



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA  
LA CUANTIFICACIÓN DE RA 8 BS EN UNA  
FORMA FARMACÉUTICA SÓLIDA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ISRAEL HERNANDEZ FLORES



MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: PROF.: JUAN MANUEL RODRIGUEZ

Vocal: PROF.: RAUL LUGO VILLEGAS

Secretario: QFB TERESA ESPINO FUENTES

1er Suplente: PROF.: IVAN ALEJANDRO FRANCO MORALES

2do Suplente: PROFA: KENNETH RUBIO CARRASCO

Lugar en el cual se desarrollo el tema:

Laboratório Boehringer Ingelheim Promeco  
Calle Maíz No 49 Col. Barrio Xaltocan.

Asesor de tema:

\_\_\_\_\_  
QFB Teresa Espino Fuentes

Supervisor Técnico:

\_\_\_\_\_  
M. en F. Ma. Del Socorro Alpizar Ramos

Sustentante:

\_\_\_\_\_  
Israel Hernández Flores

## Agradecimientos y dedicatorias

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme pertenecer a tan prestigiada institución.

A mi madre: Margarita  
A la cual agradezco la educación que me dio, ya que ella me enseñó a nunca rendirme a pesar de las adversidades.

A mis profesores de la Facultad de Química los cuales me dieron la formación académica con la cual actualmente cuento.

A mi padre: Simón  
Ya que es una de las personas más importantes de mi vida, es una de mis inspiraciones por las cuales he terminado esta carrera.

A mis hermanas Rocio, Erika Berenice, ya que me apoyaron en los momentos difíciles y estuvieron animándome.

A la profesora María del Socorro Alpizar Ramos y a Teresa Espino Fuentes ya que gracias a ellas lleve a termino la elaboración del trabajo escrito, gracias por su apoyo.

A mis amigos: Alfredo, Karina, Diana, Adriana, Elizabeth, Mariano, Leobardo, que siempre estuvieron conmigo en los momentos difíciles y me apoyaron para llevar a término este trabajo.

A mis compañeros de trabajo, ya que fueron un pilar muy importante en mi vida ya que gracias a ellos aprendí todo lo que hoy en día conozco.

A Rocio Torreblanca que dedicó algunas tardes de su vida para apoyarme en la culminación de este proyecto, además de que siempre me apoyo en los momentos difíciles que se presentaron a lo largo de este trabajo.

Gracias por estar conmigo.

Un pensamiento que contribuye  
al mejoramiento del hombre vale  
más que una moneda de oro.

La diferencia entre un sabio y un  
científico es que el primero  
domina la naturaleza y al  
segundo lo dominan las  
pasiones.

El que no enseña lo que sabe,  
ni da de lo que tiene, ni muestra  
lo que descubre, difícilmente  
dejará su huella en la tierra.

Alfonso Madrigal

## Índice General

CAPITULO 1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO .....	1
CAPITULO 2 GENERALIDADES.....	2
2.1 Monografía de RA 8 BS <sup>11</sup> .....	2
2.1.1 Propiedades Fisicoquímicas .....	3
2.1.2 Farmacocinética y Mecanismo de Acción <sup>12</sup> .....	3
2.1.3. Aplicaciones Terapéuticas .....	3
2.1.4. Precauciones .....	4
2.2 Validación de Métodos Analíticos .....	5
Validación <sup>14,16</sup> .....	6
2.2.1.1 VALIDACIÓN PROSPECTIVA <sup>17</sup> .....	7
2.2.1.2 VALIDACIÓN CONCURRENTE <sup>19</sup> .....	7
2.2.1.3 VALIDACIÓN RETROSPECTIVA <sup>18</sup> .....	7
Identidad <sup>13</sup> .....	8
Pureza <sup>13</sup> .....	8
Concentración <sup>13</sup> .....	8
Potencia <sup>13</sup> .....	8
Inocuidad <sup>13</sup> .....	8
Biodisponibilidad <sup>14</sup> .....	9
Linealidad <sup>1,2,</sup> .....	9
Exactitud <sup>2</sup> .....	9
Precisión <sup>2</sup> .....	9
Reproducibilidad <sup>2</sup> .....	9
Repetibilidad <sup>2</sup> .....	9
Precisión intermedia <sup>2</sup> .....	9
Especificidad (selectividad) <sup>2,14</sup> .....	10
Limite de Detección <sup>1,2,14</sup> .....	10
Limite de Cuantificación <sup>1,2,14</sup> .....	10
Tolerancia <sup>1,14</sup> .....	10
Robustez <sup>1</sup> .....	10
Estabilidad de muestras <sup>15,10</sup> .....	10
Adecuabilidad del sistema <sup>1</sup> .....	11
2.3 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN .....	11
2.3.1 HISTORIA <sup>7</sup> .....	11

2.3.2 TIPOS DE CROMATOGRAFÍA <sup>9</sup> .....	11
2.3.3 CLASIFICACIÓN DE CROMATOGRAFÍA <sup>8</sup> .....	12
2.3.3.1 Cromatografía de absorción .....	12
2.3.3.2 Cromatografía de partición .....	12
2.3.3.3 Cromatografía de intercambio iónico .....	12
2.3.3.4 Cromatografía de permeación .....	12
CAPITULO 3 Desarrollo Experimental .....	17
3.1 Método Analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) para cuantificar RA 8 BS en una forma farmacéutica Sólida. ....	17
3.1.1 Reactivos, Equipos, Estándares y Materiales .....	17
3.1.2 Preparación de Soluciones .....	18
3.1.2.1 Preparación de la Fase móvil .....	18
3.1.2.2 Preparación de solución de referencia. ....	18
3.1.2.3 Preparación de la curva patrón para linealidad del sistema. ....	18
3.1.3 Método analítico para cuantificar RA 8 BS en una forma farmacéutica sólida. ....	19
3.2 Validación de un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para cuantificar RA 8 BS en una forma sólida. ....	21
3.2.1 Adecuabilidad del sistema .....	21
3.2.2 Especificidad .....	22
3.2.3 Linealidad del sistema .....	24
3.2.4 Exactitud del método .....	24
3.2.5 Precisión del método (Repetibilidad) .....	25
3.2.6 Precisión intermedia (Reproducibilidad) .....	26
3.2.7.1 Límite de detección .....	26
3.2.7.2 Límite de cuantificación .....	27
3.2.8 Tolerancia y robustez .....	28
3.2.8.1 Cambio en la proporción de la fase móvil .....	28
3.2.8.2 Cambio de filtros .....	29
3.2.9 Estabilidad de muestras de producto terminado y solución de referencia .....	29
3.2.10 Estabilidad de la fase móvil .....	29
CAPITULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	31
4.1 Especificidad .....	31
4.2 Linealidad .....	65
4.3 Linealidad del método .....	67

4.3.1	Linealidad del método para la primer concentración. ....	67
4.3.2	Linealidad del método para la segunda concentración. ....	69
4.4	Exactitud.....	71
4.5	Precisión y precisión intermedia .....	73
4.5.1	Precisión.....	73
4.5.2	Precisión intermedia .....	75
4.6	Límite de detección y de cuantificación .....	77
4.6.1	Limite de detección.....	77
4.6.2	Límite de cuantificación.....	80
4.7	Tolerancia y robustez .....	82
4.7.1	Variación de la forma en la que se prepara la fase móvil. (Prueba de Robustez).....	82
4.7.2	variación en la proporción de la fase móvil. (Prueba de Robustez) .....	84
4.7.3	Tolerancia de filtros .....	86
4.8	Adecuabilidad del sistema.....	89
4.9	Estabilidad de las muestras y estándares.....	89
4.9.1	Estabilidad estándares .....	90
4.9.2	Estabilidad muestras de RA 8 BS 1er Concentración .....	90
4.9.3	Estabilidad muestras de RA 8 BS 2da Concentración .....	91
4.9.4	Estabilidad de la fase móvil.....	91
CAPITULO 5	Conclusiones .....	93
CAPITULO 6	Referencias bibliográficas .....	95
CAPITULO 7	Apéndice .....	97

## Lista de Figuras

Figura 1 Estructura química del RA 8 BS .....	2
Figura 2 Blanco .....	31
Figura 3 Estándar t= inicial.....	32
Figura 4 Estándar T=15 Días .....	32
Figura 5 Muestra de RA 8 BS 1er concentración t= inicial .....	33
Figura 6 Muestra de RA 8 BS 1er concentración t=15 días .....	33
Figura 7 Muestra de RA 8 BS 2da concentración t= inicial.....	34
Figura 8 Muestra de RA 8 BS 2da concentración t=15 días .....	34
Figura 9 Estándar con temperatura t= inicial.....	35
Figura 10 Estándar con temperatura t=15 días .....	35
Figura 11 Muestra de RA 8 BS 1er concentración con temperatura t= inicial .....	36
Figura 12 Muestra de RA 8 BS 1er concentración con temperatura t=15 días.....	36
Figura 13 Muestra de RA 8 BS 2da concentración con temperatura t= inicial.....	37
Figura 14 Muestra de RA 8 BS 2da concentración con temperatura t=15 días .....	37
Figura 15 Placebo de RA 8 BS 1er concentración con temperatura t= inicial .....	38
Figura 16 Placebo de RA 8 BS 1er concentración con temperatura t=15 días.....	38
Figura 17 Placebo de RA 8 BS 2da concentración con temperatura t= inicial.....	39
Figura 18 Placebo de RA 8 BS 2da concentración con temperatura t=15 días .....	39
Figura 19 Estándar con luz UV t= inicial.....	40
Figura 20 Estándar con luz UV t= 15 días .....	40
Figura 21 Muestra de RA 8 BS 1er concentración con luz UV t= inicial.....	41
Figura 22 Muestra de RA 8 BS 1er concentración con luz UV t=15 días .....	41
Figura 23 Muestra de RA 8 BS 2da concentración con luz UV t= inicial.....	42
Figura 24 Muestra de RA 8 BS 2da concentración con luz UV t=15días .....	42
Figura 25 Placebo de RA 8 BS 1er concentración con luz UV t= inicial.....	43
Figura 26 Placebo de RA 8 BS 1er concentración con luz UV t=15 días .....	43
Figura 27 Placebo de RA 8 BS 2da concentración con luz UV t= inicial.....	44
Figura 28 Placebo de RA 8 BS 2da concentración con luz UV t=15 días .....	44
Figura 29 Estándar con HCl t= inicial .....	45
Figura 30 Estándar con HCl t=15 días.....	45
Figura 31 Muestra de RA 8 BS 1er concentración con HCl t= inicial.....	46
Figura 32 Muestra de RA 8 BS 1er concentración con HCl t= 15 días .....	46
Figura 33 Muestra de RA 8 BS 2da concentración con HCl t= inicial.....	47

Figura 34 Muestra de RA 8 BS 2da concentración con HCl t=15 días .....	47
Figura 35 Placebo de RA 8 BS 1er concentración con HCl t= inicial.....	48
Figura 36 Placebo de RA 8 BS 1er concentración con HCl t=15 días .....	48
Figura 37 Placebo de RA 8 BS 2da concentración con HCl t= inicial.....	49
Figura 38 Placebo de RA 8 BS 2da concentración con HCl t=15 días .....	49
Figura 39 Estándar con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> t= inicial .....	50
Figura 40 Estándar con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> t=15 días .....	50
Figura 41 Muestra de RA 8 BS 1er concentración con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> t= inicial.....	51
Figura 42 Muestra de RA 8 BS 1er concentración con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> t=15 días .....	51
Figura 43 Muestra de RA 8 BS 2da concentración con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> t= inicial.....	52
Figura 44 Muestra de RA 8 BS 2da concentración con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> t=15 días.....	52
Figura 45 Placebo de RA 8 BS 1er concentración con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> t= inicial.....	53
Figura 46 Placebo de RA 8 BS 1er concentración con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> t=15 días .....	53
Figura 47 Placebo de RA 8 BS 2da concentración con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> t= inicial.....	54
Figura 48 Placebo de RA 8 BS 2da concentración con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> t=15 días.....	54
Figura 49 Estándar con NaOH t= inicial.....	55
Figura 50 Estándar con NaOH t=15 días .....	55
Figura 51 Muestra de RA 8 BS 1er concentración con NaOH t= inicial.....	56
Figura 52 Muestra de RA 8 BS 1er concentración con NaOH t= 15 días .....	56
Figura 53 Muestra de RA 8 BS 2da concentración con NaOH t= inicial.....	57
Figura 54 Muestra de RA 8 BS 2da concentración con NaOH t= 15 días.....	57
Figura 55 Placebo de RA 8 BS 1er concentración con NaOH t= inicial.....	58
Figura 56 Placebo de RA 8 BS 1er concentración con NaOH t=15 días.....	58
Figura 57 Placebo de RA 8 BS 2da concentración con NaOH t= inicial.....	59
Figura 58 Placebo de RA 8 BS 2da concentración con NaOH t=15 días.....	59
Figura 59 Blanco con HCl t= inicial .....	60
Figura 60 Blanco con HCl t=15 días.....	60
Figura 61 Blanco con NaOH t= inicial.....	61
Figura 62 Blanco con NaOH t=15 días .....	61
Figura 63 Blanco con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> t= inicial.....	62
Figura 64 Blanco con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> t=15 días .....	62
Figura 65 Blanco con luz t= inicial.....	63
Figura 66 Blanco con luz t=15 días .....	63
Figura 67 Blanco con temperatura t= inicial.....	64

Figura 68 Blanco con temperatura $t=15$ días .....	64
Figura 69 Grafica de regresión lineal de RA 8 BS .....	66
Figura 70 Grafica de linealidad de Método para 1er concentración. ....	67
Figura 71 Grafica de linealidad de Método para 2da concentración.....	69
Figura 72 Cromatograma del blanco.....	77
Figura 73 Cromatograma del límite de detección .....	78
Figura 74 Curva de calibración de límite de detección.....	78
Figura 75 Cromatograma del límite de cuantificación .....	80
Figura 76 Curva de calibración de límite de cuantificación.....	80
Figura 77 Fase normal: 75% Metanol: 25% Buffer pH 4.6 .....	84
Figura 78 Fase 1 80% Metanol: 20% Buffer pH 4.6.....	84
Figura 79 Fase 2 70% Metanol: 30% Buffer pH 4.6.....	85

## Lista de tablas

Tabla 1 Linealidad .....	65
Tabla 2 de linealidad de Método para 1er concentración .....	67
Tabla 3 de linealidad de Método para 2da concentración .....	69
Tabla 4 Exactitud para RA 8 BS 1er concentración .....	71
Tabla 5 Exactitud para RA 8 BS 2da concentración .....	72
Tabla 6 Precisión para RA 8 BS 1er concentración .....	73
Tabla 7 Precisión para RA 8 BS 2da concentración .....	74
Tabla 8 Precisión intermedia RA 8 BS 1er concentración.....	75
Tabla 9 Precisión intermedia RA 8 BS 2da concentración .....	76
Tabla 10 Resultados del blanco.....	77
Tabla 11 Resultados de las alturas de la curva para límite de detección .....	79
Tabla 12 Resultados de las alturas de la curva para límite de cuantificación.....	81
Tabla 13 Resultados de la corroboración de límite de cuantificación .....	82
Tabla 14 Resultados Variación de Preparación de fase.....	83
Tabla 15 Resultados variación de fase móvil .....	85
Tabla 16 Resultados variación de membranas de filtración para 1er concentración .....	87
Tabla 17 Resultados de variación de membranas de filtración para 2da Concentración .....	88
Tabla 18 Adecuabilidad de RA 8 BS .....	89
Tabla 19 Estabilidad de estándares. ....	90
Tabla 20 Estabilidad de muestras RA 8 BS 1er Concentración. ....	90
Tabla 21 Estabilidad de muestras RA 8 BS 2da Concentración.....	91
Tabla 22 Temperatura ambiente.....	92

## CAPITULO 1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

Como es bien sabido, todo producto farmacéutico debe reunir atributos de identidad, pureza, concentración, potencia, inocuidad y disponibilidad para cumplir con los aspectos normativo oficiales e internos y no menos importantes, los éticos, por lo que si un método analítico, que finalmente es el medidor de las características críticas de calidad del producto, no es confiable, se corre el grave riesgo de afectar al usuario final que es el paciente<sup>1</sup>.

Desde hace años existe una gran variedad de formas para cuantificar principios activos, sin embargo al paso del tiempo se tienen que ir modificando el tipo de método analítico utilizado para este propósito, además de seguir con las regulaciones establecidas por tal motivo se debe de realizar una validación, ya que día a día se utilizan métodos mas sensibles y específicos de acuerdo a las características de los productos.

La validación de métodos analíticos mediante los procedimientos de las estancias regulatorias asegura un exitoso funcionamiento de la técnica que se desea obtener como una prescripción de análisis.

Un objetivo de esta validación es proveer a la empresa Boehringer Ingelheim Promeco de una metodología por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para el análisis de RA 8 BS en dos concentraciones distintas de una forma farmacéutica sólida, además se desea obtener evidencia documentada de que el proceso se comporta en forma consistente y demostrar ante las instancias regulatorias el control que se tiene para el producto que se esta realizando el estudio.

## CAPITULO 2 GENERALIDADES

### 2.1 Monografía de RA 8 BS<sup>11</sup>.

#### Nombre Químico

- 2,2',2'',2'''-[(4,8-Di-1-piperidinilpirimido[5,4-d]pirimidina-2,6-diy)l)dinitrilo]tetrakisethanol;
- 2,6-bis(dietanolamino)-4,8-dipiperidinopirimido-[5,4-d]pirimidina;

Formula Condensada: C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>N<sub>8</sub>O<sub>4</sub>

Estructura<sup>5</sup>:

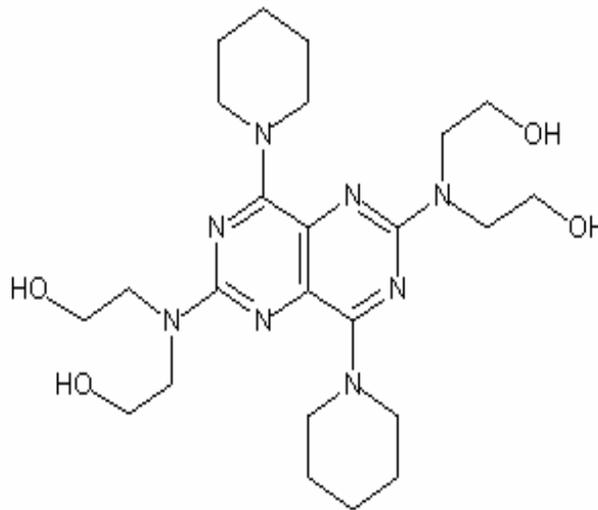


Figura 1 Estructura química del RA 8 BS

Masa molecular: 504.63g/mol

Punto de fusión: 163°C

### 2.1.1 Propiedades Fisicoquímicas

Descripción: Polvo o agujas cristalinas de color amarillo intenso.

Solubilidad: Muy soluble en metanol, alcohol y cloroformo; ligeramente soluble en agua; muy ligeramente soluble en acetona y en acetato de etilo.

### 2.1.2 Farmacocinética y Mecanismo de Acción<sup>12</sup>

FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA EN HUMANOS: Las grageas se absorben con rapidez en aproximadamente 10 a 15 minutos y alcanzan concentraciones máximas en plasma en 45 a 75 minutos. Niveles en plasma “steady state” se consiguen al cabo de 2 días.

### 2.1.3. Aplicaciones Terapéuticas

INDICACIONES TERAPÉUTICAS: RA 8 BS es un miocardioprotector, que mejora la vascularización, y reduce el riesgo de accidentes tromboembólicos. Está indicado en la insuficiencia coronaria aguda o crónica, angor pectoris, profilaxis y tratamiento del infarto del miocardio; enfermedades tromboembólicas.

Propiedades: Gracias a una dilatación máxima de la circulación coronaria, aumenta notablemente la oferta de sangre y de oxígeno a las células del miocardio. Además se estimula el desarrollo de colaterales de los vasos coronarios.

Tiene acción antitrombótica debido a su facultad de inhibir la adhesión y agregación plaquetarias.

#### 2.1.4. Precauciones

RA 8 BS es un vaso dilatador muy activo y debe utilizarse con prudencia en los pacientes con una angina que se agrava rápidamente, en los casos de estenosis aórtica subvalvular o de labilidad hemodinámica.

En pacientes con insuficiencia coronaria muy acusada RA 8 BS no debe inyectarse por vía parenteral.

La aplicación I.V. de RA 8 BS en dosificaciones elevadas (0.5 mg/kg peso corporal y más) para fines diagnósticos requiere la mayor precaución.

Se han observado estenocardias, alteraciones isquémicas del ECG y trastornos de transmisión de estímulos del corazón.

En los estados de pre-colapso y colapso no está indicada la administración I.V. de RA 8 BS.

La administración conjunta de un vasodilatador puede llevar a una hipotensión grave.

**REACCIONES SECUNDARIAS Y ADVERSAS:** Las propiedades vasodilatadoras de RA 8 BS pueden determinar ocasionalmente cefaleas vasculares, que suelen desaparecer al reducir la dosis: En ocasiones aparecen molestias gástricas, náuseas y diarrea, vértigo, debilidad, bochornos, síncope y “rash” cutáneo.

**INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS Y DE OTRO GENERO:** En caso de tratamiento con RA 8 BS asociado con anticoagulantes o ácido acetilsalicílico deben tenerse en cuenta las “intolerancias y riesgos” así como “observaciones especiales” válidas para estos medicamentos.

Los derivados de la xantina (presentes por ejemplo: en el café o en el té negro) pueden atenuar la acción de RA 8 BS.

## 2.2 Validación de Métodos Analíticos

Los parámetros para una validación de un método de acuerdo a la categoría en la cual se localiza esta basada en las siguientes pruebas:

Especificidad, linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, tolerancia y robustez.

Estas pruebas se realizan de acuerdo al tipo de método analítico, ya que se clasifica en la siguiente manera:

**Categoría I-** Métodos empleados para la cuantificación de principios activos y materias primas incluyendo conservadores y productos a granel.

**Categoría II.-** Métodos para la determinación de impurezas en materias primas o productos a granel. Las impurezas pueden ser productos de descomposición, síntesis, componentes volátiles etc. Estos métodos incluyen ensayos cuantitativos y cualitativos.

**Categoría III.-** Métodos para la determinación de características funcionales como disolución o liberación del activo.

**Categoría IV.-** Pruebas de identificación.

En la siguiente tabla nos muestra los elementos que son requeridos para cada tipo de categoría<sup>2,3,4</sup>.

PARÁMETRO	CATEGORÍA I	CATEGORÍA II		CATEGORÍA III	CATEGORÍA IV
	CONTENIDO/ UNIFORMIDAD DE CONTENIDO POTENCIA/ VALORACIÓN	CONTENIDO/ VALORACIÓN	PRUEBAS LÍMITE	CONTENIDO	IDENTIFICACIÓN
Exactitud	SI	SI	*	*	NO
Precisión	SI	SI	NO	SI	NO
Especificidad	SI	SI	SI	*	SI
Tolerancia	SI	SI	SI	*	NO
Límite de detección	NO	NO*	SI	*	NO
Límite de cuantificación	NO *	SI	NO	*	NO
Linealidad	SI	SI	NO	*	NO
Rango	SI	SI	*	*	NO

\* Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método.

### Validación<sup>14,16</sup>

Es la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones de calidad establecidas

El plan de validación se basa en requerimientos del sistema. Dependiendo los requerimientos los tipos de validación pueden ser divididos en tres tipos principales los cuales son:

Validación Prospectiva

Validación Concurrente

Validación Retrospectiva

### 2.2.1.1 VALIDACIÓN PROSPECTIVA<sup>17</sup>

Evidencia documentada realizada antes de que el producto salga al mercado que demuestra que las operaciones se encuentran bajo control.

La validación prospectiva se refiere a comprobar que a través de un proceso predeterminado se obtienen productos con la calidad diseñada.

La validación prospectiva es el momento para demostrar que un proceso de manufactura opera bajo condiciones estándar bien definidas y es capaz de generar un producto que cumpla con las especificaciones preestablecidas.

### 2.2.1.2 VALIDACIÓN CONCURRENTE<sup>19</sup>.

Es un tipo de validación que se aplica exclusivamente en productos y procesos que se realizan esporádicamente en los que puede decidir que está bajo control con el análisis de muestras representativas de distintas etapas del proceso cada vez que se valide un lote.

Es aplicada cuando el sistema no se puede desafiar y no se cuenta con los datos históricos, entonces será necesario estudiar el sistema, analizar el rendimiento del mismo, establecer controles asociados y comprobar el sistema.

### 2.2.1.3 VALIDACIÓN RETROSPECTIVA<sup>18</sup>

Evidencia documentada basada en los datos acumulados de producción (datos históricos), análisis y control de que un producto ya en distribución está siendo fabricado con efectividad.

Esta validación no se puede aplicar a equipos de proceso.

La validación retrospectiva abarca las situaciones donde un producto se elabora sin proceso de documentación validado, depende de un registro adecuado de datos históricos de los procesos tales como: tiempos de mezclado, equipo utilizado, especificaciones, etc.

Para que un producto pueda ser considerado para la validación retrospectiva, se requiere que tenga un proceso estable, es decir, un proceso por el cual el método de manufactura permanece constante, es necesario haber trabajado durante un tiempo razonable bajo condiciones correctas de manufactura y tener completa la documentación correspondiente.

#### Identidad<sup>13</sup>

Es una característica que debe de cumplir un medicamento y se define como la presencia del ingrediente activo correcto en el producto.

#### Pureza<sup>13</sup>

Es el grado en el cual las materias Primas, los productos a granel están exentos de materiales extraños

#### Concentración<sup>13</sup>

Es la cantidad del fármaco presente en el medicamento expresada como peso/peso, peso/volumen o unidad de dosis/volumen

#### Potencia<sup>13</sup>

Se denomina a la actividad terapéutica del producto farmacéutico tal como es indicada por pruebas apropiadas de laboratorio o por datos clínicos controlados y desarrollados en forma adecuada.

#### Inocuidad<sup>13</sup>

Es la característica de un medicamento de poder usarse sin mayores posibilidades de causar efectos tóxicos injustificables.

### Biodisponibilidad<sup>14</sup>

Es la proporción de fármaco que se absorbe a la circulación general después de la administración de un medicamento y el tiempo que requiere para hacerlo.

### Linealidad<sup>1,2,</sup>

Es la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra

### Exactitud<sup>2</sup>

Es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

### Precisión<sup>2</sup>

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.

### Reproducibilidad<sup>2</sup>

Es la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre laboratorios.

### Repetibilidad<sup>2</sup>

Es la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones.

### Precisión intermedia<sup>2</sup>

Es la precisión de un método analítico expresada como concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo diferentes condiciones (analista, tiempo, equipos) en un mismo laboratorio.

Especificidad (selectividad)<sup>2,14</sup>

Es la capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestras.

Límite de Detección<sup>1,2,14</sup>

Es la mínima concentración de un compuesto en una muestra el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidas.

Límite de Cuantificación<sup>1,2,14</sup>

Es la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método.

Tolerancia<sup>1,14</sup>

Es la capacidad del método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante las variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo y que proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal.

Robustez<sup>1</sup>

Es el grado de reproducibilidad a largo plazo cuando un método es usado en diferentes laboratorios.

Estabilidad de muestras<sup>15,10</sup>

Es la propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis.

Adecuabilidad del sistema<sup>1</sup>

Es la verificación de que el sistema se encuentra trabajando bajo criterios establecido , los cuales permiten asegurar la confiabilidad de los resultados que se obtienen dentro del método analítico entre los cuales pueden estar evaluándose las posibles interferencias en cada análisis, entre los cuales podemos nombrar los siguientes: instrumento, analista, equipo, sustancia de referencia, entre otros.

## 2.3 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

### 2.3.1 HISTORIA<sup>7</sup>

La primera persona en usar el termino cromatografía fue Tswett un químico Ruso el cual definió a la cromatografía como un método en el cual los componentes de una mezcla son separados en una columna adsorbente en un sistema fluido.

### 2.3.2 TIPOS DE CROMATOGRAFÍA<sup>9</sup>

De acuerdo a la fase estacionaria se puede clasificar en dos tipos de cromatografía, esto es en fase reversa y fase normal.

La cromatografía en fase reversa en esta técnica una mezcla de disolvente acuoso/orgánico es comúnmente usado como fase móvil, la fase estacionaria comúnmente empleada es de carácter no polar, esta técnica es la más utilizada hoy en día.

La cromatografía en fase normal el disolvente más usado es no polar y la fase estacionaria es polar, por lo cual lo primero que eluye es lo más polar.

### 2.3.3 CLASIFICACIÓN DE CROMATOGRAFÍA<sup>8</sup>

La cromatografía se puede clasificar en cuatro tipos principales los cuales son:

#### 2.3.3.1 Cromatografía de absorción

En este tipo de cromatografía se utiliza una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida o gaseosa. El soluto puede adsorberse en la superficie de las partículas sólidas. El equilibrio entre el estado absorbido y la solución es la causa de la separación de las moléculas de soluto.

#### 2.3.3.2 Cromatografía de partición

En esta técnica, una fase estacionaria forma una película delgada en la superficie de un soporte sólido. El soluto se equilibra entre este líquido estacionario y una fase móvil líquida o gaseosa.

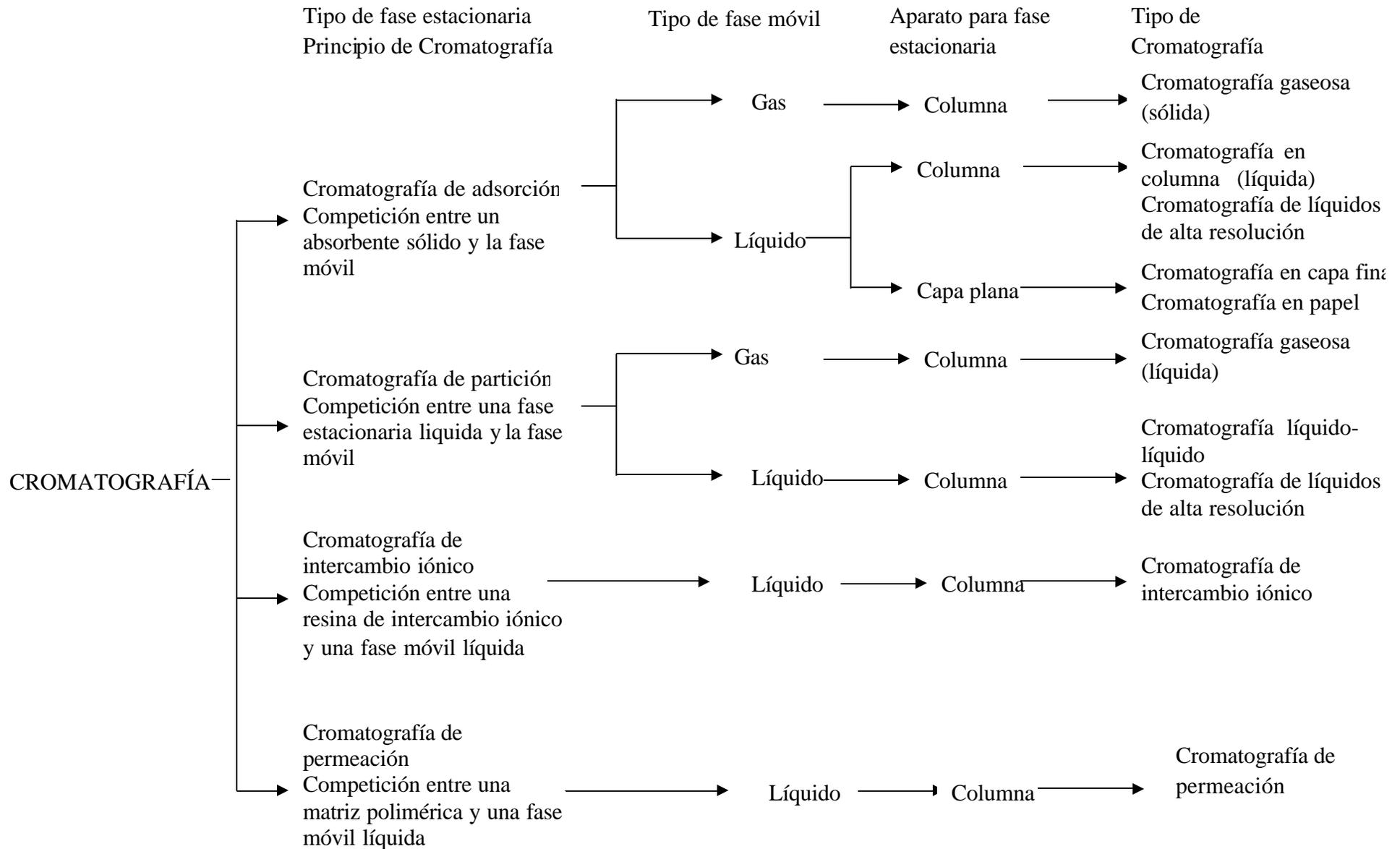
#### 2.3.3.3 Cromatografía de intercambio iónico

En este tipo de cromatografía, aniones (como  $-\text{SO}_3^-$ ) o cationes (como  $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ ) se unen covalentemente a la fase estacionaria sólida, por lo común una resina. Los iones de soluto, de carga opuesta a los de la fase estacionaria, son atraídos por esta última mediante una fuerza electrostática. La fase móvil es un líquido.

#### 2.3.3.4 Cromatografía de permeación

En la cromatografía de permeación no existen interacciones por atracción entre la fase estacionaria y el soluto. La fase móvil líquida o gaseosa pasa a través de un gel poroso. Los poros son suficientemente pequeños para excluir las moléculas grandes de soluto, pero no las pequeñas. Las moléculas pequeñas tardan más tiempo en fluir por lo cual se lleva a cabo la separación.

En el siguiente esquema se ejemplifica que tipo de cromatografía se realiza de acuerdo a su clasificación.



Clasificación de Métodos Cromatográficos

### 2.3.4 parámetros Cromatográficos<sup>7</sup>

Los parámetros de cromatografía de líquidos que se evalúan son los que a continuación se describen:

#### 2.3.4.1 Tiempo de volumen muerto<sup>5</sup>

Es el tiempo al cual el solvente eluye ( primer cambio de pendiente que se presenta.

#### 2.3.4.2 Tiempo de retención<sup>5</sup>

Es un parámetro característico para cada compuesto, pero este se puede ver modificado por la composición de la fase móvil y por el tipo de fase estacionaria de la columna que se utilice para la separación de estos compuestos.

#### 2.3.4.3 Coleo (tailing T)<sup>7</sup>

La precisión de para cuantificar un activo decrece con el incremento del coleo del pico porque se encuentran dificultades por el integrador para determinar donde/cuando el termina el pico, por lo que se pueden obtener resultados erróneos, la forma de calcular el coleo es de la siguiente manera:

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

donde  $W_{0.05}$  es ancho de pico al 5% de altura y  $f$  distancia del máximo del pico a la distancia del 5% de la altura.

El coleo recomendado e menor o igual a 2.0

#### 2.3.4.4 Resolución (R)<sup>7,8</sup>

Es una medida que nos indica que tan separados se encuentran los picos de los compuestos que se están analizando.

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_2 + W_1}$$
 donde  $t_2$  y  $t_1$  son tiempo de retención de compuesto 1 y 2

respectivamente y  $W_1$  y  $W_2$  son ancho de pico de cada compuesto

La resolución recomendada es mayor a 2

#### 2.3.4.5 Platos teóricos (N)<sup>7,8</sup>

Los platos teóricos nos indica que tan eficiente es la columna, entre más platos teóricos se obtengan mejor eficiencia tiene la columna.

La forma de calcular los platos teóricos es:

$$N = 16 \left( \frac{t}{W} \right)^2$$
 donde  $t$  es tiempo de retención de la muestra y  $W$  es ancho del pico

La cantidad de platos teóricos mínimos recomendado es de 2000

#### 2.3.4.6 Factor de capacitancia (K')<sup>5,7,8</sup>

Es una medida de la ubicación del pico de interés con respecto al tiempo de volumen muerto.

Forma de calculo:

$$K' = \frac{(t_r - t_0)}{t_0}$$

Donde  $t_r$  es tiempo de retención del pico de interés y  $t_0$  es tiempo de volumen muerto.

Generalmente este valor debe ser mayor a 2.

Estos parámetros cromatográficos se pueden verse modificados esto puede ser por la composición de la fase móvil, ya que puede ayudar a que el pico de interés eluya antes de lo estipulado, o puede eluir después, esto se debe a que al modificar la fase móvil cambia la polaridad de esta.

Otra forma en la que se modifican los parámetros es con el flujo, ya que si el flujo aumenta el pico de interés sale antes de lo estipulado y al disminuir el flujo el pico de interés sale después.

La temperatura es otro factor que puede modificar la elusión del activó ya que al aumentarla, hay mayor actividad de las moléculas, este es el motivo por el cual se observa que el pico de interés sale antes de lo estipulado.

## CAPITULO 3 Desarrollo Experimental

3.1 Método Analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) para cuantificar RA 8 BS en una forma farmacéutica Sólida.

### 3.1.1 Reactivos, Equipos, Estándares y Materiales

Reactivos.

- Metanol HPLC, EMD
- Fosfato disódico dihidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), Merck
- Agua HPLC, obtenida del equipo Milli Q.
- Placebo de sólido 1er Concentración lote TPL0405-013
- Suspensión de Recubrimiento con color de 1er Concentración lote 452930
- Jarabe de azúcar con color de 1er Concentración lote 452930
- Jarabe de azúcar sin color de 1er Concentración lote TPL0407-017
- Solución de Pulido I de 1er Concentración lote TPL0407-017
- Solución de Pulido II de 1er Concentración lote TPL0407-017
- Placebo de sólido 2da Concentración lote TPL0405-014
- Suspensión de Recubrimiento con color de 2da Concentración lote TPL0405-015
- Jarabe de azúcar con color de 2da Concentración lote TPL0405-015
- Solución de Pulido I de 2da Concentración lote TPL0405-015
- Solución de Pulido II de 2da Concentración lote TPL0405-015
- Tabletas de RA 8 BS 1er Concentración lote 253370
- Tabletas de RA 8 BS 2da Concentración lote 253625

Equipos

Cromatógrafo WATERS

Estándar Sigma RA 8 BS ( el cual fue reestandarizado por medio del mismo metodo que se esta realizando)

## Materiales

Columna  $\mu$ bondapack C<sub>18</sub> 125 A 3.9mm \* 30 cm (Merck)

### 3.1.2 Preparación de Soluciones

#### 3.1.2.1 Preparación de la Fase móvil

Fase móvil: 250 mL de solución tampón de fosfato pH 4.6 + 750 mL de Metanol HPLC, se filtra por separado, se mezcla y desgasifica.

Solución Tampón: Disolver 1 g de fosfato disódico anhidro en 900 mL de agua, ajustar pH a 4.6 con ácido fosfórico diluido (8.5%) y diluir con agua hasta 1000 mL.

Ácido fosfórico Diluido: Tomar 10mL de ácido fosfórico concentrado y diluir a 100mL con agua.

#### 3.1.2.2 Preparación de solución de referencia.

Solución de referencia: Pesar con exactitud 7.5 mg de RA 8 BS (sustancia de referencia) a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con Metanol y llevar a volumen con el mismo disolvente, tomar 10.0 mL y diluir a 50.0mL con fase móvil. (Preparar por duplicado)

#### 3.1.2.3 Preparación de la curva patrón para linealidad del sistema.

Para determinar que el método es lineal se elaboro una curva patrón, la cual contenía seis niveles estos abarcaban de 60-140% del valor teórico del 100 %

#### Preparación de Solución stock

Solución stock Pesar con exactitud 7.5 mg de estándar de RA 8 BS y disolver con Metanol a 100.0mL

Nivel 1 Tomar 3.0 mL de la solución stock y llevar a volumen con fase móvil hasta 25.0 mL equivalente a 60 %

Nivel 2 Tomar 7.0 mL de la solución stock y llevar a volumen con fase móvil hasta 50.0 mL equivalente a 70 %

Nivel 3 Tomar 4.0 mL de la solución stock y llevar a volumen con fase móvil hasta 25.0 mL equivalente a 80 %

Nivel 4 Tomar 10.0 mL de la solución stock y llevar a volumen con fase móvil hasta 50.0 mL equivalente a 100 %

Nivel 5 Tomar 6.0 mL de la solución stock y llevar a volumen con fase móvil hasta 25.0 mL equivalente a 120 %

Nivel 6 Tomar 7.0 mL de la solución stock y llevar a volumen con fase móvil hasta 25.0 mL equivalente a 140 %

3.1.3 Método analítico para cuantificar RA 8 BS en una forma farmacéutica sólida.

Muestras para cuantificar RA 8 BS para 1er Concentración

Colocar 20 tabletas en un matraz volumétrico de 1000 mL, adicionar 100 mL de agua, someter a la acción del ultrasonido durante 15 minutos, adicionar 400 mL de metanol HPLC y agitar durante 30 minutos, llevar a volumen con metanol, transferir una alícuota de 10.0 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100.0 mL y llevar a volumen con fase móvil, tomar 3.0 mL y llevar a 20.0 mL con fase móvil.

Muestras para cuantificar RA 8 BS para 2da Concentración

Colocar 20 tabletas en un matraz volumétrico de 1000 mL, adicionar 100 mL de agua, someter a la acción del ultrasonido durante 15 minutos, adicionar 400 mL de metanol HPLC y agitar durante 30 minutos, llevar a volumen con metanol, transferir una alícuota de 10.0 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100.0 mL y llevar a volumen con fase móvil, tomar 5.0 mL y llevar a 50.0 mL con fase móvil

Análisis de la muestra de Placebo.

Muestras de placebo para 1er Concentración

Pesar 1.200g de placebo sólido y colocarlo en un matraz volumétrico de 1000mL, agregar las siguientes cantidades de los excipientes restantes Suspensión de Recubrimiento con color 1.1264g, Jarabe de azúcar con color 0.1468g, Jarabe de azúcar 0.0593g, Solución de Pulido I 0.0083g , Solución de Pulido II 0.0034g, adicionar 100 mL de agua, someter a la acción del ultrasonido durante 15 minutos, adicionar 400 mL de metanol HPLC y agitar durante 30 minutos, llevar a volumen con metanol, transferir una alícuota de 10.0 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100.0 mL y llevar a volumen con fase móvil, tomar 3.0 mL y llevar a 20.0 mL con fase móvil.

Muestras de placebo para 2da Concentración

Pesar 1.800g de placebo sólido y colocarlo en un matraz volumétrico de 1000mL, agregar las siguientes cantidades de los excipientes restantes Suspensión de Recubrimiento con color 0.8911g, Jarabe de azúcar con color 0.2870g, Solución de Pulido I 0.0129g , Solución de Pulido II 0.0055g, adicionar 100 mL de agua, someter a la acción del ultrasonido durante 15 minutos, adicionar 400 mL de metanol HPLC y agitar durante 30 minutos, llevar a volumen con metanol, transferir una alícuota de 10.0 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100.0 mL y llevar a volumen con fase móvil, tomar 5.0 mL y llevar a 50.0 mL con fase móvil

Condiciones Cromatográficas

Columna:  $\mu$ bondapack C18 125 A 3.9mm\*30 cm

Fase Móvil: 750 mL de metanol y 250 mL de Buffer pH 4.6

Temperatura: Controlada a 25°C

Volumen de inyección: 10  $\mu$ L

Flujo: 1.5 mL/ min.

Longitud de onda: 288nm

Tiempo de Corrida: 6 minutos

### 3.2 Validación de un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para cuantificar RA 8 BS en una forma sólida.

El método analítico se validó tomando en consideración los requerimientos corporativos, los cuales están basados por las organizaciones regulatorias internacionales.

Los parámetros a evaluar fueron los siguientes:

Especificidad, linealidad, exactitud, precisión del método, precisión intermedia, límite de detección, límite de cuantificación, tolerancia, estabilidad de solución de referencia y soluciones de muestra, estabilidad de la fase móvil. Estos requisitos son los que están indicados en el procedimiento normalizado de operación de la empresa para llevar a cabo la validación de un método analítico.

A continuación se describen las pruebas realizadas:

#### 3.2.1 Adecuabilidad del sistema

Preparar dos soluciones de estándar de RA 8 BS al 100% (ver página 18 solución de referencia)

Inyectar 5 replicas del estándar 1 y 1 inyección del estándar 2.

Criterio de Aceptación:

La adecuación del sistema debe cumplir con un coeficiente de variación menor al 2.0%

Además debe cumplir con los siguientes parámetros

Tiempo de retención (Tr) 4.5 min  $\pm$  1 min

Coleo (T)	menor a 2.0
Platos Teóricos	2000 o mayor
K'	Mayor a 2.0

### 3.2.2 Especificidad

#### Soluciones de prueba

NaOH 1N Pesar 40 g de Hidróxido de Sodio y disolver en 1000.0 mL de agua

HCl 1% Tomar 27 mL de HCl concentrado (al 37%) y diluir hasta 1000 mL de agua

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% esta solución es proporcionada por un proveedor conocido

Se prepararon 2 muestras que fueron inyectadas dos veces, estas muestras se corren con una adecuación de sistema, las muestras que se prepararon se mencionan a continuación:

- Solución stock de estándar pesar 7.5 mL de Sustancia de referencia y se diluye con metanol hasta 100.0 mL.
- Solución de placebo
- Solución de muestras de las dos concentraciones
- Soluciones a condiciones de luz: se colocaron las muestras a luz UV durante 1 hora
- Soluciones a condiciones de calor: se colocaron las muestras a baño María a 60°C durante 1 hora

Preparación de solución de placebo y muestras de ambas concentraciones

Muestras de la 1er Concentración

#### Muestras de placebo para 1er Concentración

Pesar 1.200g de placebo sólido y colocarlo en un matraz volumétrico de 1000mL, agregar las siguientes cantidades de los excipientes restantes Suspensión de

Recubrimiento con color 1.1264g, Jarabe de azúcar con color 0.1468g, Jarabe de azúcar 0.0593g, Solución de Pulido I 0.0083g, Solución de Pulido II 0.0034g, adicionar 100 mL de agua, someter a la acción del ultrasonido durante 15 minutos, adicionar 400 mL de metanol HPLC y agitar durante 30 minutos, llevar a volumen con metanol, transferir una alícuota de 10.0 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100.0 mL y llevar a volumen con fase móvil, tomar 3.0 mL y llevar a 20.0 mL con fase móvil.

#### Muestras de placebo para 2da Concentración

Pesar 1.800g de placebo sólido y colocarlo en un matraz volumétrico de 1000mL, agregar las siguientes cantidades de los excipientes restantes Suspensión de Recubrimiento con color 0.8911g, Jarabe de azúcar con color 0.2870g, Solución de Pulido I 0.0129g, Solución de Pulido II 0.0055g, adicionar 100 mL de agua, someter a la acción del ultrasonido durante 15 minutos, adicionar 400 mL de metanol HPLC y agitar durante 30 minutos, llevar a volumen con metanol, transferir una alícuota de 10.0 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100.0 mL y llevar a volumen con fase móvil, tomar 5.0 mL y llevar a 50.0 mL con fase móvil

#### Preparación del estándar

Tomar 10.0 mL de la solución stock de estándar, adicionar 0.4 mL de la solución correspondiente (ver solución de prueba)

Además de las soluciones de prueba, también se deben preparar muestras con las siguientes condiciones: luz UV y Calor.

#### Criterio de Aceptación:

Los productos de degradación no deben interferir con la señal del compuesto de interés.

### 3.2.3 Linealidad del sistema

Se evaluó la linealidad de la respuesta preparando dos curvas de la solución de referencia, a seis niveles diferentes de concentración de un intervalo de 60 a 140% de la concentración teórica con la cual se trabaja (15 µg/mL), ya que ambas concentraciones de trabajo llegan a la misma concentración.

Para cada curva se inyectó por triplicado cada nivel, se calculó la pendiente, la ordenada al origen, el coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación.

Las curvas se describen en la Pág. 18

### 3.2.4 Exactitud del método

Se prepararon por triplicado muestras de placebos cargados con tres concentraciones diferentes de RA 8 BS, se preparó una de las muestras al 70% de la cantidad de activo presente de acuerdo a la preparación de la muestra, se prepararon dos muestras más una del 100% del activo y otra al 130%, cada muestra fue inyectada por triplicado, y se calcula el promedio, y la desviación estándar, así como el coeficiente de variación de los porcentajes de recobro.

#### Muestras de la 1er Concentración

Pesar 1.200g de placebo sólido y colocarlo en un matraz volumétrico de 1000mL, agregar las siguientes cantidades de los excipientes restantes Suspensión de Recubrimiento con color 1.1264g, Jarabe de azúcar con color 0.1468g, Jarabe de azúcar 0.0593g, Solución de Pulido I 0.0083g , Solución de Pulido II 0.0034g, adicionar el equivalente a cada nivel de RA 8 BS, colocar 100 mL de agua, someter a la acción del ultrasonido durante 15 minutos, adicionar 400 mL de metanol HPLC y agitar durante 30 minutos, llevar a volumen con metanol, transferir una alícuota de 10.0 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100.0 mL y llevar a volumen con fase móvil, tomar 3.0 mL y llevar a 20.0 mL con fase móvil.

Para Nivel de 70%	700mg de RA 8 BS
Para Nivel de 100%	1000mg de RA 8 BS
Para Nivel de 130%	1300mg de RA 8 BS

#### Muestras de la 2da Concentración

Pesar 1.800g de placebo sólido y colocarlo en un matraz volumétrico de 1000mL, agregar las siguientes cantidades de los excipientes restantes Suspensión de Recubrimiento con color 0.8911g, Jarabe de azúcar con color 0.2870g, Solución de Pulido I 0.0129g , Solución de Pulido II 0.0055g, adicionar el equivalente a cada nivel de RA 8 BS, colocar 100 mL de agua, someter a la acción del ultrasonido durante 15 minutos, adicionar 400 mL de metanol HPLC y agitar durante 30 minutos, llevar a volumen con metanol, transferir una alícuota de 10.0 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100.0 mL y llevar a volumen con fase móvil, tomar 5.0 mL y llevar a 50.0 mL con fase móvil

Para Nivel de 70%	1050mg de RA 8 BS
Para Nivel de 100%	1500mg de RA 8 BS
Para Nivel de 130%	1950mg de RA 8 BS

#### 3.2.5 Precisión del método (Repetibilidad)

La precisión del método se evaluó analizando 6 diferentes preparaciones de una misma muestra a una concentración del 100%, por un analista, en dos días diferentes, se preparan tres muestras por día y se realiza la inyección de las muestras por triplicado.

Se calcula el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los porcentajes de recobro obtenidos.

Criterio de aceptación:

El coeficiente de variación del porcentaje recuperado es menor o igual a 1.5%.

### 3.2.6 Precisión intermedia (Reproducibilidad)

La precisión intermedia se evaluó analizando 6 diferentes preparaciones de una misma muestra a una concentración del 100%, por dos analistas, en dos días diferentes, se preparan tres muestras por día por cada analista y se realiza la inyección de las muestras por triplicado.

Se calcula el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los porcentajes de recobro obtenidos.

Criterio de aceptación:

El coeficiente de variación del porcentaje recuperado es menor o igual a 2.0%.

#### 3.2.7.1 Límite de detección

Se deben inyectar 10 veces el blanco y obtener la altura máxima que presenta el blanco, con esto se calcula la respuesta que debe de presentar la señal del límite de detección que es tres veces mayor a la obtenida en el blanco.

Para determinar el valor del límite de detección se elaboro una curva patrón, que contenía cinco niveles estos abarcaban de 0.4-1.0% del valor teórico del 100 %

#### Preparación de Solución stock

Solución stock Pesar con exactitud 7.5 mg de sustancia de referencia y disolver con Metanol a 100.0mL, tomar 10.0 mL y diluir hasta 50.0 mL, tomar 7.0 mL y diluir hasta 100.0 mL.

Nivel 1 Tomar 3.0 mL de la solución stock y llevar a volumen con fase móvil hasta 50.0 mL equivalente a 0.42 %

Nivel 2 Tomar 4.0 mL de la solución stock y llevar a volumen con fase móvil hasta 50.0 mL equivalente a 0.56 %

Nivel 3 Tomar 5.0 mL de la solución stock y llevar a volumen con fase móvil hasta 50.0 mL equivalente a 0.70 %

Nivel 4 Tomar 6.0 mL de la solución stock y llevar a volumen con fase móvil hasta 50.0 mL equivalente a 0.84%

Nivel 5 Tomar 7.0 mL de la solución stock y llevar a volumen con fase móvil hasta 50.0 mL equivalente a 0.98 %

Criterio de aceptación:

El coeficiente de determinación no debe ser menor a 0.98.

#### 3.2.7.2 Límite de cuantificación

Para el límite de cuantificación se calcula de una forma similar al límite de detección, diferencia del límite de detección el valor de la altura para este punto debe ser 10 veces mayor que la altura del blanco

Para determinar el valor del límite de cuantificación se elaboro una curva patrón, que contenía cinco niveles estos abarcan de 0.5-4.0% del valor teórico del 100 %

Preparación de Solución stock

Solución stock Pesar con exactitud 7.5 mg de sustancia de referencia y disolver con Metanol a 100.0mL, tomar 10.0 mL y diluir hasta 50.0 mL.

Nivel 1 Tomar 2.0 mL de la solución stock y llevar a volumen con fase móvil hasta 100.0 mL, tomar 25.0 mL y diluir hasta 100.0 mL equivalente a 0.5 %

Nivel 2 Tomar 2.0 mL de la solución stock y llevar a volumen con fase móvil hasta 100.0 mL, tomar 25.0 mL y diluir hasta 50.0 mL equivalente a 1.0 %

Nivel 3 Tomar 3.0 mL de la solución stock y llevar a volumen con fase móvil hasta 100.0 mL equivalente a 2.0 %

Nivel 4 Tomar 4.0 mL de la solución stock y llevar a volumen con fase móvil hasta 100.0 mL equivalente a 3.0%

Nivel 5 Tomar 5.0 mL de la solución stock y llevar a volumen con fase móvil hasta 100.0 mL equivalente a 4.0 %

Al obtener el valor del límite de cuantificación se deben preparar 6 soluciones independientes e inyectar por triplicado y obtener su Coeficiente de Variación.

Criterio de aceptación:

El coeficiente de determinación no debe ser menor a 0.98. El coeficiente de variación de las áreas de 6 soluciones inyectadas por duplicado no debe ser mayor de 10%.

### 3.2.8 Tolerancia y robustez

La prueba de robustez se realizó modificando dos parámetros.

Los parámetros modificados son:

Cambio de proporción de fase móvil

Cambios en la preparación de la fase móvil.

La prueba de Tolerancia se realizó modificando los tipos de filtros.

A continuación se menciona la metodología seguida para la preparación de las muestras, así como parámetros que se evaluaron, el coeficiente de Variación y se hizo una comparación entre estos.

#### 3.2.8.1 Cambio en la proporción de la fase móvil

Se realizó la modificación de la fase móvil para observar como se ven afectados los parámetros cromatográficos, estos se realizaron con muestras preparadas, y se utilizaron estándares al 100% de la concentración a evaluar.

Fase normal: 25% Buffer pH 4.6 y 75% Metanol

Fase 1: 20% Buffer pH 4.6 y 80% Metanol

Fase 2: 30% Buffer pH 4.6 y 70% Metanol

### 3.2.8.2 Cambio de filtros

Dentro de las buenas prácticas de laboratorio las muestras deben ser filtradas debido a que esto disminuye el error que puede llegar a ocasionar un mal funcionamiento del equipo, por lo que se evaluó la influencia del tipo de filtro. Para dicha prueba se prepararon muestras, y se filtraron a través de filtros Whatman de 0.45  $\mu\text{m}$  y filtros Millex del mismo tamaño de poro.

El criterio de aceptación es que no debe existir una diferencia significativa en el recobro obtenido entre ambos tipos de filtros.

### 3.2.8.3 Cambio en la preparación de la Fase móvil

Se preparó la fase móvil colocando por separado los componentes cada uno en un reservorio y programando el equipo para que realice la mezcla de ambos componentes con ayuda de las bombas del equipo antes del análisis, y la siguiente forma es filtrando por separado cada componente y mezclando antes del análisis, esto es colocando un solo reservorio en el equipo.

El criterio de aceptación es que no debe existir una diferencia en el tiempo de retención, así como cambios en los parámetros cromatográficos.

### 3.2.9 Estabilidad de muestras de producto terminado y solución de referencia

La estabilidad de muestras se evaluó preparando tres muestras de producto terminado y dos de la solución de referencia al 100%, las cuales se analizaron a las 24, 48, 72 horas.

Las muestras para dicho análisis fueron almacenadas a temperatura ambiente, con luz y sin luz, además de que se colocaron en refrigeración. Se calcularon los porcentajes de recobro de cada muestra.

El criterio de aceptación es que no debe de existir una diferencia mayor al 2.0 %

### 3.2.10 Estabilidad de la fase móvil

Se prepararon soluciones de referencia al 100%, las cuales se analizaron empleando la fase móvil preparada el día de análisis. Una parte de la fase

preparada se almaceno a temperatura ambiente y la otra en refrigeración, a las 48hrs se prepararon nuevamente soluciones de referencia al 100% y se corren en la fase móvil almacenada, tanto a temperatura ambiente como en refrigeración, este procedimiento se repite a los 7 días.

Se compararon los resultados obtenidos en los diferentes días de análisis y se determinó el tiempo durante el cual puede almacenarse la fase móvil.

Criterio de aceptación:

No se deben modificar considerablemente los parámetros cromatográficos, y no deben aparecer picos de productos de degradación de la fase móvil.

## CAPITULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Especificidad

Se sometieron muestras de placebo de RA 8 BS, así como producto terminado y estándares a diferentes condiciones de estrés, Calentamiento (a baño Maria y a temperatura de 60°C durante 1 hora), luz UV (se sometió durante 1 hora a esta condición), acidez, basicidad y oxidación se analizaron las muestras al tiempo 0, 8 y 15 días.

Los cromatogramas representativos al tiempo 0 y a los 15 días se muestran a continuación:

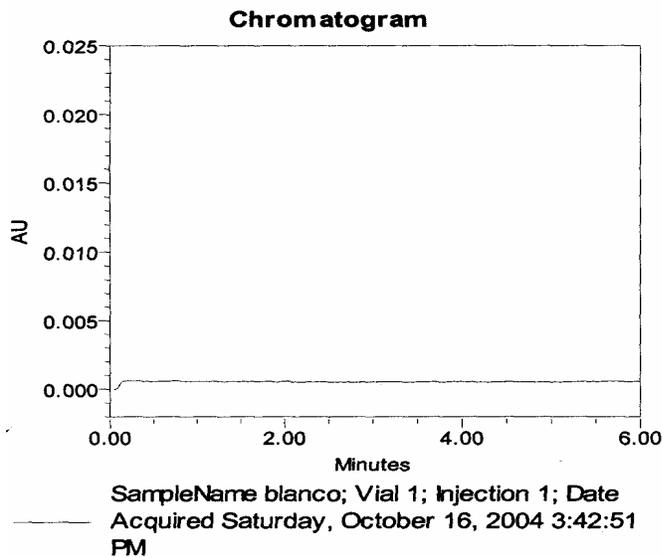


Figura 2 Blanco

En el cromatograma del blanco podemos observar que no se observan picos que puedan interferir con la cuantificación de la sustancia de interés.

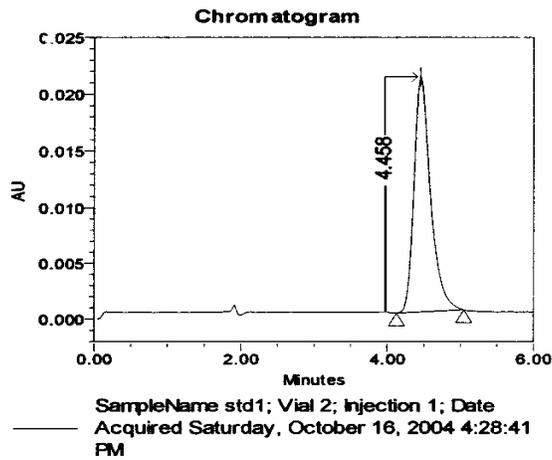


Figura 3 Estándar t= inicial

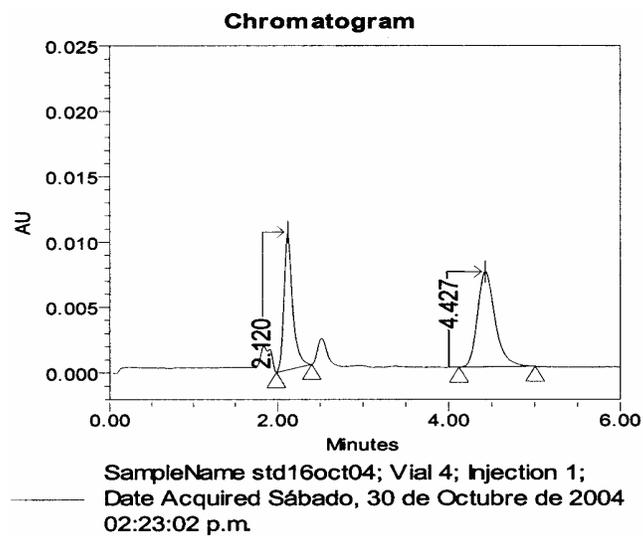


Figura 4 Estándar T=15 Días

En estos dos cromatogramas del estándar se puede observar que en el primero el pico de interés presenta una respuesta aproximada de 0.02 unidades de absorbancia, pero después de que pasan 15 días el pico de interés disminuye pero además aparecen otras sustancias, que no afectan la cuantificación del activo, pero estos picos se deben a la acción que tiene la luz sobre el activo.

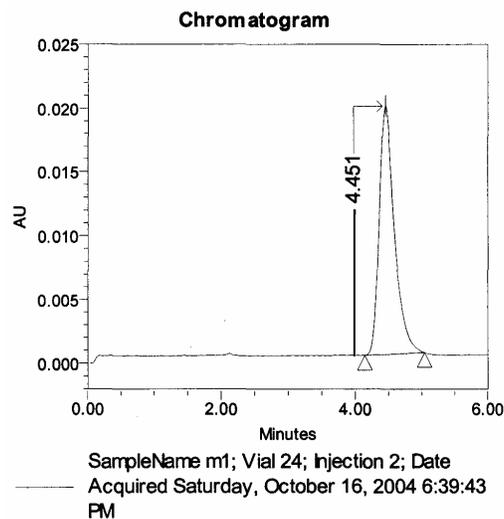


Figura 5 Muestra de RA 8 BS 1er concentración t= inicial

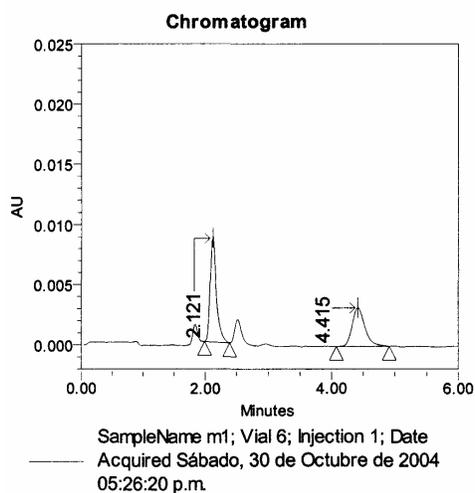


Figura 6 Muestra de RA 8 BS 1er concentración t=15 días

En estos dos cromatogramas de la muestra se observa el mismo comportamiento que presenta el estándar, ya que en ambos casos se observa la influencia que tiene la luz después de los 15 días expuesta, los picos que se observan a los 15 días no afectan la cuantificación del activo.

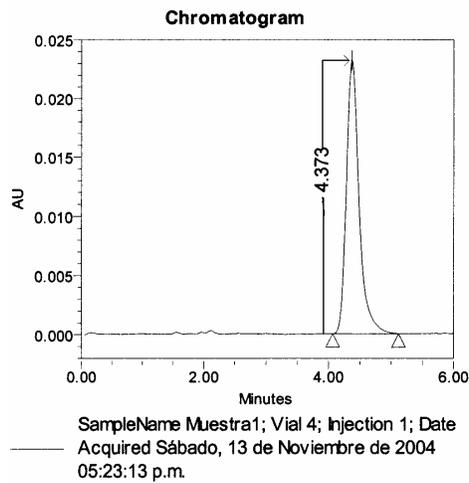


Figura 7 Muestra de RA 8 BS 2da concentración t= inicial

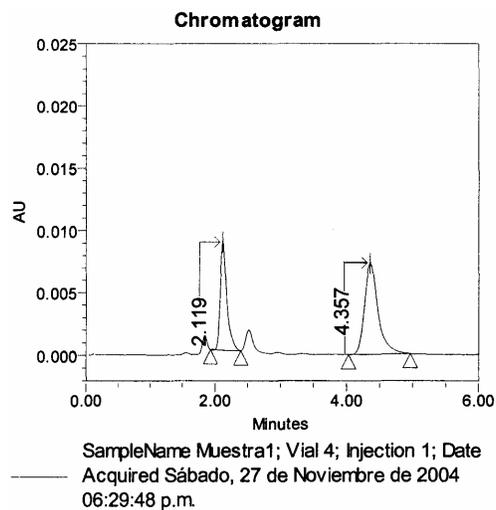


Figura 8 Muestra de RA 8 BS 2da concentración t=15 días

En estos dos cromatogramas de la muestra de la segunda concentración se observa el mismo comportamiento que presenta el estándar, ya que en ambos casos se observa la influencia que tiene la luz después de los 15 días expuesta, los picos que se observan a los 15 días no afectan la cuantificación del activo.

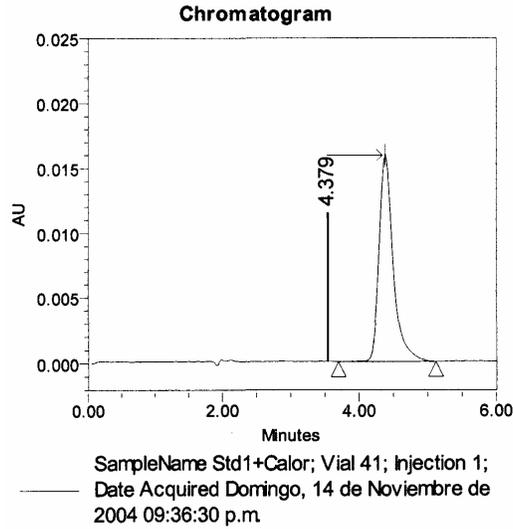


Figura 9 Estándar con temperatura  $t=$  inicial

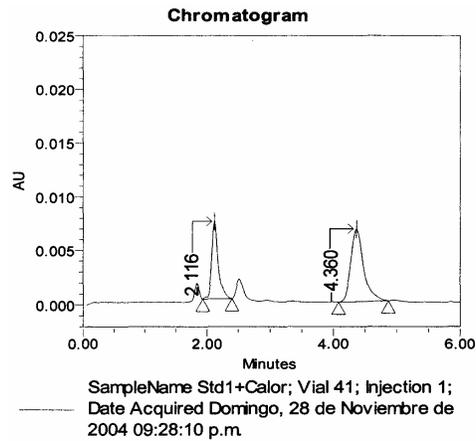


Figura 10 Estándar con temperatura  $t=15$  días

Para el caso en el cual los estándares fueros sometidos a la condición de temperatura, se puede observar que no existe influencia sobre el activo, pero al paso de los quince días este presenta el comportamiento que el caso en el cual no se somete a ninguna condición.

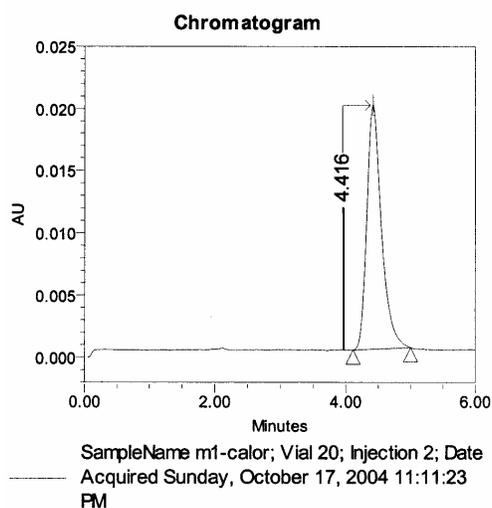


Figura 11 Muestra de RA 8 BS 1er concentración con temperatura  $t=$  inicial

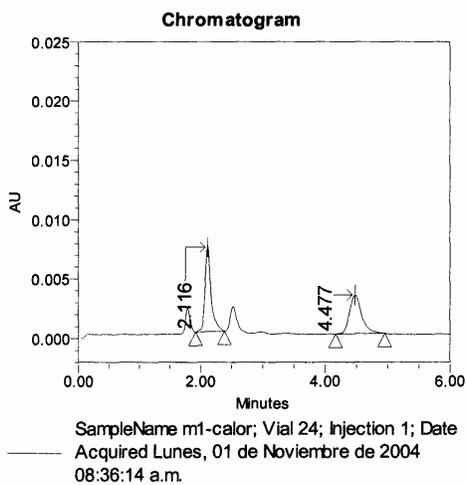


Figura 12 Muestra de RA 8 BS 1er concentración con temperatura  $t=15$  días

Las muestras de la primer concentración al ser sometidas a la condición de temperatura no se ven afectadas ya que presenta el comportamiento de las muestras que no se sometieron a condiciones, por lo cual la temperatura no tiene influencia sobre estas.

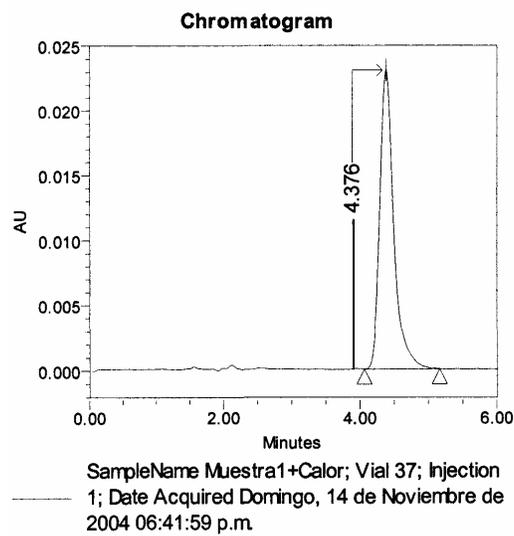


Figura 13 Muestra de RA 8 BS 2da concentración con temperatura  $t =$  inicial

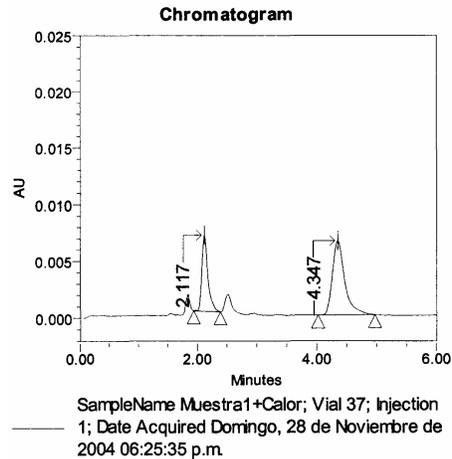


Figura 14 Muestra de RA 8 BS 2da concentración con temperatura  $t = 15$  días

Las muestras de la segunda concentración al ser sometidas a la condición de temperatura no se ven afectadas ya que presenta el comportamiento de las muestras que no se sometieron a condiciones, por lo cual la temperatura no tiene influencia sobre estas.

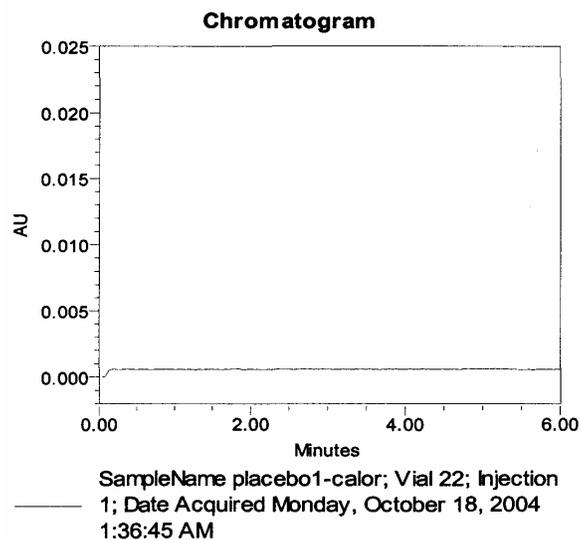


Figura 15 Placebo de RA 8 BS 1er concentración con temperatura  $t=$  inicial

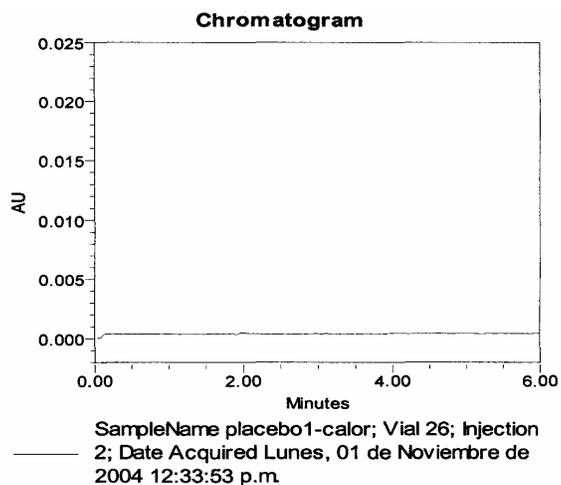


Figura 16 Placebo de RA 8 BS 1er concentración con temperatura  $t=15$  días

El placebo al ser sometido a la condición de temperatura muestra que no se ve afectado desde la condición inicial hasta los 15 días, indicando que los componentes del cual esta constituido no sufre ningún cambio, además de que no se presentan reacciones entre las materias utilizadas para la fabricación de estas muestras.

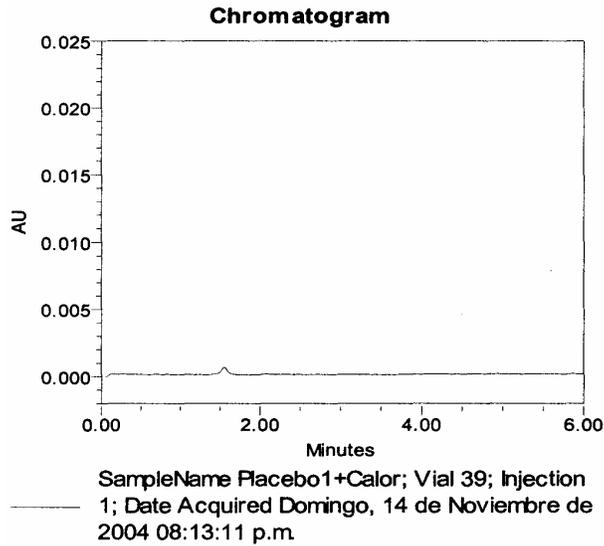


Figura 17 Placebo de RA 8 BS 2da concentración con temperatura  $t = \text{inicial}$

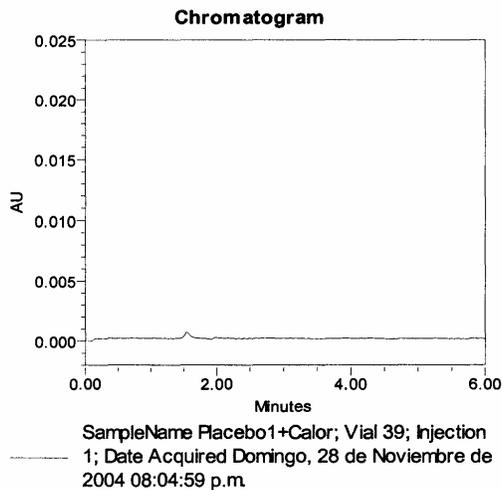


Figura 18 Placebo de RA 8 BS 2da concentración con temperatura  $t = 15 \text{ días}$

El placebo al ser sometido a la condición de temperatura muestra que no se ve afectado desde la condición inicial hasta los 15 días, indicando que los componentes del cual esta constituido no sufre ningún cambio, además de que no se presentan reacciones entre las materias utilizadas para la fabricación de estas muestras.

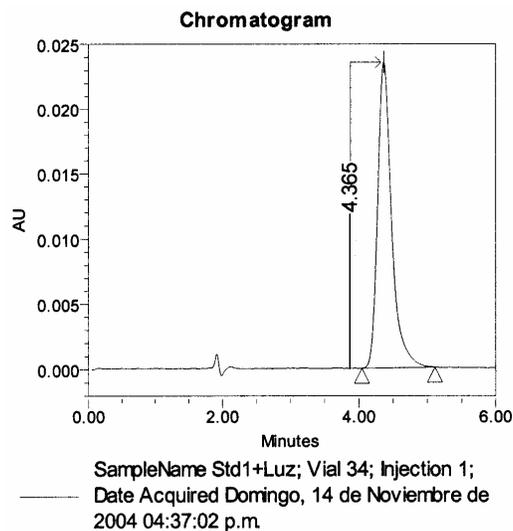


Figura 19 Estándar con luz UV  $t=$  inicial

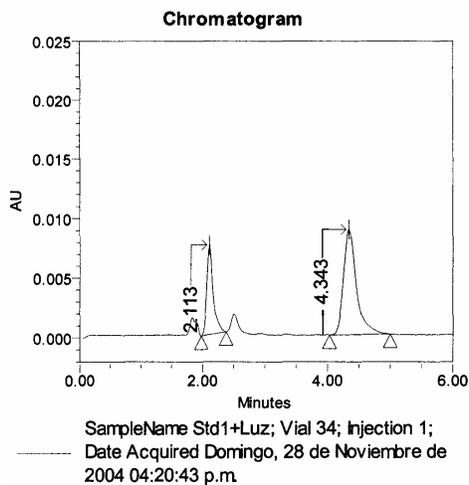


Figura 20 Estándar con luz UV  $t=$  15 días

El estándar sometido a la condición de luz UV no se ve afectado, ya que el tiempo en el cual se sometió fue de 1 hora, y al tiempo cero o inicial no le afecta pero al paso del tiempo y en presencia de la luz se ve como aparecen sustancias, que no afectan la cuantificación del activo.

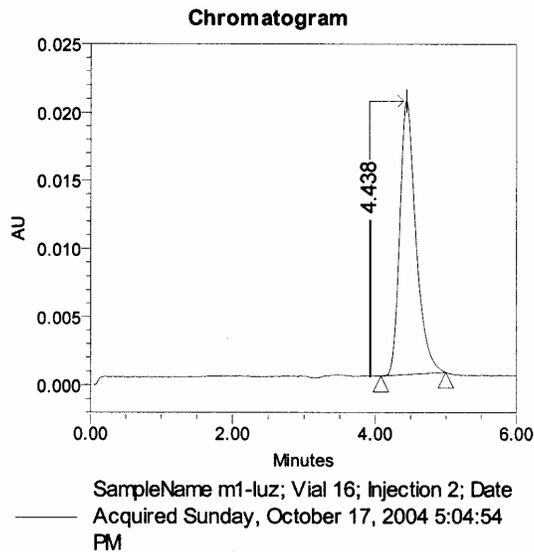


Figura 21 Muestra de RA 8 BS 1er concentración con luz UV  $t=$  inicial

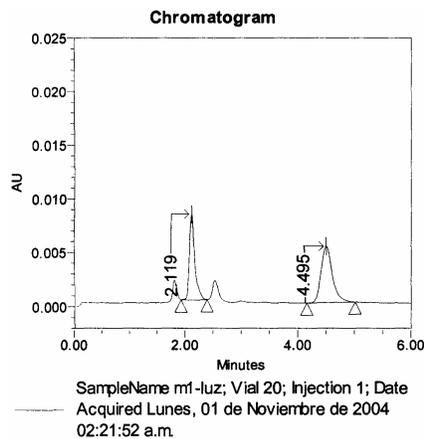


Figura 22 Muestra de RA 8 BS 1er concentración con luz UV  $t=15$  días

Las muestras de la primer concentración al ser sometidas a la condición de luz ultravioleta no se ven afectadas ya que presenta el comportamiento de las muestras que no se sometieron a condiciones, por lo cual la luz ultravioleta no tiene influencia sobre estas.

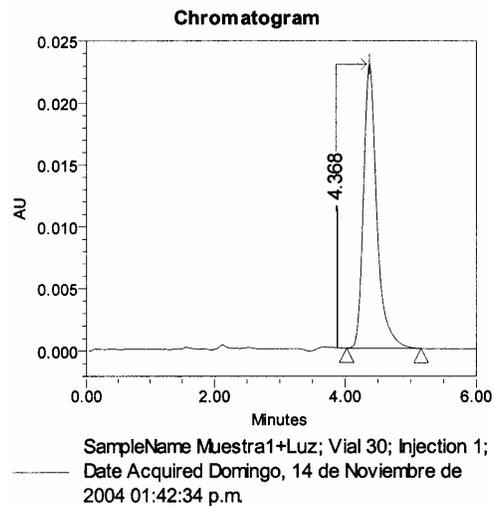


Figura 23 Muestra de RA 8 BS 2da concentración con luz UV  $t=$  inicial

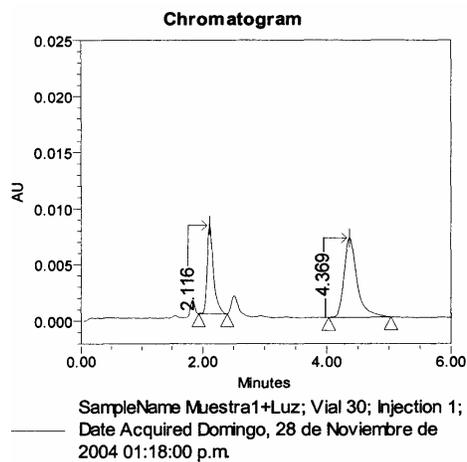


Figura 24 Muestra de RA 8 BS 2da concentración con luz UV  $t=15$ días

Las muestras de la segunda concentración al ser sometidas a la condición de luz ultravioleta no se ven afectadas ya que presenta el comportamiento de las muestras que no se sometieron a condiciones, por lo cual la luz ultravioleta no tiene influencia sobre estas.

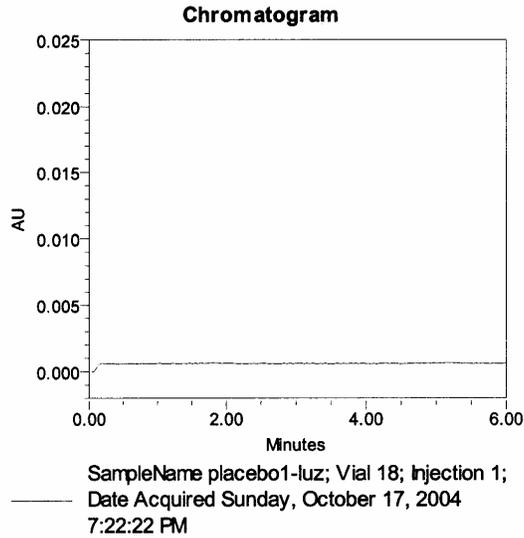


Figura 25 Placebo de RA 8 BS 1er concentración con luz UV  $t=$  inicial

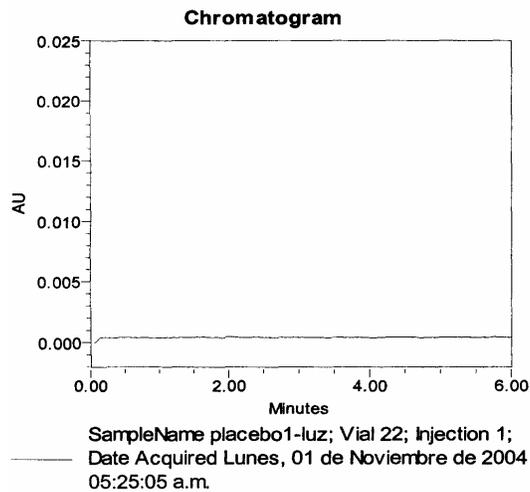


Figura 26 Placebo de RA 8 BS 1er concentración con luz UV  $t=$ 15 días

El placebo al ser sometido a la condición de luz ultravioleta muestra que no se ve afectado desde la condición inicial hasta los 15 días, indicando que los componentes del cual esta constituido no sufre ningún cambio, además de que no se presentan reacciones entre las materias utilizadas para la fabricación de estas muestras.

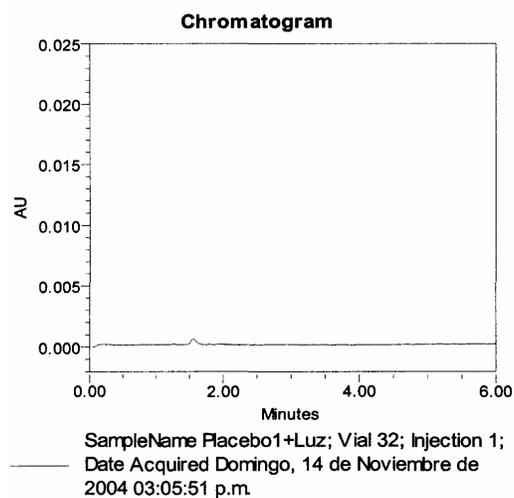


Figura 27 Placebo de RA 8 BS 2da concentración con luz UV  $t=$  inicial

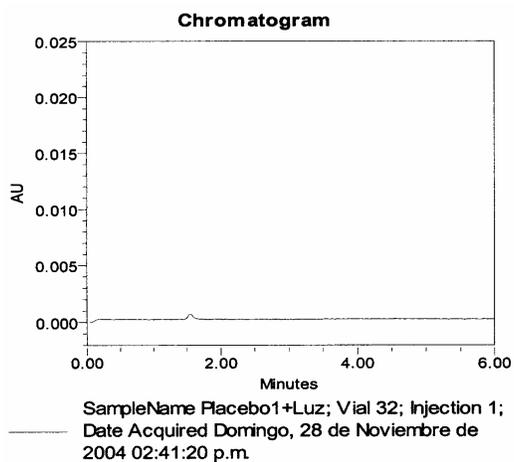


Figura 28 Placebo de RA 8 BS 2da concentración con luz UV  $t=15$  días

El placebo al ser sometido a la condición de luz ultravioleta muestra que no se ve afectado desde la condición inicial hasta los 15 días, indicando que los componentes del cual esta constituido no sufre ningún cambio, además de que no se presentan reacciones entre las materias utilizadas para la fabricación de estas muestras.

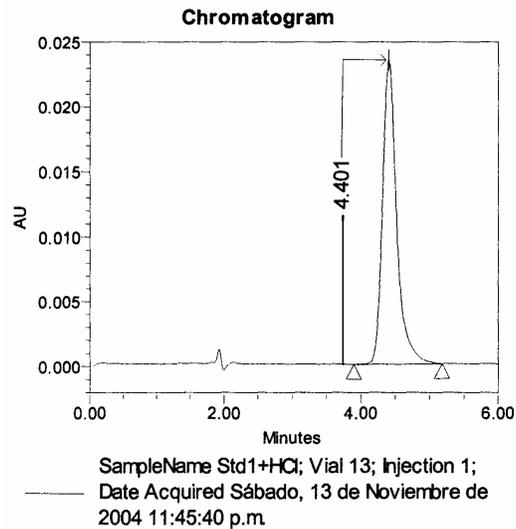


Figura 29 Estándar con HCl  $t=$  inicial

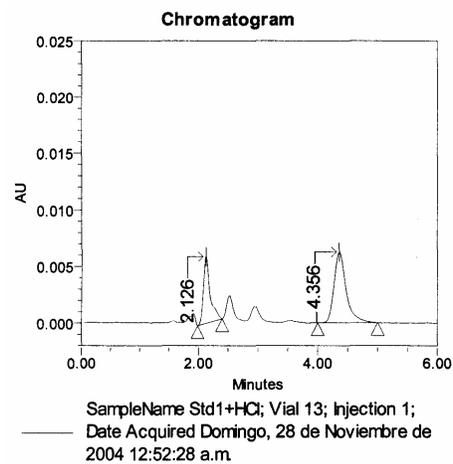


Figura 30 Estándar con HCl  $t=15$  días

El estándar sometido a la condición de ácido clorhídrico HCl no se ve afectado, ya que al tiempo cero o inicial no le afecta pero al paso del tiempo y en presencia de la luz se ve como aparecen sustancias, que no afectan la cuantificación del activo.

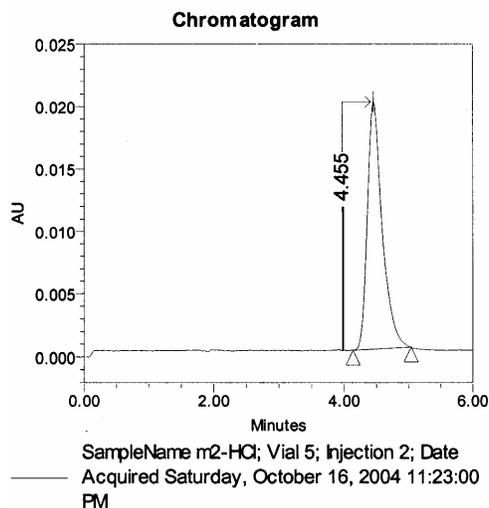


Figura 31 Muestra de RA 8 BS 1er concentración con HCl  $t=$  inicial

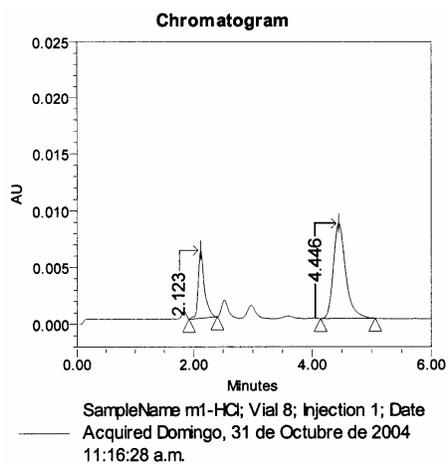


Figura 32 Muestra de RA 8 BS 1er concentración con HCl  $t=$  15 días

Las muestras de la primer concentración al ser sometidas a la condición de ácido clorhídrico no se ven afectadas ya que presenta el comportamiento de las muestras que no se sometieron a condiciones, por lo cual el ácido clorhídrico no tiene influencia sobre estas.

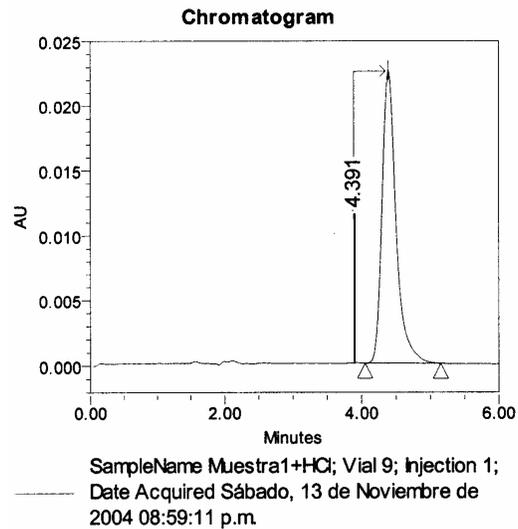


Figura 33 Muestra de RA 8 BS 2da concentración con HCl  $t=$  inicial

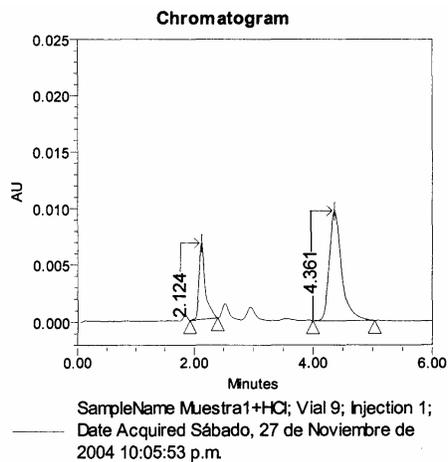


Figura 34 Muestra de RA 8 BS 2da concentración con HCl  $t=15$  días

Las muestras de la segunda concentración al ser sometidas a la condición de ácido clorhídrico no se ven afectadas ya que presenta el comportamiento de las muestras que no se sometieron a condiciones, por lo cual el ácido clorhídrico no tiene influencia sobre estas.

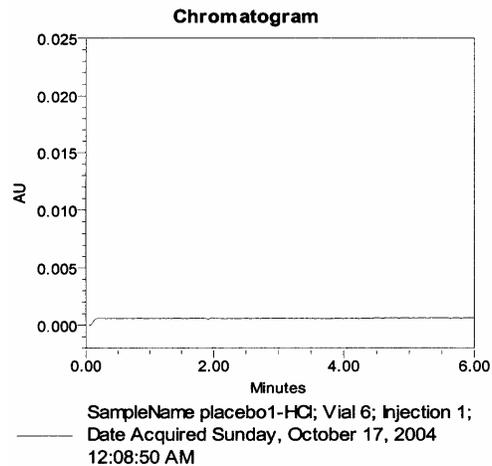


Figura 35 Placebo de RA 8 BS 1er concentración con HCl t= inicial

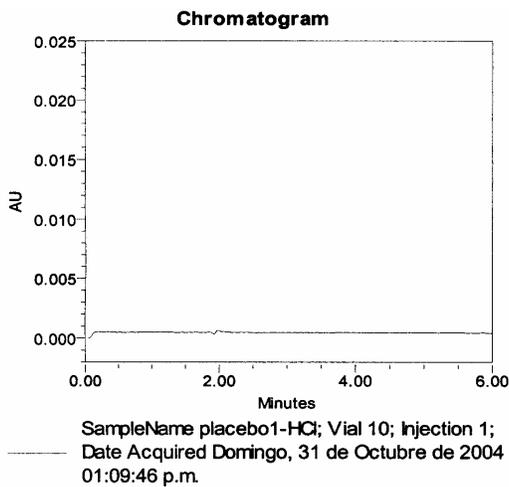


Figura 36 Placebo de RA 8 BS 1er concentración con HCl t=15 días

El placebo al ser sometido a la condición ácida con HCl muestra que no se ve afectado desde la condición inicial hasta los 15 días, indicando que los componentes del cual esta constituido no sufre ningún cambio, además de que no se presentan reacciones entre las materias utilizadas para la fabricación de estas muestras.

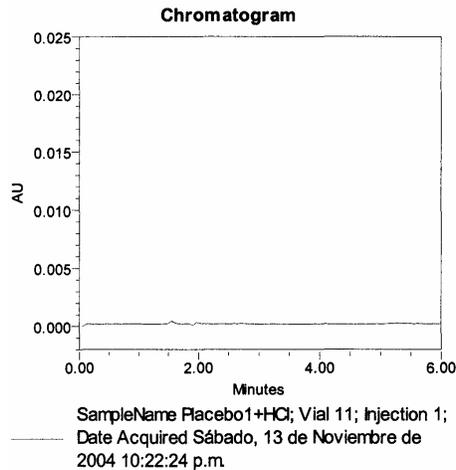


Figura 37 Placebo de RA 8 BS 2da concentración con HCl t= inicial

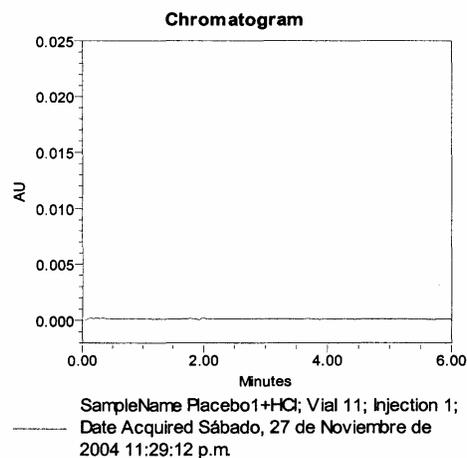


Figura 38 Placebo de RA 8 BS 2da concentración con HCl t=15 días

El placebo al ser sometido a la condición ácida con HCl muestra que no se ve afectado desde la condición inicial hasta los 15 días, indicando que los componentes del cual esta constituido no sufre ningún cambio, además de que no se presentan reacciones entre las materias utilizadas para la fabricación de estas muestras.

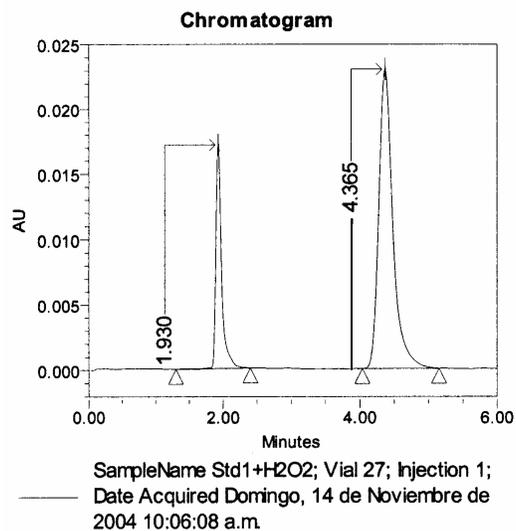


Figura 39 Estándar con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> t= inicial

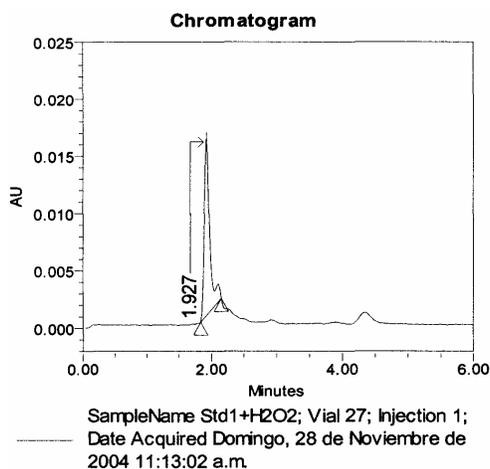


Figura 40 Estándar con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> t=15 días

El estándar sometido a la condición de someter la solución con agua oxigenada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no se ve afectado si el análisis se realiza inmediatamente, pero con el paso del tiempo esta solución empieza a romper los enlaces que tiene la molécula lo cual origina que no absorba a la longitud de onda establecida para este análisis.

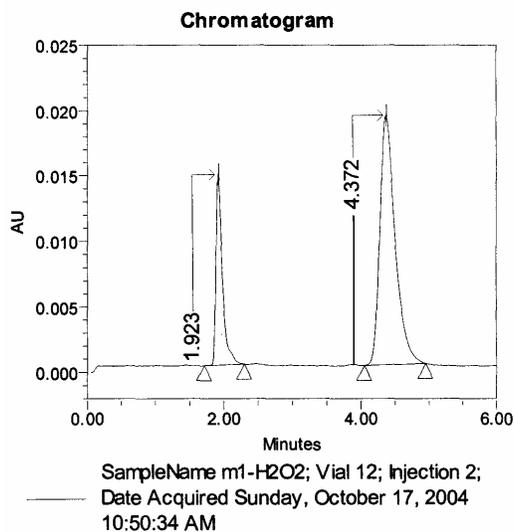


Figura 41 Muestra de RA 8 BS 1er concentración con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> t= inicial

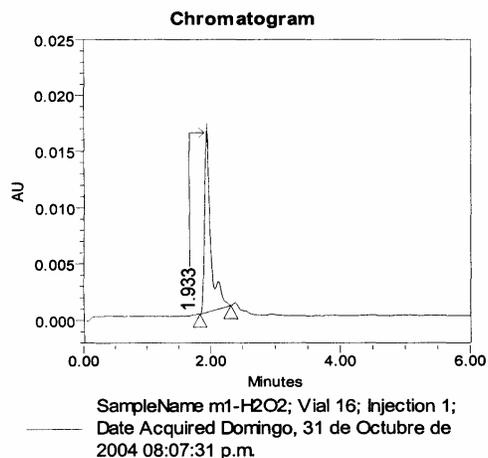


Figura 42 Muestra de RA 8 BS 1er concentración con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> t=15 días

Las muestras de la primer concentración al ser sometidas a la condición de oxidación no se ven afectadas ya que presenta el comportamiento de las muestras que no se sometieron a condiciones, pero en este caso se observa un que las muestras se degradan con mayor rapidez, esto se debe por el mismo efecto con el estándar.

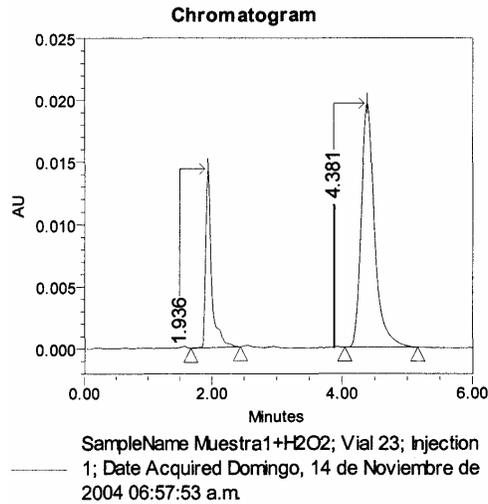


Figura 43 Muestra de RA 8 BS 2da concentración con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> t= inicial

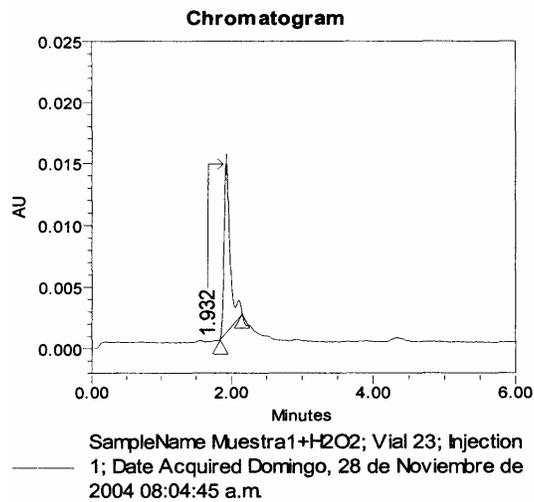


Figura 44 Muestra de RA 8 BS 2da concentración con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> t=15 días

Las muestras de la segunda concentración al ser sometidas a la condición de oxidación no se ven afectadas ya que presenta el comportamiento de las muestras que no se sometieron a condiciones, pero en este caso se observa un que las muestras se degradan con mayor rapidez, esto se debe por el mismo efecto con el estándar.

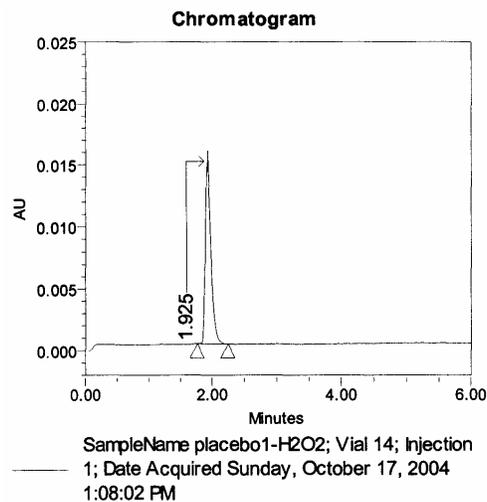


Figura 45 Placebo de RA 8 BS 1er concentración con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> t= inicial

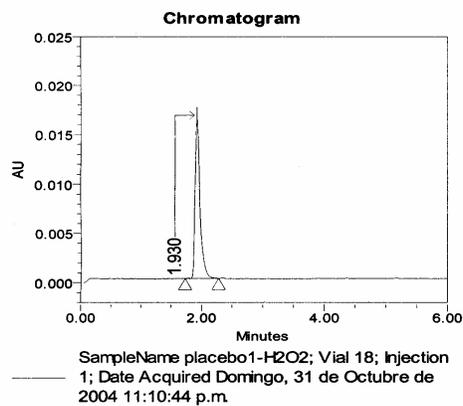


Figura 46 Placebo de RA 8 BS 1er concentración con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> t=15 días

El placebo al ser sometido a la condición de oxidación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> muestra que no se ve afectado desde la condición inicial hasta los 15 días, ya que el pico que se observa es debido al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se utilizó, además de que se mantiene constante durante los 15 días, esto indica que los componentes del cual esta constituido no sufre ningún cambio, además de que no se presentan reacciones entre las materias utilizadas para la fabricación de estas muestras.

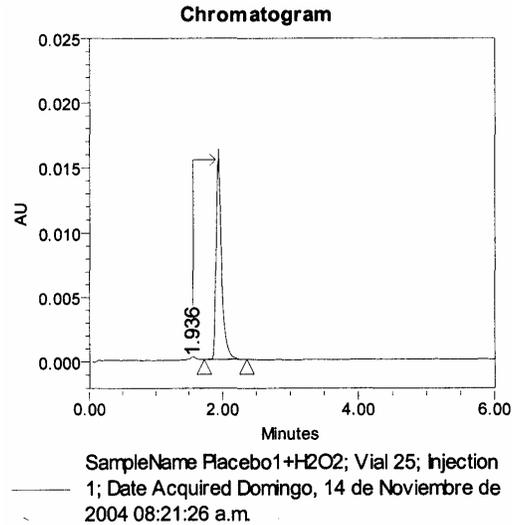


Figura 47 Placebo de RA 8 BS 2da concentración con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> t= inicial

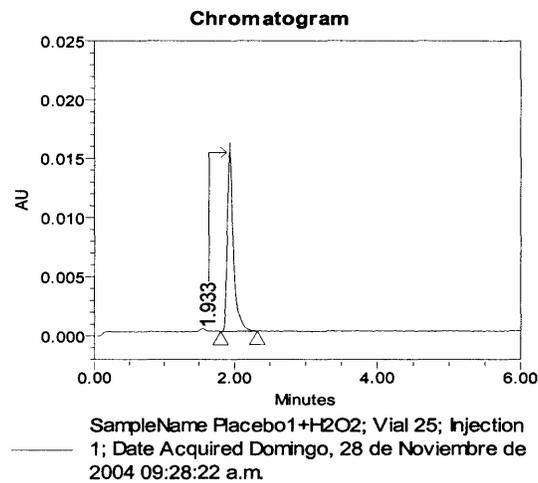


Figura 48 Placebo de RA 8 BS 2da concentración con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> t=15 días

El placebo al ser sometido a la condición de oxidación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> muestra que no se ve afectado desde la condición inicial hasta los 15 días, ya que el pico que se observa es debido al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se utilizó, además de que se mantiene constante durante los 15 días, esto indica que los componentes del cual esta constituido no sufre ningún cambio, además de que no se presentan reacciones entre las materias utilizadas para la fabricación de estas muestras.

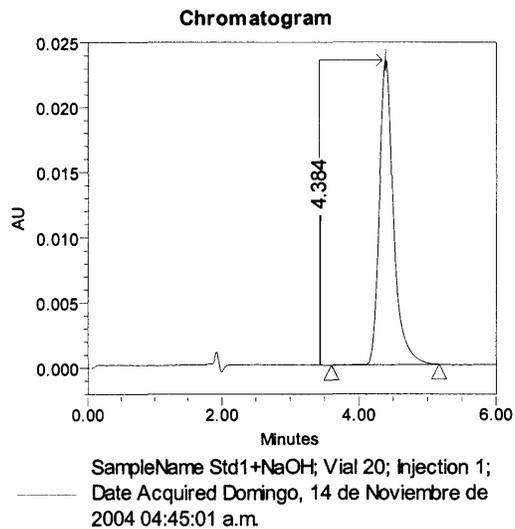


Figura 49 Estándar con NaOH  $t=$  inicial

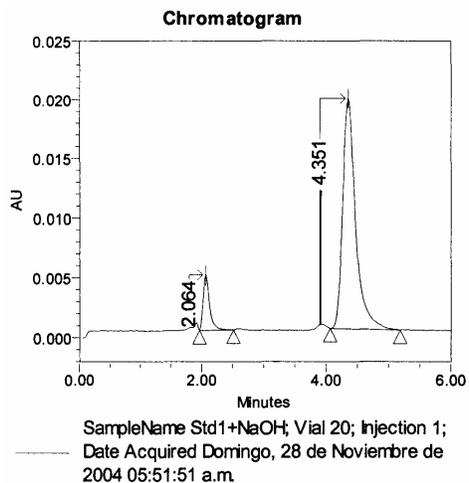


Figura 50 Estándar con NaOH  $t=15$  días

El estándar sometido a la condición de hidróxido de sodio NaOH no se ve afectado, ya que al tiempo cero o inicial no le afecta pero al paso del tiempo y en presencia de la luz se ve como aparecen sustancias, que no afectan la cuantificación del activo.

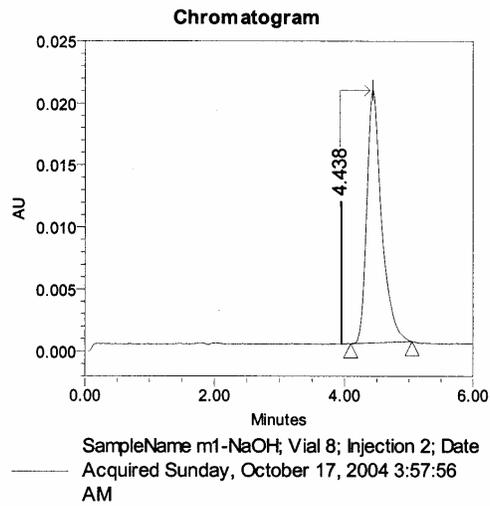


Figura 51 Muestra de RA 8 BS 1er concentración con NaOH t= inicial

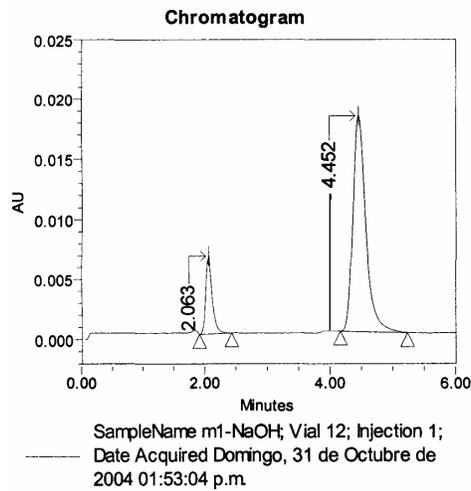


Figura 52 Muestra de RA 8 BS 1er concentración con NaOH t= 15 días

Las muestras de la primer concentración al ser sometidas a la condición de hidroxido de sodio no se ven afectadas ya que presenta el comportamiento de las muestras que no se sometieron a condiciones, por lo cual el hidroxido de sodio no tiene influencia sobre estas.

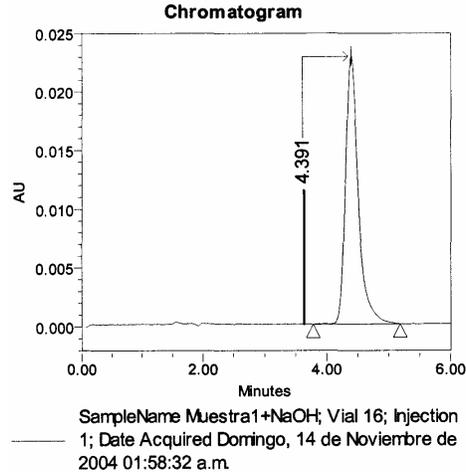


Figura 53 Muestra de RA 8 BS 2da concentración con NaOH  $t =$  inicial

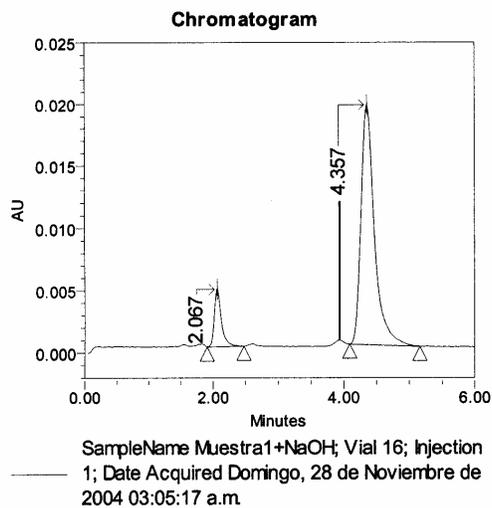


Figura 54 Muestra de RA 8 BS 2da concentración con NaOH  $t =$  15 días

Las muestras de la segunda concentración al ser sometidas a la condición de hidroxido de sodio no se ven afectadas ya que presenta el comportamiento de las muestras que no se sometieron a condiciones, por lo cual el hidroxido de sodio no tiene influencia sobre estas.

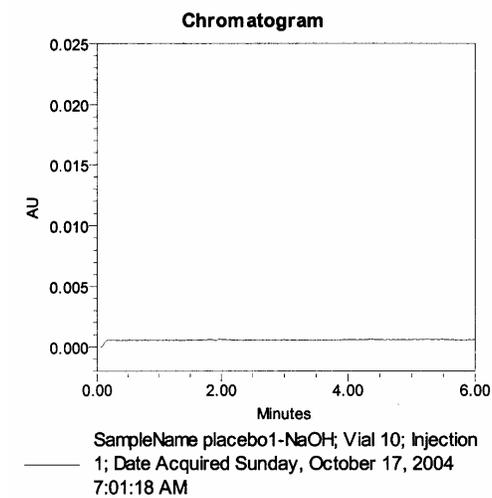


Figura 55 Placebo de RA 8 BS 1er concentración con NaOH t= inicial

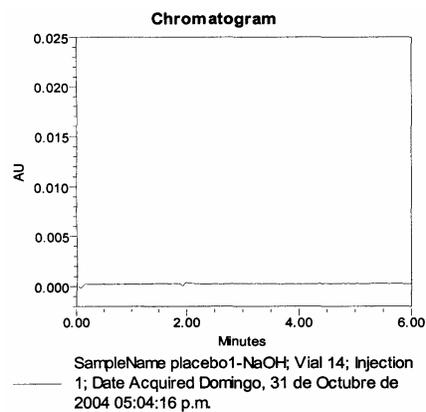


Figura 56 Placebo de RA 8 BS 1er concentración con NaOH t=15 días

El placebo al ser sometido a la condición básica con NaOH muestra que no se ve afectado desde la condición inicial hasta los 15 días, indicando que los componentes del cual esta constituido no sufre ningún cambio, además de que no se presentan reacciones entre las materias utilizadas para la fabricación de estas muestras.

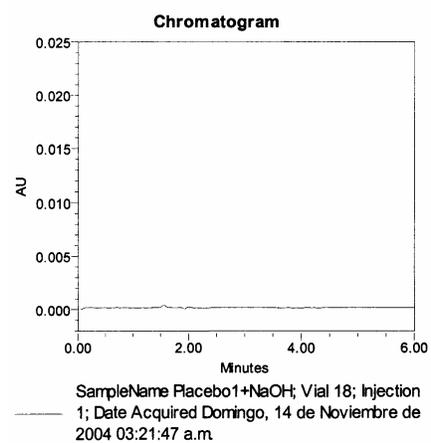


Figura 57 Placebo de RA 8 BS 2da concentración con NaOH  $t=$  inicial

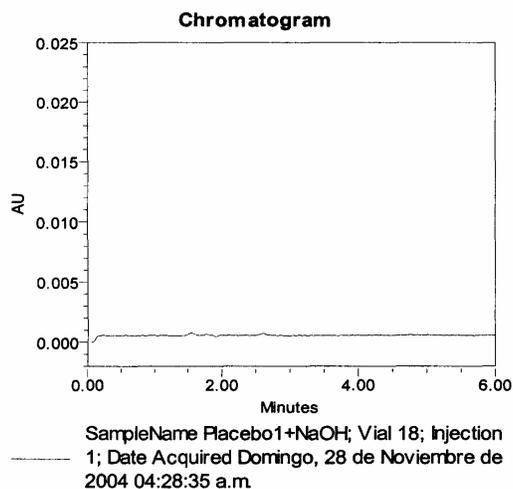


Figura 58 Placebo de RA 8 BS 2da concentración con NaOH  $t=$ 15 días

El placebo al ser sometido a la condición básica con NaOH muestra que no se ve afectado desde la condición inicial hasta los 15 días, indicando que los componentes del cual esta constituido no sufre ningún cambio, además de que no se presentan reacciones entre las materias utilizadas para la fabricación de estas muestras.

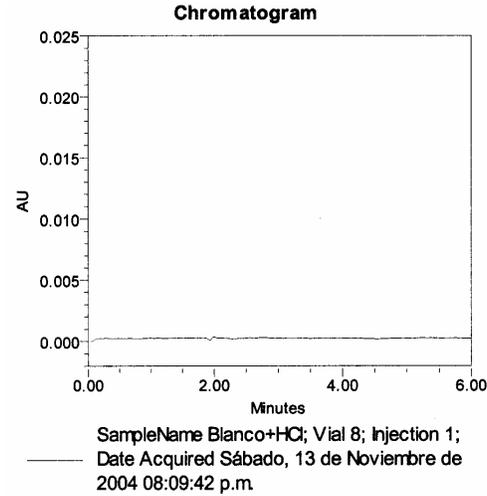


Figura 59 Blanco con HCl  $t=$  inicial

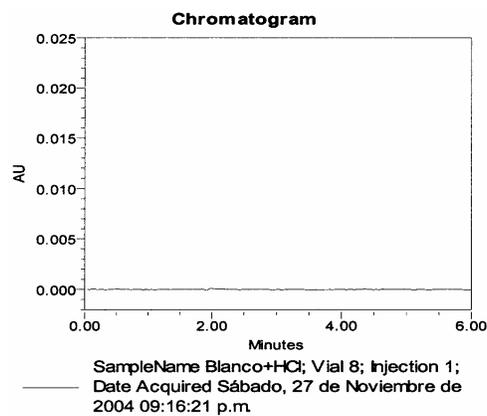


Figura 60 Blanco con HCl  $t=$ 15 días

Como se puede observar no existe diferencia alguna entre el blanco que fue sometido a la condición de ácido clorhídrico y la que se obtiene cuando se somete a la condición ácida después de 15 días, por lo cual la fase no se degrada con este condición.

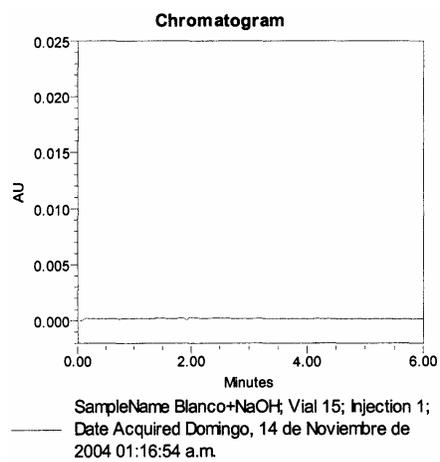


Figura 61 Blanco con NaOH  $t=$  inicial

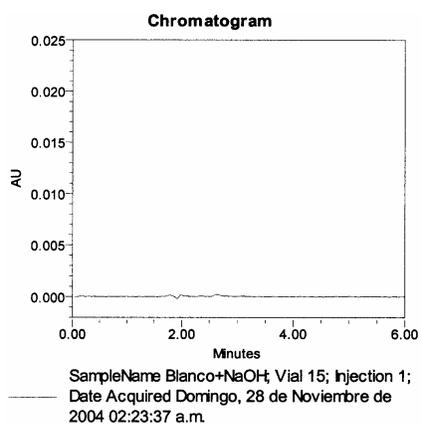


Figura 62 Blanco con NaOH  $t=$ 15 días

Como se puede observar no existe diferencia alguna entre el blanco que fue sometido a la condición de hidróxido de sodio y la que se obtiene cuando se somete a la condición básica después de 15 días, por lo cual la fase no se degrada con este condición.

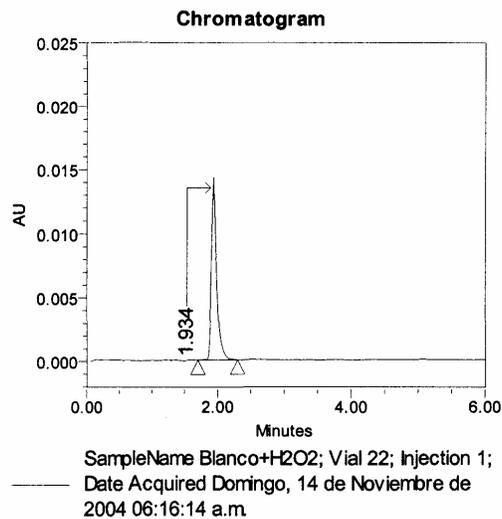


Figura 63 Blanco con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> t= inicial

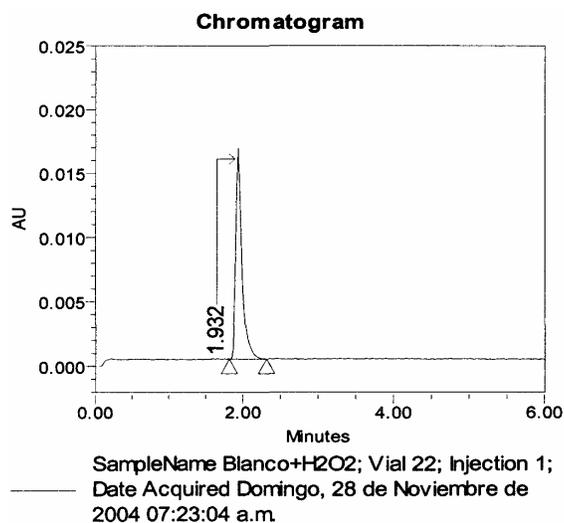


Figura 64 Blanco con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> t=15 días

Como se puede observar no existe diferencia alguna entre el blanco que fue sometido a la condición de oxidación y la que se obtiene cuando se somete a la condición de oxidación después de 15 días, por lo cual la fase no se degrada con este condición.

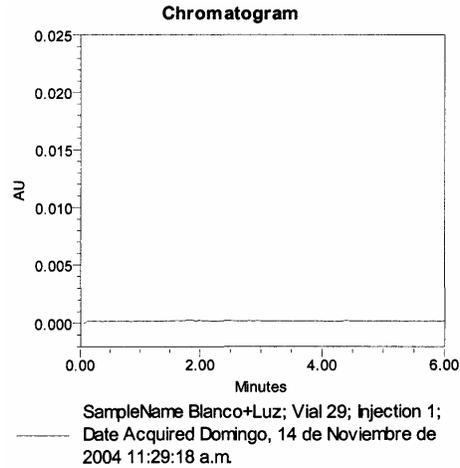


Figura 65 Blanco con luz  $t=$  inicial

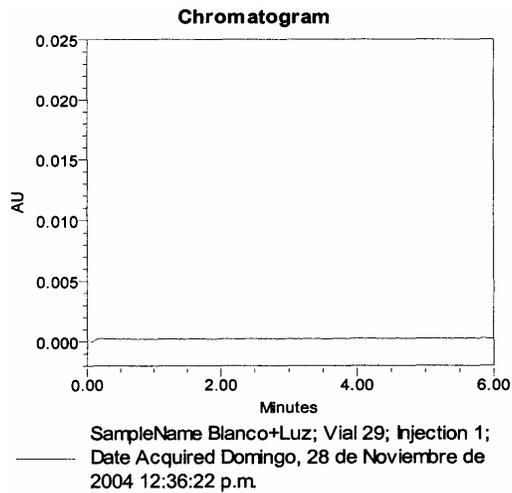


Figura 66 Blanco con luz  $t=15$  días

Como se puede observar no existe diferencia alguna entre el blanco que fue sometido a la condición de exposición de Luz UV y la que se obtiene cuando se somete a la condición de exposición de Luz UV después de 15 días, por lo cual la fase no se degrada con este condición.

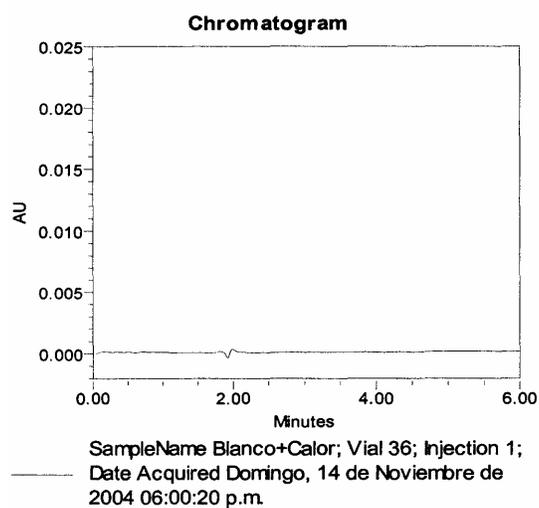


Figura 67 Blanco con temperatura  $t = \text{inicial}$

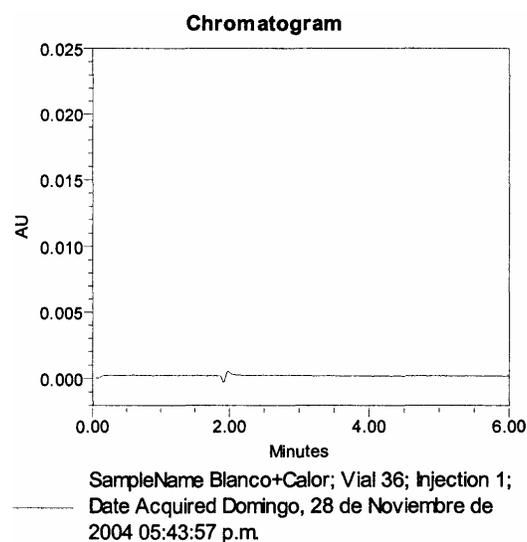


Figura 68 Blanco con temperatura  $t = 15 \text{ días}$

Como se puede observar no existe diferencia alguna entre el blanco que fue sometido a la condición de exposición de Temperatura y la que se obtiene cuando se somete a la condición de exposición de Temperatura después de 15 días, por lo cual la fase no se degrada con este condición.

#### 4.2 Linealidad

La linealidad de la respuesta del detector (área) a la longitud de onda del método fue examinada en seis niveles diferentes de concentración de la solución estándar en un rango de 60 a 140 %. Se prepararon dos diferentes curvas y cada nivel fue inyectado por triplicado, los datos se resumen en las siguientes tablas con sus respectivas gráficas.

Tabla 1 Linealidad

NIVEL (%)	MUESTRA	INYECCION	AREA RA 8 BS	AREA/ Conc.
60 (9.072 µg/mL)	1	1	191854.000894	21147.93
		2	190876.937129	21040.23
		3	191334.223225	21090.61
	2	1	192778.386136	21249.78
		2	192699.801252	21241.18
		3	192000.605056	21164.13
70 (10.584 µg/mL)	1	1	223087.093957	21077.76
		2	222337.403201	21006.90
		3	223130.012388	21081.82
	2	1	225301.312493	21286.94
		2	224947.584354	21253.59
		3	224376.131449	21199.55
80 (12.096 µg/mL)	1	1	255773.045285	21145.25
		2	255289.794046	21105.32
		3	257367.469600	21277.03
	2	1	259119.870326	21421.96
		2	259658.837329	21466.52
		3	259473.572355	21451.22
100 (15.12 µg/mL)	1	1	325693.490778	21540.54
		2	324075.796341	21433.60
		3	325634.479526	21536.64
	2	1	329520.656018	21793.72
		2	328811.761918	21746.83
		3	329063.416545	21763.43
120 (18.144 µg/mL)	1	1	384409.262727	21186.56
		2	385334.130780	21237.54
		3	384813.725714	21208.88
	2	1	390045.404748	21497.19
		2	391356.004003	21569.44
		3	392350.077717	21624.23
140 (21.168 µg/mL)	1	1	448409.321871	21183.34
		2	450164.247512	21266.25
		3	450685.013211	21290.86
	2	1	456133.020855	21548.23
		2	456696.466242	21574.83
		3	455827.495466	21533.78
PROMEDIO				21340.1
CV				1.02

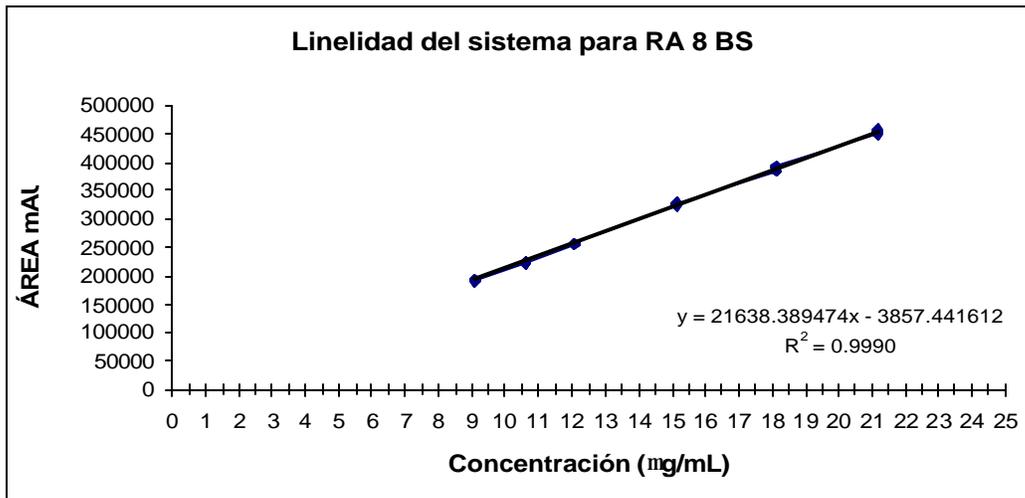


Figura 69 Grafica de regresión lineal de RA 8 BS

**Criterio de aceptación:** El coeficiente de determinación debe ser mayor o igual a 0.98 y el coeficiente de variación de la respuesta debe ser menor o igual a 2.0%

Al realizar el análisis estadístico de valores área (y) contra concentración (x) se observa que existe una relación estadísticamente significativa entre ambos y que el modelo que describe la relación que se ajusta a la recta es la siguiente:

$Y=m*x+b$	$y = 21638.389474x - 3857.441612$
Pendiente (m)=	21638.389474
Ordenada al origen (b)=	3857.441612
Coeficiente de correlación=	0.9995
Coeficiente de determinación ( $r^2$ )=	0.9990

Se puede observar que se presenta un comportamiento lineal en el intervalo de concentración de RA 8 BS de 9.072  $\mu\text{g/mL}$  a 21.168  $\mu\text{g/mL}$  con un coeficiente de determinación mayor a 0.98 y el coeficiente de variación del factor de respuesta es menor a 2.0 %, por lo cual se cumplen los criterios de aceptación establecidos para esta prueba.

### 4.3 Linealidad del método

#### 4.3.1 Linealidad del método para la primer concentración.

Tabla 2 de linealidad de Método para 1er concentración

Nivel (%)	No de inyección	mg Adicionados	mg Recuperados
70	1	0.700	0.7056
	2	0.700	0.7119
	3	0.700	0.7038
	1	0.700	0.6983
	2	0.700	0.7021
	3	0.700	0.6994
	1	0.700	0.6952
	2	0.700	0.6942
	3	0.700	0.6956
100	1	1.000	1.0090
	2	1.000	1.0150
	3	1.000	1.0143
	1	1.000	1.0114
	2	1.000	1.0062
	3	1.000	1.0106
	1	1.000	1.0150
	2	1.000	1.0172
	3	1.000	1.0130
130	1	1.300	1.3216
	2	1.300	1.3248
	3	1.300	1.3216
	1	1.300	1.3230
	2	1.300	1.3225
	3	1.300	1.3187
	1	1.300	1.3206
	2	1.300	1.3214
	3	1.300	1.3153

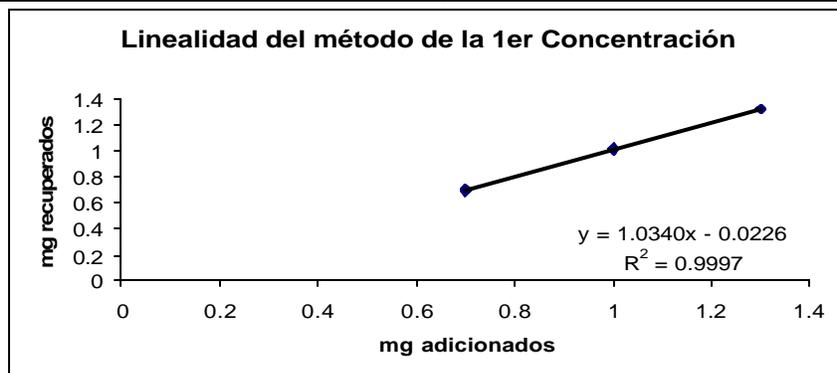


Figura 70 Grafica de linealidad de Método para 1er concentración.

**Criterio de aceptación:** El coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.98, la ordenada al origen no debe ser significativamente diferente de cero y la pendiente no debe ser significativamente diferente de uno.

Después de realizar la regresión lineal de los valores de mg adicionados (x) contra mg recuperados (y) se obtiene la siguiente ecuación de la recta.

$y=mx+b$	$Y=1.0340x-0.0226$
Pendiente (m)=	1.0340
Ordenada al origen (b)=	-0.0226
Coeficiente de correlación ( r ) =	0.9999
Coeficiente de determinación ( $r^2$ )=	0.9997
$t_{(0.95,25)}$ =	1.7081
Intervalo de confianza para la pendiente (95%, 25 g. l.)	1.0284 a 1.0396
Intervalo de confianza para la ordenada (95%, 25 g. l.)	-0.01681 a -0.02835
Coeficiente de variación de la regresión.	0.413%

Con los resultados obtenidos se puede observar que existe una relación estadística entre los mg adicionados y los recuperados de RA 8 BS, ya que nos arroja como resultado un coeficiente de determinación de 0.9997, el cual es mayor a 0.98, el cual indica que el método es lineal, por lo cual se puede observar que el método cumple con este parámetro, también se puede observar que el rango de la ordenada al origen no incluye el cero por lo cual se puede considerar que no cumple con este criterio, pero esto se debe a que no todos los métodos cumplen con la ley de Lambert y Beer, y esto se puede observar que a concentraciones bajas cambia el valor de la pendiente.

Para el caso de la pendiente el criterio indica que no debe ser significativamente diferente de uno, pero en el cálculo del intervalo para este parámetro se observa que no lo incluye y esto se puede deber a un error en el método.

### 4.3.2 Linealidad del método para la segunda concentración.

Tabla 3 de linealidad de Método para 2da concentración

NIVEL (%)	No de inyección	Mg Adicionados	Mg Recuperados
70	1	1.050	1.0346
	2	1.050	1.0401
	3	1.050	1.0354
	1	1.050	1.0336
	2	1.050	1.0273
	3	1.050	1.0419
	1	1.050	1.0352
	2	1.050	1.0340
	3	1.050	1.0264
100	1	1.500	1.5041
	2	1.500	1.4802
	3	1.500	1.4847
	1	1.500	1.4976
	2	1.500	1.4900
	3	1.500	1.4853
	1	1.500	1.4870
	2	1.500	1.4927
	3	1.500	1.4866
130	1	1.950	1.9757
	2	1.950	1.9700
	3	1.950	1.9685
	1	1.950	1.9622
	2	1.950	1.9627
	3	1.950	1.9546
	1	1.950	1.9697
	2	1.950	1.9709
	3	1.950	1.9660

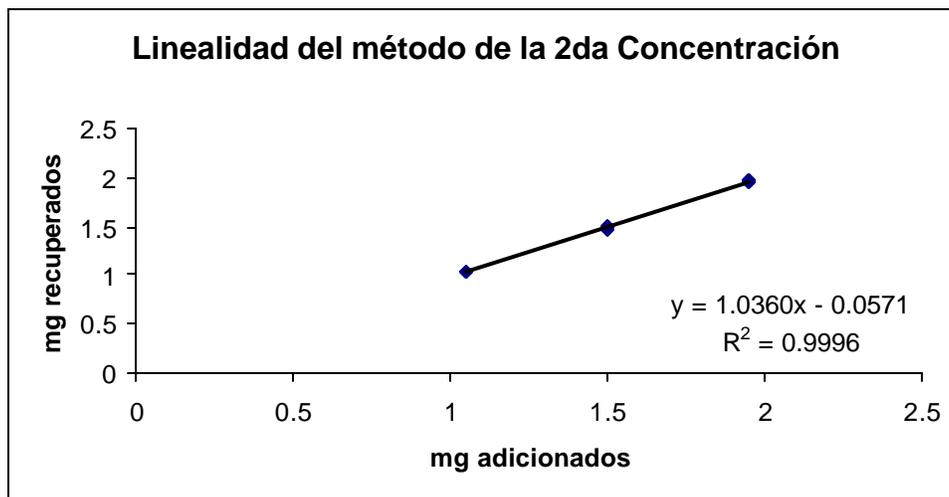


Figura 71 Grafica de linealidad de Método para 2da concentración.

**Criterio de aceptación:** El coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.98, la ordenada al origen no debe ser significativamente diferente de cero y la pendiente no debe ser significativamente diferente de uno.

Después de realizar la regresión lineal de los valores de mg adicionados (x) contra mg recuperados (y) se obtiene la siguiente ecuación de la recta.

$y=mx+b$	$Y=1.0360x-0.0571$
Pendiente (m)=	1.0360
Ordenada al origen (b)=	-0.0571
Coeficiente de correlación ( r ) =	0.9998
Coeficiente de determinación ( $r^2$ )=	0.9996
$t_{(0.95,25)}$ =	1.7081
Intervalo de confianza para la pendiente (95%, 25 g. l.)	1.0288 a 1.0432
Intervalo de confianza para la ordenada (95%, 25 g. l.)	-0.04597 a -0.06825
Coeficiente de variación de la regresión.	0.539%

Con los resultados obtenidos se puede observar que existe una relación estadística entre los mg adicionados y los recuperados de RA 8 BS, ya que nos arroja como resultado un coeficiente de determinación de 0.9996, el cual es mayor a 0.98, el cual indica que el método es lineal, por lo cual se puede observar que el método cumple con este parámetro, también se puede observar que el rango de la ordenada al origen no incluye el cero por lo cual se puede considerar que no cumple con este criterio, pero esto se debe a que no todos los métodos cumplen con la ley de Lambert y Beer, y esto se puede observar que a concentraciones bajas cambia el valor de la pendiente.

Para el caso de la pendiente el criterio indica que no debe ser significativamente diferente de uno, pero en el cálculo del intervalo para este parámetro se observa que no lo incluye y esto se puede deber a un error en el método.

#### 4.4 Exactitud

Se prepararon muestras de placebo cargado a tres diferentes niveles de concentración (70, 100 y 130 %). Los resultados se muestran las tablas 2 y 3

Tabla 4 Exactitud para RA 8 BS 1er concentración

NIVEL (%)	MUESTRA	INYECCION	% RECOBRO RA 8 BS	PROMEDIO (%)	CV
70	1	1	100.8	100.1%	0.8%
		2	101.7		
		3	100.5		
	2	1	99.8		
		2	100.3		
		3	99.9		
	3	1	99.3		
		2	99.2		
		3	99.4		
100	1	1	100.9	101.2%	0.3%
		2	101.5		
		3	101.4		
	2	1	101.1		
		2	100.6		
		3	101.1		
	3	1	101.5		
		2	101.7		
		3	101.3		
130	1	1	101.7	101.6%	0.2%
		2	101.9		
		3	101.7		
	2	1	101.8		
		2	101.7		
		3	101.4		
	3	1	101.6		
		2	101.6		
		3	101.2		

Promedio Global= 101.0%

Desv. Est. Global= 0.8

CV Global= 0.8%

#### **Criterio de aceptación:** Recobros del 98% al 102%

Como se puede observar en la tabla los porcentajes de recuperación a cada nivel de concentración de RA 8 BS cumple con el criterio de aceptación estipulado para esta prueba y se obtuvo un promedio general de 101.0%, el cual se encuentra dentro del rango establecido, además se tiene un coeficiente de variación de 0.8% el cual es menor al 2.0%, por lo que el método es exacto para esta concentración.

Tabla 5 Exactitud para RA 8 BS 2da concentración

NIVEL (%)	MUESTRA	INYECCION	% RECOBRO RA 8 BS	PROMEDIO (%)	CV
70	1	1	98.5	98.5	0.5
		2	99.1		
		3	98.6		
	2	1	98.4		
		2	97.8		
		3	99.2		
	3	1	98.6		
		2	98.5		
		3	97.8		
100	1	1	100.3	99.3	0.5
		2	98.7		
		3	99.0		
	2	1	99.8		
		2	99.3		
		3	99.0		
	3	1	99.1		
		2	99.5		
		3	99.1		
130	1	1	101.3	100.9	0.3
		2	101.0		
		3	100.9		
	2	1	100.6		
		2	100.7		
		3	100.2		
	3	1	101.0		
		2	101.1		
		3	100.8		

Promedio Global= 99.6%  
 Desv. Est. Global= 1.1  
 CV Global= 1.1%

**Criterio de aceptación:** Recobros del 98% al 102%

Como se puede observar en la tabla los porcentajes de recuperación a cada nivel de concentración de RA 8 BS cumple con el criterio de aceptación estipulado para esta prueba y se obtuvo un promedio general de 99.6%, el cual se encuentra dentro del rango establecido, además se tiene un coeficiente de variación de 1.1% el cual es menor al 2.0%, por lo que el método es exacto para esta concentración.

## 4.5 Precisión y precisión intermedia

### 4.5.1 Precisión

Se tomaron los valores obtenidos de la Precisión intermedia del analista 2 los días 1 y 2 (seis muestras en total), los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 6 Precisión para RA 8 BS 1er concentración

Precisión de RA 8 BS 1er Concentración		
DIA	MUESTRA	% DE RECOBRO
1	1	101.4
		101.2
		101.6
	2	102.0
		102.3
		101.9
	3	102.3
		102.3
		102.8
2	1	100.1
		100.1
		100.0
	2	99.4
		99.3
		99.3
	3	100.0
		100.0
		99.6

Promedio= 100.9%

Desv. Est.= 1.2

CV= 1.2%

**Criterio de aceptación:** El Coeficiente de variación debe ser menor o igual al 1.5 %

Con los resultados obtenidos en la prueba se puede observar que el coeficiente de variación de la prueba es de 1.2% por lo cual cumple con el criterio de aceptación de la prueba, por lo cual el método es preciso para esta concentración.

Se tomaron los valores obtenidos de la Precisión intermedia del analista 2 los días 1 y 2 (seis muestras en total), los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 7 Precisión para RA 8 BS 2da concentración

Precisión de RA 8 BS 2da Concentración		
DIA	MUESTRA	% DE RECOBRO
1	1	98.6
		98.2
		98.4
	2	98.2
		98.5
		98.0
	3	98.5
		98.3
		98.3
2	1	98.5
		98.3
		98.3
	2	97.7
		97.5
		97.5
	3	97.0
		97.1
		97.1

Promedio = 98.0%  
 Desv. est. = 0.5  
 % DSR = 0.5%

**Criterio de aceptación:** El Coeficiente de variación debe ser menor o igual al 1.5 %

Con los resultados obtenidos en la prueba se puede observar que el coeficiente de variación de la prueba es de 0.5 % por lo cual cumple con el criterio de aceptación de la prueba, por lo cual el método es preciso para esta concentración.



Tabla 9 Precisión intermedia RA 8 BS 2da concentración

Precisión intermedia 2da Concentración				
DIA	MUESTRA	INYECCION	% RECOBRO	
			ANALISTA 1	ANALISTA 2
1	1	1	97.4	98.6
		2	97.2	98.2
		3	97.1	98.4
	2	1	97.7	98.2
		2	97.7	98.5
		3	98.5	98.0
	3	1	97.9	98.5
		2	97.8	98.3
		3	97.8	98.3
		Promedio	98.0%	
		Desv est	0.5	
		CV	0.5%	
2	1	1	97.3	98.5
		2	97.7	98.3
		3	97.4	98.3
	2	1	96.3	97.7
		2	96.2	97.5
		3	96.3	97.5
	3	1	97.6	97.0
		2	97.5	97.1
		3	97.5	97.1
		Promedio	97.4%	
		Desv est	0.7	
		CV	0.7%	
Promedio General			97.7%	
Desv. Est. General			0.6	
CV General (%)			0.6%	

**Criterio de Aceptación:** El Coeficiente de variación debe ser menor o igual a 2.0%

Con los resultados obtenidos en la prueba se puede observar que el coeficiente de variación promedio de las 12 determinaciones es de 0.6 %, lo que indica que el método es reproducible ya que cumple con el criterio de aceptación establecido para esta prueba.

## 4.6 Límite de detección y de cuantificación

### 4.6.1 Límite de detección

Para obtener el valor del límite de detección, primero se obtiene el promedio de la altura del ruido, este valor se multiplica por tres y este es el valor que se obtiene

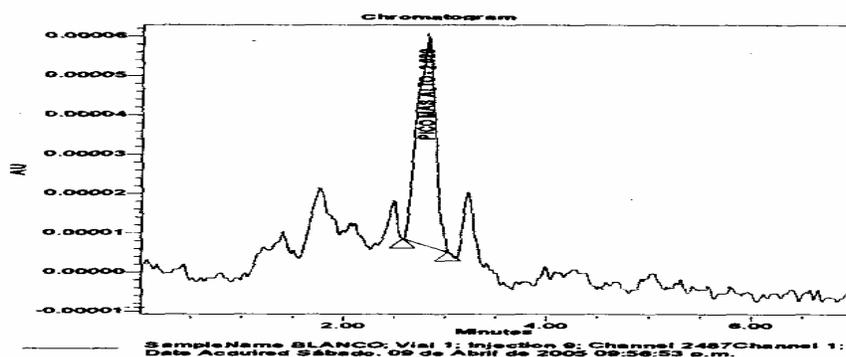


Figura 72 Cromatograma del blanco

La altura del pico se observa en el siguiente cuadro de resultados

Tabla 10 Resultados del blanco

**RESULTADOS POR AREA**  
Name: PICO MAS ALTO

SampleName	Vial	Name	Inj	RT (min)	USP N	USPT	K	USPR	Height (µV)	Area (µV*sec)
BLANCO	1	PICO MAS ALTO	1	2.8	795.157250	0.9	1.8		45	525
BLANCO	1	PICO MAS ALTO	2	2.8	1016.951563	0.9	1.8		49	578
BLANCO	1	PICO MAS ALTO	3	2.8	673.006748	0.8	1.8		45	526
BLANCO	1	PICO MAS ALTO	4	2.8	831.480753	0.9	1.8		46	565
BLANCO	1	PICO MAS ALTO	5	2.8	1132.991753	0.9	1.8		54	629
BLANCO	1	PICO MAS ALTO	6	2.8	985.251102	0.9	1.8		50	609
BLANCO	1	PICO MAS ALTO	7	2.8	627.553550	0.9	1.8		52	607
BLANCO	1	PICO MAS ALTO	8	2.8	1037.743954	1.0	1.8		52	628
BLANCO	1	PICO MAS ALTO	9	2.8	1045.114955	1.0	1.8		53	690
BLANCO	1	PICO MAS ALTO	10	2.8	790.443094	0.9	1.8		49	599
				2.8	694	0.9	1.8		49.5	593
									6.5	7.4

El límite de detección estimado es con una altura de aproximadamente 150 µV

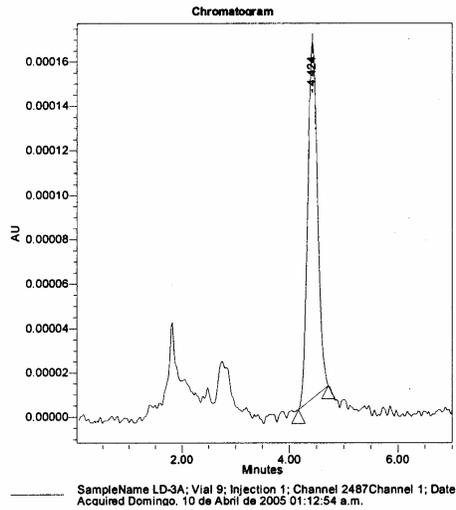


Figura 73 Cromatograma del límite de detección

Se realizó una curva de calibración para obtener el valor del límite de detección y del límite de cuantificación.

La curva de calibración es la siguiente:

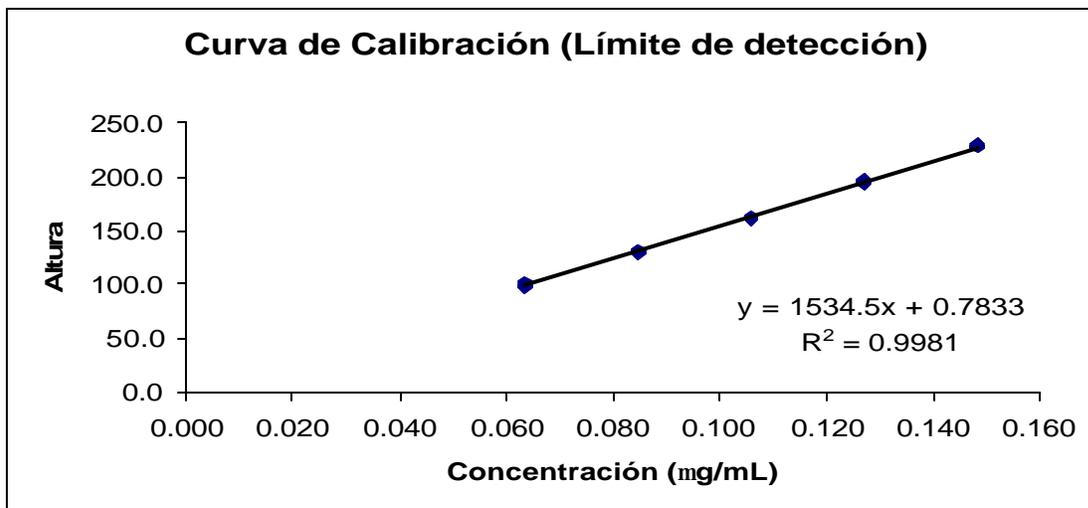


Figura 74 Curva de calibración de límite de detección

Tabla 11 Resultados de las alturas de la curva para límite de detección

NIVEL	INYECCIÓN	Curva	CONCENTRACIÓN	RESPUESTA	FACTOR
%			( µg/mL )	(ALTURA)	(ALTURA/Con.)
0.423	?	1	0.064	103.0	1621.95
	2		0.064	98.0	1543.21
	3		0.064	100.0	1574.70
	1	2	0.064	99.0	1558.96
	2		0.064	97.0	1527.46
	3		0.064	99.0	1558.96
0.564	?	1	0.085	132.0	1558.96
	2		0.085	131.0	1547.15
	3		0.085	128.0	1511.72
	1	2	0.085	130.0	1535.34
	2		0.085	132.0	1558.96
	3		0.085	129.0	1523.53
0.706	?	1	0.106	161.0	1521.16
	2		0.106	160.0	1511.72
	3		0.106	159.0	1502.27
	1	2	0.106	162.0	1530.61
	2		0.106	164.0	1549.51
	3		0.106	164.0	1549.51
0.847	?	1	0.127	198.0	1558.96
	2		0.127	196.0	1543.21
	3		0.127	198.0	1558.96
	1	2	0.127	195.0	1535.34
	2		0.127	194.0	1527.46
	3		0.127	192.0	1511.72
0.988	?	1	0.148	231.0	1558.96
	2		0.148	228.0	1538.71
	3		0.148	229.0	1545.46
	1	2	0.148	229.0	1545.46
	2		0.148	230.0	1552.21
	3		0.148	228.0	1538.71
				PROMEDIO	1543.4
				DESV. EST.	23.09
				CV	1.50

Con los resultados que se obtuvieron se puede decir que el límite de detección es 0.106µg/mL, ya que es tres veces más alto que la señal del ruido, pero en este caso se puede observar también que dicho cálculo es erróneo, ya que el tiempo de retención en el cual se tomó la altura del ruido no corresponde al tiempo de retención del activo del cual se está desarrollando el método analítico,

#### 4.6.2 Límite de cuantificación

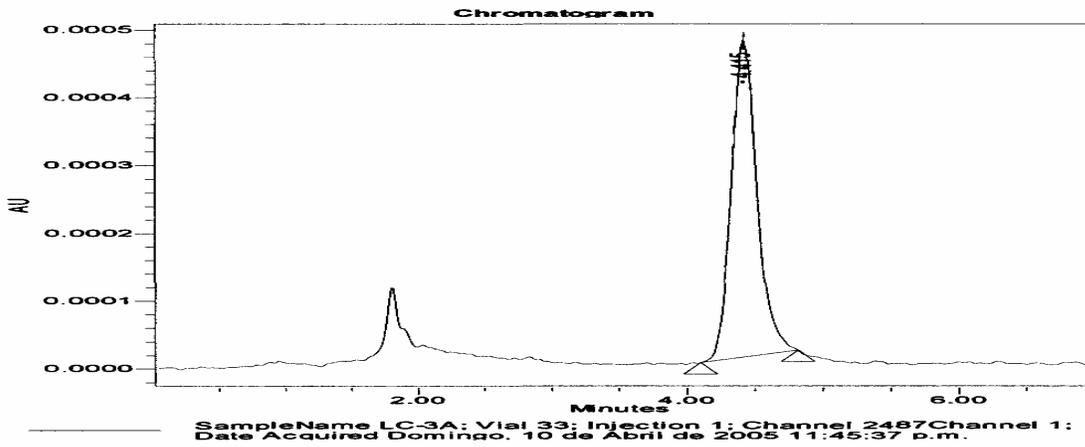


Figura 75 Cromatograma del límite de cuantificación

De acuerdo a la altura promedio del ruido el valor calculado de altura para el límite de cuantificación es de 500.

La curva de calibración para el límite de cuantificación es la siguiente:

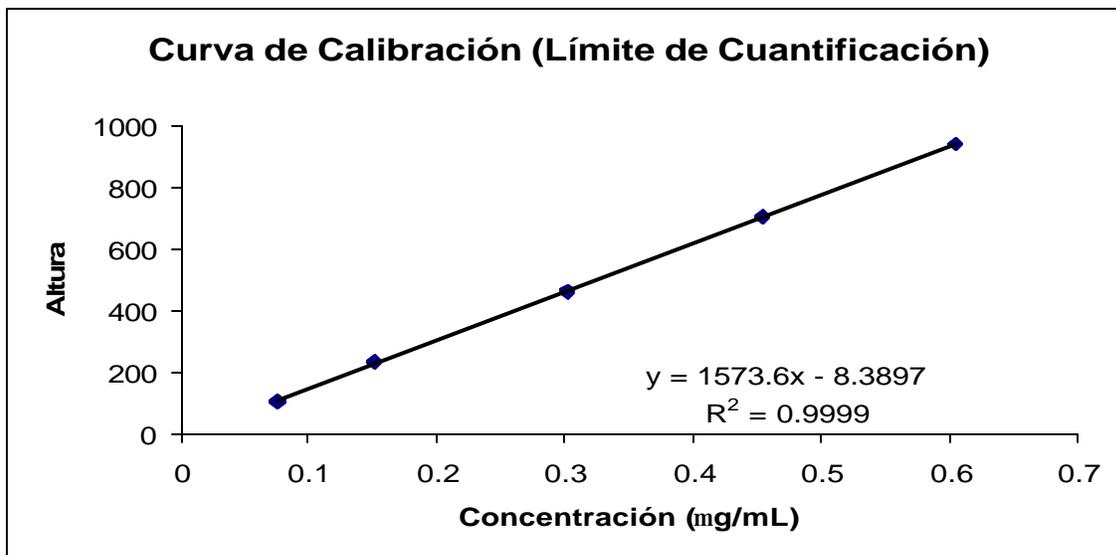


Figura 76 Curva de calibración de límite de cuantificación

Tabla 12 Resultados de las alturas de la curva para límite de cuantificación.

NIVEL	INYECCION	Curva	CONCENTRACION	RESPUESTA	FACTOR
%			( $\mu\text{g/mL}$ )	(ALTURA)	(ALTURA/CONC)
0.504	1	1	0.076	107	1407.895
	2		0.076	107	1407.895
	3		0.076	105	1381.579
	1	2	0.076	114	1500.000
	2		0.076	111	1460.526
	3		0.076	114	1500.000
1.008	1	1	0.151	231	1529.801
	2		0.151	235	1556.291
	3		0.151	231	1529.801
	1	2	0.151	235	1556.291
	2		0.151	233	1543.046
	3		0.151	229	1516.556
2.016	1	1	0.302	466	1543.046
	2		0.302	464	1536.424
	3		0.302	458	1516.556
	1	2	0.302	467	1546.358
	2		0.302	468	1549.669
	3		0.302	463	1533.113
3.024	1	1	0.454	704	1550.661
	2		0.454	707	1557.269
	3		0.454	705	1552.863
	1	2	0.454	708	1559.471
	2		0.454	708	1559.471
	3		0.454	711	1566.079
4.032	1	1	0.605	945	1561.983
	2		0.605	944	1560.331
	3		0.605	942	1557.025
	1	2	0.605	945	1561.983
	2		0.605	943	1558.678
	3		0.605	942	1557.025
PROMEDIO					1527.3
DESV. EST.					49.49
CV					3.24

Con la curva de calibración se puede observar que la concentración con la cual se obtiene una altura cercana a la calculada es la de  $0.302\mu\text{g/mL}$ , por lo cual esta solución es la encontrada como límite de cuantificación.

Para llevar a cabo la corroboración se prepararon 6 soluciones de esta concentración y e inyecto por triplicado para obtener el CV de las muestras.

Tabla 13 Resultados de la corroboración de límite de cuantificación

RESULTADOS POR AREA												
Name: DIPIRIDAMOL												
	SampleName	Vial	Name	Inj	RT (min)	USP N	USP T	K'	USP R	Height (µV)	Area (µV*sec)	Amount
1	LC-1	10	DIPIRIDAMOL	1	4.4	2644.335278	1.2	3.4		469	6155	0.302
2	LC-1	10	DIPIRIDAMOL	2	4.4	2636.574943	1.2	3.4		467	6114	0.302
3	LC-1	10	DIPIRIDAMOL	3	4.4	2672.635270	1.2	3.4		465	6058	0.302
4	LC-2	11	DIPIRIDAMOL	1	4.4	2692.823866	1.2	3.4		460	6021	0.302
5	LC-2	11	DIPIRIDAMOL	2	4.4	2655.310729	1.3	3.4		462	6207	0.302
6	LC-2	11	DIPIRIDAMOL	3	4.4	2727.863869	1.1	3.4		457	5911	0.302
7	LC-3	12	DIPIRIDAMOL	1	4.4	2654.076717	1.2	3.4		474	6269	0.302
8	LC-3	12	DIPIRIDAMOL	2	4.4	2710.861404	1.2	3.4		469	6105	0.302
9	LC-3	12	DIPIRIDAMOL	3	4.4	2699.057872	1.2	3.4		471	6195	0.302
10	LC-4	13	DIPIRIDAMOL	1	4.4	2690.769137	1.2	3.4		467	6118	0.302
11	LC-4	13	DIPIRIDAMOL	2	4.4	2733.269373	1.2	3.4		466	6097	0.302
12	LC-4	13	DIPIRIDAMOL	3	4.4	2734.576475	1.2	3.4		465	6111	0.302
13	LC-5	14	DIPIRIDAMOL	1	4.4	2714.741842	1.1	3.4		473	6132	0.302
14	LC-5	14	DIPIRIDAMOL	2	4.4	2622.970621	1.2	3.4		477	6335	0.302
15	LC-5	14	DIPIRIDAMOL	3	4.4	2704.878170	1.2	3.4		474	6189	0.302
16	LC-6	15	DIPIRIDAMOL	1	4.4	2681.873780	1.2	3.4		478	6356	0.302
17	LC-6	15	DIPIRIDAMOL	2	4.4	2637.020472	1.2	3.4		475	6257	0.302
18	LC-6	15	DIPIRIDAMOL	3	4.4	2646.512907	1.2	3.4		475	6215	0.302
Mean					4.4	2679	1.2	3.4		469.2	6160	0.3
% RSD										1.2	1.6	0.0

Con los resultados obtenidos se puede observar que el coeficiente de variación es de 1.2, este valor es menor al estipulado en el criterio de aceptación que es de 10.0%, con lo cual se corrobora que el límite de detección es el correcto.

#### 4.7 Tolerancia y robustez

##### 4.7.1 Variación de la forma en la que se prepara la fase móvil. (Prueba de Robustez)

Esto es que el equipo usó dos reservorios diferentes y al analizar se preparaba la fase móvil con ayuda de las bombas del equipo o que el químico analista prepare la fase móvil filtrando todo por separado y mezclando al final, solo se utiliza un reservorio.

El % de variación no debe ser mayor al 2.0

Los resultados obtenidos son los siguientes:

Tabla 14 Resultados Variación de Preparación de fase

FASE MÓVIL	ÁREA PROMEDIO	TR	T	K	Rs	Platos teóricos	CV del área
FASE MÓVIL PREPARADA POR EL EQUIPO CON DOS RESERVORIOS	324609	4.4	1.3	3.4	N/A	2604	0.8
FASE MÓVIL PREPARADA MANUALMENTE EN UN SOLO RESERVORIO	323357	4.4	1.3	3.4	N/A	2607	0.9

CONCEPTO	FASE MÓVIL PREPARADA POR EL EQUIPO CON DOS RESERVORIOS	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO	
			FASE MÓVIL PREPARADA MANUALMENTE EN UN SOLO RESERVORIO	% VARIACIÓN
Coleo (T) :	1.3	Menor a 2.0	1.3	0
Tiempo de retención (TR) :	4.4	No se ve afectado sensiblemente y no se afecta la selectividad	4.4	0
K:	3.4	No debe haber una variación mayor del 2.0% con respecto a la fase original	3.4	0
C.V del área. :	0.8	No mayor del 2.0%	0.9	0.1

El tiempo de retención, así como los parámetros cromatográficos no se ven modificados utilizando la fase móvil con ayuda del equipo, utilizando dos reservorios y la fase móvil preparada por el analista en un reservorio por lo cual no existe diferencia alguna entre el modo de preparación de la fase móvil.

#### 4.7.2 variación en la proporción de la fase móvil. (Prueba de Robustez)

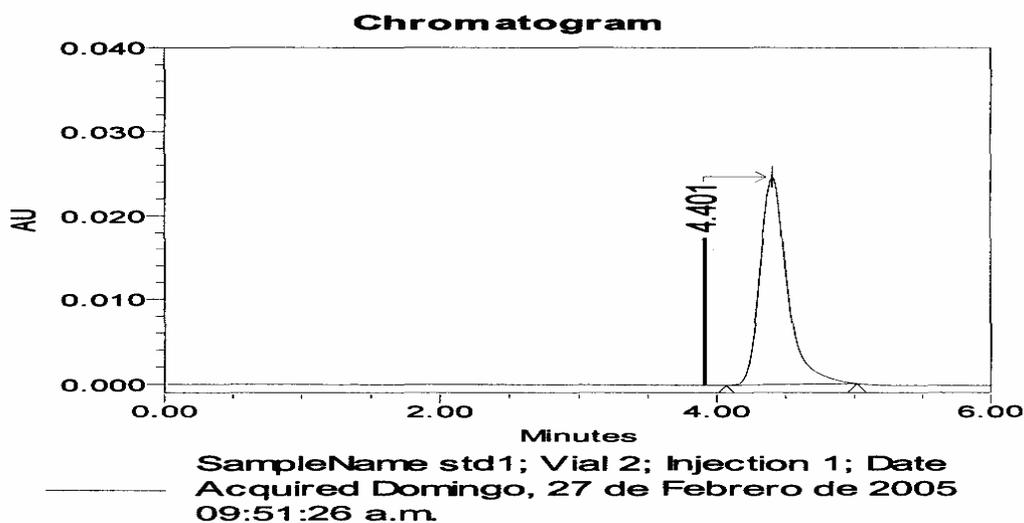


Figura 77 Fase normal: 75% Metanol: 25% Buffer pH 4.6

En este cromatograma se observa que en condiciones normales de operación el tiempo de retención es de 4.4 min.

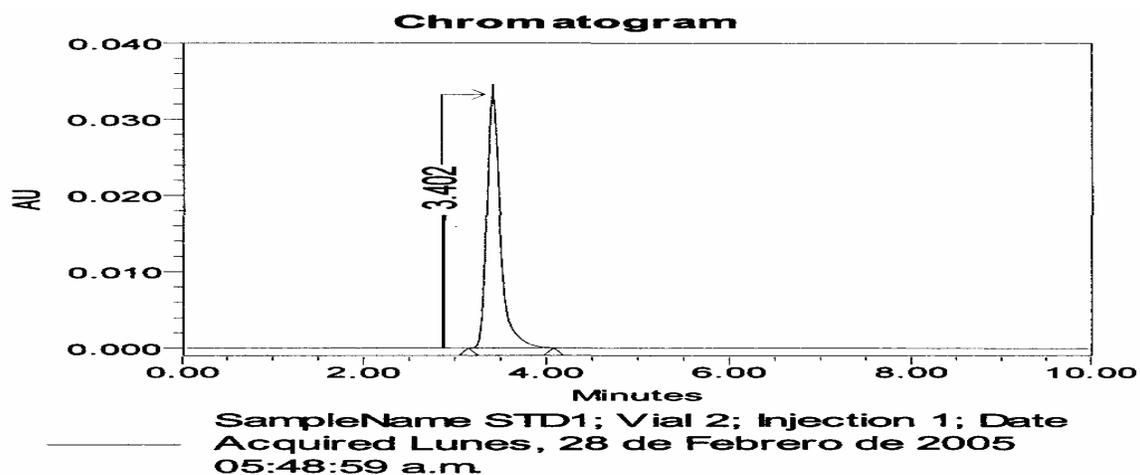


Figura 78 Fase 1 80% Metanol: 20% Buffer pH 4.6

En este cromatograma se observa que el tiempo de retención del activo se modifica hasta un valor de 3.4 min

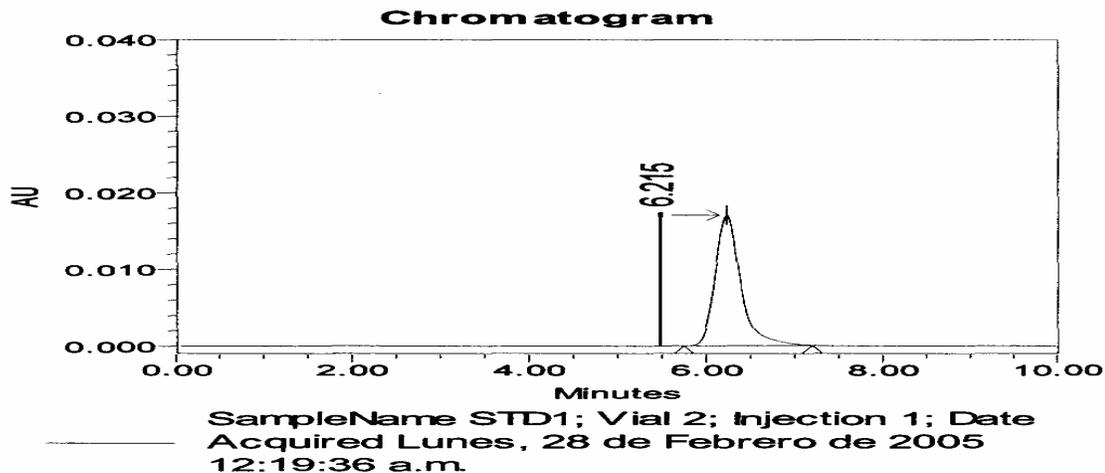


Figura 79 Fase 2 70% Metanol: 30% Buffer pH 4.6

En este cromatograma se observa que el tiempo de retención del activo se modifica hasta un valor de 6.2 min.

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la variación de fase móvil.

Tabla 15 Resultados variación de fase móvil

FASE MÓVIL	ÁREA PROMEDIO	TR	T	K	Rs	Platos teóricos	CV del area
NORMAL (Buffer de fosfatos pH 4.6 25 %y metanol HPLC 75%)	333468	4.4	1.3	3.4	N/A	2643	0.9
Fase 1 (Buffer de fosfatos pH 4.6 20 %y metanol HPLC 80%)	342103	3.4	1.4	2.4	N/A	2871	0.7
Fase 2 (Buffer de fosfatos pH 4.6 30 %y metanol HPLC 70%)	340928	6.2	1.4	5.2	N/A	2453	0.9

CONCEPTO	RESULTADOS FASE MÓVIL NORMAL	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	RESULTADO	
			Fase 1 (Buffer de fosfatos pH 4.6 20 %y metanol HPLC 80%)	Fase 2 (Buffer de fosfatos pH 4.6 30 %y metanol HPLC 70%)
Coleo (T) :	1.3	Menor a 2.0	1.4	1.4
Tiempo de retención (TR) :	4.4	No se ve afectado por $\pm 1.0 \text{ min}^{20}$	3.4	6.2
K:	3.4	No se debe ver afectado considerablemente <sup>20</sup>	29.4%	52.9%
C.V. del área :	0.9	No mayor del 2.0%	0.7	0.9

Para dar un resultado más adecuado se realizó un análisis de varianza entre la condición de trabajo normal y las variaciones de proporción de fase móvil, se encontró que existe una diferencia significativa entre la fase móvil normal y la variación de proporción de fase móvil, El análisis estadístico se encuentra en el Apéndice 1, el cual describe la metodología que se siguió para realizar estos cálculos.

#### 4.7.3 Tolerancia de filtros

Se utilizaron filtros Whatman 0.45 $\mu\text{m}$  y filtros Millex 0.45 $\mu\text{m}$  para cada concentración.

Para la tolerancia de filtros no debe existir una diferencia significativa entre ambos filtros , además de que no debe existir una diferencia entre ambos tipos de filtro mayor a 2%

Para la 1er concentración.

Tabla 16 Resultados variación de membranas de filtración para 1er concentración

Filtro	MUESTRA	ÁREA	% DE RECOBRO	Promedio
Whatman	1	328295	99.3	99.1
		326966	98.9	
		326896	98.9	
	2	326903	98.9	98.8
		326300	98.7	
		326451	98.8	
	3	324935	98.3	98.3
		324797	98.3	
		324555	98.2	
Millex	1	326614	98.8	98.8
		326570	98.8	
		326532	98.8	
	2	327054	99.0	98.9
		326517	98.8	
		326767	98.9	
	3	325863	98.6	98.7
		326713	98.8	
		326220	98.7	

Promedio Whatman=	98.7	Promedio Millex=	98.8
Desviación estándar		Desviación estándar	
Whatman=	0.4	Millex=	0.1
% DSR Whatman=	0.4	% DSR Millex=	0.1

No existe una diferencia significativa entre el uso de filtros millex y Whatman, ya que la diferencia entre medias es de 0.1, pero además se realizó una prueba de comparación de medias para corroborar los resultados obtenidos, esta prueba se encuentra descrita en el apéndice 2, en el cual nos dice que no existe diferencia significativa entre ambos tipos de filtros para la concentración de 50 mg.

Tabla 17 Resultados de variación de membranas de filtración para 2da Concentración

Filtro	MUESTRA	ÁREA	% DE RECOBRO	Promedio
Whatman	1	419776	101.2	101.0
		419661	101.2	
		417928	100.8	
	2	418733	101.0	100.7
		417311	100.6	
		417340	100.6	
	3	416876	100.5	100.4
		416383	100.4	
		416213	100.3	
Millex	1	416921	100.5	100.6
		417768	100.7	
		417081	100.6	
	2	417611	100.7	100.6
		417044	100.5	
		417356	100.6	
	3	416858	100.5	100.5
		416348	100.4	
		416968	100.5	

Promedio Whatman= 100.7

Promedio Millex= 100.6

Desv. Est. Whatman= 0.3

Desv. Est. Millex= 0.1

% DSR Whatman= 0.3

% DSR Millex= 0.1

No existe una diferencia significativa entre el uso de filtros millex y Whatman, ya que la diferencia entre medias es de 0.1, pero además se realizó una prueba de comparación de medias para corroborar los resultados obtenidos, esta prueba se encuentra descrita en el apéndice 3, en el cual nos dice que no existe diferencia significativa entre ambos tipos de filtros para la concentración de 75 mg.

#### 4.8 Adecuabilidad del sistema

Tabla 18 Adecuabilidad de RA 8 BS

FASE	TR	N	T	K'	No. Inyecciones
1	4.9	2875	1.1	3.9	7
2	4.4	2933	1.3	3.4	8
3	4.4	1930	1.4	3.4	12
4	4.7	2135	1.3	3.7	11
5	4.5	2497	1.4	3.5	11
6	4.4	2479	1.4	3.4	14
7	4.4	2359	1.5	3.4	16
8	4.4	2469	1.5	3.4	16
9	4.5	1785	1.5	3.5	29
10	4.4	2688	1.3	3.4	15
PROMEDIO	4.5	2415	1.4	3.5	14

De acuerdo con los resultados obtenidos los parámetros de adecuabilidad son los que a continuación se presentan:

	RA 8 BS
Tiempo de retención (Tr)	4.5 min $\pm$ 1 min
Coleo (T)	Menor a 2
Platos Teóricos	2415

Además antes de cada serie de medición, inyectar por quintuplicado la solución de comparación 1 y una vez la solución de comparación dos la DER deberá ser menor o igual a 2 %, intercalar inyecciones de estándar cada 6 muestras y al final de la serie la DER de todas las inyecciones deberá ser menor o igual a 2.0 %.

#### 4.9 Estabilidad de las muestras y estándares

La estabilidad de las muestras y referencias se evaluó preparando tres muestras y dos referencias, los cuales fueron analizados a las 24, 48 y 72 horas después de su preparación. Las muestras y referencias fueron almacenadas en temperatura

ambiente y en refrigeración, empleando soluciones de referencia recientemente preparadas.

#### 4.9.1 Estabilidad estándares

Tabla 19 Estabilidad de estándares.

CONDICIÓN	Refrigeración	sin Luz	con Luz
INICIAL	100.0	100.0	100.0
Muestra 1	97.6	97.5	86.9
Muestra 2	99.0	98.0	87.7
PROMEDIO 24 HORAS	98.3	97.8	87.3
DIFERENCIA %	1.7	2.2	12.7
Muestra 1	99.1	97.2	75.3
Muestra 2	100.7	97.9	79.6
PROMEDIO 48 HORAS	99.9	97.6	77.5
DIFERENCIA %	0.1	2.4	22.5

Las soluciones de referencia son estables en refrigeración hasta 48 horas, y no son estables más de 24 horas con y sin luz a temperatura ambiente.

#### 4.9.2 Estabilidad muestras de RA 8 BS 1er Concentración

Tabla 20 Estabilidad de muestras RA 8 BS 1er Concentración.

CONDICIÓN	Refrigeración	sin Luz	con Luz
Muestra 1	100.2	100.2	100.2
Muestra 2	100.8	100.8	100.8
INICIAL	100.5	100.5	100.5
Muestra 1	98.7	99.6	92.1
Muestra 2	98.9	99.1	93.0
PROMEDIO 24 HORAS	98.8	99.4	92.6
DIFERENCIA %	1.7	1.1	7.9
Muestra 1	97.5	96.8	77.6
Muestra 2	97.3	96.8	77.1
PROMEDIO 48 HORAS	97.4	96.8	77.4
DIFERENCIA %	3.1	3.7	23.1
Muestra 1	99.3	96.8	67.6
Muestra 2	99.3	95.5	59.9
PROMEDIO 72 HORAS	99.3	96.2	63.8
DIFERENCIA %	1.2	4.3	36.7

Las soluciones muestras son estables en refrigeración y a temperatura ambiente sin luz hasta 24 horas, las muestras con luz no son estables 24 horas.

#### 4.9.3 Estabilidad muestras de RA 8 BS 2da Concentración

Tabla 21 Estabilidad de muestras RA 8 BS 2da Concentración.

CONDICIÓN	Refrigeración	sin Luz	con Luz
Muestra 1	95.9	95.9	95.9
Muestra 2	95.3	95.3	95.3
INICIAL	95.6	95.6	95.6
Muestra 1	96.3	96.2	90.2
Muestra 2	96.0	96.0	93.0
PROMEDIO 24 HORAS	96.2	96.1	89.2
DIFERENCIA %	-0.6	-0.5	6.4
Muestra 1	94.6	93.0	73.0
Muestra 2	94.4	93.6	72.2
PROMEDIO 48 HORAS	94.5	93.3	72.6
DIFERENCIA %	1.1	2.3	23.0
Muestra 1	95.7	92.8	59.8
Muestra 2	95.1	92.3	59.6
PROMEDIO 72 HORAS	95.4	92.6	59.7
DIFERENCIA %	-0.2	3.0	35.9

Las soluciones muestras son estables en refrigeración hasta un periodo de 72 horas, a temperatura ambiente sin luz son estables hasta 24 horas y las muestras con luz no son estables más de 24 horas.

#### 4.9.4 Estabilidad de la fase móvil

La fase móvil fue preparada y almacenada durante 7 días a temperatura ambiente y en refrigeración, se determino en base a los parámetros cromatográficos obtenidos con soluciones de referencia recientemente preparadas a las cero horas, 48 hrs y a los 7 días.

Tabla 22 Temperatura ambiente

PARÁMETRO	TIEMPO (días)			CRITERIO	CALCULADO		RESULTADO
	0	2	7		-----	-----	
DÍAS	0	2	7	-----	-----	-----	-----
Flujo (mL/min)	1.5	1.5	1.5	N/A	N/A	N/A	N/A
C.V. (%)	1.0	0.4	1.0	<2.0	<2.0	<2.0	Cumple
Área Promedio	334418	325570	319713	N/A	N/A	N/A	N/A
Tiempo de retención	4.5	5	4.40	N/A	N/A	N/A	N/A
No. Platos teóricos	2425	1970	2687	$n > n_i - 20\%$	1940	2910	Cumple
Coleo	1.4	1.3	1.3	$T \leq 2.0$	$T \leq 2.0$		Cumple
Factor de capacidad	3.5	4.0	3.4	$k' + 50\%$	1.75	5.25	Cumple

Temperatura: refrigeración

PARÁMETRO	TIEMPO (días)			CRITERIO	CALCULADO		RESULTADO
	0	2	7		-----	-----	
DÍAS	0	2	7	-----	-----	-----	-----
Flujo (mL/min)	1.5	1.5	1.5	N/A	N/A	N/A	N/A
C.V. (%)	1.0	0.3	0.9	<2.0	<2.0	<2.0	Cumple
Área Promedio	334418	325349	319559	N/A	N/A	N/A	N/A
Tiempo de retención	4.5	5	4.40	N/A	N/A	N/A	N/A
No. Platos teóricos	2425	1946	2679	$n > n_i - 20\%$	1940	2910	Cumple
Coleo	1.4	1.3	1.3	$T < 2.0$	$T < 2.0$		Cumple
Factor de capacidad	3.5	4.0	3.4	$k' + 50\%$	1.75	5.25	Cumple

La fase móvil es estable hasta 7 días, ya sea a temperatura ambiente o refrigeración, ya que los parámetros de la adecuación del sistema no tienen cambios significativos.

## CAPITULO 5 Conclusiones

Se realizó la validación de un método analítico por cromatografía de Líquidos de alta resolución (CLAR) para la cuantificación de RA 8 BS en una forma farmacéutica sólida, para lo cual se utilizó una columna  $\mu$ bondapak C18 de 300\*3.9mm de 10 $\mu$ m de tamaño de partícula, así como la fase móvil utilizada de 25% Buffer pH 4.6 y 75% de Metanol y una longitud de onda de detección de 288nm.

Dentro de las pruebas que se realizaron se encuentran:

- Especificidad
- Linealidad del sistema
- Exactitud del método
- Precisión del método
- Reproducibilidad del método
- Límites de detección y cuantificación
- Tolerancia
- Estabilidad de muestras y estándares
- Estabilidad de la fase móvil

Al finalizar esta validación podemos concluir que:

- a. El método analítico para la cuantificación de RA 8 BS es específico, ya que no existe interferencia alguna con el pico de interés.
- b. El método analítico es lineal en un intervalo de concentración de 60 a 140% de la concentración de activo teórica.
- c. El método analítico es exacto en un intervalo de concentración de 70 a 130 % de la concentración teórica.
- d. El método analítico es preciso, ya que presenta un CV menor a 1.5% estipulado en las guías y normas.
- e. El método analítico es reproducible, ya que al realizarse la determinación por dos analistas se corrobora este punto.
- f. El método analítico permitió obtener el límite de detección y cuantificación de acuerdo a la metodología descrita en las paginas centrales, este calculo no fue el correcto, ya que la forma de calculo se malinterpreto y se realizó dicho analisis en forma erronea, al final no se realizó la prueba por falta de tiempo.
- g. El método analítico fue tolerante al cambio de filtros, así como la forma en la que se prepara la fase móvil.
- h. La solución de referencia es estable por lo menos 48hrs en refrigeración y 24 hrs con luz diurna, las muestras de la 1er concentración son estables 24 horas en refrigeración y con luz diurna, las muestras de la 2da concentración son estables 72 horas en refrigeración y con luz diurna.
- i. La fase móvil fue estable a temperatura ambiente por 7 días.

El método Analítico validado puede utilizarse en el laboratorio de Control de Calidad, para la cuantificación de RA 8 BS en una forma farmacéutica sólida en sus dos presentaciones analizadas.

## CAPITULO 6 Referencias bibliográficas

1. Guía de Validación de Métodos Analíticos, Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C., México,(2002)
2. Text on validation of Analytical Procedures Q2A, International Conference on Harmonization of Technical (ICH), USA. (1994)
3. Validation of Analytical Procedures: Methodology Q2B, International Conference on Harmonization of Technical (ICH), USA. (1996)
4. Analytical Procedures and Methods Validation Chemistry, Manufacturing , and Controls Documentation, Food and Drug Administration (FDA), USA (2000)
5. U. S. Pharmacopeia 28 National Formulary
6. Probabilidad y estadística para Ingeniería y Ciencias 4ta Edición, Mendenhall William & Sincich Terry Trad. M. en C. Roberto Escalona, Prentice Hall Hispanoamericana, México, 1997.
7. Chromatographic Methods , Braithwaite A. & Smith F.J. 4ta Ed. Chapman & Hall, Great Britain, 1994
8. Chromatographi, 5<sup>th</sup> Edit. Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods part A: fundamentals and techniques. Edited by Heftmann E, ELSEVIER 1992, journal of chromatography library vol 51A Netherlands, 1992.
9. Instrumental Methods of chemical analysis, Galenw Swing, 5ta edition, Mc Graw Hill Book Company, Singapore, 1985.

10. ICH- Technical Coordination- R. Bass, (1998); ICH Topic Q1A Stability testing Guidelines: Stability testing of new drug substances and product.
11. The Merck Index. White House Station, Chapman and Hall, Twelfth edition, USA (1996), Versión CD.
12. Diccionario de especialidades Farmacéuticas. PLM Edición 49, México (2003), Versión CD.
13. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993. Buenas practicas de fabricación para establecimientos de la industria químico – farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.
14. Norma Oficial Mexicana NOM-117-SSA-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable.
15. Proyecto de Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-1993. Estabilidad de Medicamentos
16. Guideline on general principles of process validation  
<http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/pv.htm>
17. [http://www.betterchem.com/21cfr211/prospective\\_validation.htm](http://www.betterchem.com/21cfr211/prospective_validation.htm)
18. [http://www.betterchem.com/21cfr211/retrospective\\_validation.htm](http://www.betterchem.com/21cfr211/retrospective_validation.htm)
19. [http://www.betterchem.com/21cfr211/concurrent\\_validation.htm](http://www.betterchem.com/21cfr211/concurrent_validation.htm)
20. Validation of Analytical Procedures for APIs, Excipients and Pharmaceutical Formulations, Guía Corporativa (2004)

## CAPITULO 7 Apéndice

### Apéndice 1

Resumen del Procedimiento estadístico de comparación de varianzas.

Muestra 1: organmas5 9 valores 98.0 hasta 98.4

Muestra 2: normal 9 valores 98.2 hasta 99.2

Muestra 3: orgmenos5 9 valores 97.4 hasta 98.2

El StatAdvisor

Este procedimiento compara los datos en 3 columnas del actual fichero de datos. Realiza varios tests estadísticos y gráficos para comparar las muestras. El F-test en la tabla de ANOVA comprobará si hay alguna diferencia significativa entre las medias. Si hay, los Tests de Rangos Múltiples le indicarán las medias que son significativamente diferentes unas de otras.

#### Resumen Estadístico

	Frecuencia	Media	Varianza	Desviación típica	Mínimo
organmas5	9	98.1778	0.0144444	0.120185	98.0
normal	9	98.6	0.12	0.34641	98.2
orgmenos5	9	97.8	0.06	0.244949	97.4
Total	27	98.1926	0.170712	0.413173	97.4
	Máximo	Rango	Asimetría tipi.	Curtosis típicada	
organmas5	98.4	0.4	-0.0223967	0.689501	
normal	99.2	1.0	0.227284	-0.393668	
orgmenos5	98.2	0.8	0.0	-0.174964	
Total	99.2	1.8	0.892791	0.318763	

El StatAdvisor

Esta tabla muestra varios estadísticos para cada una de las 3 columnas de datos.

### Tabla ANOVA

#### Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	2.88296	2	1.44148	22.24	0.0000
Intra grupos	1.55556	24	0.0648148		
Total (Corr.)	4.43852	26			

#### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 22.24, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos.

Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0.05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables a un nivel de confianza del 95.0%. Para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras, seleccione los Tests de Rangos Múltiples.

### Tabla de Medias

con 95.0 intervalos de confianza

	Frec.	Media	Error Estándar (s agrupada)	Límite inf.	Límite sup.
organmas5	9	98.1778	0.0848625	98.0026	98.3529
normal	9	98.6	0.0848625	98.4249	98.7751
orgmenos5	9	97.8	0.0848625	97.6249	97.9751
Total	27	98.1926			

#### El StatAdvisor

Esta tabla muestra la media para cada columna de datos. También muestra el error estándar de cada media, que es la medida de su variabilidad en la muestra. El error estándar es el resultado de dividir la desviación típica agrupada por la raíz cuadrada del número de observaciones en cada nivel. La tabla también muestra un intervalo que incluye cada media. Los intervalos mostrados actualmente son 95.0% intervalos de confianza para cada media por separado. 95.0% de estos intervalos contendrán las medias verdaderas.

Contraste Múltiple de Rango  
Método: 95.0 porcentaje LSD

	Frec.	Media	Grupos homogéneos	
organmas5	9	98.1778	X	
normal	9	98.6	X	
orgmenos5	9	97.8	X	
Contraste			Diferencias	+/- Límites
organmas5 – normal			*-0.422222	0.247697
organmas5 - orgmenos5			*0.377778	0.247697
normal - orgmenos5			*0.8	0.247697

\* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. La mitad inferior de la salida muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares, indica que éstos muestran diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza 95.0%. En la parte superior de la página, se identifican 3 grupos homogéneos según la alineación del signo X en la columna. Dentro de cada columna, los niveles que tienen signo X forman un grupo de medias entre las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas. El método actualmente utilizado para discernir entre las medias es el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD). Con este método, hay un 5.0% de riesgo de considerar cada par de medias como significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a 0.

## Apéndice 2

Resumen de Procedimiento estadístico entre comparación de medias para la concentración de 50mg.

Datos: millex50-whatman50

9 valores comprendidos desde -0.5 hasta 0.5

El StatAdvisor

Este procedimiento está destinado a examinar las diferencias significativas entre dos muestras de datos los cuales se ha agrupado en pares. Calculará varias estadísticos y gráficos para las diferencias entre los datos pareados. El procedimiento también incluye pruebas destinadas a determinar si la diferencia media es igual a cero.

Resumen Estadístico para millex50-whatman50

Frecuencia = 9    Media = 0.1    Varianza = 0.1    Desviación típica = 0.316228

Mínimo = -0.5    Máximo = 0.5    Rango = 1.0    Asimetría tipi. = -0.597546

Curtosis típicada = 0.244949

El StatAdvisor

Incluye las medidas de tendencia central, medidas de variabilidad, y medidas de forma. De particular interés están los coeficientes de asimetría y curtosis estandarizados que pueden utilizarse para determinar si la muestra procede de una distribución normal. Los valores de estos estadísticos fuera del rango de -2 a +2 indican alejamiento significativo de normalidad que tendería a invalidar cualquier test estadístico con respecto a la desviación normal. En este caso, el valor del coeficiente de asimetría estandarizado está dentro del rango esperado para los datos de una distribución normal.

El valor del coeficiente de curtosis estandarizado está dentro del rango esperado para los datos de una distribución normal.

Contraste de Hipótesis para millex50-whatman50

Media muestral = 0.1    Mediana muestral = 0.1

contraste t

Hipótesis nula: media = 0.0    Alternativa: no igual

Estadístico t = 0.948683    P-valor = 0.370555

No se rechaza la hipótesis nula para  $\alpha = 0.05$ .

El StatAdvisor

Esta ventana muestra los resultados del tests concerniente al centro de la población de la que procede la muestra de millex50-whatman50. El test es un t-test cuya hipótesis nula es que el millex50-whatman50 medio es igual a 0.0 frente a la hipótesis alternativa en la que millex50-whatman50 medio es no igual 0.0. Puesto que el P-valor para este test es superior o igual a 0.05, podemos aceptar la hipótesis nula para un nivel de confianza del 95.0%.

### Apéndice 3

Resumen de Procedimiento estadístico entre comparación de medias para la concentración de 75mg.

Datos: millex75-whatman75

9 valores comprendidos desde -0.7 hasta 0.2

El StatAdvisor

Este procedimiento está destinado a examinar las diferencias significativas entre dos muestras de datos los cuales se ha agrupado en pares. Calculará varias estadísticos y gráficos para las diferencias entre los datos pareados. El procedimiento también incluye pruebas destinadas a determinar si la diferencia media es igual a cero.

Resumen Estadístico para millex75-whatman75

Frecuencia = 9      Media = -0.177778      Varianza = 0.0794444

Desviación típica = 0.281859      Mínimo = -0.7      Máximo = 0.2

Rango = 0.9      Asimetría tipi. = -0.935898      Curtosis típicada = 0.0276447

El StatAdvisor

Incluye las medidas de tendencia central, medidas de variabilidad, y medidas de forma. De particular interés están los coeficientes de asimetría y curtosis estandarizados que pueden utilizarse para determinar si la muestra procede de una distribución normal. Los valores de estos estadísticos fuera del rango de -2 a +2 indican alejamiento significativo de normalidad que tendería a invalidar cualquier test estadístico con respecto a la desviación normal. En este caso, el valor del coeficiente de asimetría estandarizado está dentro del rango esperado para los datos de una distribución normal.

El valor del coeficiente de curtosis estandarizado está dentro del rango esperado para los datos de una distribución normal.

Contraste de Hipótesis para millex75-whatman75

Media muestral = -0.177778      Mediana muestral = -0.1      contraste t

Hipótesis nula: media = 0.0      Alternativa: no igual

Estadístico t = -1.8922      P-valor = 0.0951034

No se rechaza la hipótesis nula para  $\alpha = 0.05$ .

Esta ventana muestra los resultados del tests concerniente al centro de la población de la que procede la muestra de millex75-whatman75. El test es un t-test cuya hipótesis nula es que el millex75-whatman75 medio es igual a 0.0 frente a la hipótesis alternativa en la que millex75-whatman75 medio es no igual 0.0. Puesto que el P-valor para este test es superior o igual a 0.05, podemos aceptar la hipótesis nula para un nivel de confianza del 95.0%.