

Unidad de Control de Calidad de Productos Farmacéuticos
Facultad de Farmacia Universidad de Coimbra
Polo de Ciencias de la Salud
Azenhaga de Santa Comba 3000-548 Coimbra
Tel. +351 239488438
Ucqfarma@ff.uc.pt



**Reporte para la validación de la prueba de disolución y determinación de calcio en
Ketosteril® Tabletas**

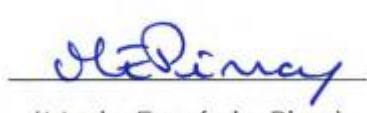
Cliente: Labesfal – Fresenius Kabi

Inicio: 07/05/2010

Fin: 21/05/2010

Código: RGRVM_10011.1

Reporte de validación

Analyst  (Rui Manadas)	Technical Director  (Maria Eugénia Pina)
---	--

Fecha de validación: 01/10/2010

1. Objetivo

El propósito de este estudio es llevar a cabo la validación de la prueba de disolución de Ketosteril® tabletas mediante la determinación de liberación de calcio con espectrometría de absorción atómica.

2. Tabla de contenidos

1.	Objetivos	2
2.	Tabla de contenidos	2
3.	Definiciones y abreviaciones	3
4.	Referencias	3
5.	Descripción de fórmula	3
5.1	Forma farmacéutica	3
5.2	Formulación	3
5.3	Principios activos	4
6.	Método	6
6.1	Reactivos y materiales	6
6.2	Equipamiento	6
6.3	Condiciones de prueba	6
6.4	Soluciones stock estándar	7
6.5	Preparación de muestra	7
6.6	Solución blanco	7
6.7	Muestras placebo	7
7.	Parámetros de validación	7
7.1	Linealidad y rango	7
7.2	Precisión	15
7.2.1	Repetibilidad	15
7.2.2	Precisión intermedia	15
7.3	Selectividad	15
7.4	Exactitud	16
8.	Conclusiones	16
9.	Historial	16

3. Definiciones y abreviaciones

AAS: espectroscopía de absorción atómica

RSD: desviación estándar relativa

SD: desviación estándar

4. Referencias

PA077 – Protocolo para la validación de la prueba de disolución de Ketosteril® (procedimiento interno)

PQVAL – Procedimiento para la validación de métodos analíticos (procedimiento interno)

5. Descripción de fórmula

5.1 Forma farmacéutica

Tabletas recubiertas.

5.2 Formulación

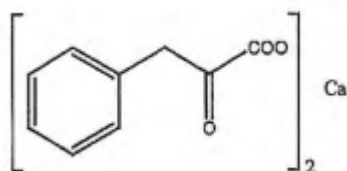
Composición	Unidad (mg)
Núcleo	
Alfa cetoisoleucina, calcio	67.0
Alfa cetoleucina, calcio	101.0
Alfa cetofenilalanina, calcio	68.0
Alfa cetovalina, calcio	86.0
Alfa hidroximetionina, calcio	59.0
Isopropil alcohol	101.666-108.333
Agua purificada	0.0016666-0.005
Povidona	26.3
Macrogol 6000	7.80
Acetato de L-lisina	105.0

L-treonina	53.0
L-triptofano	23.0
L-histidina	38.0
L-tirosina	30.0
Isopropil alcohol	0.0375
Agua purificada	0.0015
Povidona	16.883
Macrogol 6000	5.0
Almidón de maíz	44.00
Talco	19.6
Sílica coloidal anhidra	4.40
Crospovidona	6.00
Estearato de magnesio	15.00
Recubrimiento	
Isopropil alcohol	70
Talco	9.07
Dióxido de titanio	7.40
Macrogol 6000	1.20
Agua purificada	1.2
Amarillo de quinoleína E 104	0.72
Agua purificada	6
Eudragit E 12.5% m/m	5.90
Triacetina	0.43
Macrogol 6000	0.28
Agua purificada	0.22
Isopropil alcohol	2.017

5.3 Principios activos

i) alfa-cetofenilalanina, sal de calcio

Estructura:



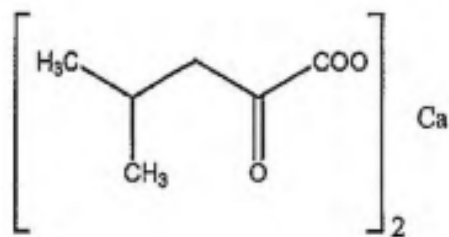
Nº CAS: 51828-93-4

Fórmula molecular: $C_{18}H_{14}O_6Ca$

Masa molecular: 366.4

ii) alfa-cetoleucina, sal de calcio

Estructura:



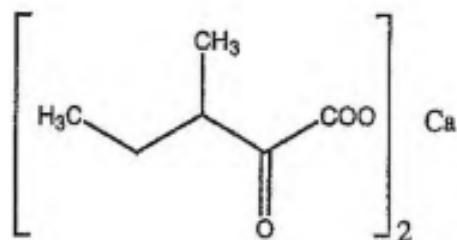
Nº CAS: 51828-95-6

Fórmula molecular: $C_{12}H_{18}O_6Ca$

Masa molecular: 298.4

iii) Alfa-cetoisoleucina, sal de calcio

Estructura:



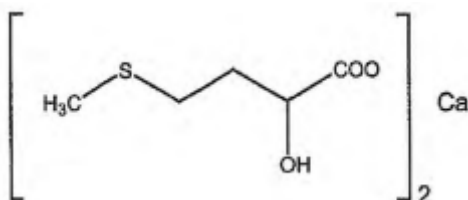
Nº CAS: 51828-96-7

Fórmula molecular: $C_{12}H_{18}O_6Ca$

Masa molecular: 298.4

iv) Alfa-hidroxi metionina, sal de calcio

Estructura:



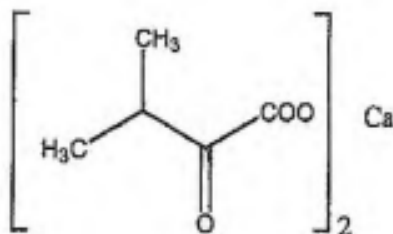
Nº CAS: 4857-44-7

Fórmula molecular: $C_{10}H_{18}O_6S_2Ca$

Masa molecular: 338.45

v) Alfa-cetovalina, sal de calcio

Estructura:



Nº CAS: 51828-94-5

Fórmula molecular: $C_{10}H_{14}O_6Ca$

Masa molecular: 270.3

6. Método**6.1 Reactivos y materiales**

- Estándar de calcio para AAS (equivalente a 1000 mg de Ca/L):
 - o Estándar para curva de calibración: Merck, cat. nº 1.19778.0500, lote nº HC961410
 - o Estándar para control de calidad: SPC Science, cat nº 140-001-205, lote nº SC8150168

- HCl 0.1 M, preparado de HCl 37%, Merck, cat nº 1.00317.2500, lote nº K40740917
- Solución de cloruro de lantano 2%, preparada a partir de cloruro de lantano (III) heptahidratado, Merck, cat. nº 1.12219.0250, lote nº S4561319
- Agua Milli Q – Obtenida a partir de un sistema Elix 5 Millipore acoplado con un sistema de ventaja Milli Q de Millipore
- Filtros de fibra de vidrio – Whatman, GF/D, cat. nº 1823-025, lote nº K11596196
- Material de vidrio volumétrico y equipamiento calibrado

6.2 Equipamiento

- Espectrómetro de absorción atómica (AAS), de Analytic Yenna, modelo Zeenit 700, equipado con sistema de atomización de llama y autosampler AS-52S capaz de diluir estándares y muestras
- Equipamiento de dilución, de Sotax, modelo AT7 Smart, equipado con bomba de pistón (CY7-50) y colector de fracción (C613), validado de acuerdo a guías USP y BP para equipos Paddle

6.3 Condiciones de prueba

i) Pruebas de dilución

- Equipos: Paddle
- Medio de disolución: 900 mL de HCl 0.1 M
- Velocidad de rotación: 100 rpm
- Temperatura: 37 ± 0.5 °C
- Número de muestras: 6 unidades
- Tiempo de muestreo: 40 minutos
- Volumen de muestreo: 2 mL

ii) Condiciones AAS

Las condiciones AAS fueron optimizadas para obtener el mejor desempeño.

- Tipo de lámpara: HCl
- Línea: 422.7 nm
- Rendija: 1.2 nm
- Corriente de lámpara: 4.0 mA
- Tiempo de integración: 3.0 s
- PMT: 249.0 V
- Corriente D2-HCl: 19.0
- Modo analítico: haz simple
- Llama: C₂H₂/N₂O
- Flujo de combustible: 185 L/h
- Altura de quemador: 8 mm
- Velocidad de nebulizador: 5.0 mL/min

6.4 Soluciones stock estándar

La Solución Stock Estándar 1 (**SS1**) fue preparada utilizando estándar de calcio 1000 mg/L para alcanzar una concentración de 50 mg/L: 10 mL de solución de cloruro de lantano 2% más 5 mL de solución estándar de calcio 1000 ppm diluida con HCl 0.1 M a 100 mL.

La Solución Stock Estándar 2 (**SS2**) fue preparada a partir de **SS1** para alcanzar una concentración de 5 mg/L de calcio: 10 mL de solución de cloruro de lantano 2% más 10 mL de calcio SS1 diluido con HCl 0.1 M a 100 mL.

AAS fue programado para diluir **SS2** y trazar una curva de calibración con las siguientes concentraciones: 0.2 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L, 1.5 mg/L, 2 mg/L y 2.5 mg/L de calcio, correspondiendo, respectivamente, a aproximadamente 10%, 25%, 50%, 75%, 100% y 125% de la concentración esperada en el recipiente de disolución.

6.5 Preparación de muestra

Cada tableta fue pesada y las 6 tabletas fueron sumergidas en contenedores de disolución, luego de que el medio de disolución alcanzara temperatura adecuada. Luego de 40 minutos, una muestra de 2 mL de medio de disolución fue tomada por el colector de fracción. Las muestras fueron automáticamente filtradas por el sistema.

Muestras a ser analizadas por el AAS fueron preparadas en viales AAS según:

Colocar 1.0 mL de solución de cloruro de lantano (2%), 0.4 mL de muestra tomada del recipiente de disolución y 10 mL de HCl 0.1 M.

6.6 Solución blanco

Solución blanco para AAS fue preparada diluyendo 10 mL de solución de cloruro de lantano 2% a 100 mL con HCl 0.1 M.

6.7 Muestras placebo

Solución placebo para Ketosteril® tabletas recubiertas fue preparada pesando cada ingrediente, excepto los cinco principios activos, mezclándolos, pensando las correspondientes cantidades de placebo para cada tableta y colocando la cantidad de un recipiente de disolución. Las muestras placebo fueron provistas por Labesfal, Fresenius Kabi.

Las muestras placebo fueron preparadas como se describe en "Preparación de muestra" (6.5).

7. Parámetros de validación

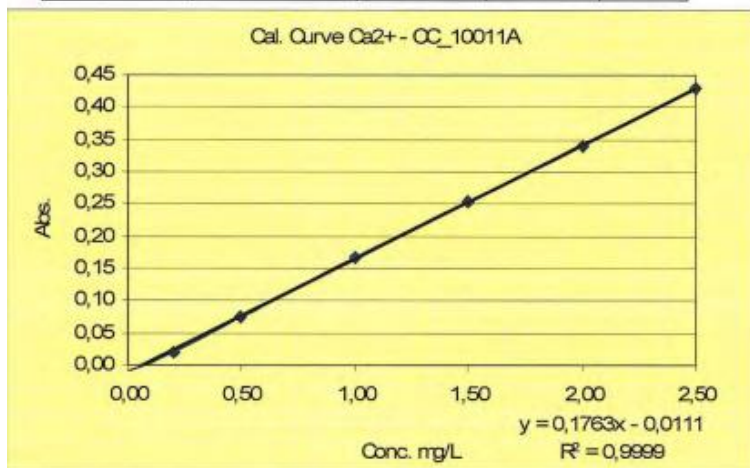
7.1 Linealidad y rango

Se estudió la linealidad del método de cuantificación en base a información del fabricante del equipamiento AAS y en las concentraciones esperadas de calcio luego de 40 minutos de disolución. Cada solución estándar fue medida 3 veces y se calculó la absorbancia promedio.

A continuación se presentan todas las curvas de calibración trazadas:

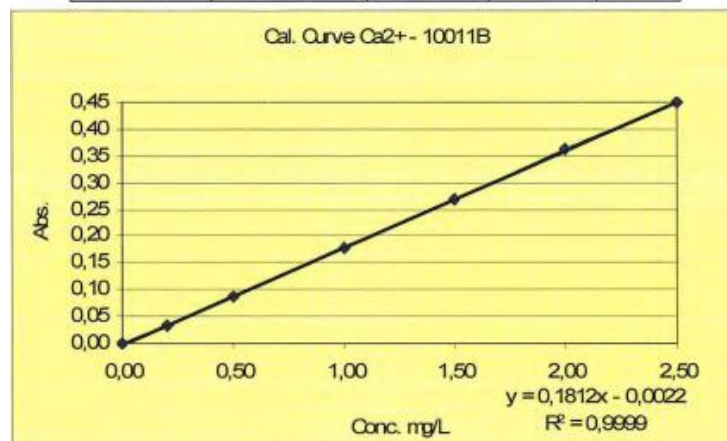
i) Curva de calibración 10011A

Standards	Conc. mg/L	Average	SD	RSD
Zero	0.0	-0,00891	0,00086	-9,7
P1	0.2	0,02135	0,00044	2,1
P2	0.5	0,07620	0,00142	1,9
P3	1.0	0,16633	0,00240	1,4
P4	1.5	0,25440	0,00121	0,5
P5	2.0	0,34140	0,00399	1,2
P6	2.5	0,42910	0,00675	1,6



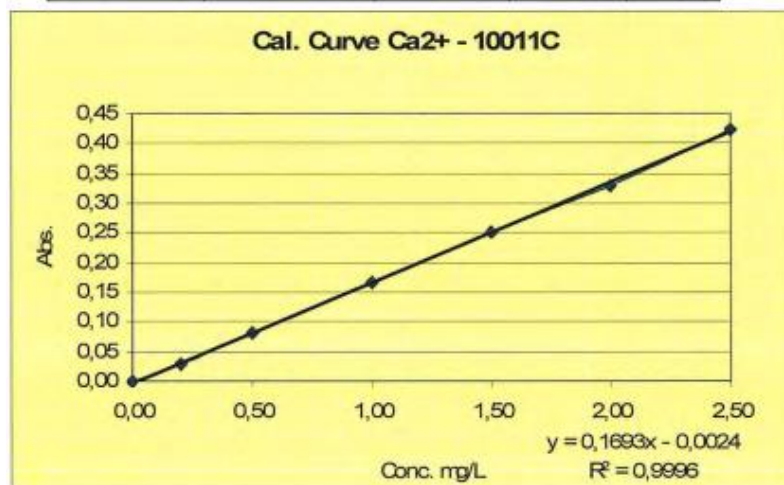
ii) Curva de calibración 10011B

Standards	Conc. mg/L	Average	SD	RSD
Zero	0.0	0,00090	0,00014	15,3
P1	0.2	0,03256	0,00007	0,2
P2	0.5	0,08778	0,00150	1,7
P3	1.0	0,17660	0,00216	1,2
P4	1.5	0,26967	0,00072	0,3
P5	2.0	0,36123	0,00046	0,1
P6	2.5	0,45107	0,00603	1,3



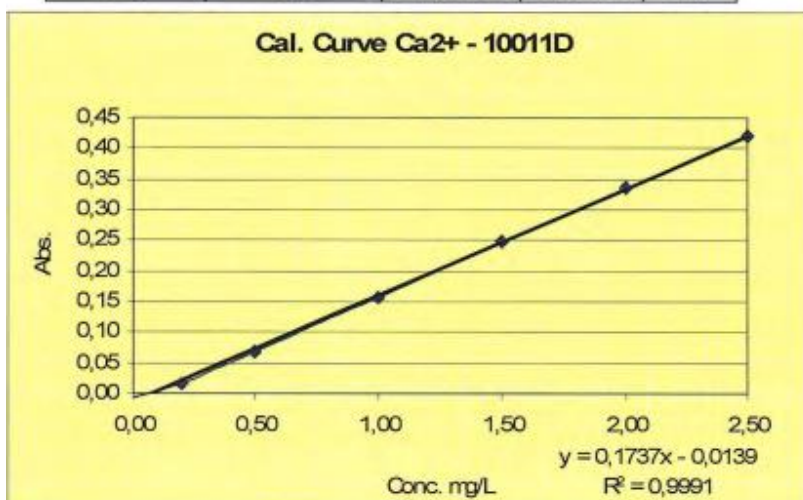
iii) Curva de calibración 10011C

Standards	Conc. mg/L	Average	SD	RSD
Zero	0.0	-0,00114	0,00021	-18,0
P1	0.2	0,03063	0,00066	2,2
P2	0.5	0,08226	0,00102	1,2
P3	1.0	0,16753	0,00244	1,5
P4	1.5	0,25177	0,00211	0,8
P5	2.0	0,33030	0,00125	0,4
P6	2.5	0,42503	0,00456	1,1



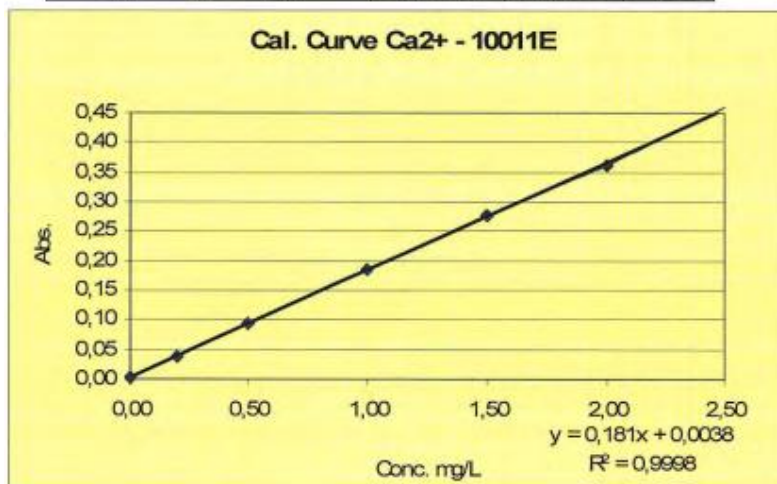
iv) Curva de calibración 10011D

Standards	Conc. mg/L	Average	SD	RSD
Zero	0.0	-0,00497	0,00044	-9,0
P1	0.2	0,01681	0,00015	0,9
P2	0.5	0,06750	0,00015	0,2
P3	1.0	0,15627	0,00473	3,0
P4	1.5	0,24867	0,00401	1,6
P5	2.0	0,33473	0,00685	2,0
P6	2.5	0,42080	0,00308	0,7



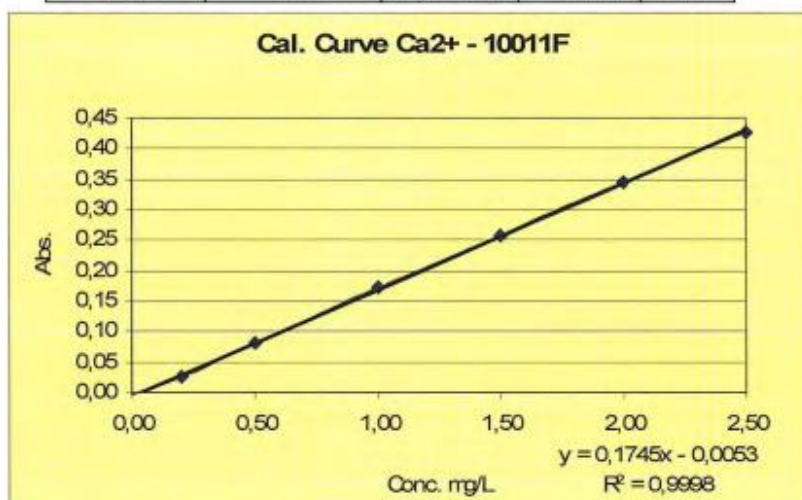
v) Curva de calibración 10011E

Standards	Conc. mg/L	Average	SD	RSD
Zero	0.0	0,00327	0,00128	39,3
P1	0.2	0,03922	0,00045	1,2
P2	0.5	0,09521	0,00075	0,8
P3	1.0	0,18680	0,00062	0,3
P4	1.5	0,27557	0,00158	0,6
P5	2.0	0,36147	0,00040	0,1
P6	2.5	0,45847	0,00233	0,5



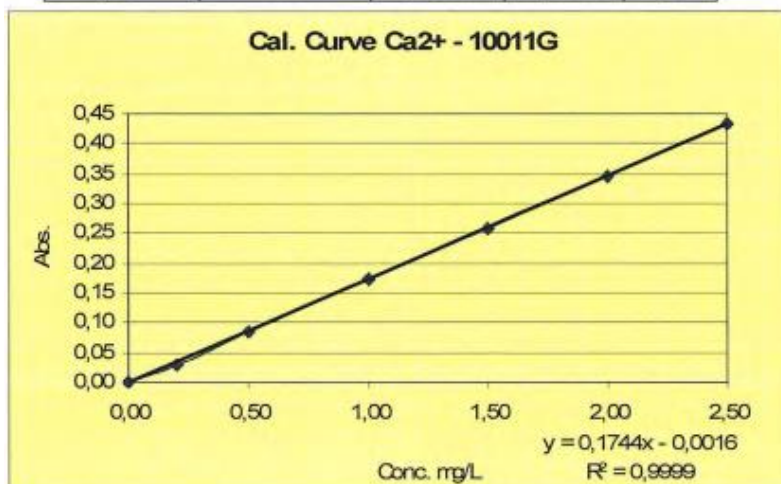
vi) Curva de calibración 10011F

Standards	Conc. mg/L	Average	SD	RSD
Zero	0.0	-0,00308	0,00021	-6,7
P1	0.2	0,02574	0,00056	2,2
P2	0.5	0,08099	0,00168	2,1
P3	1.0	0,17163	0,00099	0,6
P4	1.5	0,25720	0,00218	0,8
P5	2.0	0,34540	0,00262	0,8
P6	2.5	0,42880	0,00191	0,4



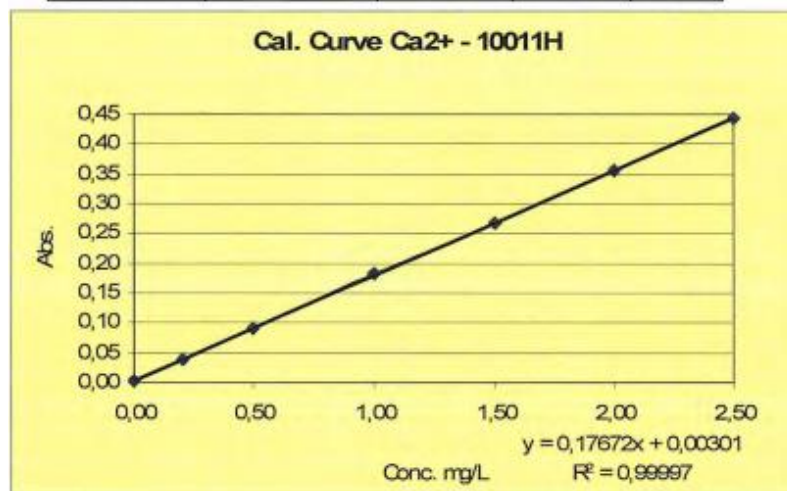
vii) Curva de calibración 10011G

Standards	Conc. mg/L	Average	SD	RSD
Zero	0.0	0,00005	0,00043	860,4
P1	0.2	0,03083	0,00053	1,7
P2	0.5	0,08627	0,00117	1,4
P3	1.0	0,17407	0,00228	1,3
P4	1.5	0,25857	0,00040	0,2
P5	2.0	0,34680	0,00255	0,7
P6	2.5	0,43507	0,00516	1,2



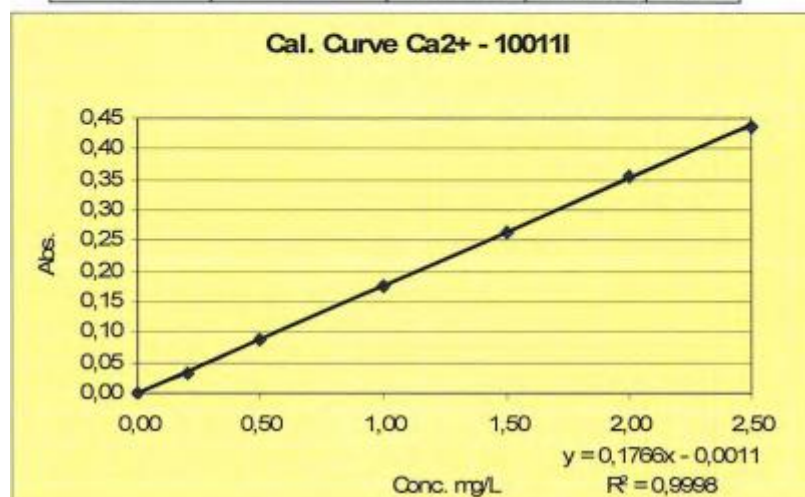
viii) Curva de calibración 10011H

Standards	Conc. mg/L	Average	SD	RSD
Zero	0.0	0,00217	0,00029	13,6
P1	0.2	0,03762	0,00036	1,0
P2	0.5	0,09209	0,00024	0,3
P3	1.0	0,18120	0,00075	0,4
P4	1.5	0,26870	0,00197	0,7
P5	2.0	0,35537	0,00424	1,2
P6	2.5	0,44460	0,00368	0,8



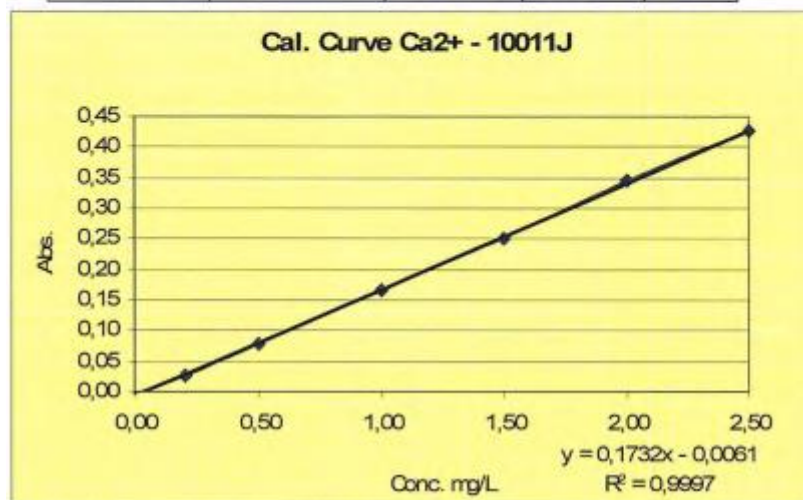
ix) Curva de calibración 10011I

Standards	Conc. mg/L	Average	SD	RSD
Zero	0.0	0,00046	0,00041	87,7
P1	0.2	0,03168	0,00023	0,7
P2	0.5	0,08642	0,00142	1,6
P3	1.0	0,17640	0,00132	0,7
P4	1.5	0,26527	0,00381	1,4
P5	2.0	0,35467	0,00575	1,6
P6	2.5	0,43780	0,00355	0,8



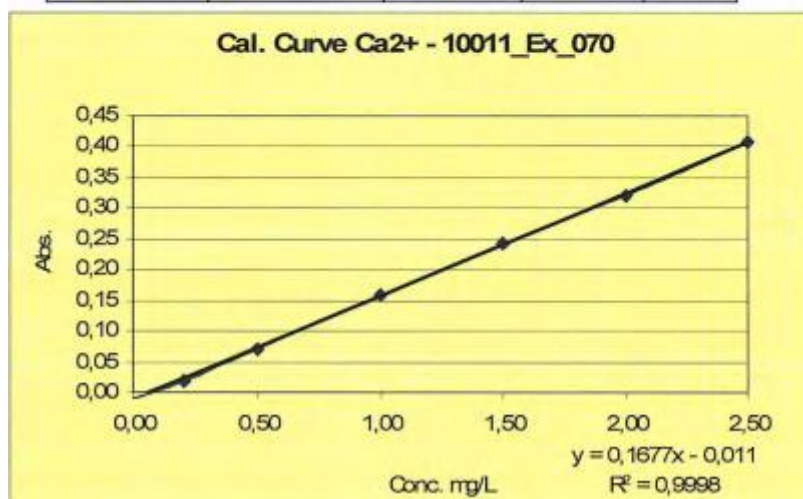
x) Curva de calibración 10011J

Standards	Conc. mg/L	Average	SD	RSD
Zero	0.0	-0,00177	0,00061	-34,5
P1	0.2	0,02554	0,00014	0,5
P2	0.5	0,07915	0,00069	0,9
P3	1.0	0,16650	0,00075	0,5
P4	1.5	0,25193	0,00182	0,7
P5	2.0	0,34413	0,00476	1,4
P6	2.5	0,42593	0,00312	0,7



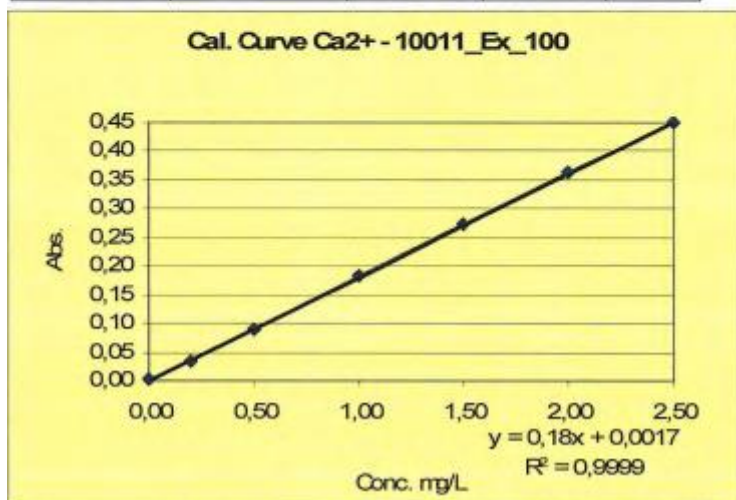
xi) Curva de calibración 10011_Ex_070

Standards	Conc. mg/L	Average	SD	RSD
Zero	0.0	-0,00997	0,00102	-10,3
P1	0.2	0,01941	0,00008	0,4
P2	0.5	0,07248	0,00108	1,5
P3	1.0	0,16007	0,00172	1,1
P4	1.5	0,24250	0,00214	0,9
P5	2.0	0,32160	0,00557	1,7
P6	2.5	0,40833	0,00239	0,6



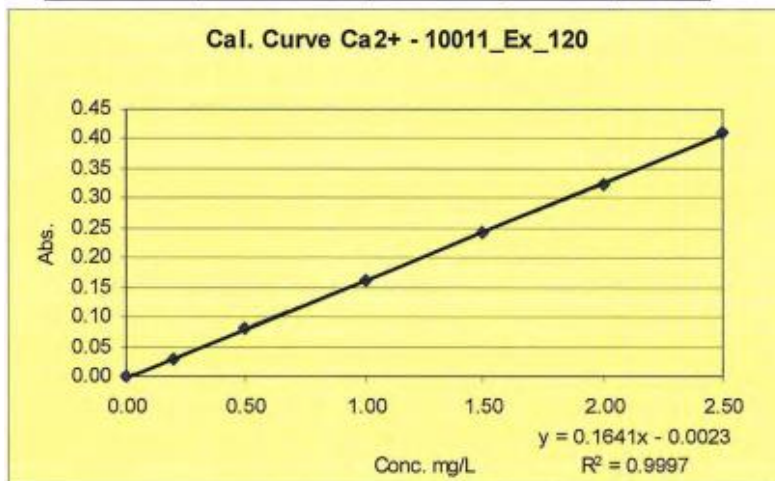
xii) Curva de calibración 10011_Ex_100

Standards	Conc. mg/L	Average	SD	RSD
Zero	0.0	0,00196	0,00006	3,2
P1	0.2	0,03583	0,00042	1,2
P2	0.5	0,09130	0,00103	1,1
P3	1.0	0,18300	0,00062	0,3
P4	1.5	0,27240	0,00304	1,1
P5	2.0	0,36410	0,00659	1,8
P6	2.5	0,44870	0,00347	0,8



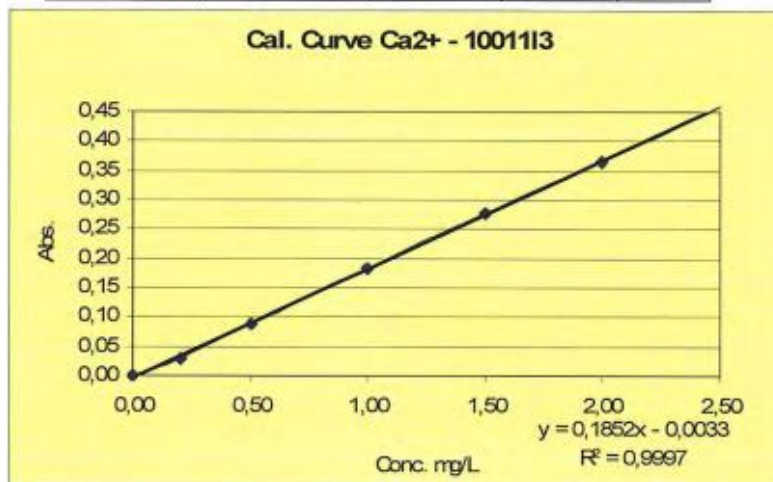
xiii) Curva de calibración 10011_Ex_120

Standards	Conc. mg/L	Average	SD	RSD
Zero	0.0	0,00110	0,00027	24,8
P1	0.2	0,02826	0,00095	3,3
P2	0.5	0,07935	0,00091	1,1
P3	1.0	0,16147	0,00107	0,7
P4	1.5	0,24363	0,00374	1,5
P5	2.0	0,32217	0,00136	0,4
P6	2.5	0,41153	0,00331	0,8



xiv) Curva de calibración 10013I3

Standards	Conc. mg/L	Average	SD	RSD
Zero	0.0	0,00002	0,00035	1717,3
P1	0.2	0,02995	0,00085	2,8
P2	0.5	0,08661	0,00148	1,7
P3	1.0	0,18403	0,00276	1,5
P4	1.5	0,27797	0,00112	0,4
P5	2.0	0,36457	0,00140	0,4
P6	2.5	0,45947	0,00356	0,8



Las curvas de calibración trazadas a lo largo del estudio revelaron buena linealidad del método – todos los $R^2 > 0.999$.

7.2 Precisión

7.2.1 Repetibilidad

La repetibilidad fue estudiada preparando 6 muestras placebo y agregando a cada una los cinco principios activos equivalentes a 100% del contenido en calcio.

Cada muestra placebo fue sometida al mismo procedimiento que la muestra (Ketosteril® tabletas).

Se determinó el contenido de calcio y los resultados obtenidos son los siguientes:

Tiempo (min)	PI-1	PI-2	PI-3	PI-4	PI-5	PI-6	Promedio	SD	RSD
40	98.3	98.7	100.1	99.5	101.5	102.3	100.1	1.6	1.6

Los resultados evidenciaron buena repetibilidad ($RSD=1.6\%$), menor a la especificada ($RSD<2.0\%$).

7.2.2 Precisión intermedia

La precisión intermedia fue estudiada analizando la misma muerta en dos días diferentes, 6 tabletas cada día, por el mismo analista.

El contenido de calcio fue determinado y los resultados obtenidos son los siguientes:

Código de muestra 10011I (% de calcio determinado)									
Día	Recip 1	Recip 2	Recip 3	Recip 4	Recip 5	Recip 6	Prom.	SD	RSD
1	98.8	99.1	94.7	97.2	91.8	95.7	96.2	2.7	2.9
2	96.9	92.4	95.0	96.7	93.7	99.6	95.7	2.6	2.7
Prom.	97.9	95.7	94.8	96.9	92.8	97.7	96.0	2.6	2.7

Los resultados evidencian buena precisión intermedia ($RSD=2.7\%$), menor que la especificada (3%).

7.3 Selectividad

La selectividad fue estudiada evaluando la interferencia de todos los ingredientes, excepto de los principios activos, en la determinación de calcio por la metodología adoptada.

Se prepararon muestras placebo de acuerdo a lo descrito en 6.7 y 6.3 i), y se analizaron de acuerdo a lo descrito en 6.3 ii).

Tiempo (min)	PI1	PI2	PI3	PI4	PI5	PI6	Prom.	SD	RSD
40	0.8	0.6	0.8	1.0	0.9	0.5	0.8	0.2	23.6

Los resultados evidencia pequeña interferencia de placebo en la determinación de calcio (<2% como especificado).

7.4 Exactitud

La exactitud fue estudiada realizando 18 determinaciones del contenido de calcio en una matriz de placebo fortificada con 3 niveles de concentración (70%, 100% y 120%), 6 muestras independientes para cada concentración, y sometidas a condiciones de disolución como las muestras. Una muestra suplementaria fue tomada y analizada a los 60 minutos.

El porcentaje recuperado fue determinado y, para cada fortificación, se evaluó el promedio y RSD.

% Recovery - fortification 70%									
Time (min.)	Vessel 1	Vessel 2	Vessel 3	Vessel 4	Vessel 5	Vessel 6	Average	SD	RSD
40	98,1	96,8	97,5	99,3	98,7	98,1	98,1	0,9	0,9
60	98,4	98,9	98,1	99,8	100,5	98,1	99,0	1,0	1,0

% Recovery - fortification 100%									
Time (min.)	Vessel 1	Vessel 2	Vessel 3	Vessel 4	Vessel 5	Vessel 6	Average	SD	RSD
40	98,3	98,7	100,1	99,5	101,5	102,3	100,1	1,6	1,6
60	99,5	101,5	99,7	100,5	101,7	104,4	101,2	1,8	1,8

% Recovery - fortification 120%									
Time (min.)	Vessel 1	Vessel 2	Vessel 3	Vessel 4	Vessel 5	Vessel 6	Average	SD	RSD
40	99,4	100,7	101,8	99,9	100,5	101,3	100,6	0,9	0,9
60	99,4	101,9	103,0	101,9	101,5	100,7	101,4	1,2	1,2

Luego de 40 minutos y 60 minutos de tiempo de disolución, todas las muestras cumplieron con las especificaciones para recuperación (95-105%).

8. Conclusiones

Podemos concluir que el método propuesto de disolución y determinación de calcio para Kestosteril® tabletas recubiertas es apropiado para su propósito debido a que cumple con especificaciones para parámetros de validación.

9. Historial

Primera edición aprobada el 21-05-2010.

01-10-2010 – Corrección de especificación desde 5% a 3% de acuerdo a PA077 – Capítulo 7.2.2, página 18.