DE LA RECTA

$$Y = 5,24826X - (7,54952)$$

DISCUSIÓN: La respuesta del método frente a los cambios de concentración de analito es aceptable como se puede observar con el valor de la pendiente 5,24826 lo cual nos indica que el sistema es sensible ya que a mayor valor de la pendiente mayor sensibilidad.

El grado de relación entre la concentración y la respuesta determinada por el coeficiente de variación r nos indica que hay un grado de probabilidad aceptable de que haya correlación.

Tabla 12. Cálculos sobre la recta de calibración Grafica 4.

<i>NIVEL</i>	<i>X ug/mL</i>	<i>Y (AREA)</i>	<i>XY</i>	<i>XX</i>	<i>YY</i>
47%	112,0	600,332	67237,184	12544,000	360398,510
		600,874	67297,888	12544,000	361049,564
		598,639	67047,568	12544,000	358368,652
77%	184,0	934,654	171976,336	33856,000	873578,100
		932,647	171607,048	33856,000	869830,427
		935,211	172078,824	33856,000	874619,615
100%	240,0	1254,613	301107,120	57600,000	1574053,780
		1255,944	301426,560	57600,000	1577395,331
		1253,316	300795,840	57600,000	1570800,996
120%	288,0	1456,324	419421,312	82944,000	2120879,593
		1521,113	438080,602	82944,000	2313785,367
		1487,954	428530,752	82944,000	2214007,106
147%	352,0	1854,345	652729,440	123904,000	3438595,379
		1857,231	653745,312	123904,000	3449306,987
		1859,428	654518,656	123904,000	3457472,487
Sumatoria	3528,000	18402,625	4867600,442	932544,000	25414141,894
Promedio	235,200	1226,842	324506,696	62169,600	1694276,126

Fuente. Este estudio

- Test de t-student para el coeficiente de correlación r :

$t_{exp} = 74,49$

$t_{tab} = 2,160$ para $15-2 = 13$ grados de libertad y $p = 0.05$

DISCUSIÓN: Como $t_{exp} > t_{tab}$ se rechaza la hipótesis nula, por lo cual la correlación lineal es significativa con un 95% de confianza.

Tabla 13. Coeficiente de variación de los factores de respuesta f grafica 4.

FACTOR DE RESPUESTA f	
1	5,360
2	5,365
3	5,345
4	5,080
5	5,069
6	5,083
7	5,228
8	5,233
9	5,222
10	5,057
11	5,282
12	5,167
13	5,268
14	5,276
15	5,282
PROMEDIO	5,221
Desv STD	0,107
% CVf	2,052

Fuente. Este estudio

DISCUSIÓN: Ya que el % CVf encontrado es menor al 5% se puede indicar con seguridad que en el rango (47%- 147%) estudiado, la respuesta del sistema presenta una elevada tendencia a un comportamiento lineal.

Tabla 14. Desviación estándar relativa de la pendiente b

S² y,x =	828,86548
Sb² =	0,00026
Sb=	0,05153

Fuente. Este estudio

Sb rel % = 0,05153/ 5,24826 x 100 = 0,982 %.

Ya que S_b rel % es menor al 2% se cumple con el valor establecido como límite de aceptación.

Test de t-student para la pendiente:

$$t_{exp} = 5,24826 / 0,05153 = 101,848$$

$$t_{tab} = 2,160 \quad \text{para } 15-2 = 13 \text{ grados de libertad y } p = 0,05$$

DISCUSIÓN: Como $t_{exp} > t_{tab}$ se rechaza la hipótesis nula con lo cual hay un 95% de confianza de que b sea diferente de cero.

- **Límites de confianza de la pendiente b :**

**Límites de confianza para la pendiente con un 95% de confianza:
(5,13695; 5,35956)**

- **Límites de confianza para el intercepto a :**

$$S_a \text{ rel} = (15,73642 / 7,54952) \times 100 = 208,44 \%$$

$$S_a = 15,73642$$

Límites de confianza para el intercepto con un 95% de confianza: (-41,540179; 26,4411)

La pendiente y el intercepto de la recta obtenida cumplen los criterios de aceptación con un 95% de confianza.

5.5 PRECISIÓN DEL MÉTODO

Tabla 15. Áreas obtenidas repetibilidad solución del estándar.

<i>INYECCION</i>	<i>AREA</i>
1	1184,664
2	1191,467
3	1188,672
4	1187,592
5	1190,157
6	1189,473
PROMEDIO	1188,5104
Dv std	2,60371
%CV	0,21907

Fuente. Este estudio

5.5.1 Repetibilidad del método:

Tabla 16. Áreas obtenidas de diferentes muestras blanco adicionado al 100%.

<i>PESO vit C mg</i>	<i>AREA 1</i>	<i>AREA 2</i>	<i>AREA 3</i>	<i>PROMEDIO</i>	<i>% ENCONTRADO</i>
30,0	1077,09619	1076,06616	1074,56055	1075,90763	No calculado
28,0	1031,55688	1028,79468	1028,57019	1029,64058	102,638%
28,8	1057,87878	1053,03674	1053,24585	1054,72046	102,218%
30,2	1110,74890	1111,35400	1111,32397	1111,14229	102,694%
28,4	1025,76501	1023,35669	1022,07977	1023,73382	100,612%
29,0	1059,30920	1058,17102	1058,50476	1058,66166	101,892%
29,2	1066,29248	1063,76807	1062,03162	1064,03072	101,707%

Fuente. Este estudio

Tabla 17. Coeficiente de variación de la áreas promedio obtenidas en las muestras blanco adicionado al 100%.

<i>Cstd = 24 ug/ mL</i>	
DVstd	1,2752
Prom	1075,91
%CV	0,119

Fuente. Este estudio

Tabla 18. Coeficiente de variación porcentaje de vitamina C encontrado en las muestras blanco adicionado 100%.

<i>PROMEDIO</i>	101,960%
DVstd	0,008
%CV	0,753

Fuente. Este estudio

Intervalo de confianza de la media:

$101,960\% \pm 2,571 \times 0,008/2,45 = \mathbf{101,960\%} \pm 0,0083$ con 6-1 grados de libertad y $p= 0,05$

El método analítico tiene la precisión (Repetibilidad) requerida

5.5.2. Precisión intermedia (reproducibilidad intralaboratorio):

Tabla 19. Porcentaje de Vitamina C encontrado en muestras con concentraciones de 50 %, 100% y 150%.

NIVE L	Peso vitamina C mg			AREAS			% Encontrado		
				DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 1	DIA 2	DIA 3
ST				1011,9078 4	1224,7435 3	1235,6892 1	NA	NA	NA
	30, 0	30, 0	30, 0	1012,0437 6	1224,4022 2	1235,2154 5			
				1011,6464 2	1223,7161 9	1235,8812 3			
50%	15, 2	13, 2	13, 0	537,25299	530,32495	516,02563	104,89 %	98,547 %	96,473 %
				538,06659	529,62561	515,52844			
				536,24115	531,03375	516,51239			
100%	30, 2	27, 2	26, 0	1059,7644 0	1070,6438 0	1031,7539 1	104,14 %	96,408 %	96,113 %
				1061,2314 5	1069,3084 7	1027,5941 2			
				1058,0665 3	1067,2926 0	1025,2262 0			
150%	47, 0	42, 0	41, 0	1621,1928 7	1643,7275 4	1647,8566 9	102,36 %	95,906 %	97,654 %
				1621,4542 2	1642,0741 0	1647,5146 5			
				1620,6055 9	1640,7628 2	1646,7857 7			
Promedio Global							99,165%		
Dest							0,0071		
% Cv							0,7123		

Fuente. Este estudio

El método analítico presenta el nivel de precisión intermedia requerida para análisis.

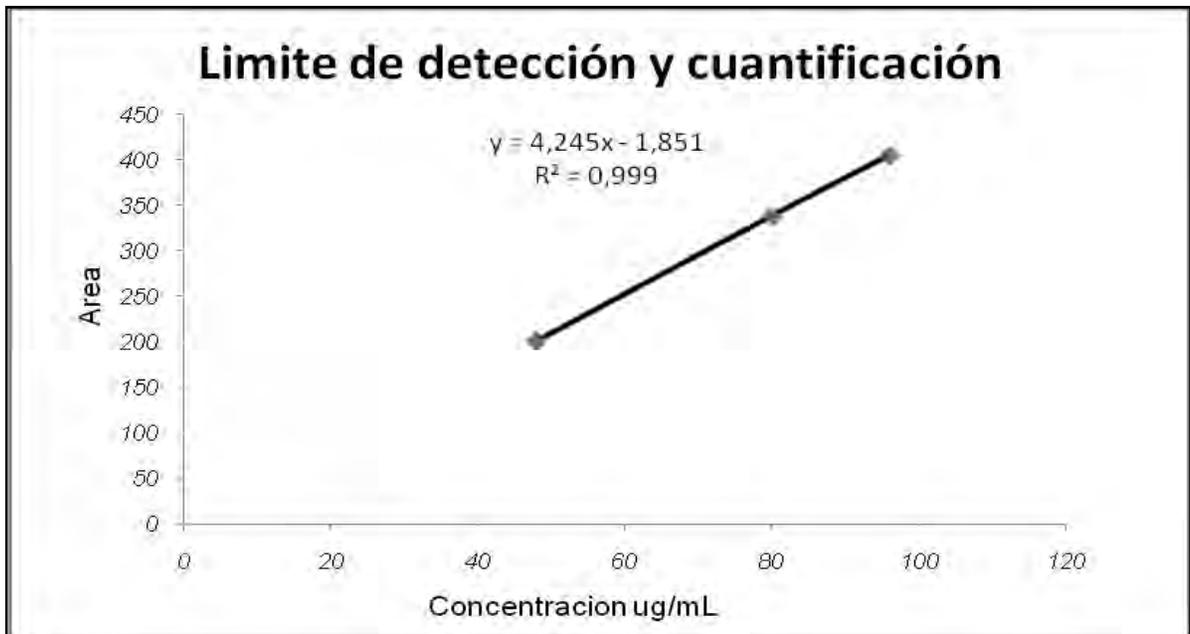
6.5.3 Límites de detección y cuantificación.

Tabla 20. Áreas obtenidas en muestras con concentraciones menores a la zona inferior curva de calibración de linealidad del método Grafica 4.

<i>ug/mL</i>	<i>AREAS</i>	<i>PROMEDIO</i>	<i>DESVIACION ESTANDAR</i>
96	405,207	405,109	0,105765464
	404,997		
	405,124		
80	338,152	338,718	0,530543118
	339,204		
	338,798		
48	202,901	201,629	1,425662302
	201,898		
	200,088		

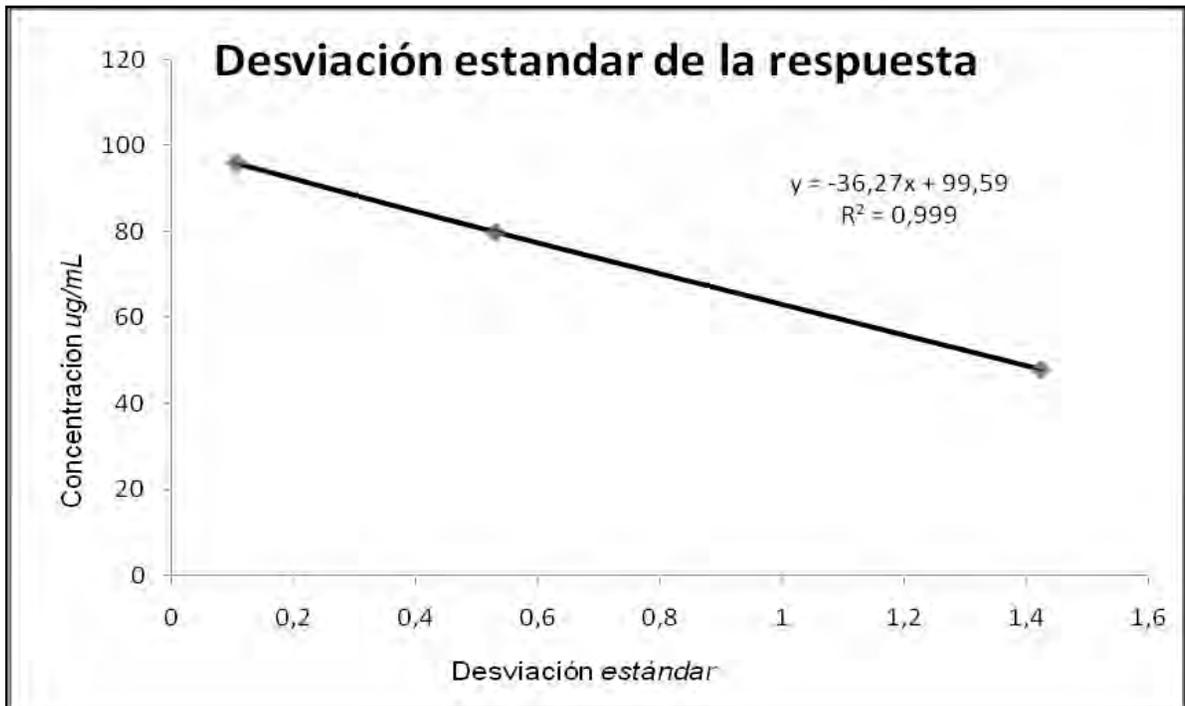
Fuente. Este estudio

Grafica 5. Cálculo de la respuesta a concentración cero



Fuente. Este estudio

Grafica 6. Cálculo de la desviación estándar de la respuesta a concentración cero



Fuente. Este estudio

Tomando como pendiente b: 5.24826 de la gráfica de linealidad del método los índices son:

Límite de detección: $(-1.851+3 \times 99.59)/5.24826 \times \sqrt{3} = 32.66 \mu\text{g/mL}$

Límite de cuantificación: $(-1.851+10 \times 99.59)/5.24826 \times \sqrt{3} = 109.36 \mu\text{g/mL}$

DISCUSIÓN: Extrapolando a concentración cero la gráfica de linealidad se obtiene la señal ruido proporcionado por la pendiente lo que se define como Y_{bl} : 5,24826 y de la desviaciones estándar proporcionada por el ruido determinado con las concentraciones menores a la curva de linealidad se obtuvo S_{bl} : 99.59

5.6 EXACTITUD (% de recuperación)

Tabla 21. Porcentaje de Vitamina C recuperado en muestras con concentraciones de 50 %, 100% y 150%.

<i>NIVEL %</i>	<i>Peso vit C mg</i>	<i>AREA</i>	<i>PROMEDIO</i>	<i>% RECUPERADO</i>
ST		1011,91687	1011,41069	NA
	30,2	1011,27051		
		1011,04468		
		531,51062	530,89432	101,070%
50	15,7	530,27802		
		530,67963		
		1042,88110	1042,12091	100,478%
100	31,0	1042,30322		
		1041,93860		
		1610,68567	1609,08997	100,197%
150	48,0	1608,34338		
		1609,08997		

PROMEDIO %R	100,581%
DvSTD	0,004
%CV	0,443

Fuente. Este estudio

TEST t- student PARA LA RECUPERACION %R:

$$t_{exp} = |100 - 100.581| / 3 * 0,004 = \mathbf{0,00077}$$

$$t_{tab} = 2,306 \text{ para } 9-1 \text{ grados de libertad y } p= 0,05$$

Ya que $t_{exp} < t_{tab}$ se puede establecer que el método presenta la exactitud (recuperación) requerida y no existe diferencia significativa entre recuperación media y el 100% en el rango evaluado (50-150%).

5.7 ROBUSTEZ

Utilizando el diseño de Youden-Steiner se estudió el efecto de 3 variables.

Comparando la diferencia obtenida por cada parámetro con el valor de la desviación estándar obtenida en la prueba de repetibilidad multiplicada por la raíz de 2 se tiene: $V_x < s\sqrt{2}$

Tabla 22. Factores nominales y alternativos evaluados.

AREA	ENSAYO				
	1 (NORMAL)	2 Flujo	3 Diluyente	4 Analista M1	4 Analista M2
Estandar	1172,79333	1699,93533	1127,23300	1193,29067	1193,29067
Muestras	1165,96540	1709,86067	1102,99400	1188,86467	1183,65410

Fuente. Este estudio

Tabla 23. Matriz resultante de los factores evaluados.

FACTOR	ENSAYO			
	1 (normal)	2 Flujo	3 Diluyente	4 (Analista)
A/a	0,6 mL/mín	0,4 mL/min	0,6 mL/min	0,6 mL/Min
B/b	Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ a pH 2.5	Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ a pH 2.5	Agua	Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ a pH 2.5
C/c	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C
D/d	UNO	UNO	UNO	DOS
%Encontrado	100,08%	101,25%	98,50%	100,07%

A-a =	0,001	< 0,011
B-b =	0,017	>0,011
C-c=	0,020	> 0,011
D-d=	0,001	< 0,011

Fuente. Este estudio

Un factor evaluado fue el flujo (*condición normal*: 0,6mL/mín, *condición alterna*: 0,4 mL/mín), que dentro del rango de variación estudiado, presenta un efecto significativo sobre la precisión del método analítico validado, esto se ve reflejado en el porcentaje de recuperación, el cual fue mayor. Lo anterior, debido, a que existe un ensanchamiento del pico, resultado de la mayor retención que se presenta por parte de la molécula debido al flujo bajo. Por consiguiente el valor de V_x resultó mayor a $s\sqrt{2} = 0,011$. Igualmente para la evaluación del diluyente (*condición normal*: Buffer Na₂HPO₄/KH₂PO₄ a pH 2,5 *condición alterna*: Agua), que también en el rango de variación experimentado, tiene un efecto significativo sobre la precisión del método analítico, esto se ve reflejado en el porcentaje de recuperación, que al contrario del flujo fue menor.

Lo anterior, debido, a que existe una disminución del área del pico resultado de la descomposición de la molécula que se presenta debido a la ionización del ácido ascórbico en el producto vitamina C inyectable, siendo la condición normal: Buffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ a pH 2,5 proporciona un medio ácido y estable para la vitamina C, Por consiguiente el valor de V_x resultó mayor a $s\sqrt{2} = 0,01$.

CONCLUSIONES

El método analítico evaluado cumple con los parámetros de idoneidad establecidos lo que muestra dicho sistema altamente estable y confiable para su empleo en el análisis de producto terminado y materia prima.

El método analítico por Cromatografía líquida HPLC empleado para identificar y valorar Ácido ascórbico en el producto **VITAMINA C INYECTABLE 100mg/mL** se muestra selectivo respecto a los diferentes excipientes de la formulación e igualmente para potenciales sustancias de descomposición, ya que permite distinguir los picos asociados de todas las especies químicas que se generan con una resolución entre picos mayores a 1.5 y un número de platos teóricos >2000.

El método analítico presenta un comportamiento lineal ya que los coeficientes de variación de los factores de respuesta que expresan la relación entre la respuesta o área y la concentración son menores del 2% y el test de student realizado comprueba que existe una pendiente distinta de cero.

El sistema cromatográfico usado presenta la precisión (Repetibilidad) requerida ya que el coeficiente de variación de las áreas de la muestra estándar es de 0.219% menor del 2%. Al igual que la precisión de método con coeficiente de variación de 0.328%.

Se puede establecer que el método presenta la exactitud (recuperación) requerida para materias primas y productos terminados que entre el 80% y 120% y no existe diferencia significativa entre recuperación media y el 100% en el rango evaluado (50-150%).

De los resultados obtenidos se puede concluir que el método analítico por Cromatografía HPLC para identificar y valorar el compuesto Ácido ascórbico en el producto VITAMINA C INYECTABLE fue satisfactoriamente validado en las características o parámetros analíticos evaluados al mostrar la selectividad, exactitud, precisión y linealidad requeridas, por lo que puede ser usado con un alto nivel de confianza para tal fin.

BIBLIOGRAFÍA

ARYA, Styá. y MAHAJAN, Meenakshi. Photometric methods for the determination of vitamin C. USA: Analytical Sciences, 14; (1998) 889-894. Reviews.

BAUERNFEIND, P. y SEIB, B.M. TOLBERT. Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism and Uses, Advances in Chemistry Series 200. Washington, DC: American Chemical Society, 1989.

BURDURLU, Hande; KOCA, Nuray. y KARADENIZ, Feryal. Degradation of vitamin C in citrus juice concentrates during storage. USA: Journal of Food Engineering, 2005.

ESTEVE, M. y BLASCO, R. Ascorbic acid degradation kinetic in mushrooms in a high temperature short-time process controlled by a thermoresistometer. USA: Journal of Food Quality, 2004.

JHNSON, J. y BRADDOCK, R. Kinetics of ascorbic acid loss and onenzymatic browning in orange juice serum: Experimental rate constants. USA: Journal of Food Science, 1995.

LEVINE, M.; WANG, Y.; PADAYATTY, S. J., & MORROW, J. A new recommended dietary allowance of vitamin C for healthy young women. USA: Proc Natl Acad Sci, 1998.

MORALES DE LA CRUZ, C. Desarrollo y validación prospectiva de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para el enalapril 10 mg tabletas recubiertas. Bogotá: s.n, 2000.

QUATTROCCHI, Oscar; ABELAIRA, Sara y LABA, Raul. Introducción al HPLC, aplicación y práctica. Buenos Aires, Argentina: s.n., 1992. 245 .P

TAUGUINAS, Alicia I; AVALLONE, Carmen; HOYOS, Silvia; y CRAVSOV, Alicia. Análisis de niveles de concentración de vitamina c en mieles de la provincia del chaco. Argentina: Facultad de Agroindustrias, 2000.

THE COORDINATION CHEMISTRY OF VITAMIN C. An overview B. Zumreoglu-Karan Department of Chemistry. Ankara, Turkey: Hacettepe University, Beytepe Campus, 06800. S.f.

THIN, Mai. y FARID, Mohammed. Ultraviolet treatment of orange juice. USA: Innovate Food Science and Emerging Technologies, 2004

TORREGROSA, F. y ESTEVE, M. Ascorbic acid stability during refrigerated storage of orange carrot juice treated by high pulsed electric field and comparison with pasteurized juice. USA: Journal of Food Engineering, 2005.

VIEIRA, Margarida y TEIXEIRA, A. Mathematical modelling of the thermal degradation kinetic of vitamin C in cupuacu nectar. USA: Journal of Food Engineering, 2000.

ANEXOS

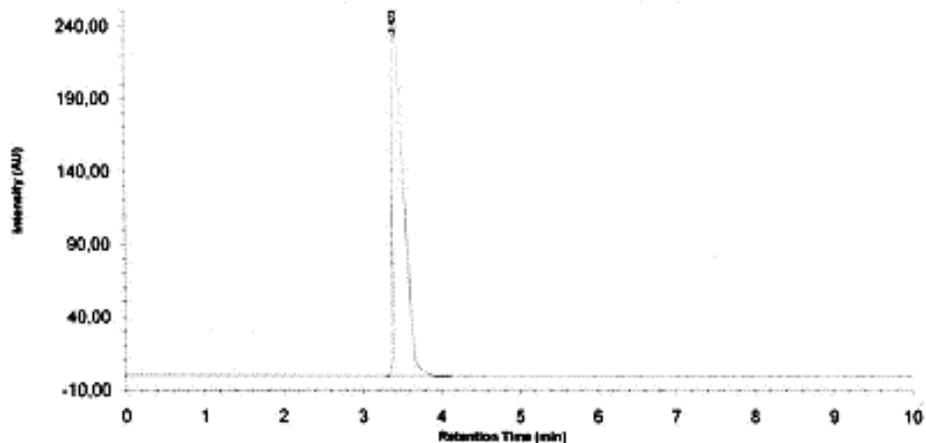
ANEXO A. CROMATOGRAMA SOLUCIÓN ESTÁNDAR AL 100%.

Analyzed: 11/02/11
 Data Path: C:\Win32App\HSM\DATA\1920\
 Processing Method: VITAMINA C
 System (acquisition): KEOPS
 Application: SELECTIVIDAD
 Sample Name: STD VITAMINA C AL 100%
 Injection from this vial: 1 of 3
 Sample Description: Estandar

Reported: 11/02/11
 Processed: 11/02/11

Series: 1919
 Vial Number: 1
 Vial Type: Std1
 Volume: 20uL

Chrom Type: HPLC Channel: 1



Acquisition Method: VITAMINA C
 Method Description: SELECTIVIDAD

Name	RT (min)	Area	Conc 1 Other	No.
VITAMINA C	3,423	1205,354	100,000%	2
		1205,354		

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asyn	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
3,423	VITAMINA C	405,45	1,10	4457	---	---	---	---

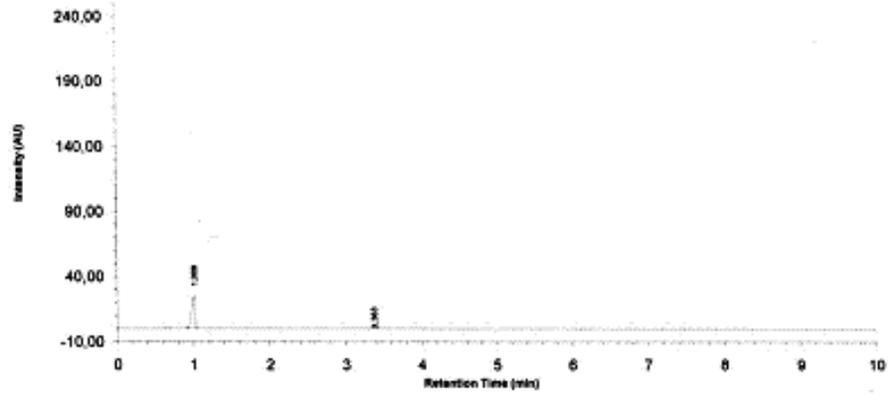
Asymmetry warning outside the range of: 0,800 to 2,000
 No. of theoretical plates warning at less than: 2,000
 Signal to noise ratio warning at less than: 3

ANEXO B. CROMATOGRAMA SOLUCIÓN BLANCO.

Analyzed: 11/02/11
 Data Path: C:\Win32App\HSM\DATA\1920\
 Processing Method: VITAMINA C
 System (acquisition): KEOPS
 Application: SELECTIVIDAD
 Sample Name: SOLUCION BLANCO
 Injection from this vial: 1 of 1
 Sample Description: SELECTIVIDAD

Reported: 11/02/11
 Processed: 11/02/11
 Series: 1919
 Vial Number: 2
 Vial Type: UNK
 Volume: 20uL

Chrom Type: HPLC Channel: 1



Acquisition Method: VITAMINA C
 Method Description: SELECTIVIDAD

Name	RT (min)	Area	Conc 1 Other	No.
	1.01	238,691	100,000%	2
		238,691		

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
1.01		359,45	1,13	4064	---	---	---	---

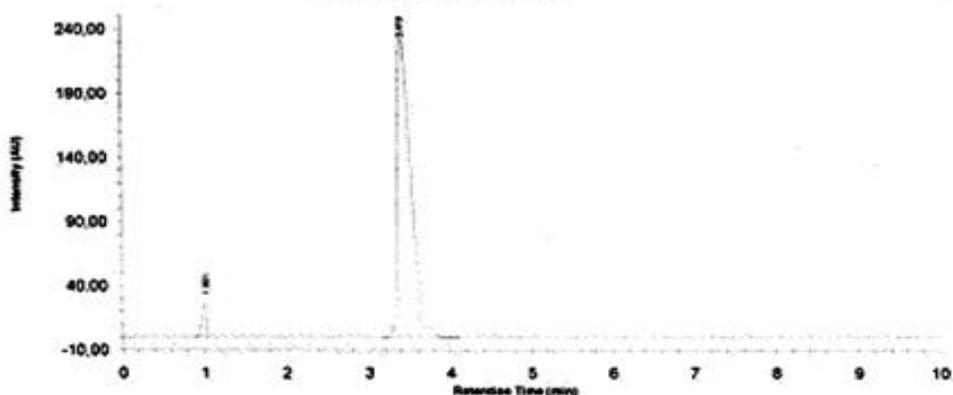
Asymmetry warning outside the range of 0.800 to 2.000
 No. of theoretical plates warning at less: 1000
 Resolution warning at less than: 2.000
 Signal to noise ratio warning at less than: 3

ANEXO C. CROMATOGRAMA SOLUCIÓN BLANCO ADICIONADO.

Analyzed: 11/02/11
 Data Path: C:\Win32App\HSM\DATA\1920\
 Processing Method: VITAMINA C
 System (acquisition): KEOPS
 Application: SELECTIVIDAD
 Sample Name: SOLUCION BLANCO ADICIONADO
 Injection from this vial: 1 of 1
 Sample Description: SELECTIVIDAD

Reported: 11/02/11
 Processed: 11/02/11
 Series: 1919
 Vial Number: 3
 Vial Type: UNK
 Volume: 20uL

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: VITAMINA C
 Method Description: SELECTIVIDAD

Name	RT (min)	Area	Conc 1 Other	No.
	1,003	204,482	100,000%	1
VITAMINA C	3,419	1156,912	99,234%	2
		1363,395		

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
1,003		392,08	0,98	3760	---	---	---	---
3,419	VITAMINA C	361,84	1,06	3915	---	---	---	---

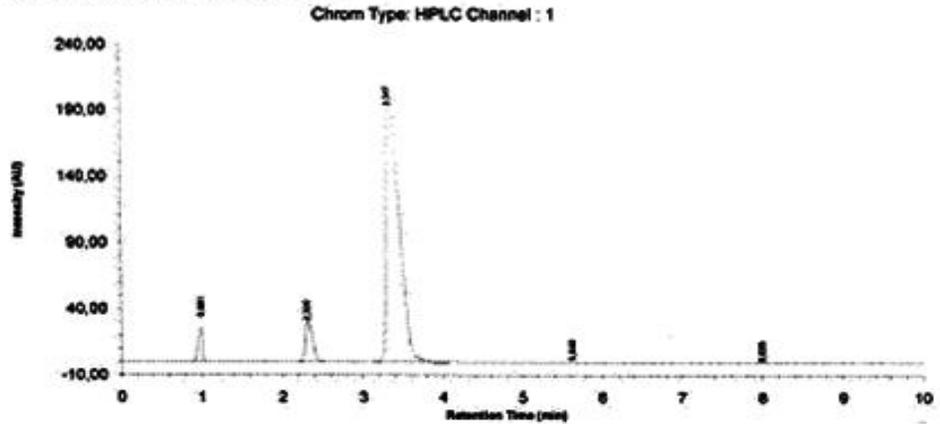
Asymmetry warning outside the range of: 0.800 to 2.000
 No. of theoretical plates warning at less: 1000
 Resolution warning at less than: 2.000
 Signal to noise ratio warning at less than: 3

ANEXO D. CROMATOGRAMA HIDROLISIS ALCALINA SOBRE PRINCIPIO ACTIVO

Analyzed: 11/02/11
 Data Path: C:\Min32App\HSM\DATA\1920\
 Processing Method: VITAMINA C
 System (acquisition): KEOPS
 Application: SELECTIVIDAD
 Sample Name: HIDROLISIS ALCALINA
 Injection from this vial: 1 of 1
 Sample Description: SELECTIVIDAD

Reported: 11/02/11
 Processed: 11/02/11

Series: 1919
 Vial Number: 4
 Vial Type: UNK
 Volume: 20uL



Acquisition Method: VITAMINA C
 Method Description: SELECTIVIDAD

Name	RT (min)	Area	Conc 1 Other	No.
	0.991	209.404	100.000%	1
	2.320	215.327	100.000%	2
VITAMINA C	3.347	969.680	82.654%	3
		1394.411		

Peak rejection level: 0

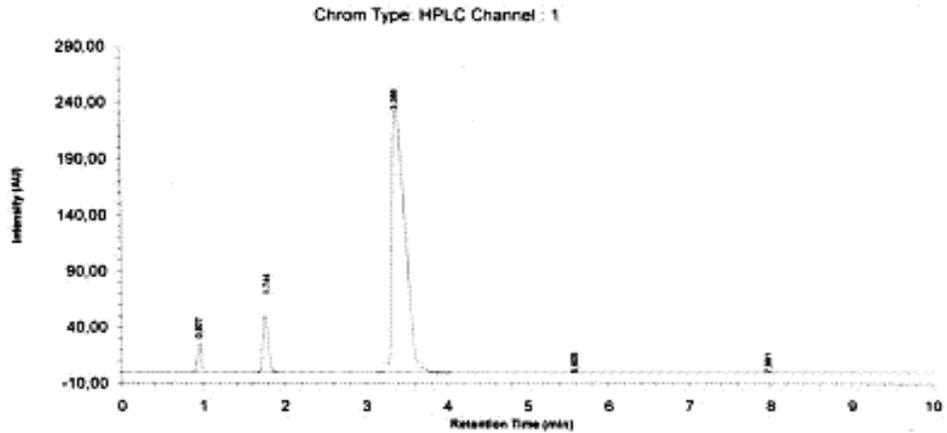
RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
0.991		393.04	1.04	4893	---	---	---	---
2.320		359.21	1.12	4828	---	---	---	---
3.347	VITAMINA C	412.07	1.09	4503	---	---	---	---

Asymmetry warning outside the range of: 0.800 to 2.000
 No. of theoretical plates warning at less: 1000
 Resolution warning at less than: 2.000
 Signal to noise ratio warning at less than: 3

ANEXO E. CROMATOGRAMA HIDROLISIS ACIDA SOBRE PRINCIPIO ACTIVO

Analyzed: 11/02/11
 Data Path: C:\Min32App\HSM\DATA\1920\
 Processing Method: VITAMINA C
 System (acquisition): KEOPS
 Application: SELECTIVIDAD
 Sample Name: HIDROLISIS ACIDA
 Injection from this vial: 1 of 1
 Sample Description: SELECTIVIDAD

Reported: 11/02/11
 Processed: 11/02/11
 Series: 1919
 Vial Number: 5
 Vial Type: UNK
 Volume: 20uL



Acquisition Method: VITAMINA C
 Method Description: SELECTIVIDAD

Name	RT (min)	Area	Conc 1 Other	No.
	0,965	206,375	100,000%	1
	1,765	151,982	100,000%	2
VITAMINA C	3,388	1160,431	99,107%	3
		1518,788		

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
0,965		478,78	0,99	4730	---	---	---	---
1,765		448,39	0,98	4389	---	---	---	---
3,388	VITAMINA C	420,73	1,11	4676	---	---	---	---

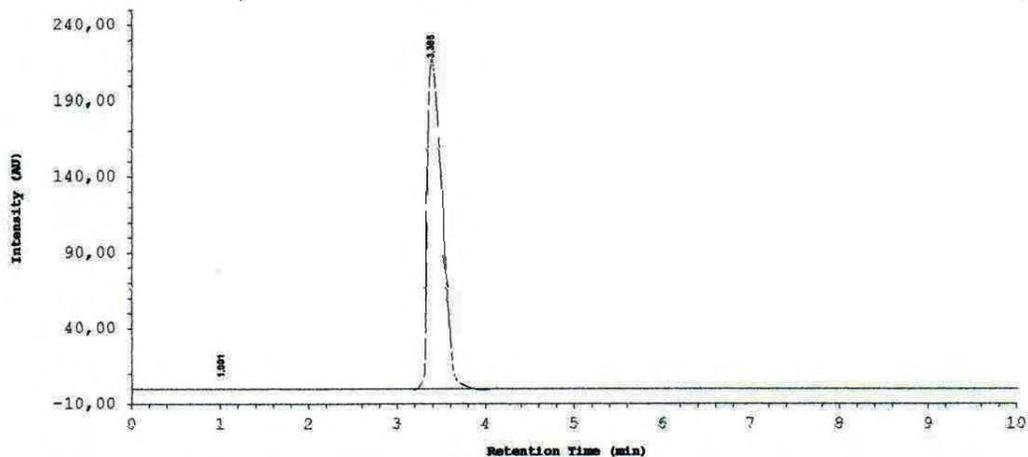
Asymmetry warning outside the range of: 0,800 to 2,000
 No. of theoretical plates warning at less: 1000
 Resolution warning at less than: 2,000
 Signal to noise ratio warning at less than: 3

ANEXO F. CROMATOGRAMA OXIDACIÓN SOBRE PRINCIPIO ACTIVO

Analyzed: 11/02/11
 Data Path: C:\Win32App\HSM\DATA\1920\
 Processing Method: VITAMINA C
 System (acquisition): KEOPS
 Application: SELECTIVIDAD
 Sample Name: OXIDACION
 Injection from this vial: 1 of 1
 Sample Description: SELECTIVIDAD

Reported: 11/02/11
 Processed: 11/02/11
 Series: 1919
 Vial Number: 3
 Vial Type: UNK
 Volume: 20uL

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: VITAMINA C
 Method Description: SELECTIVIDAD

Name	RT (min)	Area	Conc 1 Other	No.
VITAMINA C	3,385	1122,862	92,480%	1
		1122,862		

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
3,385	VITAMINA C	362,18	1,08	3916	---	---	---	---

Asymmetry warning outside the range of: 0,800 to 2,000
 No. of theoretical plates warning at less: 1000
 Resolution warning at less than: 2,000
 Signal to noise ratio warning at less than: 3

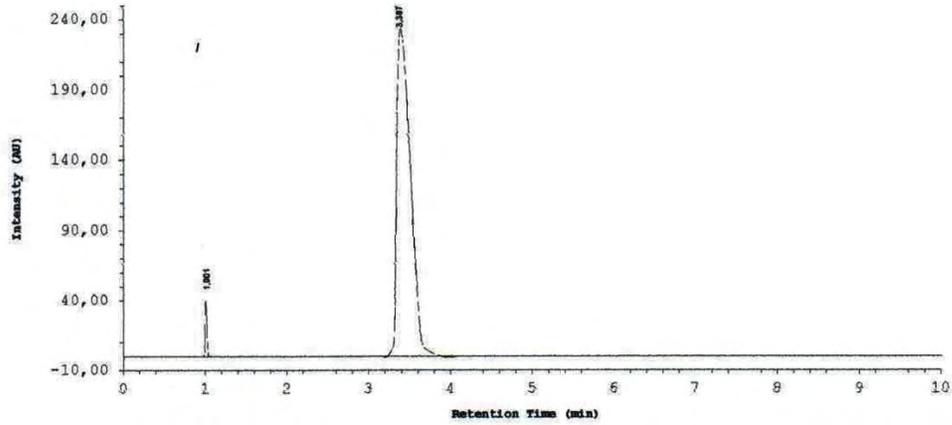
ANEXO G. CROMATOGRAMA HIDROLISIS NEUTRA SOBRE MUESTRAS VITAMINA C INYECTABLE

Analyzed: 11/02/11
 Data Path: C:\Win32App\HSM\DATA\1922\
 Processing Method: VITAMINA C
 System (acquisition): KEOPS
 Application: SELECTIVIDAD
 Sample Name: HIDROLISIS NEUTRA
 Injection from this vial: 1 of 1
 Sample Description: MUESTRAS VITAMINA C INYECTABLE

Reported: 11/02/11
 Processed: 11/02/11

Series: 1922
 Vial Number: 3
 Vial Type: UNK
 Volume: 20uL

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: VITAMINA C
 Method Description SELECTIVIDAD

Name	RT (min)	Area	Conc 1 Other	No.
	1,003	226,713	100,000%	1
VITAMINA C	3,387	1205,732	99,421%	1
		1432,445		

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
1,003		477,19	0,96	4570	---	---	---	---
3,387	VITAMINA C	416,56	1,06	4408	---	---	---	---

Asymmetry warning outside the range of: 0,800 to 2,000
 No. of theoretical plates warning at less: 1000
 Resolution warning at less than: 2,000
 Signal to noise ratio warning at less than: 3

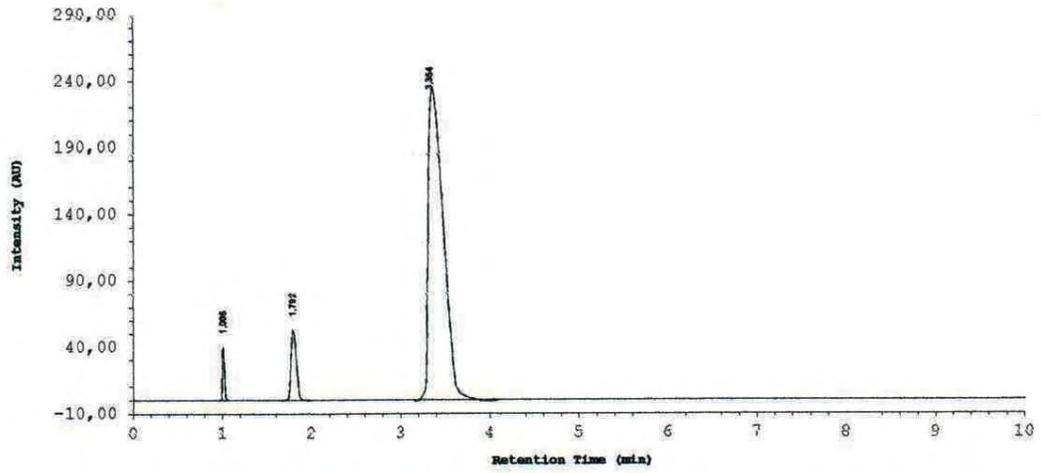
ANEXO H. CROMATOGRAMA HIDROLISIS ACIDA SOBRE MUESTRAS VITAMINA C INYECTABLE

Analyzed: 11/02/11
 Data Path: C:\Win32App\HSM\DATA\1922\
 Processing Method: VITAMINA C
 System (acquisition): KEOPS
 Application: SELECTIVIDAD
 Sample Name: HIDRÓLISIS ACIDA
 Injection from this vial: 1 of 1
 Sample Description: MUESTRAS VITAMINA C INYECTABLE

Reported: 11/02/11
 Processed: 11/02/11

Series: 1922
 Vial Number: 4
 Vial Type: UNK
 Volume: 20uL

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: VITAMINA C
 Method Description SELECTIVIDAD

Name	RT (min)	Area	Conc 1 Other	No.
	1,006	234,812	100,000%	1
	1,792	162,381	100,000%	2
VITAMINA C	3,354	1204,810	99,412%	3
		1602,003		

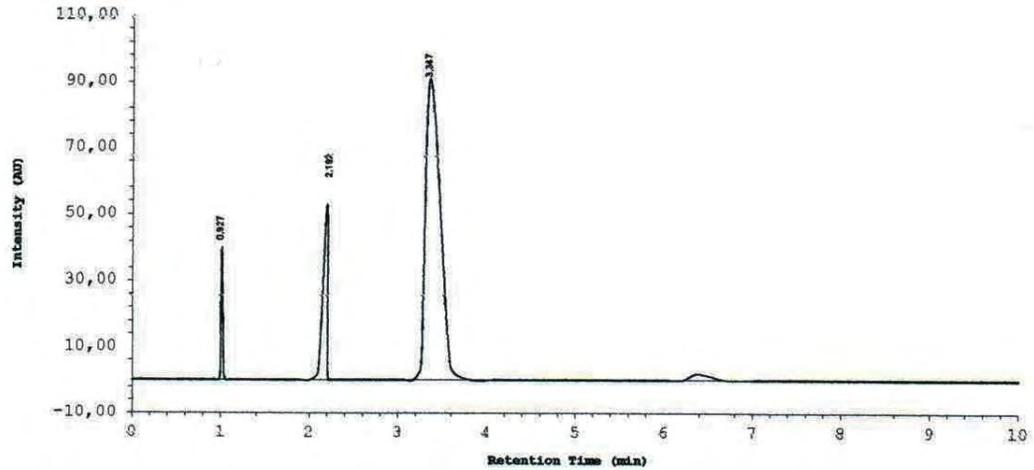
Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
1,006		429,27	1,03	4439	---	---	---	---
1,792		334,34	1,10	3663	---	---	---	---
3,354	VITAMINA C	489,17	1,02	4990	---	---	---	---

Asymmetry warning outside the range of: 0,800 to 2,000
 No. of theoretical plates warning at less: 1000
 Resolution warning at less than: 2,000
 Signal to noise ratio warning at less than: 3

ANEXO I. CROMATOGRAMA HIDRÓLISIS ALCALINA SOBRE MUESTRAS VITAMINA C INYECTABLE

Analyzed: 11/02/11
 Data Path: C:\Win32App\HSM\DATA\1922\
 Processing Method: VITAMINA C
 System (acquisition): KEOPS
 Application: SELECTIVIDAD
 Sample Name: HIDRÓLISIS ALCALINA
 Injection from this vial: 1 of 1
 Sample Description: MUESTRAS VITAMINA C INYECTABLE
 Reported: 11/02/11
 Processed: 11/02/11
 Series: 1922
 Vial Number: 5
 Vial Type: UNK
 Volume: 20uL
 Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: VITAMINA C
 Method Description: SELECTIVIDAD

Name	RT (min)	Area	Conc 1 Other	No.
	1,006	147,251	100,000%	1
	2,192	296,135	100,000%	2
VITAMINA C	3,347	468,392	38,712%	3
		911,778		

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
1,006		423,28	1,18	4995	---	---	---	---
2,192		352,48	1,06	3720	---	---	---	---
3,347	VITAMINA C	366,61	0,99	3648	---	---	---	---

Asymmetry warning outside the range of: 0,800 to 2,000
 No. of theoretical plates warning at less: 1000
 Resolution warning at less than: 2,000
 Signal to noise ratio warning at less than: 3

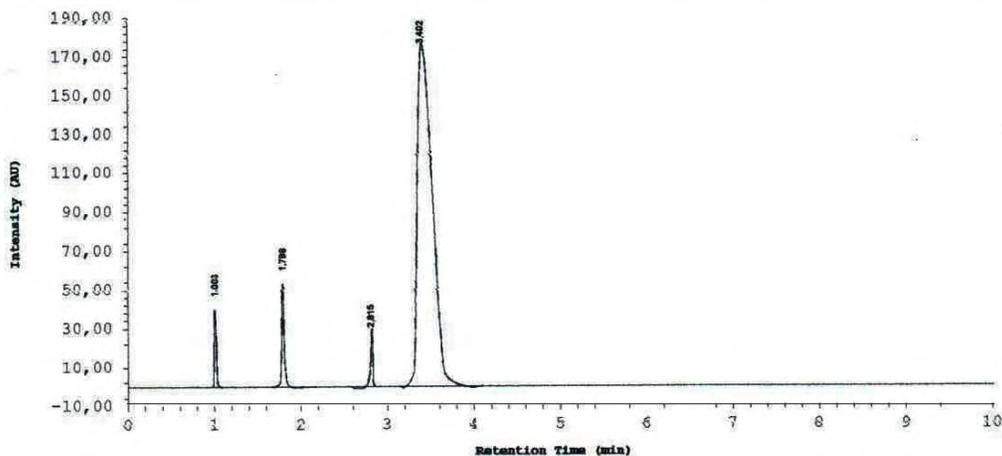
ANEXO J. CROMATOGRAMA OXIDACIÓN SOBRE MUESTRAS VITAMINA C INYECTABLE.

Analyzed: 11/02/11
 Data Path: C:\Win32App\HSM\DATA\1922\
 Processing Method: VITAMINA C
 System (acquisition): KEOPS
 Application: SELECTIVIDAD
 Sample Name: OXIDACION
 Injection from this vial: 1 of 1
 Sample Description: MUESTRAS VITAMINA C INYECTABLE

Reported: 11/02/11
 Processed: 11/02/11

Series: 1922
 Vial Number: 6
 Vial Type: UNK
 Volume: 20uL

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: VITAMINA C
 Method Description: SELECTIVIDAD

Name	RT (min)	Area	Conc 1 Other	No.
	1,003	232,707	100,000%	1
	1,788	167,933	100,000%	2
	2,815	152,966	100,000%	3
VITAMINA C	3,402	2257,576	75,102%	4
		2257,576		

Peak rejection level: 0

RT (min)	Name	k'	Asym	N (USP)	Res (USP)	Alpha	S/N	Noise (uV)
1,003		416,65	1,09	4540	---	---	---	---
1,788		419,97	1,11	4642	---	---	---	---
2,815		413,99	0,96	3983	---	---	---	---
3,402	VITAMINA C	341,66	1,14	3902	---	---	---	---

Asymmetry warning outside the range of: 0,800 to 2,000
 No. of theoretical plates warning at less: 1000
 Resolution warning at less than: 2,000
 Signal to noise ratio warning at less than: 3