

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

3.2.P.5.3 Reporte de validación del ensayo del contenido de Calcio en Ketosteril tabletas recubiertas

Tabla de contenidos

3.2.P.5.3	Reporten de validación del ensayo del contenido de Calcio en Ketosteril tabletas recubiertas	1
1.	Objetivo	3
2.	Definiciones y abreviaciones	3
3.	Referencias	3
4.	Resultados	3
4.1	descripción de la fórmula	3
4.2	Método	5
4.3	Parámetros de validación	7
4.4	Análisis de resultados	15

Tabla de tablas

Tabla 3.2.P.5.3-1	Composición de los núcleos	4
Tabla 3.2.P.5.3-2	Composición de la película de recubierta	5
Tabla 3.2.P.5.3-3	Eq. n° 5120-II-0037	8
Tabla 3.2.P.5.3-4	Estadísticas de regresión	10
Tabla 3.2.P.5.3-5	ANOVA	10
Tabla 3.2.P.5.3-6	Datos estadísticos	10
Tabla 3.2.P.5.3-7	Salida de residuo	11
Tabla 3.2.P.5.3-8	Eq. n° 5120-II-0037	11
Tabla 3.2.P.5.3-9	Ensayo de Calcio (%)	12
Tabla 3.2.P.5.3-10	Ensayo de calcio (mg/tableta)	12
Tabla 3.2.P.5.3-11	Ensayo de Calcio	13
Tabla 3.2.P.5.3-12	Estabilidad de solución muestra	14
Tabla 3.2.P.5.3-13	Variación de temperatura del baño de agua	14

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Tabla 3.2.P.5.3-14	Variación del período de extracción	15
Tabla 3.2.P.5.3-15	Variación del lote de electrodo de Cobre	15

Tabla de Figuras

Figura 3.2.P.5.3-1	Vol. EDTA 0.1 M – Vol. CuSO ₄ vs. concentración de calcio (%)	9
Figura 3.2.P.5.3-2	Concentración de Calcio (%) gráfico residual	9

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

1. Objetivo

Presentar los resultados obtenidos en la validación del método analítico para la determinación cuantitativa de calcio por titulación potenciométrica en tabletas de Ketosteril.

2. Definiciones y abreviaciones

RSD - Desviación estándar relativa
EP - Farmacopea Europea

3. Referencias

ICH-Q2(R1) – Guía de la validación de procedimientos analíticos: Texto y resolución de la metodología RE n. 899 del 29 de Mayo de 2003 de la Agencia Sanitaria Brasileira de Vigilancia.

4. Resultados

4.1 Descripción de la fórmula

4.1.1 Sustancia activa

Aminoácidos, Ceto-ácidos e Hidroxiácidos.

4.1.2 Forma farmacéutica

Tabletas recubiertas.

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

4.1.3 Formulación

Tabla 3.2.P.5.3-1 Composición de los núcleos

Componentes	Cantidad por unidad (mg)
Alfa-cetoisoleucina, calcio**	67,0**
Alfa-cetoleucina, calcio**	101,0**
Alfa-cetofenilalanina, calcio**	68,0**
Alfa-cetovalina, calcio**	86,0**
Alfa-hidroximetionina, calcio**	59,0**
Alcohol isopropil*	101,666 - 108,333 0,1295 - 0,138 ml
Agua purificada*	0,001666 - 0,005
Povidona	26,3
Macrogol 6000	7,8
Acetato de L-Lisina	105,0
L-Treonina	53,0
L-Triptófano	23,0
L-Histidina	38,0
L-Tirosina	30,0
Alcohol Isopropil*	0,0375 0,0478 ml
Agua purificada*	0,0015
Povidona	16,883
Macrogol 6000	5,0
Almidón de maíz***	Máx. 44
Talco	19,6
Silica coloidal anhidro	4,40
Crospovidona	6,0
Estearato de magnesio	15,0
Total	~775

*eliminados durante el proceso;

**el contenido de agua individual es tenido en cuenta para alcanzar el 100% del contenido del ingrediente activo en cada lote;

***varía, debido a que es utilizado como agente de relleno para alcanzar un peso constante del núcleo de tableta con un contenido especificado continua de ingrediente activo.

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Tabla 3.2.P.5.3-2 Composición de la película de recubierta

Componentes	Cantidad por unidad (mg)
Alcohol isopropil*	70
	89,166 ml
Talco	9,067
Dioxido de titanio	7,40
Macrogol 6000	5,0
Agua purificada*	0,0015
Quinolina Amarilla E 104	0,72
Agua purificada*	6
Eudragit E 12,5% m/m**	47,2 (5,9 sólido)
Triacetin	0,43
Macrogol 6000	0,28
Agua purificada*	0,22
Alcohol isopropil*	2,017
	0,0025688 ml
Total	~25

*eliminado durante el proceso

**eliminado en parte durante el proceso

4.2 Método

4.2.1 Reactivos y materiales

Ácido clorhídrico 37% (Fisher Scientific, cat n° H/1200/PB17, lote: 1524353, validez: 06 de Febrero de 2018)

Solución de amonio 26% (logbook R47/16 U2, página 02, validez: 16 de Febrero de 2017)

Solución de cloruro de amonio buffer pH 10 (Logbook R46/15 U2, página 174, validez: 04 de Mayo de 2016)

Sal sódica del ácido diaminoetanotetraacético (EDTA) 0.1 M (Fisher Scientific cat. n°: J/3700/15, lote: 1548905, Validez: 17 de Abril de 2016, Factor: 0.9995)

Sulfato de cobre (II) 0.1 M solución volumétrica (Panreac, cat. n° 181271, lote: 0000688204, validez: 17 de Abril de 2016, Factor: 1.001)

Sulfato de cobre (II) 0.1 M solución volumétrica (Panreac, cat. n° 181271, lote: 0000716017, validez: 19 de Abril de 2016, Factor: 1.001)

MilliQ water, obtenido con un sistema Millipore

Filtros (VWR, cat. n° 516-0833, lote: 107888, tamaño 110mm, retención de partícula 12-15µm)

Electrodo de cobre como indicador I (Metrohm, cat. n° 6.0502.140, lote: 00796136)

Electrodo de cobre como indicador I (Metrohm, cat. n° 6.0502.140, lote: 11022855)

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Electrodo de KCl como indicador II (Metrohm, cat. n° 6.0262.100, lote: 10403977)
Alfa-cetioisoleucina de calcio estándar primario (Evonik, lote: 1427520620, validez 30 de Marzo de 2016, actividad: 88.6%)
Alfa-cetioisoleucina de calcio estándar primario (Evonik, lote: 2427830118, validez 30 de Marzo de 2016, actividad: 89.4%)
Alfa-cetioisoleucina de calcio estándar primario (Evonik, lote: 2428420410, validez 30 de Marzo de 2016, actividad: 93.9%)
Alfa-cetioisoleucina de calcio estándar primario (Evonik, lote: 3428730105, validez 30 de Marzo de 2016, actividad: 90.4%)
Alfa-hidroximetionina de calcio estándar primario (Evonik, lote: 2427930107, validez 30 de Marzo de 2016, actividad: 99.7%)
Providone (Lote: 160100627, validez: 30 de Junio de 2018)
Magrocol 6000 (Lote: 160100494, validez: 19 de Julio de 2019)
Acetato de L-Lisina (Lote: 160200008, validez: 25 de Octubre de 2018)
L-Treonina (Lote: 160200010, validez: 19 de Diciembre de 2021)
L-Triptofano (Lote: 160100200, validez: 22 de Septiembre de 2017)
L-Histidina (Lote: 160100203, validez: 22 de Abril de 2019)
L-Tirosina (Lote: 1601001493, validez: 31 de Diciembre de 2019)
Maize Starch (Lote: 150500002, validez: 28 de Febrero de 2017)
Talc (Lote: 160100099, validez: 18 de junio de 2018)
Sílice coloidal anhidra (Lote: 160100499, validez: 21 de Octubre de 2017)
Crospovidone (Lote: 160100468, validez: 28 de Octubre de 2018)
Estearato de Magnesio (Lote: 160100057, validez: 31 de Octubre de 2017)
Dióxido de Titanio (Lote: 150800228, validez: 07 de Julio de 2018)
Amarillo de Quinoleína E 104 (Lote: 150900495, validez: 23 de Julio de 2020)
Eudragit E 12.5% (Lote: 151100190, validez: 31 de enero 2018)
Triacetina (Lote: 150400580, validez: 30 de Septiembre de 2019)
Tabletas de Ketosteril (Lote: 18M4133, validez: Diciembre 2018)
Matraces volumétricos y pipetas
Embudos

4.2.2 Equipamiento

Potenciómetro Metrohm: 5120-II-0037
Bureta Metrohm: 5120-II-0229
Baño de agua: 5120-II-0454
Sistema MilliQ: 5120-II-0383
Termómetro calibrado: 2951NI7004

4.2.3 Solución Prueba

Se pesaron 10 tabletas (cerca de 8000 mg) de ketosteril y se transfirieron a un matraz volumétrico de 500 ml. Se agregaron 50 ml de HCl 37% y la solución se calentó a 65°C en in baño de agua durante 30 minutos. Luego del enfriamiento, se completó el volumen con agua. La solución fue mezclada y filtrada. A 30 ml de filtrado se agregaron 10 ml de solución de amonio 26% y 3 ml de solución buffer de cloruro de amonio pH 10. Luego de la adición de 25 ml de EDTA 0.1 M, el exceso es titulado de nuevo con sulfato de cobre

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

0.1 M. El punto final de la titulación fue determinado por potenciometría, utilizando un electrodo de cobre como indicador I y un electrodo de KCl fue indicador II.

El porcentaje de calcio se calcula utilizando la siguiente fórmula, tomando en consideración la masa de las tabletas, el factor de dilución y el valor nominal de calcio en la muestra (49.7 mg Ca^{2+} / tableta).

$$\% \text{Ca}^{2+} = \frac{(V_{\text{EDTA agregado}} - V_{\text{CuSO}_4 \text{ agregado}}) \times 4.008}{m\text{Ca}^{2+}_{\text{titulado}}} \times 100$$

1 ml de EDTA 0.1 M es equivalente a 4.008 mg de Ca^{2+} .

4.3 Parámetros de validación

4.3.1 Selectividad

La solución placebo no interfiere en la cuantificación de calcio.

4.3.2 Linealidad de alto rango

Criterio de aceptación: $r \geq 0.99$

Los residuos deben tener una distribución aleatoria y el intervalo de confianza de 95% o 99% para el término intercepto debe contener un cero.

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Tabla 3.2.P.5.3-3 Eq. n° 5120-II-0037

Level (%)	Calcium concentration (%)	V _{CuSO₄} 0,1 M consumed (mL)	V _{EDTA} - V _{CuSO₄} (mL)
80	80,070	19,308	5,660
		19,246	5,722
		19,245	5,723
	Average	19,266	5,702
	RSD	0,2%	0,6%
90	90,081	18,493	6,476
		18,532	6,437
		18,487	6,482
	Average	18,504	6,465
	RSD	0,1%	0,4%
100	100,087	17,744	7,226
		17,721	7,249
		17,756	7,214
	Average	17,740	7,229
	RSD	0,1%	0,3%
110	110,088	17,085	7,885
		17,170	7,800
		17,205	7,765
	Average	17,153	7,817
	RSD	0,4%	0,8%
120	120,121	16,221	8,750
		16,384	8,587
		16,378	8,593
	Average	16,328	8,644
	RSD	0,6%	1,1%

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Figura 3.2.P.5.3-1 Vol. EDTA 0.1 M - Vol. CuSO₄ vs. concentración de calcio (%)

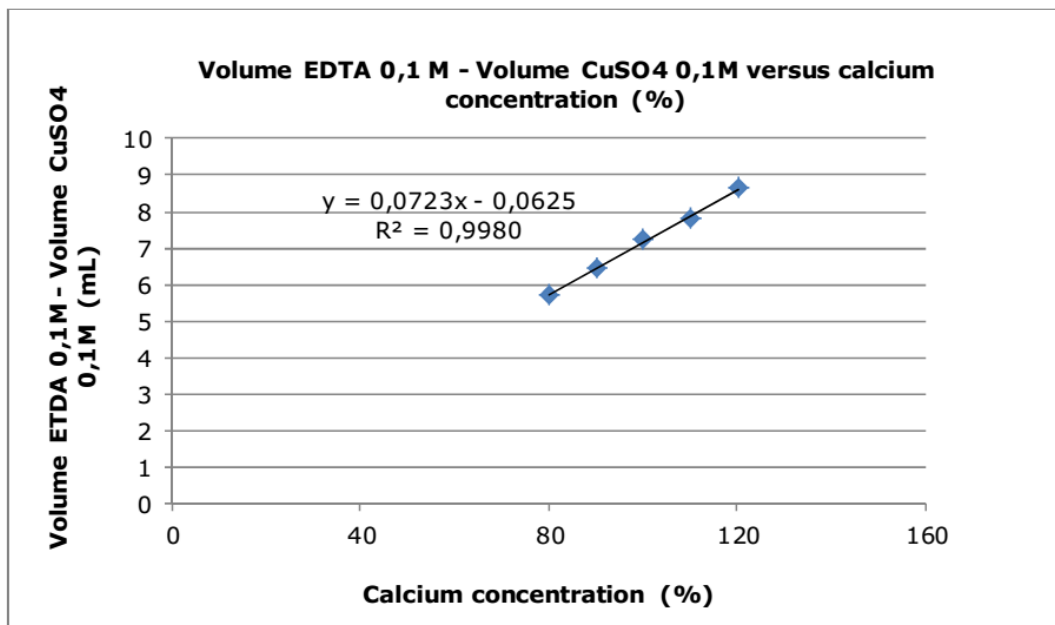
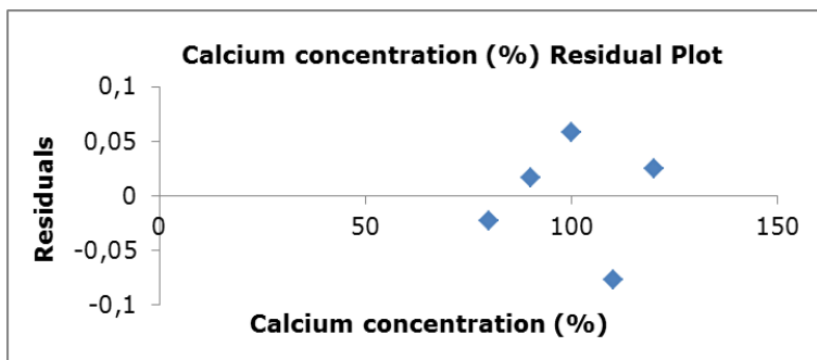


Figura 3.2.P.5.3-2 Concentración de calcio (%) gráfico residual



Ecuación de la regresión lineal ($y = 0.0723x - 0.0625$)

$m = 0.0723$

$b = -0.0625$

$r = 0.9990$

kipdips 195,237/2.0

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Tabla 3.2.P.5.3-4 Estadísticas de regresión

Regression Statistics	
Multiple R	0,998978755
R Square	0,997958552
Adjusted R Square	0,997278069
Standard Error	0,059746279
Observations	5

Tabla 3.2.P.5.3-5 ANOVA

ANOVA					
	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	5,235005748	5,235005748	1466,545129	3,91708E-05
Residual	3	0,010708854	0,003569618		
Total	4	5,245714602			

Tabla 3.2.P.5.3-6 Datos estadísticos

	Intercept	Calcium concentration (%)
Coefficients	-0,06246554	0,072273691
Standard Error	0,190775529	0,001887263
t Stat	-0,327429518	38,2954975
P-value	0,764860923	3,91708E-05
Lower 95%	-0,669598418	0,066267577
Upper 95%	0,544667338	0,078279806
Lower 95,0%	-0,669598418	0,066267577
Upper 95,0%	0,544667338	0,078279806

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Tabla 3.2.P.5.3-7 Salida de residuo

Observation	Predicted VEDTA-V CuSO ₄ (ml)	Residuals
1	5,724473612	-0,022573278
2	6,448015738	0,016980262
3	7,171202382	0,058223951
4	7,89400392	-0,076990586
5	8,619146016	0,024359651

Los residuos tienen una distribución aleatoria y el intervalo de confianza de 95% para el término intercepto contiene un cero.

4.3.3 Exactitud

Criterio de aceptación: El porcentaje de recupero debe estar dentro del intervalo 95.0% y 105.0%.

La RSD entre los resultados para 3 determinaciones de cada nivel debe ser menor o igual a 3.0%.

Tabla 3.2.P.5.3-8 Eq. n° 5120-II-0037

Level (%)	Theoretical concentration (%)	Experimental concentration (%)	Recovery (%)
80	80,091	80,355	100,329
	80,084	81,034	101,187
	80,088	80,947	101,073
Mean (%)			100,863
RSD (%)			0,462
100	100,126	99,709	99,583
	100,109	98,935	98,827
	100,100	98,336	98,238
Mean (%)			98,883
RSD (%)			0,682
120	120,130	116,298	96,809
	119,880	113,903	95,014
	119,951	114,098	95,120
Mean (%)			95,648
RSD (%)			1,053

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

4.3.4 Precisión

4.3.4.1 Precisión intermedia

Criterio de aceptación: RSD para las mediciones de cada analista no debe ser mayor a 3.0%.

RSD entre las mediciones de los dos analistas no debe ser mayor a 3.5%.

Las medias entre los dos analistas no deben ser estadísticamente diferentes (*Prueba t*).

Tabla 3.2.P.5.3-9 Ensayo de Calcio (%)

Sample	Analyst 1: VG Date: 17 Feb. 2016 Calcium Assay (%)	Analyst 2: MC Date: 19 Feb. 2016 Calcium Assay (%)
A1	100,315	101,266
A2	100,392	98,007
A3	100,531	98,302
A4	101,516	100,059
A5	100,270	99,780
A6	99,411	100,168
Average (%)	100,4	99,6
RSD (%)	0,7	1,2

Tabla 3.2.P.5.3-10 Ensayo de Calcio (mg/tableta)

Sample	Analyst 1: VG Date: 17 Feb. 2016 Calcium Assay (mg/tablet)	Analyst 2: MC Date: 19 Feb. 2016 Calcium Assay (mg/tablet)
A1	49,9	50,3
A2	49,9	48,7
A3	50,0	48,9
A4	50,5	49,7
A5	49,8	49,6
A6	49,4	49,8
Average (%)	49,9	49,5
RSD (%)	0,7	1,2

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Media entre analistas: **100.0% (49.7 mg/tableta)**

RSD entre analistas: **1.0%**

Prueba t

t Stat = 1.362827

t crítico dos colas = 2.570582

t Stat $\leq$ T Crítico dos colas, las medias no son estadísticamente diferentes.

4.3.4.2 Repetitividad

Criterio de aceptación: RSD para las 6 mediciones no deben ser mayor a 3.0%.

Tabla 3.2.P.5.3-11 Ensayo de Calcio

Sample	Calcium Assay (%)	Calcium Assay (mg/tablet)
A1	100,315	49,9
A2	100,392	49,9
A3	100,531	50,0
A4	101,516	50,5
A5	100,270	49,8
A6	99,411	49,4
Average (%)	100,4	49,9
RSD (%)	0,7	0,7

4.3.5 Robustez

4.3.5.1 Estabilidad de la solución muestra

Criterio de aceptación: La solución muestra se considera estable si la RSD entre el ensayo de Calcio es menor a 2.5% en el período probado.

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Tabla 3.2.P.5.3-12 Estabilidad de la solución muestra

Time point	Calcium assay (%)
0 hour	99,244
1 hour	99,404
2 hours	98,266
Average (0–2 hours)	98,755
RSD (0–2 hours)	0,7%
Comment	The sample solution is stable during two hours after preparation.

4.3.5.2 Variación de la temperatura del baño de agua

La temperatura del baño de agua fue modificada en el rango de 60°C a 70°C (65°C $\pm$ 5°C), determinando su influencia en el ensayo de Ca²⁺ cuando se compara con las condiciones del método original.

Tabla 3.2.P.5.3-13 Variación de la temperatura del baño de agua

Variation of water-bath temperature	65°C (Method conditions)	60°C (65°C - 5°C)	70°C (65°C + 5°C)
Calcium assay (%)	99,244	100,557	99,000
Comment:	-----	Not Critical: slight increase of calcium assay within expected analysis variation.	Not Critical: slight decrease of calcium assay within expected analysis variation.

4.3.5.3 Variación del período de extracción

El período de extracción fue modificado en el rango de 25 minutos a 35 minutos (30 min $\pm$ 5 min), determinando su influencia en el ensayo de Ca²⁺ cuando se compara con las condiciones del método original.

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

Tabla 3.2.P.5.3-14 Variación del período de extracción

Variation of extracting period	30 min. (Method conditions)	25 min. (30 min. – 5min.)	35 min. (30 min. + 5min.)
Calcium assay (%)	99,244	96,738	97,825
Comment:	-----	Critical: decrease of calcium assay (more than 2%). The extracting period have influence in the calcium assay.	Not Critical: slight decrease of calcium assay within expected analysis variation.

4.3.5.4 Variación del lote del electrodo de cobre

El lote de electrodo fue modificado, determinando su influencia en el ensayo de Ca^{2+} cuando se compara con las condiciones del método original.

Tabla 3.2.P.5.3-15 Variación del lote del electrodo de cobre

Variation of Copper electrode batch	Copper electrode batch 00796136	Copper electrode batch 11022855
Calcium assay (%)	99,244	98,721
Comment:	-----	Not Critical: slight decrease of calcium assay within expected analysis variation.

4.4 Análisis de los resultados

4.4.1 Determinación de Calcio

El método es selectivo y lineal en el rango de 80% a 120%.

El porcentaje de recupero medio obtenido en la prueba de exactitud es 100.9%, 98.0% y 95.6% para los niveles 80, 100 y 120% respectivamente.

Con respecto a la prueba de precisión intermedia, la media y la RSD entre los resultados de los dos analistas son respectivamente 100.0% y 1.0%. Los resultados medios no son estadísticamente diferentes.

3.2.P.5.3 Validación de procedimientos analíticos (Ketosteril, tabletas recubiertas)

4.4.2 Robustez

Las pruebas de robustez demuestran que las modificaciones de la temperatura del baño de agua y del lote del electrodo de cobre no son críticas comparadas con las condiciones del método original. Los resultados obtenidos con un período de extracción de 25 minutos muestran una valoración de calcio inferior a las condiciones originales del método de 2.5%, significando que los 25 minutos no son suficientes para extraer el calcio de la matriz de tabletas. El período de extracción debe ser rigurosamente controlado.

La solución muestra es estable durante 2 horas luego de la preparación.

4.4.3 Conclusión

El método de valoración de calcio por titulación potenciométrica es selectivo, lineal, preciso, exacto y robusto, por lo tanto válido para realizar la determinación de calcio en tabletas de Ketosteril.